



Etude de la variole ovine en Tunisie et caractérisation des protéines virales impliquées dans la réponse immunitaire anti-capripoxvirus

Faten Ben Chehida Regaya

► To cite this version:

Faten Ben Chehida Regaya. Etude de la variole ovine en Tunisie et caractérisation des protéines virales impliquées dans la réponse immunitaire anti-capripoxvirus. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Montpellier; Faculté des sciences de Bizerte (Tunisie), 2017. Français. NNT : 2017MONTT021 . tel-02936259

HAL Id: tel-02936259

<https://theses.hal.science/tel-02936259>

Submitted on 11 Sep 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**Université de Montpellier**
Et l'**Université de Carthage**

Préparée au sein de l'école doctorale **CBS2** et
la Faculté de Bizerte

Et des laboratoires du CIRAD (UMR **ASTRE**),
de l'IRVT et de l'IPT

Spécialité : **Virologie/Immunologie**

Présentée par **Faten BEN CHEHIDA REGAYA**

**Etude de la variole ovine en Tunisie
et caractérisation des protéines virales
impliquées dans la réponse immunitaire
anti-capripoxvirus**

Soutenue le 27/07/2017 devant le jury composé de

Pr Stéphane BERTAGNOLI, Professeur, ENVT, France	Président
Dr Charles LAMIEN, Virologue, IAEA, Autriche	Examineur
Pr Imed TURKI, Professeur, ENMV, Tunisie	Rapporteur
Pr Hafedh ABDELMELEK, Professeur, FSB, Tunisie	Examineur
Dr Catherine CETRE-SOSSAH, Virologue, CIRAD, France	Directeur de thèse
Dr Abdeljelil GHAM, Biologiste principal, IPT, Tunisie	Directeur de thèse
Dr Philippe CAUFOUR, Virologue, CIRAD, France	Membre invité
Dr Emna AYARI-FAKFAKH, Virologue, IRVT, Tunisie	Membre invité

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup de gratitude et d'émotion que je rédige ces dernières lignes pour remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail ainsi que ceux que j'ai pu rencontrer lors de ces quatre années de thèse. Les travaux qui font l'objet de cette thèse n'auraient pas été possibles sans l'aide et le soutien de ces personnes.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, Dr Catherine Cêtre-Sossah et Dr Abdeljelil Ghram, pour leur rigueur scientifique et leur enthousiasme. Merci de m'avoir fait confiance et donné tous les moyens scientifiques et humains pour que je puisse mener à bien ce travail. Merci aussi pour votre encadrement et pour les lectures des différentes versions de ce manuscrit.

D'un autre côté, je tiens à remercier vivement mes deux encadrants scientifiques, Dr Philippe Caufour et Dr Emna Ayari-Fakfakh pour leur disponibilité et leur soutien à toute épreuve, pour leur présence à mes côtés, car sans eux, cette thèse n'aurait probablement pas vu le jour. Merci de m'avoir accueillie dans vos équipes respectives et de m'avoir initié au monde passionnant de la recherche. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre confiance en moi et pour les conseils que vous m'avez prodigués tout au long de ces quatre années. Je suis fière d'avoir été votre première étudiante en thèse même si c'était un long parcours parfois difficile pour nous, mais finalement nous y sommes arrivés.

Travailler avec vous quatre était un réel honneur tant au niveau professionnel que personnel.

Je tiens également à remercier le Professeur Stéphane Bertagnoli et le Professeur Imed Turki d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Mes hommages respectueux.

Je remercie également le Docteur Charles Lamien et le Professeur Hafedh Abdelmelek, qui nous ont fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail de thèse. Mes hommages respectueux.

Mes remerciements s'adressent aussi :

Au Directeur de l'unité mixte de recherche ASTRE 117 du CIRAD, le Dr Thierry Lefrancois et au Directeur général de l'Institut de Recherche Vétérinaire de Tunis.

Au Dr Philippe Hozmuller, pour nous avoir fait partager sa passion des protéines, trouvez, en ce travail, l'expression de ma profonde gratitude.

Au Dr Hela Kallel, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de microbiologie moléculaire, vaccinologie et développement biotechnologique à l'Institut Pasteur de Tunis.

Et au Dr Khaled Trabelsi, pour m'avoir initié au système de production des protéines. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, je garde que de bons souvenirs de mon passage dans votre laboratoire.

Au Pr Lilia Messadi du service de microbiologie et immunologie de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, de m'avoir laissé la latitude nécessaire pour la préparation de cette thèse. Merci pour votre compréhension et votre patience.

A toute l'équipe du laboratoire de virologie de l'Institut de Recherche Vétérinaire de Tunis, pendant ces quatre années, vous étiez ma deuxième famille. Merci d'avoir épaulé pendant ce travail : Dr Salma Hadouchi, Dr Sonia Ben Hassen, Dr Salma Mejri, Khaled Ben Hmida, Aida Krichen et Yosra Ayari.

Un clin d'œil particulier au Dr Sofiene Sghaier, qui a été toujours été présent pendant ces quatre années de thèse, merci pour ta patience et ta serviabilité. L'année 2017 aura été pour nous l'année de consécration de nos thèses. Enfin nous y sommes arrivés !!

Au Dr Sami Lakhal, je n'oublierai jamais le temps que tu as passé avec moi à faire et à refaire les blots. Merci pour tout ce que tu m'as appris.

A toute l'équipe du laboratoire de microbiologie vétérinaire de l'Institut Pasteur de Tunis, qui a été toujours été présente pour moi. Merci.

A toute l'équipe de virologie de l'unité ASTRE du CIRAD. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe.

A mes compagnons du CIRAD : Ramzi, Imen, Tiffany et Esmail qui ont rendu mes séjours à Montpellier agréables. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté.

Je dédie ce travail,

A mes chers parents, Nouredine et Soumaya. C'est grâce à vous que je suis là aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours soutenue durant les moments difficiles. J'espère que vous êtes fiers de moi.

A mon fils Selim, qui a accompagné ce travail de thèse dès le début. Te voilà maintenant un petit bonhomme qui illumine nos vies. Je sais que j'ai été souvent absente mon chéri mais maintenant je suis là, je veux que tu sois fier de ta maman.

A mon mari Bachar, merci d'être toujours là pour moi dans tout ce que j'entreprends, de m'encourager à aller de l'avant même si cela a été souvent difficile pour toi. Merci pour ta patience et ta tolérance.

A ma sœur Aida, son mari Amine et leurs enfants Skander et Dorra

A mon frère Malek

A ma grand-mère Fadhila

A ma belle famille

A mes ami(e)s

Ce travail a été réalisé au

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le
Développement, CIRAD, Montpellier, France dans l'unité mixte de recherche
ASTRE au sein de l'équipe de Virologie

Avec l'Institut de Recherche Vétérinaire de Tunis, Tunisie ; Service de
Virologie

Et l'Institut Pasteur de Tunis, Tunisie ; au sein du laboratoire d'Epidémiologie et
de Microbiologie Vétérinaire et le laboratoire de Microbiologie Moléculaire,
Vaccinologie et Développement Biotechnologique

Sous la direction du Dr Catherine CETRE-SOSSAH et Dr Abdeljelil GHAM
avec

l'encadrement de Dr Philippe CAUFOUR et Dr Emna Fakhfakh

Ce travail a été financé par le projet CMCU/PHC Utique **N°13G0906**

RESUME

Le virus de la variole ovine est omniprésent dans les élevages de petits ruminants dans les pays d'Afrique du Nord et particulièrement en Tunisie malgré les campagnes de vaccination annuelles mises en place par les autorités vétérinaires du pays. L'optimisation de la souche vaccinale utilisée passe par le développement de vaccins dits de nouvelle génération tels que les vaccins sous unitaires utilisant des protéines reconnues pour induire une réponse humorale protectrice chez l'animal immunisé. Ceci pourrait être une alternative aux stratégies de lutte actuelles permettant de limiter la dissémination du virus en Tunisie. Peu de données existent sur les antigènes protecteurs spécifiques des virus du genre *Capripoxvirus*. Ce travail de thèse a ciblé, par homologie aux protéines du virus de la vaccine, quatre protéines du genre *Capripoxvirus* appartenant au virus de la dermatose nodulaire contagieuse potentiellement immuno-dominantes nommées LSDV60, LSDV117, LSDV122 et LSDV141 respectivement homologues des protéines L1, A27, A33 et B5. En premier lieu, une analyse structurale *in silico* a permis d'identifier les domaines essentiels de chaque protéine et de vérifier le taux de conservation de ces protéines parmi différents virus appartenant à la famille des poxvirus. Une analyse structurale approfondie mettant en évidence la structure primaire, secondaire et tertiaire de la protéine A27 a été réalisée. Suite à cette étude structurale, les protéines ont été produites dans deux systèmes d'expression différents ; le système eucaryote et le système baculovirus-cellules d'insectes afin de caractériser leur antigénicité vis-à-vis de sérums provenant d'animaux immunisés ou éprouvés. La reconnaissance des protéines d'intérêt en vecteur d'expression eucaryote n'a pas été concluante. En revanche, le système d'expression BEVS a permis la production de la protéine A27 (L1, A33 et B5 en cours) avec succès sous forme soluble qui a été correctement reconnue par des sérums provenant de caprins naïfs challengés. La mise en évidence de formes trimériques et hexamériques confirment son antigénicité. Une immunodétection des peptides correspondants à la protéine A27 synthétisés sur membranes (PepScan) combinée à une analyse *in silico* ont permis d'identifier des zones susceptibles de constituer des régions épitopiques reconnues situées majoritairement en partie N terminale de la protéine.

Mots clés : Capripoxvirus, variole ovine, protéine recombinante, baculovirus, vaccin, outils bioinformatiques.

ABSTRACT

The sheep pox virus is omnipresent in small ruminant farms in North African countries and particularly in Tunisia despite the annual vaccination campaigns set up by the Tunisian veterinary authorities. The optimization of the used vaccine strain involves the development of the so-called new generation vaccines such as subunit vaccines and this, using proteins recognized to induce a protective humoral response in the immunized animal. This could be considered as an alternative to current control strategies limiting virus spread in Tunisia. Few data exist on protective antigens specific to viruses in the genus *Capripoxvirus*. By homology to vaccinia virus proteins, this thesis work has targeted four proteins in the genus *Capripoxvirus* belonging to the potentially immuno-dominant contagious nodular dermatosis virus named LSDV60, LSDV117, LSDV122 and LSDV141 respectively homologues of proteins L1, A27, A33 and B5. First, an *in silico* structural analysis has allowed to identify the essential domains of each protein and to check the conservation rate of these proteins among different viruses belonging to the poxvirus family. A thorough structural analysis identifying the primary, secondary and tertiary structure of the A27 protein was conducted. Following this structural study, the proteins were produced in two different expression systems, namely the eukaryotic system and the baculovirus-insect cell system, in order to characterize their antigenicity to sera from immunized or proven animals. The recognition of the proteins of interest in the eukaryotic expression vector has not been conclusive. On the other hand, the BEVS expression system successfully allowed the production of the A27 protein (L1, A33 and B5 in progress) in a soluble form, which was correctly recognized by sera from challenged naïve goats. Identifying trimeric and hexameric forms confirms its antigenicity. An immunodetection of the peptides corresponding to protein A27 synthesized on membranes (PepScan) combined with an *in silico* analysis led to identify zones capable of constituting recognized epitopic regions located predominantly in part N-terminal of the protein.

Keywords : capripoxvirus, sheep poxvirus, recombinant protein, baculovirus, vaccine, bioinformatics tools.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification de la sous-famille des <i>Chordopoxvirinae</i>	8
Tableau 2. Diagnostic différentiel des <i>Capripoxvirus</i>	27
Tableau 3. Principales techniques de PCR optimisées pour le contrôle des Capripoxirus depuis 1989.....	32
Tableau 4. Liste des souches vaccinales atténuées de DNC/LSD.....	39
Tableau 5. Liste des souches vaccinales de sheep poxvirus atténuées et inactivées.....	41
Tableau 6. Liste des souches vaccinales de Goat poxvirus atténuées et inactivées.	42
Tableau 7. Exemple de souches vaccinales basées sur des recombinants Capripoxvirus expérimentaux	43
Tableau 8. Outils et serveurs permettant l'étude et la prédiction des structures protéiques ...	55
Tableau 9. Paramètres utilisés en culture de cellules d'insectes.....	61
Tableau 10. Baculovirus utilisés comme vecteurs de transfert.	64
Tableau 11. Lignées cellulaires de mammifères	68
Tableau 12. Les différents systèmes de production de protéines recombinantes et leurs caractéristiques	73
Tableau 13. Description des indicateurs épidémiologiques majeurs de la variole ovine en Tunisie (2006-2009).....	115
Tableau 14. Estimation du coût financier annuel de la variole ovine	124
Tableau 15. Numéro d'accès des protéines L1, A27, A33 et B5 appartenant aux différents genres de la famille des <i>Poxviridae</i>	130
Tableau 16. Résultat de la prédiction de la relative surface d'accessibilité des acides aminés de la protéine A27 du virus LSD à partir de NetSurfP	160
Tableau 17. Résultat de la prédiction de la relative surface d'accessibilité des acides aminés de la protéine A27 du virus de la vaccine à partir de NetSurfP	162
Tableau 18. Liste des amorces utilisées pour le clonage des gènes L1R, A27L, A33R et B5R dans le vecteur d'expression pCI-neo et conditions de PCR.....	167
Tableau 19. Ratios de ligation testés pour chacun des gènes L1R, A27L, A33R et B5R	170
Tableau 20. Liste des amorces utilisées en PCR pour le criblage de la présence de l'insert	171
Tableau 21. Liste des amorces utilisées en PCR pour la vérification de l'orientation de l'insert au sein des colonies transformées avec les inserts L1R, A27L, A33R et B5R.	172
Tableau 22. Protocole d'amplification par PCR de l'ADN du clone 9 pCIneo/A27	174

Tableau 23. Liste des plasmides utilisés pour la transfection en cellules Vero	175
Tableau 24. Liste des amorces utilisées pour la vérification de la transcription des ARN... ..	180
Tableau 25. Protocole d'amplification des ARN messagers à partir de l'ARN total extrait	181
Tableau 26. Liste et quantification des constructions plasmidiques utilisées	182
Tableau 27. Séquences des amorces et conditions d'amplification pour le criblage des colonies transformées.	203
Tableau 28. Protocole d'amplification par PCR de l'ADN du clone pCIneo/L1	205
Tableau 29. Liste et séquence nucléotidique des amorces utilisées pour la production des inserts L1R, A33R et B5R.	206
Tableau 30. Cycle d'amplification par PCR de la partie extracellulaire des gènes L1R, A33R et B5R.....	208
Tableau 31. Cycle d'amplifications utilisées pour le criblage des colonies issues de la transformation des trois produits de ligation.....	210
Tableau 32. Différents passages et supports utilisés pour l'amplification des baculovirus recombinants.	214
Tableau 33. Cycles d'amplification par PCR des baculovirus recombinants des différents passages	215
Tableau 34. Résultat des comptages de la viabilité des cellules d'insectes infectées par P3/A27.	229
Tableau 35. Résultat des dosages des différentes fractions obtenues	234
Tableau 36. Répartition des bandelettes du test Pepscan	244
Tableau 37. Résultats bruts de l'analyse avec le Pepscan.....	253
Tableau 38. Interprétation du résultat du Pepscan.	257
Tableau 39. Tableau récapitulatif des épitopes linéaires et discontinus définis pour la protéine A27 du virus LSD et de la vaccine.....	265

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Répartition géographique des infections à <i>Capripoxvirus</i> , 1970-2015.	9
Figure 2. Vue schématique d'un poxvirus	10
Figure 3. Morphogenèse du virus de la vaccine	11
Figure 4. Organisation génomique des Poxvirus.....	13
Figure 5. Représentation schématique du cycle de réplication des poxvirus	16
Figure 6. Manifestations cliniques de la DNC	25
Figure 7. Lésions papulo-vésiculeuses	26
Figure 8. Coloration positive de particules virales de Sheep poxvirus en cours de morphogenèse	30
Figure 9. Représentation schématique d'un acide aminé.....	44
Figure 10. Représentation hiérarchique de la structure des protéines	45
Figure 11. Représentation des principales formes de structure protéique.....	47
Figure 12. Classification des domaines	49
Figure 13. Diagramme général présentant la démarche de prédiction des structures 3D des protéines	54
Figure 14. Cycle de réplication des baculovirus	63
Figure 15. Implication des 4 protéines d'intérêt A27 , A33, B5, L1 dans le cycle viral du virus de la vaccine.	76
Figure 16. Domaines fonctionnels et interactifs de la protéine A27.	78
Figure 17. Structure cristallographique de la protéine L1	83
Figure 18. Localisation des épitopes neutralisants de la protéine L1	84
Figure 19. Structure cristallographique de la protéine A33	87
Figure 20. Lyse médiée par le complément des EEV et des IMV.	90
Figure 21. Organisation des domaines de B5R et VCP	91
Figure 22. Organisation schématique de la structure de B5 du virus de la vaccine	92
Figure 23. Distribution mondiale des virus de la variole caprine et ovine.....	101
Figure 24. Nombre de foyers de clavelée déclarés dans les pays d'Afrique du Nord.....	103
Figure 25. Nombre de foyers de clavelée rapportés en Tunisie entre 1989 et 2015	105
Figure 26. Evolution du taux de couverture vaccinale entre 1989 et 2015.	107
Figure 27. Variation saisonnière des foyers de variole ovine entre 2005 et 2015.....	109
Figure 28. Distribution spatiale des foyers de variole ovine en Tunisie entre 1995 et 2015	111

Figure 29. Manifestations clinique de la variole ovine :	114
Figure 30. Taux de létalité de la variole ovine en Tunisie entre 1996 et 2005	115
Figure 31. Etapes de prédiction de la structure secondaire et tertiaire de la protéine A27 selon le serveur PHYRE 2	133
Figure 32. Résultat de prédiction de la présence du domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de la L1 du virus LSD	135
Figure 33. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la L1 du virus LSD.	136
Figure 34. Délimitations des domaines de la protéine L1 du virus LSD.	137
Figure 35. Résultat de l'alignement de la protéine L1	138
Figure 36. Résultat de prédiction de la présence du domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD	139
Figure 37. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD	140
Figure 38. Résultat de prédiction de la présence du domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de la A33 du virus LSD	141
Figure 39. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la A33 du virus LDS.....	142
Figure 40. Résultat de l'alignement de la protéine A33	143
Figure 41. Délimitations des domaines de la protéine A33 du virus LSD.....	145
Figure 42. Résultat de prédiction de la présence du domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de la B5 du virus LSD	145
Figure 43. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la B5 du virus LSD.....	146
Figure 44. Résultat de l'alignement de la protéine B5	148
Figure 45. Délimitation des domaines de la protéine B5 du virus LSD.....	149
Figure 46. Alignement de la séquence protéique de la A27.....	151
Figure 47. Pourcentage d'identité de la protéine A27.....	153
Figure 48. Délimitation des domaines de la protéine A27 du virus LSD.	153
Figure 49. Prédiction de la structure secondaire et des régions désordonnées de la protéine A27 du virus LSD	154
Figure 50. Prédiction de la structure secondaire et des régions désordonnées de la protéine A27 du virus de la vaccine.	155
Figure 51. Résultat de l'analyse des domaines par le logiciel Phyre 2	156

Figure 52. Prédiction de la structure tridimensionnelle de la partie C terminale de la protéine A27 du virus LSD	157
Figure 53. Prédiction de la structure tertiaire de la protéine A27 du virus de la vaccine	158
Figure 54. Nature de l'exposition des résidus de la séquence protéique de la A27 du virus LSD	159
Figure 55. Nature de l'exposition des résidus de la séquence protéique de la A27 du virus de la vaccine	161
Figure 56. Carte de restriction enzymatique du vecteur d'expression pCI-neo	165
Figure 57. Représentation schématique de la limite de positionnement des amorces générées pour chacun des 4 gènes.....	168
Figure 58. Plan de plaque transfection pour le test d'IFI.	177
Figure 59. Révélation de la digestion du plasmide pCIneo par SmaI	184
Figure 60. Amplification par PCR des inserts L1R, A27L, A33R et B5R	185
Figure 61. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt L1R.....	186
Figure 62. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A27L.....	187
Figure 63. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A33R	188
Figure 64. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt B5R.....	188
Figure 65. Alignement de la séquence du clone pCI-neo/A27.....	189
Figure 66. Détection par immunofluorescence de l'expression transitoire des constructions plasmidiques dans les cellules Vero	190
Figure 67. Résultats d'amplification PCR β actine réalisée sur des ARN extraits	192
Figure 68. Résultats d'amplification par RT-PCR des différents gènes L1R, A33R, B5R ..	192
Figure 69. Gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie.	193
Figure 70. Analyse par immunoblot des lysats protéiques	194
Figure 71. Diagramme schématique décrivant les procédures d'expression dans le système BacPAK TM Baculovirus.	197
Figure 72. Stratégie de clonage utilisée pour l'obtention des clones pBacPAK8/A27, pBacPAK8/L1, pBacPAK8/A33 et pBacPAK8/B5.	198
Figure 73. Séquence nucléotidique et en acides aminés du gène synthétique A27 à insérer dans le vecteur pUC.....	201
Figure 74. Carte de restriction du vecteur de transfert pBacPAK8.....	201
Figure 75. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A27L.....	221
Figure 76. Alignement du clone 40 avec la séquence nucléotidique de LSDV117	221
Figure 77. Résultat de la double digestion enzymatique du vecteur pBacPAK8/A27.....	222

Figure 78. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A27L.....	223
Figure 79. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt L1R.....	224
Figure 80. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt B5R.....	224
Figure 81. Résultat de l'amplification par PCR de l'ADN extrait des trois passages du baculovirus recombinant A27.	225
Figure 82. Résultat de l'amplification par PCR de l'ADN plasmidique extrait des trois passages du baculovirus recombinant A33.	226
Figure 83. Résultat les produits d'amplification PCR obtenus à partir du surnageant du baculovirus recombinant L1.	227
Figure 84. Résultat les produits d'amplification PCR obtenus à partir du surnageant du baculovirus recombinant B5.....	227
Figure 85. Western blots révélés par des anticorps anti-Histidine à partir des fractions extracellulaires.	232
Figure 86. Western blots révélés par des anticorps anti-Histidine à partir des fractions intracellulaires	233
Figure 87. Courbe représentant le résultat simultané du dosage des différentes fractions....	235
Figure 88. Western blot révélé par des anticorps anti-Histidine à partir des différentes fractions purifiées	236
Figure 89. Gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie présentant les fractions purifiées et non purifiées.	237
Figure 90. Western blot révélé avec des anticorps anti-Histidine incluant les trois premières fractions purifiées F1 à F3.....	238
Figure 91. Approches expérimentales et <i>in silico</i> pour l'étude de la protéine A27	239
Figure 92. Disposition des six bandelettes	241
Figure 93. Disposition des 68 peptides constituant la séquence protéique de la protéine A27 du virus LSD chevauchants de deux acides aminés au sein des bandelettes.	242
Figure 94. Résultat du western blot en conditions dénaturantes réalisé sur la fraction F1 ...	248
Figure 95. Résultat du Pepscan réalisé au jour 1	250
Figure 96. Résultat du Pepscan réalisé au jour 2	251
Figure 97. Résultat de prédiction des épitopes linéaires de la protéine A27 du virus LSD .	259
Figure 98. Résultat de prédiction des épitopes linéaires de la protéine A27 du VACV	261
Figure 99. Résultat de l'analyse de prédiction des épitopes discontinus de la protéine A27	263
Figure 100. Résultat de l'analyse de prédiction des épitopes discontinus de la protéine A27 du VACV.....	264

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASA : Accessible surface area
BEVS: Baculovirus Expression Vector System
BET : Bromure d'éthidium
BSA: Bovine serum albumin
CCD : Coiled coil domain
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomegalovirus
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CTDLs: C type lectin like domain
CIE: Contre immune-électrophorèse
CIP: calf Intestine phosphate
DMSO: Dimethyl sulfoxide
DAB: Diaminobenzidine
ECL: Enhanced chemiluminescence
ECP : Effet cytopathogène
EFC: Entry fusion complex
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
EGF: Epidermal growth factor
EV : Virions enveloppés
FITC: Fluorescein isothiocyanate
GAGs : Glycoaminoglycanes
HBD: Heparin binding domain
HRP: Horseradish peroxidase
IFAT: Indirect Immunofluorescence antibody test

IFN : Interféron

IL : Interleukine

LSD: Lympy skin disease

LZD : leucine zipepr domain

MCS : Multi cloning site

MDA : Multi Domain architecture

MEC : Membrane extra cellulaire

MEM: Minimum essential media

MOI: Multiplicity of infection

MV : Virions matures intracellulaires

OIE : Office international des épizooties

ORF : Open Reading Frame

PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS: phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

RBP: Receptor binding protein

RSA : Relative surface area

SCR: Short complement repeat

SDS: dodécysulfate de sodium

SOC: Super Optimal broth glucose

SHI: Hyper immune serum

SVF: Sérum foetal de veau

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TLR : Toll like receptor

TIR: Toll interleukine 1 receptor

WB: Western blot

WR: Wrapped Virion

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PARTIE I.: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	6
CHAPITRE 1: LES CAPRIPOXVIRUS	7
I. Classification.....	7
II. Répartition géographique.....	8
III. Etiologie.....	10
1. Structure du virus	10
2. Génome viral.....	12
3. Cycle viral	13
IV. Interactions hôtes/virus et réponse immunitaire.....	17
1. Interactions hôtes/virus	17
1.1. Attachement et entrée dans la cellule cible	17
1.2. Contrôle du cycle cellulaire	17
1.3. Contrôle de l'apoptose	18
1.4. La voie IFN et l'inhibition de l'hôte	18
2. Caractérisation de la réponse immunitaire des infections à Capripoxvirus. 19	
2.1. Immunité à médiation cellulaire	20
2.2. Immunité à médiation humorale	21
V. Sources et transmission de l'infection	22
1. Sources de transmission.....	22
2. Modalités de transmission	22
VI. Manifestations cliniques et lésions observées.....	24
1. Manifestations cliniques	24
1.1. La dermatose nodulaire contagieuse bovine (DNC)	24
1.2. La variole ovine et la variole caprine.....	25
2. Lésions observées.....	28
2.1. Lésions macroscopiques	28
2.2. Lésions microscopiques	28
VII. Diagnostic de laboratoire.....	29
1. Détection directe de l'agent pathogène.....	29
1.1. L'isolement viral sur culture cellulaire	29
1.2. Microscopie électronique.....	30

1.3.	La Polymerase Chain Reaction (PCR).....	31
1.4.	Les techniques basées sur des réactions immunologiques.....	31
2.	Identification des Capripoxvirus par voie indirecte (techniques immuno-sérologiques)	35
2.1.	Test de séroneutralisation virale	35
2.2.	Test ELISA indirect	35
2.3.	Test d'immunofluorescence indirect.....	36
2.4.	Western blot.....	36
VIII.	Moyens de lutte et limites	36
1.	Prophylaxie sanitaire	36
2.	Prophylaxie médicale	38
2.1.	Les souches vaccinales atténuées.....	38
2.2.	Les vaccins recombinants multi-pathogènes.....	42
2.3.	Les échecs de la vaccination	43
CHAPITRE 2 : PROTÉINES SPÉCIFIQUES DES CAPRIPOXVIRUS PRÉSENTANT UN INTÉRÊT SUR LE PLAN IMMUNOLOGIQUE : EXPRESSION, PRODUCTION ET CARACTÉRISATION		44
I.	Introduction générale sur les protéines	44
1.	Etude de la structure des protéines	44
1.1.	Généralités sur les bases structurales des protéines	44
1.2.	Méthodes expérimentales.....	49
1.3.	Prédiction des structures des protéines	53
2.	Etude de la fonction des protéines	57
3.	Caractérisation des protéines	58
3.1.	Méthodes d'expression des protéines	58
3.2.	Etude de l'antigénicité	73
3.3.	Etude de l'immunogénicité	75
II.	Exemple d'étude: les protéines du genre Capripoxvirus (A27, L1, A33 et B5)	75
1.	La protéine A27 (VACV)/LSDV117 (CaPV)	77
1.1.	Structure de la protéine A27	77
1.2.	Fonctions et interactions	79
1.3.	Etude de l'antigénicité de la protéine A27.....	80
1.4.	Etude de l'immunogénicité de la protéine A27	81
2.	La protéine L1 (VACV)/ LSDV60 (CaPV)	81
2.1.	Structure.....	82
2.2.	Fonctions et interactions	83

2.3.	Etude de l'antigénicité de la protéine L1	84
2.4.	Etude de l'immunogénicité de la protéine L1	85
3.	La protéine A33(VACV)/LSDV122(Cap)	86
3.1.	Structure de la protéine A33	86
3.2.	Fonctionset interactions de la protéine A33	87
3.3.	Etude de l'antigénicité de la protéine A33	88
3.4.	Etude de l'immunogénicité de la protéine A33	89
4.	La protéine B5 (VACV)/LSDV141 (CaPV)	91
4.1.	Structure	91
4.2.	Fonctionset interactions de la protéine B5	93
4.3.	Etude de l'antigénicité de la protéine B5	94
4.4.	Etude de l'immunogénicité de la protéine B5	95
	CADRES ET OBJECTIFS	96
	PARTIE II : ETUDE DES INFECTIONS A CAPRIPOXVIRUS: EXEMPLE	
	DE LA VARIOLE EN TUNISIE	99
I.	Introduction	100
II.	La variole ovine: propagation dans les pays du nord de l'Afrique jusqu'en	
	Tunisie	102
1.	La variole ovine en Afrique du Nord.....	102
2.	La Variole Ovine en Tunisie.....	104
2.1.	Distribution temporelle et spatiale de la variole ovine en Tunisie	104
2.2.	Distribution temporelle et saisonnière	105
2.3.	Distribution spatiale	109
2.4.	Mode de transmission	111
2.5.	Caractéristiques cliniques	113
III.	Outils de gestion de la variole ovine	116
1.	Outils de diagnostic	116
2.	Vaccination	118
2.1.	Période de vaccination	118
2.2.	Type de vaccins administrés	119
IV.	Stratégies de contrôle et d'éradicationde la variole ovine des pays d'Afrique du	
	Nord	120
1.	Pays d'Afrique du Nord	120
2.	Tunisie	121
V.	Impact économique de la clavelée en Tunisie	121

VI. Conclusion et perspectives	124
PARTIE III: CARACTERISATION DES PROTEINES VIRALES DU GENRE CAPRIPOXVIRUS	126
CHAPITRE 1: ANALYSE STRUCTURALE IN SILICO DES 4 PROTÉINES.....	127
I. Matériels et méthodes	127
1. Séquences des gènes d'intérêt utilisées	127
2. Délimitation des domaines protéiques en vue d'une production dans le système baculovirus.....	128
2.1. Prédiction des domaines transmembranaires par TMHMM Server 2.0.....	128
2.2. Prédiction de la présence d'un peptide signal par Signal P	128
2.3. Alignements avec les protéines homologues	129
3. Analyse structurale de la protéine A27 et prédiction de la surface accessible aux solvants.....	132
3.1. Analyse structurale de la protéine A27.....	132
3.2. Prédiction de la surface accessible aux solvants	133
II. Résultats	134
1. Délimitation des domaines en vue d'une production des protéines dans le système baculovirus.....	134
1.1. La protéine L1	134
1.2. La protéine A27	139
1.3. La Protéine A33	140
1.4. La protéine B5.....	145
2. Analyse structurale de la protéine A27	150
2.1. Prédiction de la structure primaire	150
2.2. Prédiction de la structure secondaire et des régions désordonnées	154
2.3. Prédiction de la structure tertiaire	156
2.4. Surface d'accessibilité des résidus	158
CHAPITRE 2 : EXPRESSION DES PROTÉINES EN SYSTÈME EUCARYOTE.....	164
I. Matériel et méthodes	164
1. Clonage des gènes sous pCI-neo.....	164
1.1. Plasmides employés	164
1.2. Souches bactériennes	165
1.3. Amplification et digestion du plasmide pCIneo.....	166
1.4. Production des insertsL1R, A27L, A33R et B5R	166
1.5. Clonage des inserts produits dans le vecteur pCI-neo	169

2. Expression in vitro des constructions plasmidiques en système eucaryote.....	174
2.1. Vérification de l'expression de L1R, A27L, A33R et B5R sous promoteur CMV par immunofluorescence indirecte (IFI).....	174
2.2. Evaluation de la transcription en ARN messagers des gènes d'intérêt introduits dans les clones plasmidiques par la technique RT-PCR	178
2.3. Vérification de l'expression des protéines L1R, A27, A33 et B5R par la technique de Western Blot.....	181
II. Résultats	184
1. Clonage des gènes sous pCI-neo.....	184
1.1. Production et digestion du pCIneo.....	184
1.2. Production des inserts	185
1.3. Criblage des colonies transformées.....	185
1.4. Séquençage	189
1.5. Mutagenèse dirigée	189
2. Expression in vitro des constructions plasmidiques en système eucaryote.....	190
2.1. Vérification de l'expression des 4 gènes par immunofluorescence indirecte (IFI)	190
2.2. Evaluation de la transcription en ARN messagers des gènes d'intérêt par RT-PCR	191
2.3. Vérification de l'expression des protéines L1, A27, A33 et B5 par la technique de Western Blot	193

CHAPITRE 3 : PRODUCTION DES PROTÉINES EN SYSTÈME BACULOVIRUS195

I. Matériel et méthodes	196
1. Clonage des 4 gènes en vecteur de transfert pBacPAK8	197
1.1. Clonage du gène A27 dans le vecteur de transfert pBacPAK8.....	199
1.2. Clonage des gènes L1R, A33R et B5R dans le vecteur de transfert pBacPAK8..	204
2. Production des baculovirus recombinants	211
2.1. Etape de transfection.....	211
2.2. Amplification virale	213
2.3. Vérification de la présence du baculovirus recombinant dans les cultures par PCR	215
2.4. Titrage par la méthode MTT	215
3. Production de la protéine d'intérêt.....	217
3.1. Production de la protéine sous différentes conditions (temps, MOI et densité cellulaire).	217
3.2. Production de la protéine d'intérêt aux conditions optimisées	219
3.3. Etape de purification.....	219

3.4. Production de la protéine A27 avec anti-protéases	220
II. Résultats	220
1. Clonage en vecteur de transfert pBacPAK8 (Clontech, France)	220
1.1. Clonage du gène A27L dans le vecteur de transfert pBacPAK8	220
1.2. Clonage du gène A33R dans le vecteur de transfert pBacPAK8	222
1.3. Clonage du gène L1R dans le vecteur de transfert pBacPAK8	223
1.4. Clonage du gène B5R dans le vecteur de transfert pBacPAK8	224
2. Obtention des baculovirus recombinants et titrage	225
2.1. Obtention des baculovirus recombinants	225
2.2. Calcul du Titre par la technique MTT	228
3. Production de la protéine A27 en système BEVS.....	228
3.1. Optimisation de la production de la protéine A27	228
3.2. Production de la protéine A27 en conditions optimisées	233
3.3. Purification de la protéine A27	234
3.4. Analyse par Western blot des différentes fractions purifiées.....	235
3.5. Production de la protéine A27 avec ajout d'anti-protéases.....	236
CHAPITRE 4: ETUDE DE L'ANTIGÉNICITÉ DE LA PROTÉINE A27	239
I. Matériels et méthodes	239
1. Approche expérimentale.....	239
1.1. Western blot.....	239
1.2. Immunodétection des peptides synthétisés sur membranes spots (Pepscan)	241
2. Analyse in silico : Prédiction des épitopes B.....	245
2.1. Epitopes continus ou linéaires :	245
2.2. Epitopes discontinus ou conformationnels :	246
II. Résultats	247
1. Analyse expérimentale	247
1.1. Western Blot	247
1.2. PepScan.....	248
2. Analyse in silico : Prédiction des épitopes B.....	258
2.1. Prédiction des épitopes linéaires	258
2.2. Prédiction des épitopes discontinus (structure 3D).....	262
DISCUSSION GENERALE.....	267
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	285
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	289

Introduction générale

L'apparition de maladies émergentes ou l'accroissement de l'incidence de maladies réémergentes est d'actualité permanente. De nos jours, au moins 75% des maladies humaines émergentes sont d'origine animale (Taylor *et al.*, 2001), les pathogènes circulant chez l'animal étant alors une menace pour la santé humaine. Le contrôle des agents pathogènes d'origine animale, pouvant être à la source ou non de zoonoses, est un moyen de lutte efficace et économique pour le maintien des élevages en bonne santé. Il est à privilégier pour protéger à la fois l'Homme et l'animal (FAO-OIE-WHO, 2010). L'homme dépend de l'agriculture et de l'élevage pour se nourrir. Cependant aujourd'hui, plus de 20% des pertes de la production animale sont liées aux maladies d'origine animale, elles-mêmes liées aux maladies humaines qui peuvent partager le même écosystème. Dans ce cadre, les changements globaux résultant de la mondialisation, les bouleversements climatiques conduisant à une modification des écosystèmes ont considérablement changé la distribution et la configuration des maladies. Ces grandes perturbations ont également largement contribué à l'émergence de nouveaux agents pathogènes qui se sont adaptés à un nouvel environnement biologique. En effet, suite à ces bouleversements, on assiste aujourd'hui à une extension géographique de pathologies infectieuses, particulièrement d'origine virale, à partir de leur berceau natal.

L'approfondissement des connaissances sur l'évolution des pathogènes en général (bactéries, virus et parasites) en lien avec leur environnement qui peut lui-même évoluer et, sur l'évolution des virus en particulier qui peut être très rapide permet de mieux appréhender les cycles de transmission et de diffusion des maladies virales. En effet, l'évolution d'un virus peut être due à des mécanismes de mutation ou de délétions mais aussi à des changements consécutifs à la globalisation constituant une source importante d'émergence virale. Peuvent être cités, à titre d'exemples, le changement climatique, la modification des écosystèmes et du comportement de l'Homme, qui laissent aux pathogènes de nombreuses opportunités pour coloniser de nouveaux territoires et évoluer vers de nouvelles entités virales (Pastoret, 2009). Dans ce contexte, le cas de l'émergence de la dermatose nodulaire contagieuse (DNC) en Europe est à mettre en avant. Cette maladie a été confinée pendant plusieurs années en Afrique et était considérée comme une maladie exotique pouvant atteindre l'espèce bovine en Europe. En effet, jusqu'en 1988, le virus a été confiné à l'Afrique subsaharienne pour ensuite s'inviter en Egypte et dans les pays du Moyen Orient (Mirzaie *et al.*, 2015; Alkhamis *et al.*, 2016). En 2015, le virus s'est propagé en Europe de l'Est en atteignant la Russie, la Grèce et l'Arménie

puis, en 2016, en Macédoine et en Bulgarie (Tuppurainen *et al.*, 2015; OIE, 2016; Promed, 2016). On ne peut exclure que cette extension de la maladie en Europe soit liée, en partie, à l'abondance et à l'augmentation de l'aire de distribution des vecteurs pouvant véhiculer cette maladie virale. En effet, l'émergence du virus par le biais d'introduction d'un animal infecté et asymptomatique à partir d'un pays de l'union européenne infecté représente une autre voie possible d'introduction de la maladie dans une région (Haj Ammar *et al.*, 2016).

Un certain nombre de maladies infectieuses d'origine virale (vectorielle ou non) affectant les animaux de rente sont présentes et circulent dans plusieurs régions d'Afrique et d'Asie. L'existence de ces maladies a un impact économique direct conséquent sur les rentes provenant des élevages de bovins et de petits ruminants et sur le niveau et les conditions de vie des éleveurs. Parmi ces maladies, la Peste des petits ruminants (PPR), la fièvre catarrhale ovine (FCO) ou bluetongue (BT), la fièvre aphteuse ou foot and mouth disease (FMD), la variole ovine (SPP, sheep pox), la variole caprine (GTP, goatpox) et la dermatose nodulaire contagieuse (DNC, LSD, lumpy skin disease) sont d'importance. Ces trois dernières maladies appartenant au genre *Capripoxvirus* et à la famille des *Poxviridae*, sont des maladies réglementées à déclaration obligatoire affectant respectivement les ovins, les caprins et les bovins. Elles sont dûes à des agents étiologiques d'importance majeure et représentent un fardeau pour l'économie et la santé publique (humaine et vétérinaire) des régions touchées, causant de graves pertes en termes de productions animales (viande, lait, dérivés tels que laine) amenant à une insécurité alimentaire des populations.

Le contrôle de ces maladies, ayant comme but ultime leur éradication, est donc capital. Dans la majorité des pays du Sud, à ressources limitées comme la Tunisie, les moyens de lutte tels que l'abattage des animaux infectés et l'application efficace de la restriction des mouvements des animaux sont difficiles à mettre en place et à maintenir à long terme. Ainsi de nos jours, la vaccination est donc considérée comme l'un des moyens les plus efficaces pour contrôler l'expansion de ces agents pathogènes (Kitching, 1986; Tuppurainen *et al.*, 2014). Dans le cas des infections à *Capripoxvirus*, la première génération de vaccins a été produite par atténuation de souches virulentes. Les exemples de ces vaccins de première génération sont des souches vaccinales atténuées provenant des souches de SPPV (Sheep poxvirus) telles que les souches Romanian et KSGP-0240 (Tuppurainen *et al.*, 2014), largement utilisées dans les pays touchés par les virus LSD (Lumpy Skin Disease), SPP (SheepPox) et GTP (GoatPox). En particulier, les souches vaccinales atténuées confèrent chez les petits ruminants un niveau de

protection élevé et permettent par ailleurs une protection croisée entre les trois virus du même genre, rendant ainsi la vaccination hétérologue possible et efficace dans de nombreux pays touchés par l'un ou l'ensemble de ces trois maladies (unicité de sérotype au sein des capripoxvirus). .

La thermostabilité, la taille du génome (plus de 200 kb) rendant possible l'insertion de transgènes, et la stabilité génétique ont fait de ces souches atténuées de capripoxvirus des vecteurs attractifs pour l'élaboration d'une seconde génération de vaccins ; les vaccins recombinants multivalents (ou multi-pathogènes) permettant le contrôle simultané de plusieurs pathologies affectant les ruminants , les capripoxvirus mais également les agents pathogènes pour lesquels certains gènes immunodominants ont pu être insérés dans le génome du capripoxvirus, par recombinaison homologue. Ainsi, un certain nombre de vaccins recombinants utilisant comme vecteur viral, la souche vaccinale 0240/KS1 ou la souche Sud-Africaine Neethling ont été développés.

Des capripoxvirus recombinants ont été générés contre la peste des petits ruminants (PPR) (Diallo *et al.*, 2002; Berhe *et al.*, 2003), la peste bovine (Romero *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1994) exprimant les gènes immunodominants F (Fusion) et H (Héماغlutinine), mais aussi la fièvre de la Vallée du Rift exprimant les glycoprotéines Gn et Gc (Wallace *et al.*, 2006; Ayari-Fakhfakh *et al.*, 2012), et la fièvre catarrhale ovine ou blue tongue (FCO, BT), exprimant différents gènes immunodominants (NS1, NS3, VP2, VP7) (Wade-Evans *et al.*, 1996; Perrin *et al.*, 2007). Le développement de tels vaccins multivalents trouve tout son intérêt pour les éleveurs réduisant ainsi le coût de la vaccination tout en limitant le nombre de campagnes de vaccination, l'aire de répartition de ces différents virus étant partagée et les maladies virales affectant les ruminants circulant généralement dans les mêmes zones géographiques.

Cependant, l'utilisation d'un vaccin à base de virus vivant atténué, pour les campagnes de vaccination annuelles des animaux de rente fait face à certaines limites. L'existence de pathogénicité résiduelle (souche sous atténuée) et d'insuffisance de protection conférée (souche sur-atténuée) rendent nécessaire l'amélioration des souches vaccinales aujourd'hui existantes (Brenner *et al.*, 2009; Tuppurainen *et al.*, 2014; Ben-Gera *et al.*, 2015). Par ailleurs, une autre stratégie vaccinale portant sur le développement de vaccins sous-unitaires pourrait voir le jour. Elle nécessite une connaissance approfondie de gènes immunodominants identifiés comme tels au sein du génome des capripoxvirus.

Dans ce contexte, mon travail de recherche s'est orienté, dans un premier temps, sur une description de l'état actuel de la variole ovine en Tunisie et, dans un deuxième temps, vers la caractérisation de certains gènes immunodominants décrits chez les capripoxvirus, qui pourraient être la cible des anticorps neutralisants. Mon choix s'est porté sur quatre protéines décrites et identifiées à partir du génome viral de la souche de LSDV (Lumpy Skin Disease Virus) identifiée NI-2490, les protéines LSDV60, LSDV117, LSDV122 et LSDV141 qui sont respectivement les homologues des protéines L1, A27, A33 et B5 du virus de la vaccine (Tulman *et al.*, 2001).

Le manuscrit de thèse se compose de trois grandes parties. Une première partie bibliographique rédigée en deux chapitres. Le chapitre I présente le genre *Capripoxvirus* de la famille des *Poxviridae*. Les principaux membres du genre ont été décrits dans leurs distributions géographiques, interactions avec les hôtes, manifestations cliniques et lésionnelles et les différentes techniques de diagnostic ainsi que les moyens de lutte utilisés pour leur éradication. Le chapitre II s'intéresse plus précisément aux protéines du capripoxvirus présentant un intérêt sur le plan immunitaire, leurs moyens d'expression, de production ainsi que leurs caractérisations.

La deuxième partie du manuscrit est consacrée à une représentation de la variole ovine en Tunisie. La revue est basée essentiellement sur une recherche bibliographique et une collecte de données et de résultats propres aux autorités vétérinaires compétentes du pays. Elle décrit la distribution temporelle et spatiale du virus de la variole ovine dans les pays d'Afrique du Nord et particulièrement en Tunisie, les aspects cliniques de l'infection virale dans les foyers, les méthodes de diagnostic disponibles ainsi que les stratégies de contrôle mises en place et pratiquées. Une première évaluation de l'impact économique de l'infection a été abordée. Les résultats obtenus et analysés proviennent d'un sondage effectué sur un ensemble d'éleveurs de petits ruminants de la région de Jelma, imada du gouvernorat de Sidid bouzid, la région la plus touchée par la variole ovine en Tunisie. Cette partie a fait l'objet d'une publication dans le journal *Transboundary and Emerging Disease* intitulée « Sheep pox in Tunisia: Current status and perspectives » (Ben Chehida *et al.*, 2017).

La troisième partie correspond à la caractérisation expérimentale des quatre protéines virales choisies du genre *Capripoxvirus*. Elle se compose de quatre chapitres. Le premier traite d'une analyse *in silico* des quatre protéines, le deuxième ainsi que le troisième chapitre traitent respectivement de l'expression de ces protéines dans deux systèmes d'expression protéique

différents, le système eucaryote et le système baculovirus. Le quatrième et dernier chapitre étudie l'antigénicité de ces protéines par une approche expérimentale appuyée par une analyse *in silico*.

Une discussion générale portant sur l'ensemble des points soulevés et étudiés au cours de ces travaux de thèse est présentée dans ce manuscrit. Elle est argumentée au regard des principaux travaux de recherche menés sur le sujet et jugés pertinents. Une conclusion générale clôturera le manuscrit. Cette dernière partie est pour sa part destinée à ouvrir de nouvelles perspectives de recherche par rapport à ce travail.

Partie I.: Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les Capripoxvirus

La dermatose nodulaire contagieuse, la variole ovine et la variole caprine sont trois maladies virales appartenant au genre *Capripoxvirus* affectant respectivement les bovins, ovins et caprins (Buller *et al.*, 2005). Elles ont un impact économique majeur sur l'industrie du bétail des régions endémiques ; où elles sont associées à d'importantes pertes en production telles qu'une chute de la production laitière, une perte de gain de poids, une augmentation du taux d'avortement, une détérioration de la qualité de la laine et peau, et une augmentation de la susceptibilité à des infections généralisées (lait, viande et laine) pouvant causer la mort de l'animal (Yeruham *et al.*, 2007). Ceci a pour conséquence un impact direct sur les moyens de subsistance des petits agriculteurs tout en constituant un frein sur le commerce international des animaux et de leurs produits. La distribution géographique des virus de la variole ovine et caprine qui partagent la même aire d'extension est plus large que celle de la dermatose nodulaire contagieuse, en effet, plusieurs pays sont encore indemnes de cette maladie y compris la Tunisie. Mais de nos jours, il existe une réelle menace de la dissémination des capripoxviroses dans de nouvelles aires géographiques. Le mouvement incontrôlé des animaux et de leurs produits, constitue l'une des principales causes de la propagation de ces virus (Domenech *et al.*, 2006). Le contrôle de ces maladies virales reste difficile à mettre en place, l'abattage des animaux infectés et des animaux en contact est la méthode de choix pour éliminer les foyers de capripoxvirus dans les pays indemnes, cependant ceci n'est pas applicable dans les pays d'Afrique et d'Asie où la vaccination constitue le moyen le plus efficace pour le contrôle de ces maladies (Tuppurainen *et al.*, 2015).

I. Classification

Les poxvirus sont classés en deux sous-familles, les *Chordopoxvirinae* qui infectent les vertébrés et les *Entomopoxvirinae* qui infectent les invertébrés (Murphy *et al.*, 1999). Les *Chordopoxvirinae* sont eux-mêmes subdivisés en dix genres sur la base, entre autres, de réactions de protections et de séro-neutralisations croisées (Kitching *et al.*, 1985; Diallo, 2007), ainsi que sur la base d'une morphologie et de propriétés biologiques identiques (Tableau1).

Le genre *Capripoxvirus* appartenant à cette sous famille des *Chordopoxvirinae*, comporte trois membres ayant pour hôtes réceptifs les ruminants.: le virus de la variole ovine touchant les ovins (sheep poxvirus, SPPV), le virus de la variole caprine touchant les caprins (goat poxvirus, GTPV) et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse bovine touchant les bovins (lumpy

skin disease virus, LSDV) (Damon, 2007), avec un pourcentage d'identité nucléotidique d'environ 97% (Tulman, 2002). Une certaine spécificité d'hôtes au sein des membres de ce genre existe, bien qu'il soit possible d'infecter expérimentalement différentes espèces avec un unique virus (Vinayagamurthy *et al.*, 2009).

Tableau 1. Classification de la sous-famille des *Chordopoxvirinae*, modifié de (Murphy *et al.*, 1999; Bertagnoli, 2003).

Genre	Virus	Réservoirs
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la variole humaine (smallpox) Virus de la vaccine Virus de la variole bovine (cowpox) Virus Ectromélie	Humains Réservoir très large Bovins, Félines, Humains, Rongeurs Rongeurs
<i>Parapoxvirus</i>	Virus de l'ecthyma contagieux (Orf) Virus de la paravaccine (pseudocowpox) Virus de la stomatite papuleuse bovine	Ovins, Caprins Bovins, Humains Bovins
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire (canarypox, fowlpox)	Oiseaux
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la variole ovine (Sheeppox) Virus de la variole caprine (goatpox) Virus de la dermatose nodulaire contagieuse (LSDV)	Ovins Caprins Bovins
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose du lapin	Lapins
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	Porcins
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus Molluscum contagiosum	Humains
<i>Yatapoxvirus</i>	Virus de la tumeur Yaba du singe	Singes, Parfois humains
<i>Cervidpoxvirus</i>	Mule deerpoxvirus	Cerf
<i>Crocodylidpoxvirus</i>	Nile crocodilepoxvirus	Crocodile

II. Répartition géographique

La répartition géographique des infections causées par les virus du genre *Capripoxvirus* varie en fonction de la sensibilité de leurs hôtes.

La variole ovine, signalée depuis le premier siècle après J.C. et la variole caprine, décrite pour la première fois par Hansen, en Norvège en 1879, partagent la même aire d'extension. Durant ces 50 dernières années, leur propagation était limitée au continent Africain, de l'Afrique du Nord jusqu'à l'Equateur (l'Afrique du Sud et Madagascar étant exclus) (Boshra *et al.*, 2013), au proche-Orient, et au continent Asiatique (Turquie, Russie, Inde, Chine, Bangladesh, Afghanistan, Pakistan, Népal, Kazakhstan, Kyrgystan, Vietnam et Mongolie) (Babiuk *et al.*, 2008). Plus récemment, des épizooties occasionnelles ont eu lieu en Europe dans les pays proches du proche-Orient (Bhanuprakash *et al.*, 2011). En effet, entre 2013 et 2015, plusieurs

épizooties ont eu lieu en Bulgarie, en Turquie et en Grèce (Tuppurainen *et al.*, 2015) (Figure 1a).

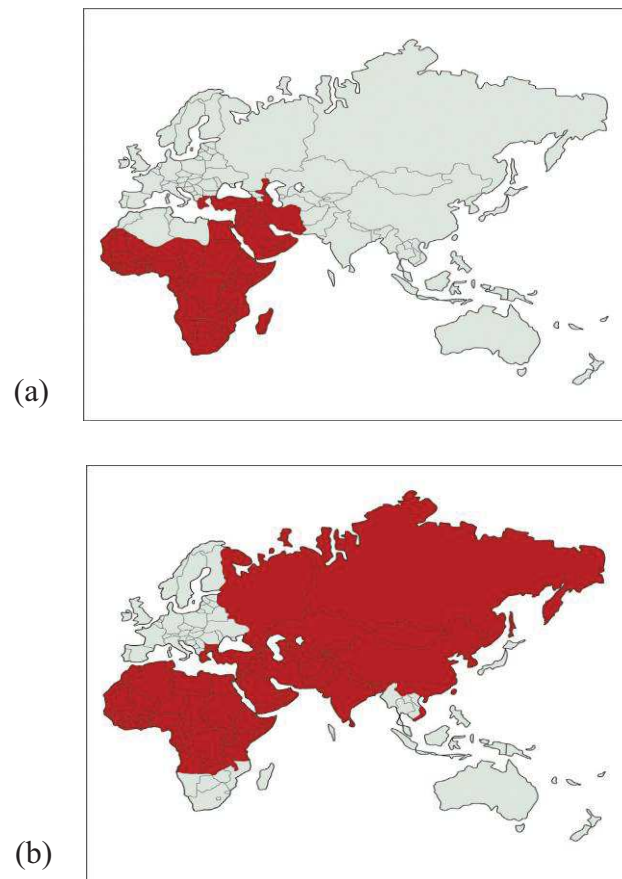


Figure 1. Répartition géographique des infections à *Capripoxvirus*, 1970-2015. (a) : Dermatose nodulaire contagieuse bovine, 1970-2015 et (b) : Variole ovine et la variole caprine (Tuppurainen *et al.*, 2015)

Le virus de la dermatose nodulaire contagieuse bovine (DNC) a été décrit pour la première fois par McDonald en 1929 en Zambie et depuis, plusieurs foyers ont été enregistrés dans différents pays d'Afrique sub-saharienne (Babiuk *et al.*, 2008; Gelaye *et al.*, 2015). La DNC est, de nos jours, devenue endémique dans la majorité des pays africains à l'exception de quelques pays d'Afrique du Nord tels que la Lybie, la Tunisie, l'Algérie et le Maroc (Figure 1b) (Gelaye *et al.*, 2015). A la fin des années 80, la DNC a envahi de nouveaux territoires. En effet, en Israël, des flambées épizootiques ont été décrites pour la première fois en 1989 (Yeruham *et al.*, 1995), puis en 2006 et 2007 (Brenner *et al.*, 2009). Klausner *et al.*, ont rapporté que les deux dernières épidémies pouvaient avoir comme origine d'introduction, les foyers d'Egypte via les vents circulants précisément entre ces deux zones (Klausner *et al.*, 2015).

En 2012, de nouveaux cas de DNC ont été rapportés au Nord d’Israël près de la frontière Syrio-Libanaise (Tuppurainen *et al.*, 2015) puis, en 2013 au Liban et en Jordanie avec plusieurs districts du pays atteints (Abutarbush *et al.*, 2015). D’autres foyers de DNC ont été aussi décrits en Irak en 2013 et en 2014 provoquant une morbidité de 9,11% (Al-Salihi *et al.*, 2015). Les pays voisins de l’Irak, la Turquie, Chypre et l’Iran ont enregistré leurs premiers cas de DNC en 2015 avec une extension vers la péninsule arabe (Koweït et Arabie Saoudite). Depuis fin août 2015, plusieurs foyers de DNC ont été déclarés en Grèce, vraisemblablement suite à une introduction de la maladie depuis la Turquie où une épizootie sévit depuis quelques années. En avril 2016, des foyers ont été déclarés en Bulgarie et dans l’Ancienne République Yougoslave de Macédoine. Depuis, l’épizootie s’est considérablement étendue avec de nombreux foyers en Serbie, au Kosovo, en Albanie et au Monténégro. Située à la frontière de la Bulgarie et la Serbie, la Roumanie est considérée comme un pays à fort risque d’introduction du virus. La France, quant à elle, est pour l’instant indemne de cette infection mais constitue un pays à risque (Anses, 2017). A ce jour, l’Afrique du Nord n’a pas observé de cas cliniques de DNC, mais est cependant considérée comme une zone à haut risque d’introduction.

III. Etiologie

1. Structure du virus

Les poxvirus et en particulier, les membres du genre *Capripoxvirus*, figurent parmi les plus gros virus infectant les mammifères décrits à ce jour. Les virions des poxvirus sont de grande taille et sont discernables en microscopie optique. En outre, la microscopie électronique a permis d’élucider l’organisation structurale des particules virales des poxvirus (Figure 2).

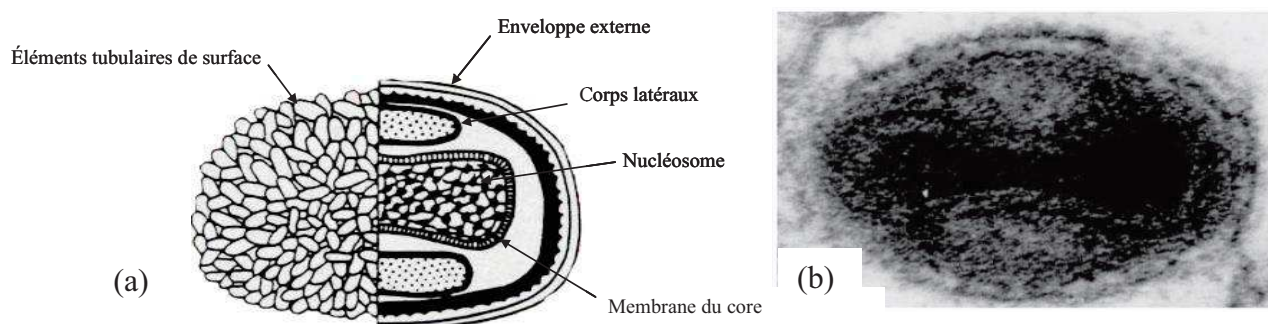


Figure 2. Vue schématique d'un poxvirus : A. Vue schématique d'un Orthopoxvirus (forme EV), adapté de (Bertagnoli, 2003). B. Représentation en microscopie électronique d'une forme enveloppée de poxvirus (Flint *et al.*, 2003).

Le virion est de forme ovoïde et mesure en moyenne 294x273nm (Diallo, 2007). Il se présente sous la forme d'un core central appelé nucléosome contenant l'ADN viral et les différentes protéines virales. Ce core est entouré par une couche biconcave flanquée de deux corps latéraux. L'ensemble est entouré de membranes lipoprotéiques externes (Figure 2).

Au cours de la morphogénèse, le nombre et la nature des enveloppes des poxvirus varient en fonction de l'évolution du cycle viral permettant ainsi de distinguer 4 types de virions : les virions matures intracellulaires (Mature Virion, MV), les virions enveloppés intracellulaires (Wrapped Virion, WV), les virions enveloppés extracellulaires (Envelopped Virion, EV) et les virions enveloppés associés aux cellules (Cell-associated Envelopped Virion, CEV) (Moss, 2015) (Figure 3).

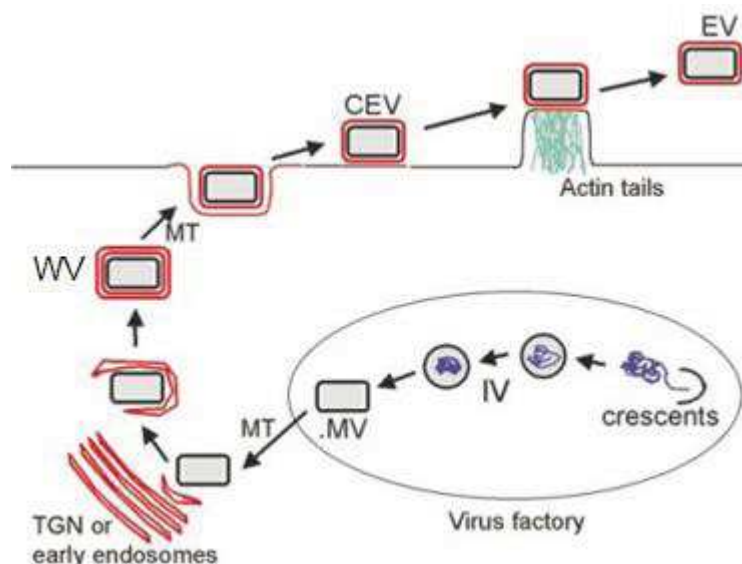


Figure 3. Morphogénèse du virus de la vaccine (Smith, 2002). MV. Mature Virion, WV. Wrapped Virion, CEV. Cell associated Envelopped Virion, EV. Envelopped Virion, MT. Microtubules, TGN. TransGolgi Network.

Les premiers stades de formation des virions ont lieu au sein de compartiments cytoplasmiques spécifiques appelés « virus factory ». La première structure virale, visible sous forme de croissant, est entourée d'une bicouche lipoprotéique, avec à l'extérieur une couche de spicules et à l'intérieur le matériel granulaire. Ce matériel granulaire est composé de protéines virales et de lipides (Dales *et al.*, 1968). Les spicules sont constituées essentiellement de polypeptides qui donnent à la particule immature sa forme caractéristique (Essani *et al.*, 1982). Cette structure primaire va évoluer par clivage protéolytique pour former le virion mature (MV) (Dales *et al.*, 1961; Moss *et al.*, 1973). Les MV ainsi formés représentent la forme la plus abondante et la

plus résistante de la progénie virale (Vanderplasschen *et al.*, 1998). Ils sont impliqués dans la transmission directe de l'infection. Un certain nombre de MV vont pouvoir migrer en transitant à l'intérieur de diverses citernes intracytoplasmiques de la cellule hôte pour donner naissance à un autre type de particules virales, les virions enveloppés intracellulaires (WV). L'origine de la double membrane qui vient s'ajouter aux WV est assez controversée. Les travaux de Van Eijl rapportent que ces membranes dériveraient des endosomes (van Eijl *et al.*, 2002) alors que ceux d'Ichihashi et de Schmelz leur désigneraient plutôt l'origine comme étant l'appareil de golgi ou le TGN (TransGolgi Network) (Ichihashi *et al.*, 1971; Schmelz *et al.*, 1994).

Les IEV, particules intermédiaires entre les MV et les CEV, se rapprochent de la surface cellulaire en migrant par l'intermédiaire de microtubules (MT) (Hollinshead *et al.*, 2001) pour fusionner avec la membrane plasmique constituant ainsi les CEV. Les CEV (Cell-associated Enveloped Virions) représentent les EEV retenus à la membrane cellulaire. La libération des EEV semble varier sous l'influence de différents facteurs tels que la souche virale et la cellule hôte (Payne, 1980). Les CEV, qui restent attachés à la surface cellulaire et les EV seront responsables de la diffusion du virion à courte portée, de cellule à cellule, par une série de signaux transmis via les protéines virales ancrées dans la membrane plasmique. Les EV libérés dans le milieu seront responsables de la dissémination du virus au sein de l'hôte (Hooper *et al.*, 2003; Lustig *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004) et sont associés à la virulence.

2. **Génome viral**

Le génome des *Capripoxvirus* est composé d'un ADN linéaire, bicaténaire, d'une taille approximative de 150 Kbp, incluant environ 150 gènes, dont le tiers présente une homologie avec les autres membres de la famille des *Poxviridae* (Lefkowitz *et al.*, 2006). Le génome du virus LSD fait, quant à lui, 151 Kbp avec 156 gènes (Gubser *et al.*, 2004). Ce génome est composé d'une région centrale conservée et de deux régions terminales variables en forme d'épingles à cheveux. Les deux brins d'ADN sont ainsi connectés à leurs extrémités pour former une chaîne nucléotidique continue (Moss, 2013) (Figure 4). Cette organisation génomique est commune à tous les poxvirus. La région centrale comporte les gènes hautement conservés, codant pour les enzymes et les protéines structurales essentielles au cycle viral (Upton *et al.*, 2003; Gubser *et al.*, 2004). Cette région est bordée de séquences terminales inversées répétées (Inverted Terminal Repeat, ITR) de 10 à 15kpb. Au niveau des ITR et des régions adjacentes, on trouve les gènes non essentiels qui codent principalement pour des facteurs de virulence et des facteurs impliqués dans l'interaction hôte-virus (Moss, 2001).



Figure 4. Organisation génomique des Poxvirus, adapté de (Babkin *et al.*, 2015).

L'étude des séquences complètes des trois espèces appartenant au genre *Capripoxvirus* a mis en évidence une identité nucléotidique de 97%. Les alignements ont permis de faire ressortir un total de 9 gènes (LSDV132, LSDV013, LSDV002, LSDV155, LSDV004, LSDV153, LSDV009, LSDV026 et LSDV136) présents et fonctionnels dans le génome du virus du LSD qui sont non fonctionnels chez les deux virus GTPV et SPPV (Tulman *et al.*, 2001; Tulman *et al.*, 2002).

3. Cycle viral

Le virus prototype de la famille des *Poxviridae* est le virus de la vaccine (*Vaccinia virus*, VACV), chef de file du genre *Orthopoxvirus*. Le cycle répliatif des poxvirus, a été décrypté grâce aux études approfondies faites sur le VACV (Moss, 2001). Les poxvirus entretiennent leur morphogenèse dans le cytoplasme de la cellule hôte impliquant donc une autonomie quant au processus de réplication et de transcription. Ainsi, l'expression des gènes se déroule de façon séquentielle au cours du cycle. La durée totale d'un cycle varie selon les genres et leurs membres, cette durée est comprise entre 8 et 75 heures à partir du moment de l'infection (Moss, 2001). Le cycle viral comprend six étapes importantes (Figure 5) :

Attachement, fusion et pénétration du virus dans la cellule hôte: le cycle viral peut être initié par les deux types de virions infectieux, les MV ou les EV (Smith *et al.*, 2002). Ils vont pénétrer dans la cellule hôte de manière différente car ils ne possèdent pas le même type et nombre de glycoprotéines de surface (Vanderplasschen *et al.*, 1998). La première étape débute par l'attachement du virion à la surface de la cellule hôte par le biais d'une interaction de certaines protéines virales avec les glycosaminoglycanes (GAGS), ou la laminine de la Membrane Extra Cellulaire (MEC) (Blasco *et al.*, 1993; Chung *et al.*, 1998; Hsiao *et al.*, 1999). A ce stade, se produit la fusion entre le virion et la membrane de la cellule hôte suivie par la libération du core du virion dans le cytoplasme de la cellule. Le déroulement de ces deux étapes n'est sous la

dépendance d'aucun récepteur spécifique (Senkevich *et al.*, 2004). Selon certains auteurs, les MV perdraient leur enveloppe avant d'entrer dans la cellule, et seul le core traverserait ainsi la membrane plasmique (Sodeik *et al.*, 2002). Cependant, l'hypothèse la plus acceptée est que la pénétration des MV se fait par généralement par fusion membranaire (Carter *et al.*, 2005). Certains auteurs suggèrent que les MV seraient endocytés, puis le core libéré par fusion membranaire dans le cytoplasme. Les mécanismes d'entrée dans la cellule des EV sont encore plus controversés. Les EV fusionnent généralement avec la membrane plasmique d'une manière dépendante du pH et avec une cinétique plus rapide que celle des MV (Townsend *et al.*, 2006).

Expression des gènes précoces: Immédiatement après l'entrée du virus dans la cellule, l'expression d'une première cascade de gènes viraux précoces conduit à la synthèse d'ARNs messagers régulée *via* les séquences spécifiques de promoteurs précoces, (Broyles *et al.*, 2003). Il est important de souligner qu'aucune protéine cellulaire ne semble nécessaire à la transcription de ces gènes précoces.

Décapsidation : Ce mécanisme est peu étudié. Il suppose un déroulement en deux phases : une première phase pendant laquelle le génome est séquestré dans le core ; cette phase s'accompagne de la perte des protéines et des lipides enveloppant le core du virion (Dales, 1965) et, une seconde phase où le génome est libéré dans le cytoplasme (Holowczak, 1972). Les transcrits sortent alors du core et sont traduits par les ribosomes cellulaires. La synthèse des protéines précoces permet la décapsidation et la libération du génome.

Réplication du génome viral : Après la dégradation du core, l'ADN viral devient totalement accessible aux enzymes. La réplication est indépendante du noyau. Elle se déroule en totalité dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'ADN viral ne s'associe aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) qui l'enveloppent pour former un compartiment dans lequel la réplication s'initie. Au début du cycle, interviennent les télomères viraux qui sont, par analogie aux chromosomes eucaryotes, des séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités de la molécule linéaire d'ADN viral. C'est au niveau de ces télomères qu'ont lieu l'initiation et la terminaison de la réplication (DeLange *et al.*, 1990). Cette étape va permettre l'expression des gènes viraux intermédiaires et tardifs.

Expression des gènes intermédiaires et tardifs : La transcription de ces gènes nécessite la synthèse *de novo* de l'ARN polymérase virale et la participation de protéines cellulaires (Rosales *et al.*, 1994). Le statut des gènes intermédiaires est ambigu. Il peut s'agir de gènes précoces, précoces/tardifs, tardifs ou bien non classés, du fait d'un profil d'expression atypique

(Assarsson *et al.*, 2008). Les gènes intermédiaires ont été peu étudiés et sont majoritairement impliqués dans la régulation des gènes tardifs. Les protéines synthétisées tardivement incluent la plupart des protéines structurales et celles ayant des activités enzymatiques nécessaires à l'assemblage du virion (Moss, 1990). Parallèlement à l'accumulation des gènes viraux tardifs, commence la morphogenèse et l'assemblage du virion.

Assemblage et relargage des virions : Les premières étapes de la formation des virions ont lieu au niveau de structures spécifiques qualifiées de virosomes ou « Virus factories » et dans lesquelles les organites cellulaires sont exclus. En situation expérimentale, leur nombre est proportionnel à la multiplicité d'infection (Katsafanas *et al.*, 2007). Les premières membranes en forme de croissant sont formées de lipides et de protéines virales et s'assemblent pour former les virions immatures. Les différentes étapes de la morphogenèse des poxvirus ont été décrites précédemment (cf. paragraphe III). Après leur morphogenèse, les virions vont soit, rester libres dans le cytoplasme soit, migrer vers la surface cellulaire et quitter la cellule hôte par l'intermédiaire de microvillosités (Ichihashi *et al.*, 1971).

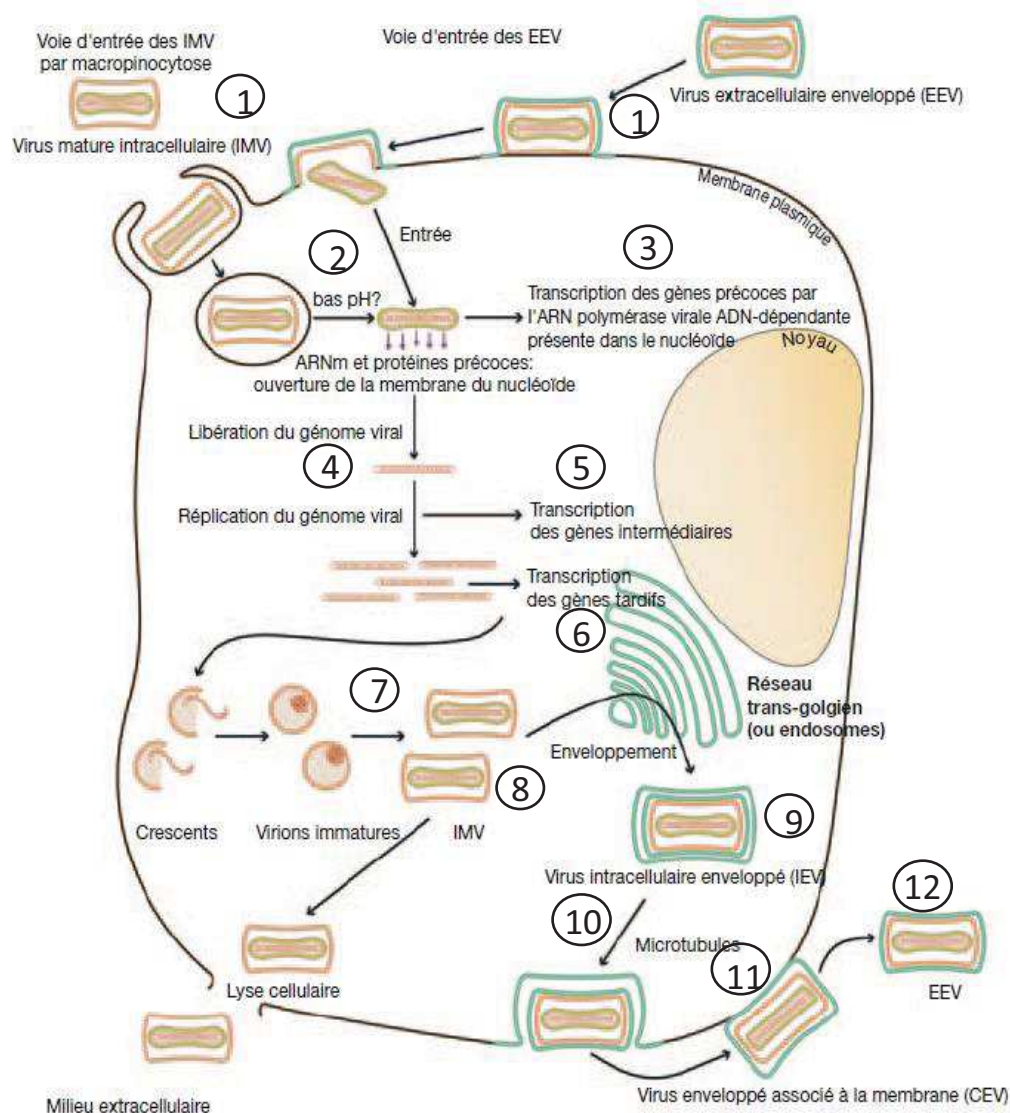


Figure 5. Représentation schématique du cycle de réplication des poxvirus (Duraffour *et al.*, 2008).

- 1 : Attachement à la cellule, deux formes de virions infectieux peuvent initier l'infection (IMV ou EEV), l'attachement à la cellule est déterminé par les GAGs ou des composants de la MEC
- 2 : Pénétration dans la cellule et libération du core dans le cytoplasme
- 3 : Transcription des gènes précoces et expression des protéines précoces
- 4 : Décapsidation du core et libération de l'ADN viral
- 5 : Réplication de l'ADN et transcription des gènes intermédiaires
- 6 : Transcription des gènes tardifs
- 7 : Début de l'assemblage avec les premiers fragments de membranes, puis formation des virions immatures
- 8 : Maturation et formation des IMV
- 9 : Transport des IMV vers le Golgi via les microtubules et acquisition d'une double enveloppe (IEV),
- 10 : Migration des IEV vers la surface cellulaire via le cytosquelette
- 11 : Fusion des IEV avec la membrane plasmique cellulaire et formation des CEV
- 12 : Libération des EEV.

IV. Interactions hôtes/virus et réponse immunitaire

Le type d'interaction entre les poxvirus et leurs hôtes peut être défini par trois niveaux ; un premier niveau cellulaire, qui se réfère au type de réplication touchant les différentes espèces (permissive, semi permissive ou abortive), le second niveau est lié au tropisme tissulaire où on peut observer une réplication virale importante au sein d'un organe ou tissu spécifique et finalement un troisième niveau de tropisme d'hôte qui se manifeste par la pathogénie et les symptômes chez les organismes infectés. Chacun de ces trois niveaux d'interactions détermine si le virus va avoir un tropisme pour une espèce donnée (McFadden, 2005).

1. Interactions hôtes/virus

1.1. Attachement et entrée dans la cellule cible

A contrario de beaucoup de familles virales pour lesquelles seules une ou deux protéines sont impliquées dans l'entrée du virus au sein de la cellule hôte, les poxvirus emploient eux un grand nombre de protéines, 11 ou 12 protéines, constituant un complexe multi-protéique (Complexe entrée-fusion EFC). Ces protéines sont conservées chez les poxvirus et s'attachent à des éléments de surface non spécifiques ubiquitaires de la cellule hôte comme les glycosaminoglycanes (GAGs) ou la laminine de la membrane extracellulaire à moindre degré. Il faut noter que pour le moment, aucun récepteur spécifique pour les poxvirus n'a été identifié (McFadden, 2005).

1.2. Contrôle du cycle cellulaire

Plusieurs poxvirus codent pour des protéines ressemblant aux facteurs de croissance eucaryote ; l'homologue du EGF (epidermal growth factor) et VEGF (vascular endothelial growth factor). Le facteur EGF est présent dans le génome de tous les genres de poxvirus alors que le VEGF est retrouvé seulement dans le génome des parapoxvirus (Seet *et al.*, 2003). Ces facteurs ont la capacité de stimuler la mitose au niveau des cellules au repos ce qui va nettement augmenter le niveau de réplication virale (McFadden, 2005). Chez le virus Orf et le pseudo-cowpoxvirus, le VEGF-A va stimuler la prolifération des cellules endothéliales ce qui va favoriser la perméabilité vasculaire (Wise *et al.*, 1999). La délétion de ces homologues aux facteurs de croissance affecte la pathogénicité du virus et se traduit par un taux moins important de mortalité ainsi que l'apparition de symptômes moins sévères de la maladie (Johnston *et al.*, 2004).

1.3. Contrôle de l'apoptose

L'apoptose est un puissant mécanisme de défense employé dans un cadre physiologique par les organismes supérieurs pour lutter contre les xénobiotiques. Cette apoptose peut être le résultat de deux mécanismes, un premier mécanisme intrinsèque dépendant de l'action de protéines de la famille Bcl-2 qui sont des facteurs clés de la voie mitochondriale de l'apoptose (Youle *et al.*, 2008), ou un mécanisme extrinsèque impliquant le TNF (facteur de nécrose tumorale) (Hengartner, 2000).

En contre partie, les virus ont mis en place des stratégies pour assurer leur multiplication, leur propagation ainsi que leur survie. Dans ce cadre, plusieurs virus expriment des inhibiteurs de cette mort cellulaire programmée, contournant ainsi les moyens de défense de l'hôte qui visent à supprimer rapidement les cellules infectées (Roulston *et al.*, 1999).

Hormis les fowlpoxvirus et parapoxvirus dont le génome inclue des gènes codant des protéines homologues de la protéine cellulaire anti-apoptotique Bcl2, la majorité des poxvirus ne possèdent pas cet homologue. D'autres protéines inhibitrices de l'apoptose ont été identifiées telle la protéine M11L du virus myxomateux, la protéine F1L du virus de la vaccine, et la protéine 14 du Sheep poxvirus (SPPV14) (Okamoto *et al.*, 2012). Enfin, le virus myxomateux code pour un gène viral « Serp2 » appartenant à la super famille des serpins (SERine Protéase INhibitor) possédant une réelle action anti-apoptotique *in vivo* (Messud-Petit *et al.*, 1998).

1.4. La voie IFN et l'inhibition de l'hôte

La production d'interféron (IFN) est un mécanisme d'immunité antivirale innée qui est mis en place par l'hôte précocement et en première ligne pour lutter contre les virus. Cette production d'IFN est déclenchée par la reconnaissance, via des récepteurs retrouvés à la surface cellulaire de l'hôte (TLR : Toll-like receptor), de motifs structuraux caractéristiques du virus : les PAMPs (pathogen associated molecular patterns). L'interféron produit par les cellules infectées va permettre de protéger les cellules voisines saines. Les cellules sensibles à l'interféron sont celles qui représentent à leur surface le récepteur IFNAR (Delhay *et al.*, 2006).

Les interférons de type I et de type III présentent de puissantes activités antivirales. Les interférons de type I constituent une large famille regroupant les interférons α et β présentant une puissante activité protectrice contre les infections virales et les IFN ω , IFN ϵ/τ , IFN κ et la limitine (IFN ζ) (Krause *et al.*, 2005). Les interférons de type III ont été découverts récemment

et sont représentés par l'Interféron λ et l'interféron L qui, bien qu'utilisant un récepteur différent des IFN de type I, régulent des groupes de gènes similaires et semblent activer des voies de transduction du signal comparables et exercer des activités antivirales et antiprolifératives similaires (Egli *et al.*, 2014). Les interférons de type II (IFN γ) possèdent une activité antivirale moins puissante que celle des interférons de types I et III.

Les poxvirus ont élaboré plusieurs stratégies pour contrecarrer la réponse aux interférons, ciblant leur production ou/et leur voie de signalisation. Au niveau de la production des interférons, la protéine A46 du virus de la vaccine va interagir via un domaine TIR (Toll interleukine 1 receptor) pour inhiber la signalisation via les TLR (Stack *et al.*, 2005), alors que la protéine A52 va inhiber la voie d'activation NF- κ B nécessaire à la production de l'IFN de type I mais aussi de plusieurs autres cytokines (Harte *et al.*, 2003).

La protéine B8 des *Orthopoxvirus* code pour un récepteur des IFN γ (IFN γ R) qui va fixer l'IFN γ et empêcher son interaction et l'activation des récepteurs IFNAR. Ainsi, des lapins ne possédant pas ce récepteur, présentent des lésions atténuées qui disparaissent rapidement. La délétion du gène B8R chez le virus de la vaccine conduit à son atténuation chez des souris (Sroller *et al.*, 2001; Verardi *et al.*, 2001). L'homologue du gène B8R chez une souche virale atténuée du virus de la DNC présente des différences au niveau de quelques acides aminés, suggérant une contribution de cette mutation au phénotype atténué de cette souche virale (Kara *et al.*, 2003). En outre, un autre gène (B18R) qui code pour la protéine B18 du virus de la vaccine code pour une protéine soluble homologue au récepteur de l'IL-1 ; cette protéine a été détectée à la surface des cellules infectées et saines mais aussi en tant que forme soluble suggérant qu'elle interfère avec l'action de l'IFN de type I en inhibant la résistance conférée par l'IFN aux cellules saines (Alcami *et al.*, 2000).

2. Caractérisation de la réponse immunitaire des infections à Capripoxvirus

La réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis d'une infection par les poxvirus est multifactorielle et dépend à la fois de la virulence de la souche virale (souche sauvage/atténuée), du statut immunitaire de l'hôte mais aussi de l'âge et de la race de l'animal (Heraud *et al.*, 2006). L'immunité anti-Capripoxvirus est surtout à médiation cellulaire; néanmoins, l'immunité humorale joue aussi un rôle dans la protection des animaux infectés (Kitching *et al.*, 1987). Immédiatement après l'infection, des mécanismes non spécifiques (apoptose, complément,

IFN, cytokines, cellules NK) servent de première ligne de défense, suite à quoi les réponses immunitaires adaptatives médiées par les cellules T prennent le relais.

2.1. Immunité à médiation cellulaire

Il a été montré que la réponse cellulaire de type T, suite à une vaccination contre la variole, contribue de façon significative à la protection de l'hôte vacciné. En effet, des patients vaccinés, déficients en cellules T mais capables de produire des anticorps, ont été infectés suggérant le rôle des cellules T dans le contrôle des infections dues au poxvirus (O'Connell *et al.*, 1964).

Dans la réponse à médiation cellulaire, dominant deux populations de cellules T ; les lymphocytes TCD4 (auxillaires) et les lymphocytes TCD8 (cytotoxiques), populations cellulaires qui varient dans leur taille et dans leur distribution en fonction de l'évolution de l'infection.

L'immunité à médiation cellulaire s'exprime en deux étapes. Au cours de la première étape, le Capripoxvirus a la capacité d'activer un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte par augmentation de la sécrétion d'interleukine 10 (IL10) par les macrophages (Abu-El-Saad *et al.*, 2005). Cette cytokine anti-inflammatoire a pour effet l'inhibition de l'induction de l'immunité antivirale, en inhibant les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), en empêchant la différenciation des cellules dendritiques et en inhibant la sécrétion et la libération d'IL-12, d'IFN (Interféron) et de TNF (Tumor Necrosis Factor), cytokines aux propriétés antivirales. Egalement, l'IL-10 va inhiber la dégradation et la présentation des antigènes par les molécules du CMH de Classe II ce qui aura pour conséquence, d'abord une inhibition de l'immunité innée puis de l'immunité acquise et de la mémoire immunologique nécessaire en cas de réinfection ou de réexposition au virus. Ce phénomène d'échappement viral permet au virus de se répliquer suivie de sa dissémination systémique. Cette phase a une durée variable, en moyenne 6 à 9 jours. Au cours de la deuxième étape, l'hôte va pouvoir développer une réponse immunitaire principalement cellulaire et ceci par la sécrétion d'interleukine 12 (IL12). Cette cytokine a un effet antiviral en stimulant les cellules NK (Natural Killer), les cellules T et B et la sécrétion d'IFN par les cellules dendritiques et les macrophages (Abu-El-Saad *et al.*, 2005).

2.2. Immunité à médiation humorale

Même si l'immunité de type cellulaire est importante, l'immunité à médiation humorale avec notamment la production d'anticorps neutralisants est impliquée dans la protection de l'hôte.

Tout d'abord sur les *Capripoxvirus*, un transfert passif de sérums d'ovins infectés avec le virus de la clavelée a permis de protéger des ovins naïfs contre une épreuve virulente, l'immunité colostrale pouvant persister jusqu'à 6 mois (Kitching, 1986d). Les virus appartenant au genre *Capripoxvirus* possèdent une similarité nucléotidique d'environ 96% (Tulman *et al.*, 2001; Tulman *et al.*, 2002) et ont en commun un site majeur de neutralisation (OIE, 2010). Qu'elle que soit la souche de *Capripoxvirus* utilisée, une vaccination devrait donc protéger contre les autres virus du même genre.

En fonction de la souche inoculée (vaccinale ou sauvage), il se développe une cinétique particulière de la réponse humorale. Ainsi, chez les animaux vaccinés, les anticorps apparaissent 15 jours post exposition, atteignant un pic à 30 jours et chutant sous le seuil de détectabilité tout en conférant une réponse protectrice vis-à-vis d'une épreuve virulente. Chez les animaux infectés naturellement, les anticorps anti-capripoxvirus peuvent être détectés jusqu'à 3 à 6 mois post infection (Bowden *et al.*, 2009; Tuppurainen *et al.*, 2015).

Les études sur les Orthopoxvirus ont permis d'identifier les gènes principaux codant pour des protéines immuno-dominantes. Le virus de la vaccine (VACV), par exemple, possède plus de 200 gènes dont 9 codent pour des protéines présentant des épitopes d'intérêt pour les cellules B. Les cinq protéines A27, B5, L1, D8 et H3 se retrouvant au niveau des MV du virus de la vaccine induisent la production d'anticorps neutralisants protecteurs alors que la protéine A33 induit une immunité protectrice non neutralisante (Galmiche *et al.*, 1999). La protéine L1 est la plus conservée au sein de la famille *Poxviridae* alors que les protéines B5 et A33 (à la surface des EV) possèdent une faible similarité. L'étude comparative de ces protéines entre Orthopoxvirus et Capripoxvirus (cf Partie III, Chapitre 1) met en évidence un faible niveau de conservation qui rend difficile de conclure sur le rôle et implication de ces protéines dans la réponse humorale développée contre le capripoxvirus.

L'activité neutralisante qui est dirigée contre les virions extracellulaires du virus de la vaccine est majoritairement dépendante du complément permettant une lyse des cellules infectées. La déplétion du complément a induit une chute considérable (plus de 50%) de la protection

confirmant l'importance du complément pour la protection contre la forme EV du virus (Benhnia *et al.*, 2009).

V. Sources et transmission de l'infection

1. Sources de transmission

Les petits ruminants excrètent le virus par voie nasale, orale et conjonctivale. Cette excrétion virale débute dès l'apparition des papules. La durée et la quantité de virus excrétés varient selon la souche virale et l'espèce hôte (Bowden *et al.*, 2008). En effet, la quantité de virus excrétée est corrélée à la sévérité de la maladie. Les petits ruminants présentant des signes cliniques légers, excréteront une plus faible quantité de virus que les animaux présentant des signes cliniques sévères (Babiuk *et al.*, 2008). La durée d'excrétion peut durer jusqu'à six semaines après l'inoculation virale (Bowden *et al.*, 2008). Le virus peut être aussi excrété dans le lait et l'urine (Bhanuprakash *et al.*, 2006).

Pour le virus de la dermatose nodulaire contagieuse, si les animaux ne présentent pas de signes cliniques, ils n'excréteront pas le virus ni par voie nasale, orale ou conjonctivale (Carn *et al.*, 1995). En revanche, en phase fébrile, la virémie dure au moins 4 à 5 jours avec présence de virus dans de nombreuses sécrétions dont jetage, larmes, salive ainsi que dans le lait. Dans les nodules, il peut être isolé pendant 4 mois. Le virus peut être retrouvé dans le sperme des taureaux infectés même si les signes cliniques ne sont pas apparents, l'excrétion dans le sperme persiste même après que la fin de la phase de virémie, après une séroconversion et même après la phase de convalescence (Irons *et al.*, 2005).

2. Modalités de transmission

Les virus de la variole ovine et caprine se transmettent classiquement par voie directe, essentiellement par voie respiratoire, par inhalation d'aérosols contaminés ou par contact direct avec des animaux infectés (lésions cutanées), ou indirectement par des objets contaminés ou de nourriture et laine contaminées (Bhanuprakash *et al.*, 2006). Dans les régions endémiques, le fait de mettre les ovins dans des enclos proches les uns des autres la nuit, participe à maintenir l'infection (Bhanuprakash *et al.*, 2006). Les animaux peuvent être infectés expérimentalement par inoculation intradermique, nasale ou orale (Bowden *et al.*, 2008). La transmission indirecte par les arthropodes vecteurs n'a pas été confirmée jusqu'à maintenant ; néanmoins, si la charge

virale est importante dans les lésions de la peau, une transmission mécanique par ces vecteurs ne pourrait être exclue (Tuppurainen *et al.*, 2015).

La transmission de la DNC peut se faire dans différents biotypes tels que les zones semi-désertiques, les régions tempérées, les prairies et les régions irriguées (Davies, 1991). Les modalités de transmission du virus et leur importance relative restent à déterminer. La transmission directe par contact est possible mais ne semble pas très efficace. En effet, Carn *et al.*, ont démontré l'absence de transmission du virus en mélangeant des animaux naïfs et infectés en l'absence d'insectes vecteurs (Carn *et al.*, 1995). Par ailleurs, une transmission virale a été observée chez des animaux naïfs ayant partagé la source d'eau avec des animaux gravement infectés (Haig, 1957). Les arguments en faveur d'une transmission vectorielle sont nombreux. Plusieurs observations suggèrent que les insectes hématophages jouent un rôle vecteur dans la transmission de la maladie (Woods, 1988).

Il a été démontré que *Stomoxys calcitrans* était un vecteur potentiel de la dermatose nodulaire bovine. Son abondance dans les fermes laitières bovines en Israël est corrélée à l'apparition de plusieurs foyers épidémiques (Kahana-Sutin *et al.*, 2017). Les moustiques femelles d'*Aedes aegypti* seraient susceptibles de transmettre mécaniquement et expérimentalement le virus responsable de la DNC représentant un aspect important de l'épidémiologie de la maladie, mais il n'existe aucune évidence de répllication virale chez ce vecteur (Chihota *et al.*, 2001).

D'autre part, plusieurs études tendent à mettre en évidence le rôle des tiques dans la transmission de la maladie. En effet, Tuppurainen *et al.*, ont démontré pour la première fois que *Rhipicephalus appendiculatus* était capable de transmettre mécaniquement le virus LSD après avoir pris un repas de sang sur un animal malade ou même sur un animal infecté ne présentant pas de lésions cutanées à des vaches naïves (Tuppurainen *et al.*, 2013a). Ces mêmes auteurs ont confirmé la transmission trans-ovarienne de la DNC chez l'espèce *Rhipicephalus decoloratus* (Tuppurainen *et al.*, 2013b). Lubinga *et al.*, ont rapporté, pour la première fois, la présence du virus dans la salive des tiques *Rhipicephalus appendiculatus* et *Amblyomma hebraeum* ainsi que la transmission verticale pour ces deux premières espèces et *Rhipicephalus decoloratus* (Lubinga *et al.*, 2013; Lubinga *et al.*, 2014).

Concernant les voies de transmission directe du virus de la DNC, la transmission vénérienne est rapportée (Annandale *et al.*, 2014). Le risque de transmission du virus par le sperme a de sérieuses implications et répercussions sur le commerce de bovins (Hentzen, 2000). La maladie

est en revanche rarement transmise lors de tétées à partir de trayons ayant des lésions ou par le lait (Weiss, 1968).

En général, les *Capripoxvirus* sont considérés comme étant des virus ayant une spécificité d'hôte stricte (Babiuk *et al.*, 2009). Aucune des souches virales n'a été rapportée comme pouvant infecter les trois espèces (bovins, ovins et caprins) en même temps (Tuppurainen *et al.*, 2014), et seule la souche KSGP 0-240 est connue pour infecter les ovins et les caprins (Yan *et al.*, 2012). Ceci est probablement attribué à une faible réplication virale chez les hôtes hétérologues et à une répartition géographique différente de ces virus (Kitching, 2008). En effet, les souches africaines de variole ovine et caprine sont connues pour infecter une gamme d'hôtes plus large que les souches indiennes ou celles du Moyen Orient (Davies, 1976).

VI. Manifestations cliniques et lésions observées

Cette partie résume les principaux symptômes spécifiques de la dermatose nodulaire contagieuse bovine d'une part, et ceux des deux varioles ovines et caprines d'autre part. Les symptômes associés aux infections à Capripoxvirus sont globalement identiques. Ils se manifestent essentiellement selon deux types de formes cliniques, une forme cutanée et une forme généralisée.

1. Manifestations cliniques

1.1. La dermatose nodulaire contagieuse bovine (DNC)

L'infection par le virus de la DNC ou LSD peut revêtir des formes très diverses dans sa gravité. Les bovins constituent l'espèce cible du virus responsable de la DNC, mais il ne semble pas exclu que les ovins ou caprins constituent un relai épidémiologique.

Selon l'OIE, la période d'incubation de l'infection peut s'étendre jusqu'à 28 jours. Typiquement, les bovins développent un premier syndrome fébrile de 40-41°C sur une période de 4 à 14 jours. Durant cette phase, les animaux présentent des sécrétions salivaires, nasales et lacrymales accompagnées de troubles oculaires. Dans les formes graves, des lésions ulcératives touchant les différentes muqueuses peuvent être observées. Il y a aussi apparition d'une lympho-adénopathie particulièrement des nœuds lymphatiques sub-scapulaires et pré-cruraux. Une deuxième phase fébrile fait suite à la première pour les 4 à 10 jours suivants avec l'apparition de nodules cutanés, signes caractéristiques de la maladie. Les nodules ayant une

taille variant de 1 à 5 cm de diamètre se développent sur la peau et le tissu sous cutané et peuvent parfois atteindre le muscle sous-jacent (Figure 6). Certains nodules peuvent fusionner pour former de grandes plaques, ils sont généralement uniformes bien circonscrits, fermes, ronds, soulevés et sont particulièrement visibles chez les animaux à poils courts. Par contre, chez les bovins à poils longs, les nodules ne sont reconnus généralement qu'au toucher ; dans ce cas, ils sont généralement perceptibles au niveau de la vulve et du périnée. Au cours de l'évolution de l'infection, les nodules s'endurcissent et se résorbent laissant place à des cicatrices permanentes qui vont endommager le cuir de l'animal. Enfin, chez les animaux gravement touchés, les nodules s'étendent sur les parties ventrales du corps (Thomas *et al.*, 1945; Haig, 1957; Weiss, 1968; Prozesky *et al.*, 1982).

Le taux de morbidité de la DNC varie de 3 à 85% avec une moyenne de 40%. Le taux de mortalité est plus faible (1 à 3%) mais peut parfois atteindre 40% (Coetzer, 2004). En effet, les indicateurs épidémiologiques sont étroitement liés à la virulence de la souche virale, à la race bovine atteinte et à son état immunitaire. Certaines races bovines sont plus sensibles que d'autres ; les races laitières et les races à peau fine chez lesquelles les femelles et les petits développent des symptômes plus sévères que chez les mâles (Babiuk *et al.*, 2008; Ayelet *et al.*, 2013).



Figure 6. Manifestations cliniques de la DNC : Apparition de nodules chez des bovins atteints de dermatose nodulaire contagieuse : A. Au niveau du cou et de la région abdominale, B. Au niveau de la tête (Zeynalova *et al.*, 2016).

1.2. La variole ovine et la variole caprine

Les infections par le virus de la variole ovine et par celui de la variole caprine ne sont pas cliniquement différenciables. Néanmoins, il existe une préférence d'hôte notable pour la plupart des souches de SPPV et GTPV, causant des symptômes plus sévères chez leurs hôtes

homologues (Kitching *et al.*, 1985). L'infection présente une période d'incubation de 8 à 13 jours suivie d'une hyperthermie de 40°C (Bhanuprakash *et al.*, 2006; Bowden *et al.*, 2008). Théoriquement, la variole peut s'exprimer sous une forme cutanée et/ou sous une forme généralisée.

Pour la forme cutanée, au cours du premier tableau clinique, quatre états lésionnels se forment et se succèdent dans l'ordre : la phase d'invasion, la phase d'éruption, la phase de sécrétion et la phase de dessiccation pour donner dans l'ordre : macule, papule, pustule et croûte (Murray *et al.*, 1973). Leur localisation touche principalement les régions glabres de la peau. Généralement, les papules peuvent envahir plus de 50% de la surface de la peau surtout dans les régions à poils courts telles que les aisselles, l'aîne, le périnée, la face ventrale de la queue, le museau et les oreilles.

Ces papules évoluent ensuite en vésicules qui sont des lésions caractéristiques des poxviroses (Figure 7) (Murray *et al.*, 1973). Les animaux guérissent en gardant des séquelles cutanées. Concernant la forme généralisée, il se rajoute particulièrement au tableau antérieur le développement de troubles respiratoires aigus avec broncho-pneumopathies. D'autres fonctions organiques sont aussi gravement altérées causant généralement la mort de l'animal.

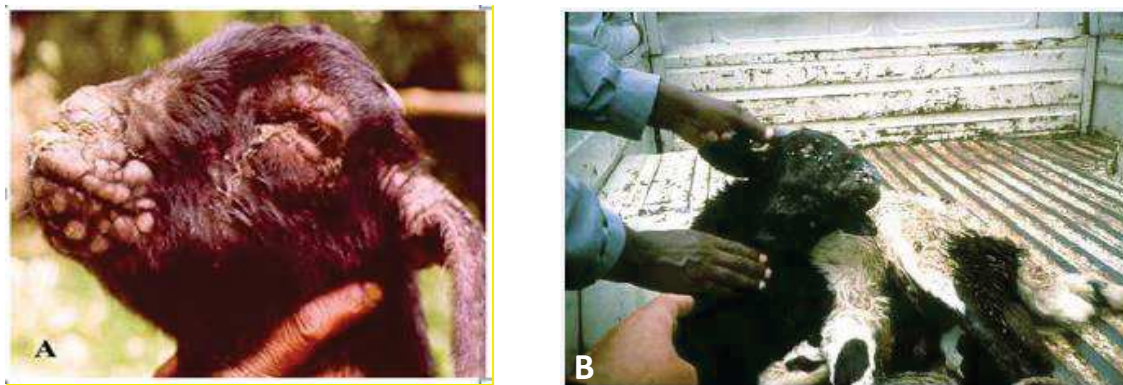


Figure 7. Lésions papulo-vésiculeuses A. chez un caprin atteint de variole caprine (Bhanuprakash *et al.*, 2011) B. chez un ovin atteint de variole ovine (Gitao *et al.*, 2017).

En conclusion, les infections à *Capripoxvirus* peuvent être confondues avec d'autres pathologies de l'élevage des ruminants d'origine virale, bactérienne et parasitaire. Le tableau 2 illustre les principales pathologies pouvant être confondues cliniquement avec les infections à *Capripoxvirus*.

Tableau 2. Diagnostic différentiel des *Capripoxvirus*.

Types de pathologies pouvant se confondre avec les infections à <i>Capripoxvirus</i>	Observations cliniques spécifiques
Ecthyma contagieux (Orf, Parapoxvirus)	Papules qui évoluent en vésicules puis en croûtes qui se dessèchent envahissant le pourtour de la bouche. Forme papillomateuse en « chou fleur » possible mais rare
Bluetongue (BTV, Orbivirus)	Fièvre intense, congestion de la langue, salivation, boiterie et immobilité, enflure de la face, ulcères des gencives et des lèvres, avortement et stérilité
Peste des petits ruminants (PPRV, Morbillivirus)	Forte hyperthermie, congestion des muqueuses buccales et oculaires, larmoiement, jetage spumeux, avortement, complications digestives (diarrhée profuse)
Herpes virus (pseudo LSD)	Forme souvent inapparente chez les ovins mais fatale chez les bovins. Fièvre, écoulement nasal et oculaire avec une opacification de la cornée, signes neurologiques (ataxie, nystagmus)
Lymphadénite caséuse (<i>Corynebactérium pseudotuberculosis</i>)	Deux formes possibles : interne ou externe. Abscès en regard des nœuds lymphatiques superficiels ou au niveau des tissus sous cutanés, abcès mammaires fréquents chez les femelles
Gale (Sarcoptes, Psoroptes)	Très forte contagion, trois formes - Gale sarcoptique : localisée au niveau de la tête, prurit intense - Gale choriotique : localisée aux pattes (lésions podales) et au scrotum chez le mâle - Gale psoroptique : gale du corps aspect modifié de la toison
Pneumonie parasitaire (Strongyloses respiratoires)	Jetage, larmoiement, fièvre, dyspnée accompagnée de bronchite et d'une bronchopneumonie chronique
Morsures d'insectes	Rougeur, prurit, zone d'inflammation remplie de liquide
Photosensibilisation	Animaux à robes foncées : Eczéma de la face Animaux à peau claire : nécrose et escarres généralisées

2. Lésions observées

2.1. Lésions macroscopiques

Les lésions typiques des capripoxviroses commencent vers le 6^{ème} jour post infection, et envahissent les surfaces muqueuses de la cavité buccale, la cavité nasale, la langue, la conjonctive et la face interne des lèvres. Ces lésions peuvent être accompagnées de rhinites avec des sécrétions nasales muco-purulentes et d'une hyper-salivation. La plupart des animaux affectés présentent des zones de nécrose multifocales et circonscrites au niveau du tractus respiratoire (museau, cavité nasale, larynx, trachée et bronches), de la cavité buccale (partie interne des lèvres et gencives), de l'estomac, de la caillette, de l'utérus, du vagin, des trayons, de la mamelle, des testicules. Les lésions de nécrose observées sur les testicules peuvent engendrer une orchite aigue qui peut progresser en une fibrose et une atrophie des testicules engendrant une infertilité temporaire ou permanente voire une stérilité, de même les lésions de l'appareil génital de la vache peuvent induire une infertilité. Les nodules observés au niveau du pis et du trayon peuvent se compliquer par une mammite, et les lésions du trayon peuvent conduire à une distorsion du canal du trayon conduisant à des infections bactériennes ascendantes (Bhanuprakash *et al.*, 2006). Une lympho-adénopathie est aussi observée avec une hyperplasie lymphoïde accompagnée d'un œdème surtout au niveau des nœuds lymphatiques pré-scapulaires.

2.2. Lésions microscopiques

Les *Capripoxvirus* provoquent, d'abord au niveau de l'épiderme, des lésions d'hyperkératose et de parakératose avec une dégénérescence des cellules épithéliales (Rao *et al.*, 1994), suivie d'une apparition d'inclusions cytoplasmiques provoquant une hyperplasie épithéliale et une prolifération des cellules endothéliales (Asagba *et al.*, 1981). Au niveau du derme, on observe une infiltration par des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes, accompagnée d'une vascularite qui peut provoquer une thrombose voire un infarctus. Les cellules infectées par le virus de la variole ovine appelées « Sheep poxcells » ou cellules claveleuses de Borrel ont une morphologie caractéristique avec un cytoplasme vacuolaire abondant, et de nombreux corps d'inclusions intra cytoplasmiques en position juxta-nucléaire (Bhanuprakash *et al.*, 2006). Ces cellules incluent les monocytes, les macrophages et les fibroblastes et sont considérées comme des sites de réplication du virus (Embury-Hyatt *et al.*, 2012). Au niveau du poumon, on note une hyperplasie épithéliale des alvéoles, des bronches et des bronchioles, avec une infiltration

de macrophages. De plus, on retrouve des cellules claveleuses dans les espaces alvéolaires provoquant un œdème. Au niveau du foie, on note plusieurs foyers de nécrose avec une perte des hépatocytes dans les zones avoisinantes ; les cellules claveleuses y sont aussi présentes avec un large noyau vacuolaire (Singh IP, 1979; Gulbahar *et al.*, 2006; Embury-Hyatt *et al.*, 2012).

VII. Diagnostic de laboratoire

Même si les lésions cutanées observées lors des infections à *Capripoxvirus* sont pathognomoniques, il est impératif d'avoir recours à l'expertise du laboratoire pour confirmer le diagnostic posé. Le diagnostic de laboratoire peut se réaliser de deux manières distinctes : (i) détection de l'agent pathogène lui-même dans le prélèvement, par des techniques d'amplification et d'isolement, (ii) détection de marqueurs de la présence de pathogènes dans l'organisme au moyen de techniques immuno-sérologiques de type ELISA, Immunofluorescence et séroneutralisation (Babiuk *et al.*, 2009).

1. Détection directe de l'agent pathogène

La mise en évidence de l'agent viral et/ou de ses constituants à partir d'un échantillon suspect exige certaines conditions de récolte, d'envoi, de transport et de traitement du prélèvement initial. Plusieurs techniques optimisées et variables en termes de sensibilité et de spécificité permettent la détection des *Capripoxvirus*.

1.1.L'isolement viral sur culture cellulaire

L'isolement viral consiste à l'inoculation sur cellules permissives d'un broyat d'échantillon suspect. Les cellules infectées développent un effet cytopathique (ECP) caractéristique des *Capripoxvirus* : rétraction de la membrane cellulaire, arrondissement des cellules et margination de la chromatine nucléaire (Plowright *et al.*, 1958).

Les *Capripoxvirus* sont capables de se multiplier dans différents types de cellules d'origine bovine, ovine et caprine mises en culture. Cependant, les cultures primaires et/ou secondaires de cellules de testicules d'agneaux et de reins d'agneaux restent les plus sensibles pour un isolement viral (Ferris *et al.*, 1958). Les avancées de la recherche ont pu élargir la liste du support cellulaire sensible aux *Capripoxvirus* avec, entre autres, les cellules de muscle de fœtus bovin (Binopal *et al.*, 2001) et les lignées cellulaires de testicules d'ovins (OA3.Ts) (Babiuk *et al.*, 2007). Les *Capripoxvirus* sont capables de s'adapter à plusieurs systèmes cellulaires

hétérologues tels que des cellules de rein de singe vert Africain (Vero) ou bien à des administrations *in ovo* (OIE, 2010).

1.2. Microscopie électronique

Elle peut être réalisée directement sur des cellules en culture inoculées et /ou de lésions cutanées. L'examen optique exige des coupes ultra-minces de l'ordre du μm d'épaisseur. Un contraste intracellulaire est révélé par une coloration au nitrate d'argent. Ce contraste permet la visualisation des particules virales et permet d'identifier les Capripoxvirus jusqu'à 33 jours post-infection (Figure 8) (Tuppurainen *et al.*, 2005). Cependant, cette technique ne permet pas de différencier les trois virus (LSDV, SPPV et GTPV) du genre *Capripoxvirus* (Kitching *et al.*, 1986b) ni même entre les virus des deux genres *Orthopoxvirus* et *Capripoxvirus*. Cependant, il existe d'autres variantes techniques qui viennent compléter l'examen optique ; à titre d'exemple, les colorations immuno-histochimiques qui mettent en évidence les particularités structurales des deux genres *Capripoxvirus* et *Orthopoxvirus* (Babiuk *et al.*, 2008; OIE, 2010).

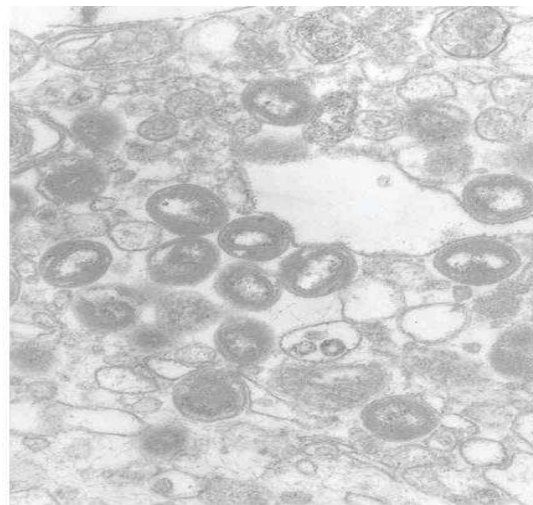


Figure 8. Coloration positive de particules virales de Sheep poxvirus en cours de morphogénèse (p.i : post infection). (EmnaFakhfakh, communication personnelle).

1.3. La Polymerase Chain Reaction (PCR)

Le principe de la PCR consiste en l'amplification ciblée d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires à partir d'un génome donné (Saiki *et al.*, 1988). Plusieurs variantes ont été développées dont les PCR de type conventionnel ou en temps réel. Plusieurs d'entre elles ont été développées ces dernières années pour le diagnostic spécifique des infections à *Capripoxvirus*. Le tableau 3 résume les principales techniques de PCR optimisées depuis 1989 pour le contrôle des infections à *Capripoxvirus*. Une autre technique, la technique LAMP (Loop-mediated isothermal AMplification), n'utilisant pas la Taq polymérase mais permettant toutefois d'amplifier le génome des *Capripoxvirus*, a été plus récemment développée (Notomi *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2013).

1.4. Les techniques basées sur des réactions immunologiques

Le principe de base de ces techniques est la détection d'un ou plusieurs antigènes à partir d'un prélèvement donné. La révélation positive de complexes immuns confirme la présence de l'agent pathogène recherché. Plusieurs techniques ont été mises au point dont la technique ELISA directe (Carn, 1995), l'immuno-diffusion sur gélose (IDG) (Chand *et al.*, 1994) et la contre-immunoélectrophorèse (CIE) (Sharma *et al.*, 1988). Leur utilisation reste limitée en matière de diagnostic de routine des infections à *Capripoxvirus*. L'interprétation du test IDG est compliquée par l'occurrence de réactions croisées avec les *Parapoxvirus* (Kitching *et al.*, 1986a).

Le test d'agglutination des particules de latex (LA) est une technique de criblage des antigènes spécifique des *goatpoxvirus*, réalisé à partir de croûtes d'animaux infectés et praticable sur terrain pour la détection des infections à *goatpox virus*. Cette technique est rapide, simple, économique et est à développer pour les autres membres du même genre (Rao *et al.*, 1996).

Tableau 3. Principales techniques PCR permettant le diagnostic des *Capripoxvirus*, 1999-2014. Conv : conventionnelle ; TR : temps réel.

Nature et type de PCR	Gène détecté	Séquences des amorces	Taille amplifiée	Commentaires	Références bibliographiques
PCR Conv.	- Protéine virale d'attachement H3 - Protéine virale de fusion A27	A : tccgagctcTTTCCTGATTTTCTTACTAT et tatgttacctAAATTATATACGTAAATAAC F : tatgttacctAAATTATATACGTAAATAAC et gctgcaggaattcTCATAGTGTGTACTTCG	A : 192pb F : 472pb	Technique sensible et spécifique	(Ireland <i>et al.</i> , 1998)
PCR conv.	P32	P32F -CACGGATCCATG GCA GAT ATC CCA TTA P32R -AATGGATCCTAAAATTAGAGAGCTATACTTCTT	1000pb	Différenciation entre les souches de LSDV et SPPV	(Heine <i>et al.</i> , 1999)
PCR conv.	ITR	KS1 : GTG TGA CTT TCC TGC CGA et TCT ATT TTA TTT CGT ATA TC Ins-1 : AGA AAC GAG GTC TCG AAG CA et GGA GGT TGC TGG AAA TGT GT	KS1 : 149 pb Ins-1 : 289 pb	Différenciation entre SPPV et Orf	(Mangana-Vougiouka <i>et al.</i> , 1999)
PCR multiplex	Ins-1 α tubulin	Une paire d'amorces supplémentaires α -tubulin non spécifiques aux Capripoxvirus par rapport à Mangana, 1999 : 5' CAC CCG TCT TCA GGG CTT CTT GGT TT 3' et 5'CAT TTC ACC ATC TGG TTG GCT GGC TC 3'	KS1 : 149pb Ins-1 : 289pb A-tubulin : 527 pb	Différenciation entre les sheep poxvirus et virus Orf	(Markoulatos <i>et al.</i> , 2000)
PCR duplex	A29L (SP et GTP) et P55 (Orf)	A29L : 5' AACTGCCGTCAATGAAGAATGG 3' et 5' TTTCAAAGCTTGTTTTAAACGTRGG 3' P55 : 5' AGGCGGTGGAATGGAAAGA 3' et 5' CCAGCAGGTATGCCAGGATG 3'	A29L : 413pb P55 : 708pb		(Zheng <i>et al.</i> , 2007)

PCR multiplex	I3L SPPV E9L parapox	I3L : Fwd1 GCCAGGAACCTTTATATTCGATG et Fwd2 GATATAGAATAGGGCTAGTTGCAG et Rev CATCAAAAATGACATCTACATATATAGC E9L : CTG CGG TAC CTG GAC TCG C et TCT CGG TGC GCT GGA TGA A	SPPV : 296 et 133pb GTPV : 133 pb ORF : 214 pb	Différenciation entre SPPV, GTPV et Orf	(Venkatesan <i>et al.</i> , 2014a)
Real time duplex PCR	P3 (CAPv) OV-RT (Orf)	P3 : GGAATGATGCCRTCTARATTCCTATC et CCCTGAAACATTAGTATCTGTATTTGTTGC avec sondeCy5-CATCRCATCTAGGTTTCRAATGGATT- TAMRA OV-RT : TACACGGAGTTGGCCGTGATCTTGTA et CGCCAAGTACAAGAAGCTGATGA avec sonde Hex- TGCATCGAGTTGTAGATCTCGCGGT-BHQ-1	P3 : 179 pb OV-RT : 103pb		(Venkatesan <i>et al.</i> , 2014b)
PCR multiplex	P32 (GTPV) B2L (Orf) ARN16S (Mycoplasma capri –colum subsp Capri- pneumoniae)	P32 : 5'-CTCATTGGTGTTCGGATT-3' et 5'-ATGGCAGATATCCCATTA-3', B2L 5'-CGAACTTCCACCTCAACCACTCC-3' et 5'-CCTTGACGATGTCGCCCTTCT-3' MCCP 5'-CGAAAGCGGCTTACTGGCTTGT-3' et 5'-CGAAA GCGGCTTACTGGCTTGT-3'	P32 : 969 pb B2L : 507 pb MCCP : 548 pb	Détection simultanée	(Chu <i>et al.</i> , 2011)
PCR-RFLP	P32	Mêmes amorces que Heine, 1999	GTPV : 1024 SPPV : 1027		(Hosamani <i>et al.</i> , 2004a)
PCR duplex et PCR-RFLP	Gène d'attachement et de fusion	A : TCC GAG CTC TTT CCT GAT TTT TCT TAC TAT et TAT GGT ACC TAA ATT ATA TAC GTA AAT AAC F : ACT AGT GGA TCC ATG GAC AGA GCT TTA TCA et GCT GCA GGA ATT CTC ATA GTG TTG TAC TTC G	F : 472 pb A : 191 pb	Différenciation entre les souches de SPPv et GTPV :	(Fulzele, 2006)
PCR conv	RP030 (homologue à E4L de la vaccine)	Cp RNA polfF : ATT CGT TTA TCG CAG AAC AAG G et Cp RNA polfR : CAC CAA CCA TAG AAT AGT ATT GAG AC	SPPV : 151 pb GTPV : 172pb	Discrimination entre les souches de GTPV et SPPV :	(Lamien <i>et al.</i> , 2011a)
PCR conv	Partie terminale du génom (ITR)	Ins-1 :AGA AAC GAG GTC TCG AAG CA et GGA GGT TGC TGGAAA TGT GT	289pb		(Zro <i>et al.</i> , 2014)

qPCR et PCR conv	DNA polymérase	PCR Conv : ACACCACCAACGCCTTTATGA et TTACGGTATATTTCAAACAGATTAGAG qPCR : FP3 : GGA ATG ATG CCR TCT ARA TTC CTA TC et RP3 CCC TGA AAC ATT AGT ATC TGT ATT TGT TGC avec sonde 5'-Cy5-CATCRCATCTAGGTTTCRCAATGGATT- 39-TAMRA	PCR conv : 134 pb qPCR : 180 pb		(Balamurugan <i>et al.</i> , 2009)
qPCR	ORFs 24 Sur 8 souches CAPs (LSDV, SPPV et GTPV)	Fw : GGCGATGTCCATTCCCTG Rev : AGCATTTTCATTTCCGTGAGGA Taqman probe : CAATGGGTAAAAGATTTCTA		Détection du virus à partir du buffy coats, écouvillons nasal et oral, crôutes, lésions cutanées, NL et poumon	(Balinsky <i>et al.</i> , 2008)
qPCR	P32	Fw : AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTGGAA Rev AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA_ TaqMan probe 5_-6FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT- MGB/NFQ	89pb	Pas de réactions croisées avec les autres poxvirus Sensibilité de 100%	(Stubbs <i>et al.</i> , 2012)
qPCR	GPCR G- protein- coupled chemokine receptor	GpCrF Forward: AAT GTT CGT ATA AAT GTA ATA AAG GpCrF Reverse: TAC AAA TCC AAC AAT GAT T CpRt Forward: GAT AGT ATC GCT AAA CAA TGG CpRt Reverse: ATC CAA ACC ACC ATA CTA AG Cp-LNA-FAM1: ACC TAG CTG TAG TTC ACC CAG TAA A-FAM-3 Cp-Cy5: Cy5 TCA ATT TCA ATA AGG ACA AAA CGA TAT GGA-3-phosphate	200pb	Détection, différenciation et quantification simultanée de différentes souches de capripoxvirus, technique sensible et spécifique	(Lamien <i>et al.</i> , 2011b)

2. Identification des *Capripoxvirus* par voie indirecte (techniques immuno-sérologiques)

Cette identification repose cette fois-ci sur la détection de la réponse sérologique, ayant recours à différents types de tests permettant de mettre en évidence la production d'anticorps dirigés contre les *Capripoxvirus* : la technique de séroneutralisation, le test d'immunofluorescence (IFAT, Indirect fluorescent Antibody Test) et le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (OIE, 2004). La distinction sérologique entre les membres du genre *Capripoxvirus* est impossible étant donné leur similarité génomique (Davies *et al.*, 1981).

2.1. Test de séroneutralisation virale

C'est la méthode de référence pour le diagnostic des infections à *Capripoxvirus*. Deux méthodes existent, soit à sérum constant soit à virus constant qui consistent respectivement à mesurer la neutralisation virale en présence de dilution sériques (concentration virale unique) ou en présence de dilutions du virus (concentration sérique unique) (OIE, 2004; Gari *et al.*, 2012).

2.2. Test ELISA indirect

Le développement d'un test ELISA sensible et spécifique pour la détection des anticorps anti-Capripoxvirus est nécessaire dans le cadre de la mise en place d'un réseau de surveillance sérologique. Le facteur déterminant est l'identification d'un antigène immuno-dominant qui doit être stable et facile à purifier. La sélection d'un tel antigène, exprimé par un vecteur approprié, offre la perspective du développement d'un test sérologique acceptable et standardisé. Pour cela, plusieurs protéines-candidates ont été testées telles que les protéines 095 et 103 du core du sheep poxvirus à fort potentiel antigénique (Bowden *et al.*, 2009). Par ailleurs, la protéine P32 entière (homologue à la protéine H3L du virus de la vaccine) exprimée soit en *Escherichia coli* (Carn *et al.*, 1994; Heine *et al.*, 1999) soit en *Pichia Pastoris* (Bhanot *et al.*, 2009) a été utilisée ; de même que deux peptides synthétiques (92-118 et 156-175) de cette même protéine P32 (Tian *et al.*, 2010). Les particules virales entières de la souche Nigeria du Sheep poxvirus inactivée ont été également évaluées (Babiuk *et al.*, 2009). A ce jour, le recours au test ELISA de type indirect pour le diagnostic des infections à *Capripoxvirus* reste très limité.

2.3. Test d'immunofluorescence indirect (IFAT, Indirect Fluorescence Antibody Test)

Ce test de par sa très bonne sensibilité (92%) et spécificité (88%), est utilisé couramment comme technique de diagnostic, notamment en Afrique dans les laboratoires équipés d'un microscope à fluorescence (Gari *et al.*, 2008; Gari *et al.*, 2012). Cependant, Des réactions croisées avec les virus du genre *Parapoxvirus* (Orf) ou du genre *Orthopoxvirus* (cowpox) ont été observées (Davies *et al.*, 1981; Bowden *et al.*, 2009).

2.4. Western blot

Son principe repose sur la reconnaissance de protéines virales spécifiques par les anticorps dirigés contre ces protéines contenus dans le sérum à tester. C'est un test spécifique et sensible qui reste, cependant, coûteux mais présente l'avantage de différencier les anticorps provenant d'animaux infectés avec les espèces du genre *Capripoxvirus* et *Parapoxvirus*, contrairement à la majorité des techniques sérologiques qui détectent, elles, la réponse en anticorps totaux à l'exception de la séroneutralisation (Chand *et al.*, 1994).

VIII. Moyens de lutte et limites

Les mesures de prévention et de lutte contre les infections à *Capripoxvirus* sont mises en œuvre dans de nombreux pays affectés. Elles correspondent à des programmes d'action différents d'un pays/région à l'autre reposant sur deux grands axes, la prophylaxie sanitaire et la vaccination.

1. Prophylaxie sanitaire

Elle est pratiquée en régions indemnes et infectées avec des mesures préventives appropriées. Les pays non infectés par les *Capripoxvirus* exercent une surveillance passive et continue au niveau des importations d'animaux sur pieds et de leurs produits dérivés (carcasses, cuirs, laine, peaux, semence). Ils disposent d'une police sanitaire solide qui applique l'abattage rapide des animaux atteints et ceux qui ont été en contact avec ces derniers (Tuppurainen, 2014). La politique tenue dans les régions/pays infectés est toute autre. Elle repose sur plusieurs mesures sanitaires imposées par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE, Office International des Epizooties) et les services vétérinaires de ces pays : respect d'une quarantaine à chaque introduction de nouvel animal, déclaration de foyers, suivi de transhumance. A chaque déclaration de foyers, les animaux doivent être isolés avec interdiction de tout type de

déplacement. La pratique de l'abattage s'applique à tout animal malade avec incinération des cadavres. La désinfection des locaux doit toujours suivre le traitement d'un foyer à Capripoxvirus (Tuppurainen *et al.*, 2014; Tuppurainen *et al.*, 2015).

La propagation de la DNC est liée à l'abondance et aux mouvements actifs et passifs (par le vent) des *Stomoxys* adultes combinés, aux déplacements des ruminants infectés et transportés. La lutte anti-vectorielle paraît difficile voire impossible du fait de cette dispersion et du grand nombre de gîtes larvaires. Cependant, cette lutte est nécessaire pour essayer de contrôler les différentes maladies vectorielles qui affectent les bovins notamment la DNC. Cette lutte anti-vectorielle doit associer impérativement des moyens mécaniques, biologiques et chimiques.

Les moyens mécaniques consistent d'une part, en une gestion des lieux de reproduction par le déplacement des aires d'affouragement ce qui permet la destruction des formes larvaires (Hogsette *et al.*, 1987) et d'autre part, au piégeage des adultes en utilisant des pièges électriques, les stomoxes, insectes diurnes, étant attirés par les rayons UV puis électrocutés. Ce piégeage peut aussi se faire en utilisant des bandes collantes (Weidhaas *et al.*, 1987). Une des techniques de lutte biologique qui a donné un bon résultat a été conduit dans une ferme biologique et a consisté en un lâcher d'espèces de parasites de pupes de stomoxes (hyménoptères) toutes les deux semaines ce qui a permis de contrôler les populations de *Stomoxys Calcitrans* (Skovgard *et al.*, 2004).

Enfin, vient la lutte chimique qui constitue le volet le plus important de cette lutte anti vectorielle. Cette lutte chimique consiste en l'utilisation de neurotoxiques ou de régulateurs de croissance. De nouvelles familles de neurotoxiques ont remplacé les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates qui sont de plus en plus interdits vu leur toxicité. Les neurotoxiques qui sont le plus souvent utilisés sont les pyréthrinés naturels ou de synthèse surtout de deuxième génération comme la perméthrine, la deltaméthrine. Les néonicotinoïdes sont aussi utilisés surtout en applications murales pour la lutte contre les stomoxes. Ces deux derniers produits ont l'avantage d'être faiblement toxiques. Les lactones macrocycliques sont aussi utilisées pour la lutte contre les larves des insectes.

A part les neurotoxiques, les régulateurs de croissance vont inhiber la reproduction des insectes ; ils peuvent agir comme analogue de l'hormone juvénile ou en inhibant la synthèse de la chitine. Ces insecticides doivent être appliqués aussi bien dans le milieu extérieur (murs des locaux, gîtes de repos, poteaux, bassins...) que sur les bovins. Pour cela, plusieurs formes

d'insecticides sont commercialisées et peuvent être appliquées en pulvérisation, en boules ou plaquettes auriculaires et en « pour-on » (Salem *et al.*, 2012). Une lutte efficace contre ces vecteurs peut servir à réduire le taux de transmission de la dermatose nodulaire contagieuse. Il faut noter que lors d'utilisation des insecticides, il faut tenir compte du temps d'enregistrement et de retrait du lait et de la viande. L'utilisation à grande échelle d'insecticides dans l'environnement n'est pas recommandée car elle peut être nocive pour l'équilibre écologique et les risques pour l'environnement ne sont pas entièrement compris. Il faut donc privilégier la limitation des sites de reproduction de vecteurs, comme l'eau stagnante, le changement du fumier, qui sont des moyens durables, abordables et respectueux de l'environnement (Tuppurainen *et al.*, 2016).

Ces mesures ainsi appliquées participent largement à limiter la propagation de l'infection virale et à assainir le statut sanitaire du pays concerné. Néanmoins, en régions infectées, elles restent insuffisantes pour une éradication totale de la maladie, la vaccination devant impérativement faire partie du plan de lutte contre les infections à *Capripoxvirus*.

2. Prophylaxie médicale

Elle concerne l'administration de différents types de vaccins en fonction du statut sanitaire de la zone à vacciner.

2.1. Les souches vaccinales atténuées

Dans les pays endémiques pour les infections à *Capripoxvirus*, la vaccination représente un outil central au sein des stratégies de contrôle mises en place. Plusieurs types de vaccins ont été développés et sont commercialisés. Les tout premiers vaccins utilisaient des souches vivantes qui provenaient d'animaux développant des signes cliniques limités en combinaison avec des antisérums provenant d'animaux convalescents (Borrel, 1903). L'injection de ces souches à des animaux susceptibles a provoqué des réactions sévères voire fatales, ce qui a encouragé la communauté scientifique à développer des vaccins conférant une meilleure protection par inactivation ou atténuation (Kitching, 1983). Ce sont principalement les vaccins vivants atténués, faciles à produire qui sont utilisés en régions infectées. Bien qu'ils engendrent des effets secondaires de gravité variable, ils confèrent une immunité solide et durable.

En zone indemne, l'usage des vaccins vivants atténués est généralement interdit puisqu'il peut entraîner la dissémination du virus dans la région traitée. Cependant, dans certaines situations d'urgence, comme lors d'apparition de foyers de LSD en 2016 dans plusieurs régions d'Europe (Bulgarie, Nord de la Grèce, Serbie), des pays indemnes comme la Roumanie et la Croatie ont instauré un programme de vaccination d'urgence par l'utilisation d'un vaccin vivant, considérant que c'était l'option la plus efficace pour la réduction de la dissémination du virus LSD dans d'autres régions en Europe (Gavinelli *et al.*, 2017). Néanmoins, dans ces zones, l'utilisation des vaccins inactivés est à préférer même si l'immunité induite par les souches inactivées n'est pas optimisée. Les épreuves expérimentales se poursuivent dans ce sens (Tuppurainen *et al.*, 2015; Boumart *et al.*, 2016).

La liste des souches vaccinales de *Capripoxvirus* étant longue ; les tableaux suivants illustrent les principaux vaccins développés reposant sur des souches vaccinales atténuées ou inactivées utilisées chez les bovins (Tableau 4), ovins (Tableau 5) et caprins (Tableau 6).

Tableau 4. Liste des souches vaccinales atténuées de DNC/LSD.

Identifiant de la souche vaccinale	Nature de la souche utilisée	Méthode d'obtention	Espèce testée	Effets secondaires enregistrés	Références
10X RM65 Souche Yougoslave (Jovivac)	SPPV	Atténuation par 30 passages sur des cellules de rein d'ovins	Bovins/dose 10 fois supérieure à celle utilisée chez les ovins ; Protection incomplète	11% des bovins vaccinés ont développé des signes cutanés (nodules), différence entre les bovins laitiers et d'engraissement	(Brenner <i>et al.</i> , 2009; Abutarbush <i>et al.</i> , 2014; Ben-Gera <i>et al.</i> , 2015)
Neethling	LSDV	Atténuation par 60 passages sur des cellules rénales d'agneaux et 20 passages sur membrane chorioallantoïdienne	Bovins/Plus efficace que 10XRM65 dans la prévention de LSDV	Effets secondaires rares : 0,38% des bovins ont présenté une forme de LSDV. Peut causer une faible incidence de la maladie	(Ben-Gera <i>et al.</i> , 2015)
KSGP 0-240	LSDV	Atténuation par 3 passages sur des cellules de plexus choroïde, suivie de 3 passages sur des cellules pulmonaires fœtales d'agneau puis 3 passages sur cellules Vero	Bovins/Protection incomplète	Virulence résiduelle causant des signes cliniques chez les bovins vaccinés (faible niveau d'atténuation)	(Tuppurainen <i>et al.</i> , 2014)

KSGP 0-180	LSDV	Atténuation par 18 passages sur des cellules musculaires fœtales bovines	Bovins/5 animaux sur 10 ont présenté des signes cliniques. Pas de protection observée	Aucun effet secondaire observé	(Gari <i>et al.</i> , 2015)
KSGP (KS-1)	LSDV	Atténuation de la souche KSGP 0-240	Bovins	Réactions secondaires (morbidité22%, mortalité2%), protection partielle des bovins contre une infection naturelle de LSDV (virulence résiduelle)	(Ayelet <i>et al.</i> , 2013)
Gorgan (CapriVac)	GTPV	Atténuation par passage, souche goat poxvirus	Bovins/Protection de tous les bovins contre LSDV. Réponse cellulaire importante (haut niveau d'immunogénicité)	Aucun effet secondaire observé	(Gari <i>et al.</i> , 2015)
WB005KO (LSDV Afrique du Sud)	LSDV	Atténuation par délétion du gène codant pour l'IL-10	Bovins/Bonne immunité humorale et cellulaire, animaux protégés suite à un challenge virulent	Aucun signe clinique développé (souche non utilisée sur le terrain)	(Boshra <i>et al.</i> , 2015)

Tableau 5. Liste des souches vaccinales de sheep poxvirus atténuées et inactivées.

Identifiant de la souche vaccinale	Méthode d’obtention	Espèce testée	Effets secondaires enregistrés	Références	
Souches vaccinales vivantes atténuées (Non autorisées dans les pays indemnes)	RM65	Immunité solide induite chez les ovins, résistance des animaux à un challenge suite à une seule dose vaccinale	Pas de réactions secondaires sévères ; pustules au niveau du point d’injection	(Ramyar, 1968)	
	Ranipet	Atténuation par 35 passages sur des cellules thyroïdiennes d’ovins	Ovins	Aucune réaction secondaire observée	(Anandan, 1972)
		Atténuation par 50 passages sur des lignées cellulaires de testicules d’agneaux	Agneaux, animaux de laboratoire (cochons d’Inde et souris) protection des animaux pendant 6 mois	Pas de réactions secondaires chez les animaux de laboratoire. Zone d’inflammation discrète chez les agneaux vaccinés	(Bhanuprakash <i>et al.</i> , 2004)
	Roumanian Fanar	Atténuation par 25 passages sur des cellules de testicules d’agneaux	Protection des animaux pendant 12 mois		(Penkova, 1974)
		Atténuation par 30 passages sur des cellules de rein d’agneaux	Augmentation du taux d’anticorps neutralisants chez les ovins vaccinés Immunité < 2 ans (rappel annuel nécessaire)	Vaccin fiable. Présence de nodules au site d’injection, élévation de la température de 1°C, pas de réactions défavorables pour la gestation.	(Precausta, 1979)
	KSGP O-240	Atténuation par 6 passages sur cellules	Efficace pour le contrôle des Capripoxvirus au Moyen Orient chez les ovins et caprins. Protection des animaux substantielle < 1an	Vaccin sûr et stable	(Kitching <i>et al.</i> , 1987)
	KSGP O-180	Atténuation par 18 passages sur des cellules de muscle fœtal			
Souches vaccinales inactivées	Jaipur	Protection des animaux pendant 120 jours	Immunité à court terme, quantité importante d’antigènes requise	(Bhanuprakash <i>et al.</i> , 2011)	
	Roumanian	Protection des animaux pendant 9 mois, nécessité d’un rappel annuel. Animaux protégés après challenge	Vaccin plus sûr que la souche atténuée. Aucun effet secondaire chez les animaux vaccinés	(Boumart <i>et al.</i> , 2016)	

Tableau 6. Liste des souches vaccinales de Goat poxvirus atténuées et inactivées.

Identifiant de la souche vaccinale	Méthode d'obtention	Espèce testée	Effets secondaires enregistrés	Références
Mysore	Inactivée par ajout de 0,5% de formol Atténuée par 25 passages sur des testicules d'agneaux	Caprins/ Bonne protection	Réaction locale au niveau du site d'inoculation	(Dubey, 1978)
Gorgan (S. goatpoxvirus Jordanienne)	Ces deux souches caprines ont été utilisées pour vacciner les bovins contre LSDV	Caprins/Bovins (protection complète des bovins vis-à-vis d'un challenge virulent de LSDV)	Voir tableau LSDV	(Gari <i>et al.</i> , 2015)
Isilio/ Kedong		Protection complète chez les bovins contre LSDV		(Tuppurainen <i>et al.</i> , 2014)
AV41	Atténuation de la souche GTPV-AV40	Caprins/Bonne immunogénicité	Nodules cutanés généralisés, mortalité	(Huang <i>et al.</i> , 2004)

Le taux d'homologie de plus de 97% des différents génomes de *Capripoxvirus* (Tulman *et al.*, 2002), explique l'immunité croisée entre les trois virus du même genre. En effet, quelle que soit la souche atténuée appartenant au genre *Capripoxvirus* utilisée, une protection est assurée pour tous les membres du même genre. Une protection contre le virus LSD peut être assurée par des souches vaccinales caprines ou ovines (Carn, 1993; Brenner *et al.*, 2009; Boshra *et al.*, 2013).

2.2. Les vaccins recombinants multi-pathogènes

Du fait en particulier de leur large génome permettant l'insertion de gènes étrangers, les souches vaccinales atténuées de poxvirus ont été utilisées comme vecteurs vaccinaux multivalents afin de pouvoir exprimer des gènes immunodominants de pathogènes d'intérêt.

Le virus de la vaccine est un modèle de choix de vecteur d'expression vaccinale pour l'élaboration de vaccins recombinants ; le plus connu étant le vaccin contre la rage fondé sur la vaccine exprimant la glycoprotéine du virus rabique (Blancou *et al.*, 1986). Depuis, plusieurs souches d'*Orthopoxvirus*, d'*Avipoxvirus* mais aussi de *Capripoxvirus* ont vu le jour avec un certain nombre d'avantages : thermo stabilité, différenciation entre animaux infectés et animaux vaccinés (DIVA) (Tableau 7). Cette réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis des immunogènes peut être améliorée en augmentant l'efficacité du vecteur capripoxviral par la suppression de gènes immuno-modulateurs (IFN, IL-10, dUTPase, GM-CSFR) (Rziha *et al.*, 2000; Boshra *et al.*, 2013).

Tableau 7. Exemple de souches vaccinales basées sur des recombinants Capripoxvirus expérimentaux (Boshra *et al.*, 2013).

Maladie	Capripoxvirus utilisé	Protéine exprimée	Espèce cible	Référence
Peste bovine	KSGPO-240	Protéine de fusion F Hémagglutinine H	Bovins	(Romero <i>et al.</i> , 1993; Romero <i>et al.</i> , 1994)
Peste des petits ruminants	KSGPO-240 AV41	Protéine de fusion F Hémagglutinine H	Ovins Caprins	(Diallo <i>et al.</i> , 2002; Berhe <i>et al.</i> , 2003)
Bluetongue	KSGPO-240	VP7 NS1 NS3 VP2	Ovins Caprins	(Wade-Evans <i>et al.</i> , 1996; Perrin <i>et al.</i> , 2007)
Fièvre de la vallée du rift	KSGPO-240 Neethling	Glycoprotéines Gn et Gc	Ovins	(Wallace <i>et al.</i> , 2005; Wallace <i>et al.</i> , 2006; Soi <i>et al.</i> , 2010)

2.3. Les échecs de la vaccination

Le choix de la souche vaccinale, la dose et le mode de préparation des vaccins choisis sont des paramètres critiques qui conditionnent la qualité d'une campagne vaccinale réussie. Le choix d'une souche vaccinale est conditionné par son antigénicité et sa capacité à induire les deux types de réponse immunitaire, cellulaire et humorale. Ainsi, la sélection de souches de Capripoxvirus les plus antigéniques doit être faite en se basant sur la connaissance approfondie des souches de terrain qui circulent afin de tendre vers une protection optimale, vaccin injecté/souche circulante. Le cas échéant, la souche vaccinale choisie ne pourra protéger contre l'infection.

Chapitre 2 : Protéines spécifiques des capripoxvirus présentant un intérêt sur le plan immunologique : expression, production et caractérisation

I. Introduction générale sur les protéines

Les protéines, représentent des molécules complexes et variées jouant un rôle fondamental dans la structure et les fonctions cellulaires et la transmission de l'information génétique. Les exemples sont nombreux (Maupetit, 2007; Gheraibia, 2012).

1. Etude de la structure des protéines

D'une manière générale et schématique, une protéine est caractérisée à la fois par sa séquence liée à sa structure et sa fonction (Maupetit, 2007).

1.1. Généralités sur les bases structurales des protéines

Une protéine est une macromolécule constituée d'une longue chaîne d'acides aminés (ou résidus) organisée sous forme de séquence qui peut contenir jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de résidus. Il existe 20 acides aminés différents qui définissent une famille de composés tous structurés avec un atome de carbone (C) central (carbone α) lié à quatre groupes de molécules : le groupe amine, le groupe carboxyle, le groupe hydrogène, et la chaîne latérale R qui elle différencie chacun des acides aminés (Figure 9).

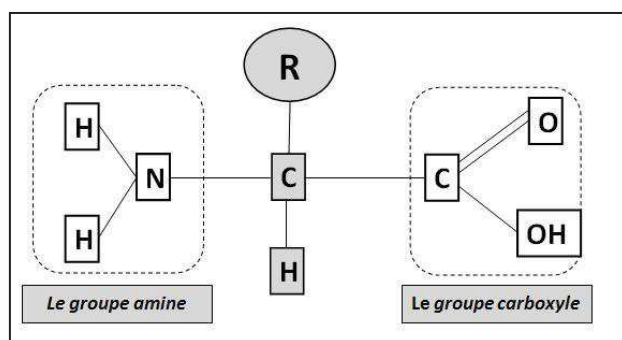


Figure 9. Représentation schématique d'un acide aminé (Robert *et al.*, 2008) (R, chaîne latérale ; C, Carbone, N, Azote, O, Oxygène, H, Hydrogène).

La structure d'une protéine est définie selon quatre niveaux : primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire comme le montre la figure 10 ci-dessous.

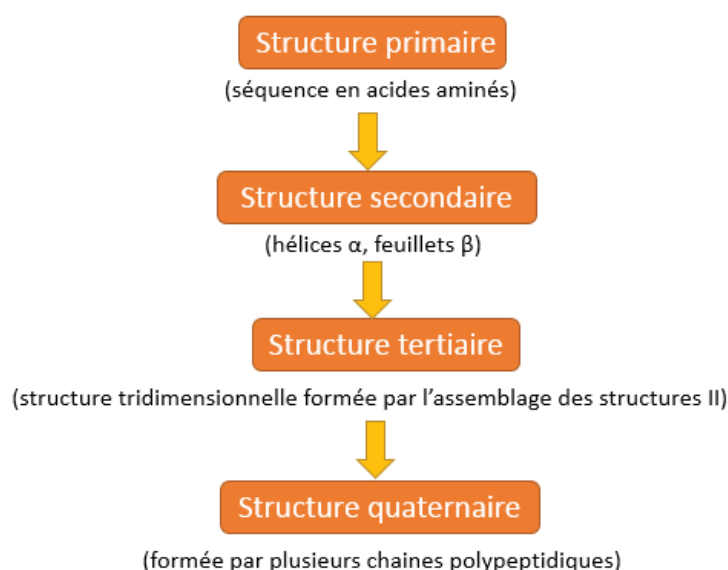


Figure 10. Représentation hiérarchique de la structure des protéines (Torgeir, 2008).

1.1.1 Structure primaire

La structure primaire correspond uniquement à la séquence en acides aminés. Le squelette de cette structure est défini par la conformation spatiale des carbones alpha reliés entre eux formant alors une chaîne. Par ailleurs, en complément du nombre d'acides aminés et des propriétés physico-chimiques qui leur sont associées et qui définissent l'état de la structure primaire d'une protéine, la nature des angles dièdres correspondant à la liaison peptidique entre le carbone C du groupe carboxyle et l'azote N du groupe amine offrent une certaine liberté de rotation aux atomes qui leur sont liés et donc à une conformation primaire particulière (Chakroun, 2009).

1.1.2 Structure secondaire

La structure secondaire des protéines résulte de la formation du repliement local qui peut se produire à partir de l'ensemble des liaisons hydrogène établies entre l'oxygène O des groupements C=O et l'hydrogène H des groupes NH des acides aminés. Cet état permet l'arrangement spatial de motifs structuraux périodiques comportant des séquences courtes laissant se former quatre grands types de structures dites secondaires : hélice α , feuillet β , les boucles et la pelote statistique (Robert *et al.*, 2008).

➤ **Les hélices α**

Les hélices α naissent des chaînes principales qui tournent sur elles-mêmes à raison d'un tour tous les quatre résidus. Ce sont donc des structures locales répétitives stabilisées essentiellement par les liaisons hydrogènes. La longueur des hélices peut varier considérablement, de 4 ou 5 résidus à plus d'une quarantaine, avec une moyenne de 10 résidus (Figure 11) (Robert *et al.*, 2008).

➤ **Les feuillets β**

Les feuillets β , qualifiés de cette façon puisqu'ils correspondent à une structure à plat, étirée et étalée, sont formés par des liaisons hydrogénées entre des régions distantes de la chaîne principale. Les segments concernés peuvent appartenir à la même chaîne ou à des chaînes différentes. Les feuillets sont qualifiés de parallèles ou anti-parallèles en fonction du sens peptidique des deux brins adjacents. Les feuillets β anti-parallèles présentent une meilleure stabilité étant donné les faibles distorsions subies par les liaisons H (Figure 11).

➤ **Les boucles**

Les boucles sont des structures secondaires locales non répétitives définies comme des structures de connexion entre les hélices et les feuillets. La longueur de chaque boucle varie de deux à une vingtaine de résidus. Elles se forment et accompagnent le changement de direction de la chaîne principale. Elles sont généralement situées à la surface des protéines et sont considérées comme des structures aléatoires (Figure 11) (Robert *et al.*, 2008; Chakroun, 2009).

➤ **Les pelotes statistiques**

Certaines régions protéiques ne sont pas structurées sous forme de conformations périodiques comme les hélices α ou les feuillets β . Leurs formes irrégulières sont qualifiées de pelotes statistiques de type ("random coil" ou pelote aléatoire) et obéissent aux contraintes de voisinage.

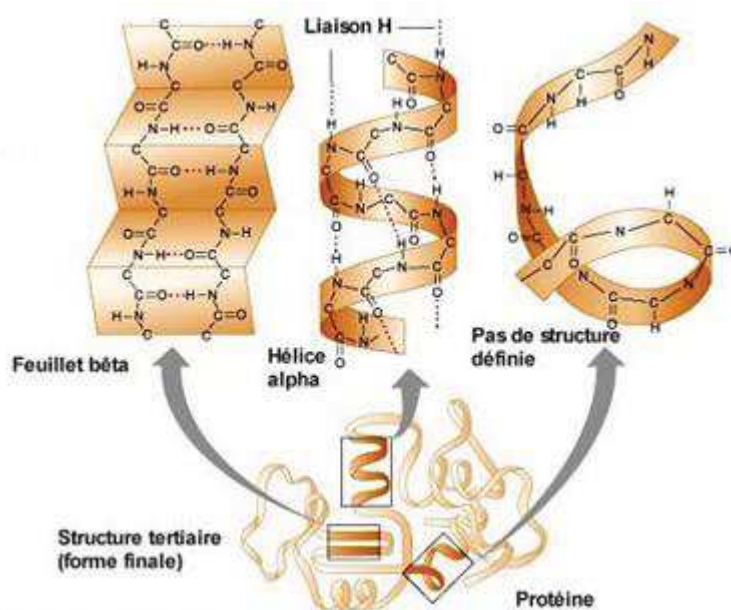


Figure 11. Représentation des principales formes de structure protéique (Ruczinski, 2008).

Les éléments composants la structure secondaire peuvent s'associer pour former des structures super-secondaires qui participeront à la structure tertiaire. Dans plusieurs exemples, il y a formation d'un motif de repliement spécifique jouant un rôle crucial dans la fonction de la protéine.

1.1.3 Structure tertiaire

La structure tertiaire représente la structure tridimensionnelle dite « native » des protéines. Elle représente l'association dans l'espace des structures secondaires obéissant à des interactions entre des résidus proches dans l'espace mais distants dans la chaîne principale. Le résultat de cet assemblage spatial conduit à la formation de domaines protéiques.

Les protéines sont donc subdivisées en domaines, la notion d'hierarchie des domaines a été introduite par le profil énergétique de Van der Waals qui permet de subdiviser les domaines en des segments distincts selon leur niveau énergétique. La notion de domaine a été élucidée pour la première fois en 1959 par Porter. Un domaine structural est défini comme un ou plusieurs segments de polypeptides formant une structure stable et compacte pouvant fonctionner indépendamment du reste de la séquence (Orengo *et al.*, 1999b). L'ensemble des domaines protéiques sont universellement construits à partir d'unités structurales simples et élémentaires. Un domaine peut constituer à lui seul une protéine mono-domaine ou former lui-même des protéines plus complexes par la recombinaison de ces différents domaines formant ainsi de

nouvelles protéines avec de nouvelles MDA « Multi-Domain Architectures » (Figure 12, e). Les deux tiers des protéines eucaryotes et plus de la moitié des protéines procaryotes sont composées de multi-domaines. La taille des domaines est variable ; avec 49% des domaines qui sont composés de 50 à 150 résidus. Les mêmes domaines sont généralement récurrents chez différentes protéines mais avec une organisation différente (Thornton *et al.*, 1999; Berezovsky, 2003; Bashton *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2007; Berezovsky *et al.*, 2016). Les domaines protéiques peuvent être groupés au sein de superfamilles selon leurs structures, leurs séquences et leurs fonctions ; les protéines groupées dans une même famille adoptent en général la même structure tridimensionnelle. Une centaine de superfamilles compte plus des deux tiers de tous les domaines connus, 93% des domaines constituant ces superfamilles sont conservés du point de vue de leurs structures et fonctions. Cependant, selon la base de données SwissProt (Arnold *et al.*, 2006); seulement 15% des protéines d'origine humaine ont une fonction bien caractérisée et seulement 4% ont une structure connue. L'existence de motifs fonctionnels conservés dans les différentes superfamilles de protéines prouve qu'elles proviennent d'un ancêtre commun avec des fonctions primitives (Reeves *et al.*, 2006; Lees *et al.*, 2014).

Les domaines protéiques peuvent aussi être classés selon les éléments de structure secondaire qui les composent : les domaines α constitués uniquement d'hélices alpha (Figure 12, a), les domaines β constitués de chaînes ou feuillets bêta (Figure 12, b) ou de domaines α/β comprenant des feuillets β et des régions hélicoïdales (Figure 12, c et d). 20% des familles possèdent seulement un domaine α , 25% un domaine β et 50% des protéines possèdent un domaine α/β . Peu de domaines ne possèdent aucune structure secondaire (Michie *et al.*, 1996; Thornton *et al.*, 1999). Les domaines β constitués uniquement de feuillets ne possèdent pas d'hélices pour établir des connexions et sont donc constitués uniquement des structures antiparallèles (Berezovsky *et al.*, 2015). Ces domaines peuvent être l'objet d'interaction protéine-protéine par une liaison de deux domaines ayant la même chaîne polypeptidique ou entre domaines ayant des chaînes polypeptidiques différentes (Teichmann *et al.*, 2001). La combinaison des domaines permet de définir la fonction générale de la protéine.

La présence de domaines ou de régions hydrophobes (domaines transmembranaires ou peptides signaux) dans une séquence protéique peut poser un problème de solubilité des protéines (Figure 12, f). Les régions désordonnées et les domaines discontinus dans leur forme native ne s'assemblent pas correctement en structure tridimensionnelle et sont caractérisées par un haut degré de flexibilité des chaînes polypeptidiques. Elles contiennent certains sites fonctionnels.

L'identification de ces régions est importante puisqu'elles sont liées à la solubilité mais aussi à la fonction de la protéine (Thornton *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2005) .

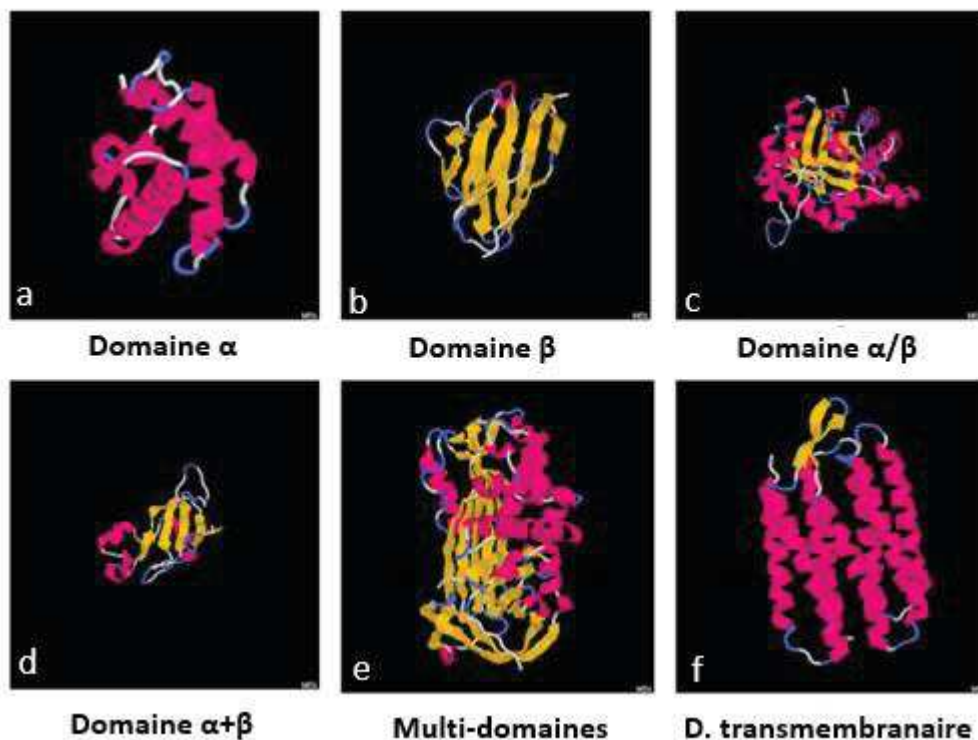


Figure 12. Classification des domaines (Torgeir, 2008).

1.1.4 Structure quaternaire

La structure quaternaire est un assemblage de plusieurs structures tertiaires et donc l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques. De manière générale, certaines des protéines ne seront actives que dans une interaction avec d'autres protéines. La stabilité des structures quaternaires réside dans l'interaction hydrophobe entre les différents résidus de la séquence protéique (Mitra *et al.*, 2003).

1.2. Méthodes expérimentales

Plusieurs méthodes reposant sur des principes physiques très différents sont utilisées pour déterminer les structures dites secondaires et tertiaires des protéines. La structure secondaire est généralement étudiée par les techniques spectroscopiques, alors que la structure tridimensionnelle l'est par des techniques dites de haute résolution telles que la radio-

cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cryo-microscopie électronique (Cryo-ME), techniques de choix pour déterminer la position de résidus d'acides aminés dans l'espace, mais également par des techniques dites de faible résolution telles que SAXS (Small angle X ray scattering) et FRET (Fluorescence resonance energy transfer) (Feiten *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

1.2.1. Résonance magnétique nucléaire

La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) fournit des informations dites de haute résolution sur les structures des protéines en définissant l'organisation des domaines. Cette méthode est souvent utilisée pour l'analyse structurale des complexes protéiques formés par des interactions protéines-protéines ainsi que pour la caractérisation de leurs interfaces (Hennig *et al.*, 2013), malgré les résultats limités ou incomplets obtenus pour les complexes protéiques de taille importante. Une variante de cette technique dite « NMR chemical shift » est utilisée pour la structure des protéines dont la taille dépasserait les 130 résidus avec une précision comparable à celle de la technique RMN conventionnelle. En outre, la technique standard pourrait être combinée avec d'autres techniques expérimentales telles que la technique SAXS pour acquérir des informations supplémentaires de type structurelles (Shen *et al.*, 2009; Hennig *et al.*, 2013).

1.2.2. Radio-cristallographie aux rayons X

La radio-cristallographie aux rayons X est la méthode de choix pour l'exploration de la structure tridimensionnelle des protéines et des macromolécules biologiques. La cristallisation des protéines est un processus au cours duquel les protéines contenues dans un échantillon purifié et hautement concentré, s'assemblent pour former une structure tridimensionnelle régulière appelée « cristal ». Le motif de diffraction des rayons X après passage dans le cristal est utilisé pour déterminer l'empreinte atomique de la structure en trois dimensions. La limite majeure des études cristallographiques est la préparation des échantillons, qui requiert une grande quantité (5mg/ml) de protéines pures et homogènes. L'hétérogénéité des échantillons ou leur contamination par d'autres protéines ou des acides nucléiques peut empêcher le processus de cristallisation. Une autre limite est la difficulté d'obtenir un volume suffisant de cristal pouvant être exposé au faisceau (Smyth *et al.*, 2000; Feiten *et al.*, 2016).

1.2.3. Cryo-microscopie électronique

La technique de microscopie électronique cryogénique (CryoME) a connu un progrès énorme dans la détermination de haute résolution de la structure de larges complexes macromoléculaires ne pouvant être élucidée par d'autres techniques expérimentales telles que la radio-cristallographie aux rayons X ou la RMN (Jonic, 2016). Elle utilise comme source d'énergie des électrons à haute énergie pour mettre en relief les plus fins détails de la structure en utilisant un microscope électronique à transmission qui offre une image englobant les informations sur la structure globale de la molécule. Contrairement à la cristallographie, la technique de CryoME ne nécessite pas d'échantillons en grand volume et a l'avantage de révéler les informations sur la structure de la protéine dans l'état le plus proche de son état natif. Ceci est dû à une congélation rapide des échantillons en azote liquide maintenant les macromolécules dans un état soluble (Wang *et al.*, 2017).

1.2.4. Diffusion des rayons X aux petits angles

Lors de cette dernière décennie, la technique SAXS a été de plus en plus utilisée en lien avec ses multiples avantages. Elle permet une caractérisation structurale facile, rapide et précise de complexes protéiques de haut poids moléculaire et définit aussi la structure globale ainsi que l'état d'oligomérisation des protéines en permettant de prédire leur forme et structure. Elle est souvent utilisée comme technique complémentaire à d'autres techniques en raison de sa sensibilité élevée (Trehwella *et al.*, 2013).

1.2.5. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

La technique FRET est une technique d'analyse expérimentale de faible résolution. Elle est utilisée pour fournir des informations sur l'hétérogénéité structurale, la fonction des protéines et l'étude de la transition conformationnelle dynamique en se basant sur le report de la distance entre des fluorophores donneurs et accepteurs placés à une certaine proximité. Elle a l'avantage d'être rapide d'exécution tout en permettant l'analyse de plusieurs conformations biomoléculaires. L'efficacité de cette technique dépend de l'orientation et la position incertaine des groupements fluorophores. La limite majeure de cette méthode est le manque de précision. La combinaison avec des analyses *in silico* est donc nécessaire pour fournir une description moléculaire détaillée (Margittai *et al.*, 2003; Kalinin *et al.*, 2012).

1.2.6. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique qui fournit des informations structurales de faible résolution qui contribue à la détermination globale de la structure native des complexes protéiques et des protéines solubles ainsi que de leur masse moléculaire. Elle permet de préciser des données qui n'ont pas été fournies avec les techniques de haute résolution (RMN et cristallographie aux rayons X). Pour des informations structurales plus détaillées, plusieurs variantes de cette technique ont été développées (Walzthoeni *et al.*, 2013):

- Chemical cross linking mass spectrometry (CX-MS) : permet de préciser la zone d'interaction entre deux sous unités protéiques ainsi que le site de fixation d'un substrat avec une grande précision.
- Affinity purification-mass spectrometry (AP-MS) : permet la caractérisation de la composition, de la stœchiométrie et de la connexion entre les différentes protéines d'un mélange.
- Hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry : révèle les changements conformationnels des complexes protéiques
- Spectrométrie de masse combinée à une technique de chromatographie liquide (LS) LS-MS : La chromatographie liquide est une technique efficace pour la séparation analytique des molécules présentes dans un mélange en deux phases : phase stationnaire et phase mobile mais ne fournit pas d'informations structurales. La technique de LC-MS utilise donc un système de séparation combiné à un système de détection fournissant une analyse structurale qualitative et quantitative plus précise en détaillant la structure de chaque pic observé sur le chromatogramme à une faible concentration de l'échantillon et un temps d'analyse réduit (Wu *et al.*, 2013).

L'avantage essentiel de ces techniques basées sur la spectrométrie de masse est qu'elles ne sont pas limitées par la taille du complexe protéique analysé. Ce sont des méthodes très sélectives et sensibles, faciles à mettre en œuvre ne nécessitant que quelques nannogrammes ou microgrammes d'échantillons. Cependant, elles ne fournissent pas les informations complètes sur la structure tridimensionnelle des protéines analysées. Ces données sont donc souvent

utilisées en combinaison avec les données générées par des outils bio-informatiques (Walzthoeni *et al.*, 2013; Pang *et al.*, 2016).

1.3. Prédiction des structures des protéines

Les nouvelles techniques de prédiction de structure macromoléculaire des protéines sont basées sur des méthodes de bio-informatique utilisant des outils visant à prédire les propriétés d'une protéine à partir de sa séquence en acides aminés (Baker *et al.*, 2001). Cette analyse dite *in silico* dispose de plusieurs méthodes : la méthode de modélisation par homologie de séquences (Homology Modeling) et les méthodes dites d'enfilage ou de reconnaissance de repliements (Fold Recognition/Protein Threading).

La méthode de modélisation par homologie de séquences est la méthode la plus utilisée, elle nécessite une ou des structures matrices identifiées par homologie entre la séquence de la structure à prédire, et un ensemble de séquences de structures expérimentalement résolues. A l'opposé, il existe des méthodes *ab initio* qui permettent de prédire une structure protéique à partir de pourcentages d'identité de séquence très faibles. Elles sont basées essentiellement sur les propriétés des acides aminés.

Au sein des méthodes *ab initio*, on parle de méthodes dites *ab initio* pures, basées uniquement sur des principes physiques et les méthodes dites *de novo* dont la recherche ne dépend ni des séquences homologues ni de repliements similaires. Ci-joint un diagramme général présentant la démarche pour une prédiction des structures 3 D des protéines (Figure 13).

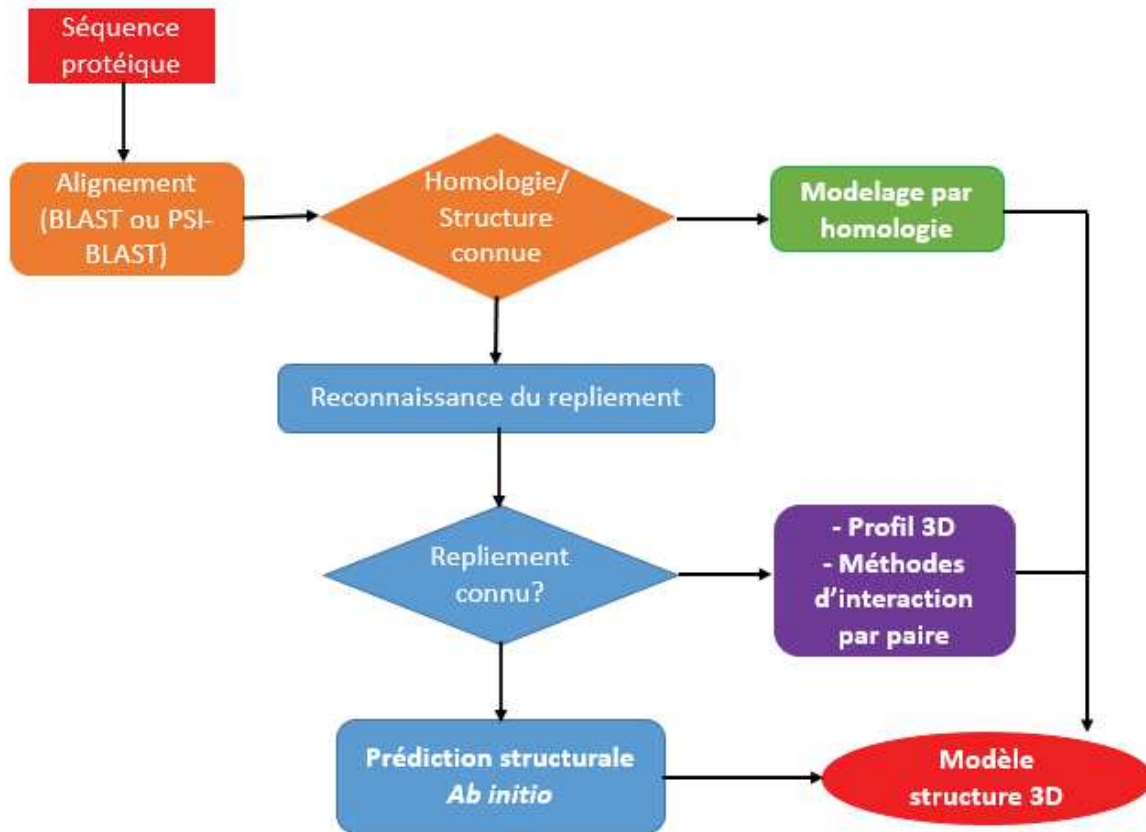


Figure 13. Diagramme présentant la démarche de prédiction des structures 3D des protéines, adapté de (Fisher, 2010).

Pour répondre à une requête de prédiction de structure tertiaire, plusieurs outils bio-informatiques incluant des logiciels libres accessibles par serveurs sont disponibles. Le tableau 8 illustre les principales ressources et serveurs donnant accès à ces outils et bases de données permettant d'étudier les principales caractéristiques des protéines.

En conclusion, la prédiction de la structure des protéines par les outils de bioinformatique structurale disponibles reste encore un réel challenge. Plusieurs étapes du processus de prédiction telles que la modélisation, la résolution de problèmes d'optimisation, l'analyse de résultats statistiques sont en voie d'amélioration.

Tableau 8. Outils et serveurs permettant l'étude et la prédiction des structures protéiques (Schwede, 2013) adapté

Outil/Serveur	Utilité	Reference/ Site Web
Protein modal portal	Prédiction de la structure protéique par homologie	http://www.proteinmodelportal.org (Arnold <i>et al.</i> , 2009)
HHpred	Serveur de prédiction de la structure et la fonction protéique	http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred (Hildebrand <i>et al.</i> , 2009)
IMP	Détermination de la structure macromoléculaire	http://www.salilab.org/imp (Russel <i>et al.</i> , 2012)
IntFOLD	Prédiction de la structure et la fonction protéique à partir de la séquence de la protéine	http://www.reading.ac.uk/bioinf/IntFOLD/ (Roche <i>et al.</i> , 2011)
I-Tasser	Prédiction de la structure protéique <i>ab initio</i>	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ (Zhang, 2014)
ModBase	Base de données de modèles structuraux protéiques	http://salilab.org/modbase/ (Pieper <i>et al.</i> , 2011)
Pcons.net	Prédiction d'un modèle protéique sur la base de multiples « templates »	http://pcons.net/ (Larsson <i>et al.</i> , 2011)
PHYRE2	Prédiction et analyse de la structure et la fonction protéique ainsi que des mutations	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/ (Kelley <i>et al.</i> , 2015)
Robetta	Prédiction structurale poétique <i>De novo</i>	http://robetta.bakerlab.org/

		(Raman <i>et al.</i> , 2009)
Rosetta	Programme de modélisation moléculaire	https://www.rosettacommons.org (Das <i>et al.</i> , 2008)
SWISS-MODEL Repository	Base de données de modèles structuraux 3D de protéines	http://swissmodel.expasy.org/repository (Kiefer <i>et al.</i> , 2009)
SWISS-MODEL Workspace	Prédiction de la structure protéique par homologie	http://swissmodel.expasy.org/workspace / (Arnold <i>et al.</i> , 2006)
SCOP2	Base de données de classification structurale des protéines	(http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk/), (Andreeva <i>et al.</i> , 2014)
Expasy	Plateforme hébergeant diverses ressources scientifiques, base de données et outils/logiciels	(http://www.expasy.org) (Artimo <i>et al.</i> , 2012)
Gene3D	Base de données de domaines structuraux protéiques	http://gene3d.biochem.ucl.ac.uk (Lees <i>et al.</i> , 2014)
PSIPRED	Serveur permettant la prédiction de la structure protéique	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/ (McGuffin <i>et al.</i> , 2000)
MODELLER	Serveur d'analyse de la structure et des séquences protéiques	http://toolkit.tuebingen.mpg.de/modeler (Alva <i>et al.</i> , 2016)

2. Etude de la fonction des protéines

La prédiction de la fonction d'une protéine inclut diverses approches telles que l'analyse du degré d'homologie avec d'autres séquences protéiques dont la fonction est déjà connue, et des analyses phylogénétiques et bio-informatiques. Pour de nombreuses protéines, la prédiction de leurs fonctions est basée sur la détection de similarités localisées à l'intérieur des sites fonctionnels des protéines. Ces exemples ont surtout concerné la prédiction de nouvelles fonctions enzymatiques, d'interactions protéines-ADN, de complexes protéine-protéine ainsi que de nouveaux sites d'attachement (Bashton *et al.*, 2007; Lobb *et al.*, 2016). Il est, par ailleurs, important de souligner que la relation structure-fonction n'est pas nécessairement vérifiée dans tous les cas. En effet, des protéines partageant une similitude structurelle peuvent avoir des fonctions différentes et des protéines ne partageant pas la même structure peuvent avoir les mêmes fonctions. Enfin, la fonction d'une protéine peut aussi être prédite chez une protéine dont la structure n'est pas encore caractérisée (Thornton *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 1999; Orengo *et al.*, 1999b). Selon leurs propriétés biochimiques, les protéines se présentent en trois groupes :

Les protéines globulaires : Les chaînes polypeptidiques formant les protéines globulaires sont étroitement enroulées en une structure compacte, sphérique ou globulaire. Elles sont généralement solubles dans les systèmes aqueux et diffusent rapidement. Elles ont une fonction dynamique (enzyme, anticorps). Par leurs motifs de surface, les protéines globulaires interagissent de façon spécifique avec d'autres molécules (Manz *et al.*, 2004).

Les protéines membranaires : Elles présentent plusieurs propriétés communes avec les protéines globulaires. Elles sont présentes dans la membrane de la cellule qui correspond à un milieu hydrophobique très différent de celui des protéines globulaires. Leur organisation suggère un mécanisme de repliement similaire à celui des protéines globulaires avec les mêmes éléments de structure secondaire. On compte environ 20 à 30% de gènes qui codent pour des protéines membranaires possédant un domaine transmembranaire qui permet l'ancrage de la protéine au sein de la membrane cellulaire (Krogh *et al.*, 2001).

Les protéines fibreuses : Elles se présentent sous forme de chaînes polypeptidiques étendues le long d'un axe au lieu d'être enroulées en une forme globulaire. Elles ont un rôle essentiellement structural ou de protection (kératine, collagène, fibroïne, actine, myosine). Ces protéines

insolubles dans l'eau et de forme allongée possèdent une force élastique et une stabilité mécanique élevée.

3. Caractérisation des protéines

3.1. Méthodes d'expression des protéines

Il existe une large variété de systèmes d'expression de protéines et plusieurs facteurs sont à considérer lors du choix du système à utiliser. En effet, la qualité de la protéine à produire, le mode d'action, la fonctionnalité, la toxicité, la vitesse de production ainsi que le rendement de la protéine conditionnent et orientent la sélection du système d'expression et de production de protéines recombinantes à choisir. Deux principaux systèmes d'expression sont largement utilisés : le système d'expression procaryote et le système d'expression eucaryote.

3.1.1. L'expression en système procaryote (*Escherichia coli*)

Il représente le système privilégié d'expression des protéines à faible poids moléculaire. C'est un moyen facile, rapide et économique pour produire une large gamme de protéines recombinantes.

Escherichia coli représente la première bactérie utilisée en 1982, avec l'expression de l'insuline humaine par Genentech (Baeshen *et al.*, 2014). Depuis, d'énormes progrès ont été effectués dans ce domaine avec le développement d'autres systèmes bactériens de type procaryote.

Le principe du système d'expression procaryote repose sur le clonage du gène d'intérêt à exprimer dans un vecteur d'expression bactérien contenant notamment un promoteur puissant permettant l'accumulation de protéines recombinantes à un taux variant de 10 à 30% des protéines cellulaires totales. Le promoteur doit aussi permettre une induction simple et peu coûteuse, l'inducteur le plus utilisé est l'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Les promoteurs les plus largement utilisés en système procaryote sont l'arabinose, les promoteurs dits hybrides de type trc et tac mais aussi le promoteur T7 RNA polymérase qui peut assurer l'accumulation de plus de 50% des protéines totales. Les protéines recombinantes produites peuvent s'accumuler dans le cytoplasme ou dans l'espace péri-plasmique. L'accumulation dans le cytoplasme reste le premier choix, le rendement étant bien meilleur dans ce cas. Le choix de la souche bactérienne utilisée joue un rôle critique dans la solubilité de la protéine recombinante exprimée ainsi que dans son rendement. La souche BL21 et ses dérivés BL21(DE3),

BL21Star(DE3), BL21(DE3) pLysS ainsi que la souche K12 et ses dérivés sont utilisées en routine (Joseph *et al.*, 2015). D'autres souches telles que Rosetta ou Lemo21 peuvent être utilisées. Les conditions de culture bactériennes sont adaptées à chaque type de bactérie utilisée: composition du milieu de culture, densité cellulaire, pH (un pH stable évite l'agrégation des protéines), vitesse d'agitation, température (une température de 30°C peut éviter la formation de corps d'inclusion et une température de 15 à 25°C permet l'amélioration de la solubilité de la protéine), ajout de cofacteurs (amélioration de la solubilité en évitant la formation de corps d'inclusions) (Schmidt, 2004; Sorensen *et al.*, 2005; Terpe, 2006; Jia *et al.*, 2016).

D'autre part, le système procaryote dispose d'un arsenal d'autres bactéries telles que des bactéries à gram positives du genre *Bacillus* (*Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*) ou à gram négatives telles que *Ralstonia eutropha* et *Caulobacter crescentus* qui assurent l'expression des protéines difficiles à produire en système *E. coli* (Barnard *et al.*, 2004; Terpe, 2006).

Les protéines cibles devenant de plus en plus complexes (présence de ponts disulfure, protéines glycosylées ou phosphorylées), le système *Escherichia coli* présente quelques limites pour leur expression qui ont pu être en partie, contournées.

Pour les protéines contenant des ponts disulfures ; la formation de ponts disulfures est une modification post-traductionnelle majeure interférant avec la stabilité de la protéine ainsi que sa fonction biologique. Ces protéines sont donc produites en *E. coli* sous forme de corps d'inclusion et seront donc inactives ou insolubles (Fischer *et al.*, 1993; Demain *et al.*, 2009). Sachant que la formation des ponts disulfures nécessite un environnement oxydant se trouvant dans le périplasma de la bactérie, des modifications ont été proposées pour aboutir à une expression optimale : (i) soit par ajout d'un peptide signal à la partie N terminale de la protéine recombinante, (ii) soit par la délétion d'enzymes réductrices favorisant la formation de ponts disulfures (Mergulhao *et al.*, 2005; de Marco, 2009; Assenberg *et al.*, 2013).

Une autre modification post-traductionnelle importante qui affecte la stabilité, la distribution et la fonction des protéines recombinantes ne pouvant être effectuée dans *Escherichia coli* est la glycosylation. Pour remédier à cela, la technique de « glyco-engineering in *Escherichia coli* » qui consiste à une N glycosylation dans *Campylobacter jejuni* suivi d'un transfert fonctionnel de ce système de glycosylation dans *E. coli* a vu le jour (Wacker *et al.*, 2002).

Pour les protéines phosphorylées ; la phosphorylation d'une molécule cible dans *Escherichia coli* a pu être réalisée par une co-expression avec une kinase d'origine humaine (Murata *et al.*, 2008). Enfin, la méthylation, la myristylation ainsi que l'acétylation des protéines ont pu être réalisées dans *Escherichia coli* en coexprimant respectivement une méthyltransférase, myristoyltransférase et une acétylase (Jia *et al.*, 2016).

3.1.2. L'expression en système eucaryote

L'objectif de produire des protéines de structure de plus en plus complexe (10 sous unités ou plus) a nécessité le développement de systèmes d'expression différents permettant l'expression de complexes multi-protéiques ne pouvant être produits efficacement par le système procaryote (Barford *et al.*, 2013). L'expression en eucaryotes peut se décliner en trois systèmes différents (i) le système baculovirus-cellules d'insectes BEVS (Baculovirus Expression Vector System), (ii) le système levure et (iii) les systèmes transgéniques. Selon leurs spécificités et leurs particularités, ces systèmes assurent les principales modifications post-traductionnelles des différents types de protéines à produire. Le système BEVS sera majoritairement abordé par rapport aux autres systèmes d'expression.

➤ Le système baculovirus-cellules d'insectes

Les baculovirus sont classés en 4 genres : *Alphabaculovirus*, *Betabaculoviruses*, *Gammabaculovirus* et *Deltabaculovirus*. Deux membres du genre *Alphabaculovirus* sont largement utilisés comme vecteurs pour produire des protéines hétérologues : *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) et à moindre degré *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV). Tous les deux peuvent exprimer des gènes étrangers sous le contrôle de promoteurs tardifs incluant la polyhédrine (pPolh) et un polypeptide de 10kda (P10) (Li *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). La polyhédrine est un gène produit naturellement à des taux élevés et n'est pas indispensable à la réplication du virus. Le gène à cloner est placé sous le contrôle de ce puissant promoteur viral. Sous le contrôle de ce dernier, la protéine d'intérêt peut représenter jusqu'à 50% des protéines cellulaires totales.

L'hôte habituel est une lignée cellulaire d'insectes qui dérivent de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 et Sf21) et *Trichoplusia ni* (Tn5, commercialisés sous le nom de High Five™) cultivée en suspension ou en tapis cellulaire en milieu sans sérum. Ces cellules ont une croissance optimale à 27- 28°C en absence de CO₂. Les différents paramètres de culture des cellules d'insectes sont

présentées dans le tableau 9 ci-dessous (Aucoin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Osz-Papai *et al.*, 2015).

Tableau 9. Paramètres utilisés en culture de cellules d'insectes (Osz-Papai *et al.*, 2015)

	Sf9	Sf9	Sf9	Sf21	High-Five
Adhérence/ Suspension	Adhérence	Suspension	Suspension	Suspension	Suspension
Milieu (Thermo Fisher Scientific)	TNM-FH 10% SVF	TNM-FH 10% SVF	SF900-II	SF900-II	Express- five
Densité cellulaire	1,5 10 ⁵ cellules/cm ²	2-3 10 ⁶ cellules/ml	2-3 10 ⁶ cellules/ml	10 10 ⁶ cellules/ml	3 10 ⁶ cellules/ml
Temps de génération	24-30h	24-30h	24-30h	18-24h	18-24h
Agitation	-	100rpm	120rpm	120rpm	120rpm

Le système BEVS développé il y a plus d'une trentaine d'années est un outil robuste d'expression eucaryote pour la production de grandes quantités de protéines hétérologues, mais aussi pour la génération de VLP « Virus-like-particules », de AAV « adeno-associated virus » et le développement de vaccins sous unitaires (Urabe *et al.*, 2002; Yamaji, 2014). En 1983, la première protéine à avoir été exprimée dans ce système fut l'interféron β humain (Smith *et al.*, 1983). Plusieurs vaccins sous-unitaires produits en cellules d'insectes ont ensuite vu le jour, un premier vaccin contre l'influenza aviaire basé sur la protéine de l'hémagglutinine H, le vaccin contre le papillomavirus humain ainsi que le vaccin sous-unitaire dirigé contre la peste porcine basé sur une glycoprotéine d'enveloppe (Liu *et al.*, 2013; Kost *et al.*, 2016).

Ce système BEVS se base sur un baculovirus recombinant portant le gène d'intérêt visant à infecter les cellules d'insectes pour la production hétérologue d'une grande quantité de la protéine candidate (Barford *et al.*, 2013). Le génome des baculovirus est composé d'ADN circulaire double brin de 134kb possédant 156 ORF. Les particules virales possèdent une morphologie en forme de tige ayant un diamètre de 30 à 60nm et une longueur de 250 à 300nm et sont entourés d'une matrice protectrice (nucléocapside) qui leur permet de survivre dans différents types d'environnement et par la suite assure leur dissémination chez de nouveaux

hôtes. Le cycle de réplication du baculovirus implique deux types de virions : une forme ODV (occlusion derived virus) qui permet l'infection des cellules de l'insecte et confère au virus une stabilité dans le milieu extérieur et, une forme BV (budded virus) qui permet la dissémination de l'infection de cellule à cellule chez l'hôte. C'est cette dernière forme qui est produite par les cellules d'insectes infectées en culture et qui est utilisée dans le système BEVS (Ayres *et al.*, 1994; Inceoglu *et al.*, 2006). L'infection est initiée par l'absorption des polyhédres par l'insecte, les corps d'occlusion OB vont se dissoudre dans l'environnement alcalin de l'intestin de l'insecte pour libérer de nombreux ODV. Ces derniers vont fusionner avec les microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin moyen. Les virions sont alors transportés au noyau où va commencer la réplication de l'ADN : c'est l'infection primaire ou précoce. Après 8h d'infection primaire, de nouvelles nucléocapsides s'assemblent, migrent et fusionnent avec la membrane basale des cellules épithéliales formant les BVs. Ces derniers vont permettre la dissémination de l'infection de cellule à cellule en pénétrant par endocytose. Les nucléocapsides sont alors libérées dans le cytoplasme et transportées au noyau où il y'aura une seconde transcription et réplication : c'est l'infection secondaire ou tardive (Figure 14) (Hefferon *et al.*, 1999; Oomens *et al.*, 1999; IJkel *et al.*, 2001).

Dissolution des OB
dans l'intestin

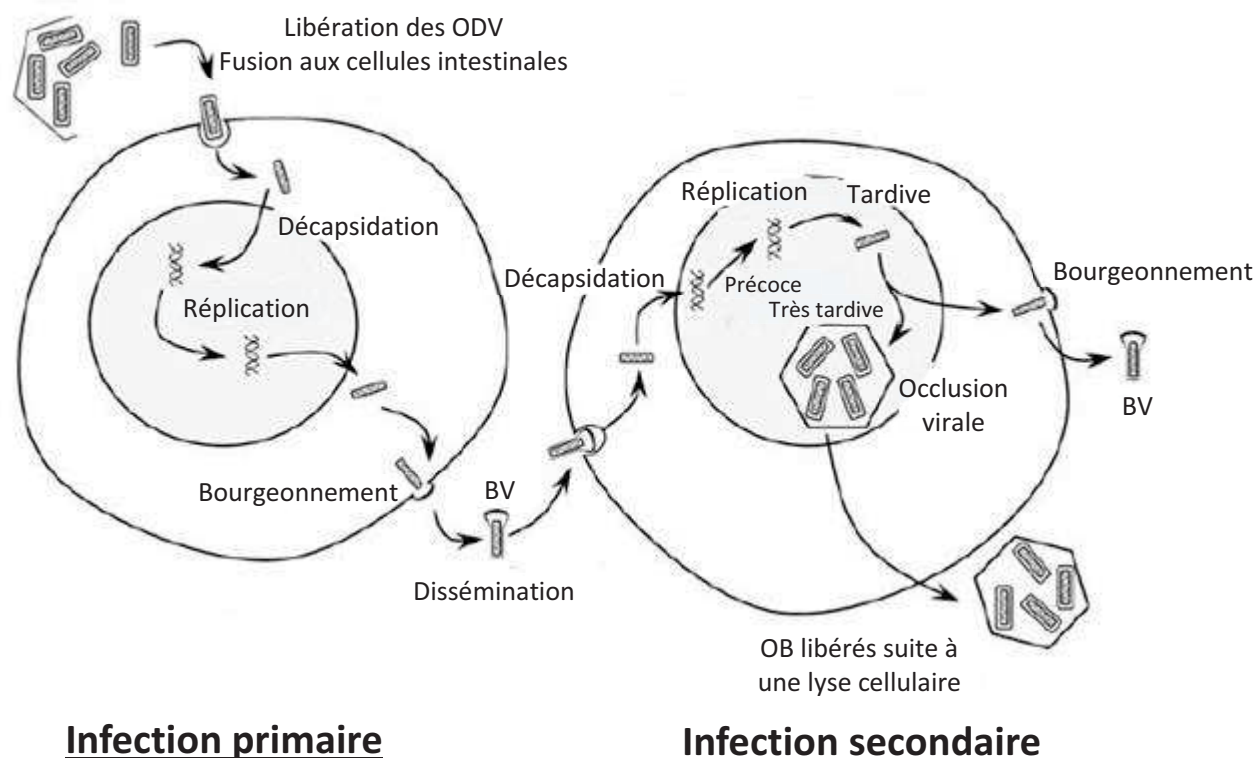


Figure 14. Cycle de réplication des baculovirus (Contreras-Gomez *et al.*, 2014).

L'expression de protéines recombinantes dans le système BEVS comporte trois étapes clés

- (i) Clonage du gène d'intérêt dans le vecteur baculovirus choisi : l'ADNc est d'abord cloné dans un vecteur de transfert en aval du promoteur pPolh. Un large panel de vecteurs de transfert permettant l'insertion d'un ou de multiples gènes a été développé pour la production de protéines hétérologues (Tableau 10). Des peptides spécifiques contenant des tags facilitant la purification ultérieure des protéines ou des séquences codant pour des peptides signaux permettant la sécrétion de la protéine dans le surnageant de culture sont désormais intégrés à ces vecteurs. (Osz-Papai *et al.*, 2015; Possee *et al.*, 2016).
- (ii) Génération et amplification des virus recombinants : par la cotransfection des cellules d'insectes avec le plasmide de transfert portant le gène d'intérêt et l'ADN du baculovirus linéarisé. Cela va permettre l'intégration de la cassette d'expression par recombinaison homologue au sein du génome viral qui va se répliquer et permettre la production virale.
- (iii) Optimisation de production protéique : les paramètres à prendre en considération durant cette étape sont la quantité de virus et le temps d'infection, l'objectif étant

d'avoir toutes les cellules infectées en même temps (Geisse, 2007; Roldao *et al.*, 2009; Osz-Papai *et al.*, 2015).

Tableau 10. Baculovirus utilisés comme vecteurs de transfert (Osz-Papai *et al.*, 2015).

Vecteur d'expression	Fournisseur	Promoteur	Caractéristiques générales
pVL1392, pVL1393	Thermofisher Scientific, France	pH	Vecteur de transfert général
pAcUW21	BD Biosciences, USA	p10	Vecteur de transfert général
pAcUW51, pAcUW31	BD Biosciences, USA	pH, p10	Co-expression de deux gènes
pACAB3, pACAB4	BD Biosciences, USA	pH, p10	Co-expression de 3 ou 4 gènes
pBacPAK8, pBacPAK9	Clontech, France	pH	Vecteur de transfert général
pTri-Ex-1.1, -2, -3	-	p10	Multi-expression
pOET1, 2, 3, 4	GenWay Biotech	pH, p6.9	Plasmides de petite taille
pOPIN		pH	Multi-expression
pOmniBac	Genscript Corp.	pH, p10	Co-expression de n gènes
pAC8	BD Biosciences	pH	C3 clivage
pAC8-GW-Lox	BD Biosciences	pH	Co-expression de n gènes

(pH : promoteur de la polyhédrine, p : promoteur)

- Avantages

Comparé à d'autres systèmes d'expression, notamment le système procaryote ; l'expression de protéines recombinantes en système cellules d'insectes-baculovirus présente de nombreux avantages. Il permet de produire des protéines ayant subi de nombreuses modifications post traductionnelles telles que l'oligomérisation, la phosphorylation, la N et O glycosylation, l'acétylation, le clivage protéolytique du peptide signal, la palmytation et la myristylation (Demain *et al.*, 2009). Ce système permet aussi un repliement correct de la protéine avec formation de ponts disulfures S-S. Egalement, c'est un système qui possède la capacité de pouvoir insérer un large fragment d'ADN et offre ainsi une flexibilité par rapport à la taille des protéines ainsi qu'une possibilité d'expression simultanée de plusieurs gènes. Il offre aussi une certaine sécurité puisque le baculovirus ne se réplique pas chez les mammifères (Wilkinson *et*

al., 1998; Morrow., 2007; Demain *et al.*, 2009). De plus, les cellules d'insectes sont connues pour être plus résistantes au stress et plus faciles à cultiver que les cellules de mammifères. Considérant tous ces avantages, le système BEVS est largement sollicité pour l'expression protéique avec un niveau d'expression important. En effet, les cellules d'insectes infectées par le baculovirus recombinant peuvent sur-exprimer la protéine cible avec des taux qui dépassent les centaines de milligrammes/litre de culture (Schmidt, 2004).

- Limites et avancées

Le baculovirus est létal pour les insectes, les cellules infectées finissent donc par mourir dans la phase tardive d'infection rendant ainsi l'expression de protéines stables difficile et induisant la formation de corps d'inclusions. Par exemple, le fait d'éliminer par centrifugation les cellules précocement après infection peut limiter la formation d'agrégats protéiques. Une altération du repliement de la protéine ainsi qu'un défaut de sécrétion peuvent avoir lieu pour certaines protéines virales telles que la cathepsine ou la v-chitinase. Ceci peut être évité en ajoutant la séquence d'un peptide signal comme celui de la mellitine par exemple (Kaba *et al.*, 2004).

Une activité protéolytique due à des protéases virales libérées lors du processus d'infection peut dégrader les protéines recombinantes, ce qui impacte sur la qualité de la protéine. L'emploi d'inhibiteurs de protéases dans le milieu de culture ou le développement de vecteurs déficients en protéases peut palier à cette limite (McCarroll *et al.*, 1997; Ikononou *et al.*, 2003; Schmidt, 2004). Considérant l'ensemble de ces limites, de nombreuses études se sont concentrées sur l'élimination des gènes spécifiques de baculovirus préjudiciables sur la qualité et la quantité de la protéine produite. Par exemple, la délétion de la cathepsine et la chitinase des vecteurs d'expression a pu améliorer le niveau de sécrétion des protéines (Kaba *et al.*, 2004). L'introduction de protéines étrangères a aussi permis d'améliorer l'expression des protéines recombinantes, par exemple, la coexpression avec des protéines chaperonnes ou avec une autre protéine telle que la vankyrine a permis d'améliorer le repliement correct de la protéine d'intérêt. Un nouveau vecteur d'expression contenant une cassette d'expression où se trouve l'ADNc codant pour les facteurs d'activation IE1 et IE0 exprimés sous le contrôle de la polyhedrine a permis d'obtenir une expression protéique 4 fois plus importante qu'un vecteur standard (Hitchman *et al.*, 2011; Marek *et al.*, 2011; Assenberg *et al.*, 2013; Gomez-Sebastian *et al.*, 2014).

➤ Le système d'expression en levures

Ce système d'expression présente de nombreux avantages : les protéines recombinantes peuvent être produites rapidement avec un rendement satisfaisant et à faible coût. Il assure l'expression des protéines complexes à haut poids moléculaire. Plusieurs protéines commercialisées et utilisées en santé humaine sont produites dans ce système : l'insuline, le glucagon, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ainsi que plusieurs facteurs de croissance. Il est représenté par deux espèces de levures : *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae*.

➔ *Pichia Pastoris* appartient aux levures méthylotrophiques. Cette famille contient aussi trois autres genres qui sont *Hansenula*, *Candida* et *Torulopsis* devenus très attractifs pour la production industrielle de protéines recombinantes puisque possédant un promoteur très puissant. *P. pastoris* est l'espèce de levures la plus utilisée pour la production de protéines hétérologues. En effet, plus de 500 protéines ont été exprimées dans ce système depuis son développement il y a 40 ans par Phillips Petroleum. Certaines protéines produites par les levures méthylotrophiques peuvent atteindre 20 à 30 g/l, ce taux étant pour certaines d'entre elles 10 fois plus important que celui produit par *S. cerevisiae*. Ce système permet aussi la production de protéines à large poids moléculaire >50kDa possédant une certaine stabilité. Etant méthylotrophique, *Pichia pastoris* possède la faculté d'assimiler le méthanol comme unique source de carbone et d'énergie avec une voie d'utilisation de méthanol hautement inductible capable de convertir 30 à 40% de son poids en protéines. Ces protéines synthétisées lorsque la levure croît sur le méthanol sont indétectables lorsque la levure croît sur le glucose ou le glycérol.

Les problèmes d'hyper-glycosylation observés chez *S.cerevisiae* sont beaucoup moins importants chez *Pichia pastoris* qui a la capacité d'effectuer plusieurs modifications post traductionnelles généralement effectuées par les eucaryotes supérieurs telles qu'un repliement correct, une N et O glycosylation, la formation de ponts disulfures (S-S) ou le clivage protéolytique du peptide signal. Des protéines riches en groupements S-S peuvent être produites dans ce système. L'avantage de *Pichia Pastoris* par rapport aux autres levures est sa capacité de produire les protéines avec un rendement important en intra ou extracellulaire, en sécrétant les protéines hétérologues permettant d'éviter les étapes de purification. *Pichia* ne nécessite pas de milieu de culture complexe ni de conditions de culture difficiles. Elle est génétiquement

facile à manipuler et peut croître à une forte densité cellulaire dans un milieu minimum (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Morrow., 2007; Demain *et al.*, 2009). *Pichia* n'est pas capable de produire des protéines nécessitant des protéines chaperonnes pour un repliement correct (Demain *et al.*, 2009). Cependant la stabilité de la cassette d'expression dans le génome de la levure, sa capacité de sécrétion, les faibles taux de protéines contaminants dans le milieu de culture et la rapidité de croissance de la levure sur des milieux non coûteux et dans les fermenteurs font de *Pichia pastoris* un système de choix pour l'expression de protéines hétérologues.

➔ *Saccharomyces cerevisiae* : les protéines de plus de 30 kilodaltons sont retenues dans le cytoplasme de *S. cerevisiae*. Certaines O et N glycosylations effectuées par *S. cerevisiae* sur des protéines eucaryotes ne sont pas satisfaisantes et aboutissent à une réduction de l'activité de la protéine.

Le travail pour exprimer des protéines étrangères dans le système levure comprend trois étapes principales : insertion du gène d'intérêt dans le vecteur d'expression, introduction du vecteur d'expression dans l'hôte suivi de l'identification des souches exprimant le gène étranger.

➤ Les systèmes transgéniques

Ils reposent sur trois modes d'expression différents, les cellules de mammifères, les animaux transgéniques et les plantes transgéniques.

- Les cellules de mammifères

Les lignées cellulaires de type CHO (Chinese Hamster Ovary) ont été les premières à permettre la production des protéines d'intérêt biologique. Les exemples sont nombreux : l'érythropoïétine, l'activateur tissulaire du plasminogène (tpA), certains anticorps monoclonaux, l'urokinase, la FSH (Hormone Folliculo-stimulante) ou le facteur humain IX (rhIX) (Hakola *et al.*, 1997; Roychoudhury *et al.*, 2006; de Castilho Fernandes *et al.*, 2011). Les protéines ainsi produites sont correctement repliées, possèdent les modifications post traductionnelles nécessaires et sont biologiquement actives (Aldrige., 2006; Demain *et al.*, 2009). L'expression de gènes dans les cellules de mammifères nécessite une lignée cellulaire adéquate et un vecteur approprié, ce dernier va véhiculer le gène d'intérêt au sein de la lignée cellulaire choisie.

Toutes les lignées cellulaires de mammifères peuvent fournir un environnement favorable qui se rapproche de celui de la protéine native. Même si la lignée cellulaire CHO reste la plus utilisée, d'autres lignées cellulaires ont également été utilisées pour l'expression de protéines hétérologues, les principales sont citées dans le Tableau 11 (Andrell *et al.*, 2013; Khan, 2013).

Tableau 11. Lignées cellulaires de mammifères (Khan, 2013).

Lignée cellulaire	Origine
HEK293	Human embryonic kidney cells
BHK-21	Baby hamster kidney cells
COS-7	Monkey kidney fibroblast cells
CHO	Chinese hamster ovary cells
HEK293T	Human embryonic kidney cells
HeLa	Human epitheloid cervix carcinoma cells
A549	Human lung carcinoma cells
HepG2	Human liver carcinoma cells

Le choix du vecteur dépend de la méthode utilisée pour l'insertion du gène d'intérêt dans les cellules de mammifères. Dans un premier temps, l'ADN d'intérêt est cloné dans un vecteur approprié, et subit une transfection. Le transgène peut être incorporé dans le génome de la cellule hôte par transfert direct de l'ADN par des méthodes dites chimiques tels que le calcium phosphate (co-précipitation de l'ADN), le polyéthylèneimine (PEI) et le dextran qui forment un complexe pris en charge par les cellules par endocytose. Alternativement, le transgène peut être incorporé par des moyens physiques tels que l'électroporation ou les micro-injections. Le calcium phosphate, le PEI et l'électroporation sont les trois méthodes les plus utilisées car peu coûteuses et adaptées à la culture cellulaire en suspension et en statique, leur efficacité de transfection dépasse les 70%. Néanmoins, l'électroporation va induire une mortalité cellulaire et seulement la moitié des cellules survivent et vont servir de substrat pour la synthèse protéique. La quantité de plasmide requise varie de 0,2 à 2 mg/10⁹ cellules (Chu *et al.*, 1987; Gorman, 1990; Paborsky *et al.*, 1990; Wurm *et al.*, 1999; Khan, 2013).

Deux types de vecteurs sont utilisés pour l'expression de protéines hétérologues en cellules de mammifères, les vecteurs d'expression plasmidique et les vecteurs viraux. Au sein des **vecteurs d'expression plasmidique**, l'expression des protéines est sous le contrôle de promoteurs viraux puissants tels que le SV40, le promoteur du cytomégalo virus (CMV) ou le facteur d'élongation

(EF-1) qui ont l'avantage d'être facile à manipuler (Gorman, 1990; Kim *et al.*, 1990; Paborsky *et al.*, 1990; Wurm *et al.*, 1999).

Les **vecteurs viraux** sélectionnés présentent des particularités de conception et de fonctionnement. Ils doivent avoir la capacité de porter des gènes étrangers et de les délivrer d'une façon efficace aux cellules de mammifères assurant ainsi leur expression en quantité importante. Les vecteurs dérivés des alphavirus, des adénovirus, des poxvirus et des rétrovirus sont les plus utilisés dans ce type d'application (Walther *et al.*, 2000).

➔ *Les vecteurs de type alphavirus*, virus à ARN enveloppés appartenant à la famille des *Togaviridae* dont trois membres sont connus pour être utilisés comme vecteurs d'expression de protéines hétérologues : le Sindbis virus (SIN), le Semliki Forest virus (SFV) et le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEE). Ces virus étant des agents de fièvres épidémiques sévissant en Afrique, leur utilisation en tant que vecteurs d'expression se fait à partir de souches atténuées. Pour améliorer le niveau d'expression de gènes hétérologues et diminuer la cytotoxicité cellulaire, des modifications par mutation et /ou par délétion de séquences particulières sur ces vecteurs ont été réalisées. Néanmoins ce système de production reste coûteux et son application limitée (Liljestrom *et al.*, 1991; Schlesinger, 2001; Lundstrom, 2015).

➔ *Les vecteurs de type adénovirus* : ce sont des virus à ADN linéaire double brin. Le génome est composé de différentes unités de transcription : quatre unités dites précoces (Early, E1 à E4) et cinq tardives (Late, L1 à L5). La connaissance précise de la régulation de la transcription des adénovirus a permis la construction de la première génération de vecteurs modifiés dits « Replication incompetent vector » pour l'expression de gènes hétérologues. Pour cela, la région E1 a été déléetée rendant le vecteur incapable de se répliquer *in vivo* et est remplacée par une cassette contenant le gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur exogène tel que le promoteur du cytomégalo virus. La suppression de la région E3 a augmenté la capacité d'insertion du transgène. Une seconde génération de vecteurs a été construite en supprimant les quatre unités de transcription E1 à E4. Enfin une troisième génération de vecteurs a vu le jour en ne conservant que les ITR « Inverted terminal repeat » avec une capacité d'insertion de transgène allant à plus de 36 kb (Vetrini *et al.*, 2010; Small *et al.*, 2011; Khan, 2013). Plusieurs protéines virales ont été exprimées dans ce type de vecteurs tels que la protéine de surface du virus de l'hépatite B, la sous unité R2 de l'Herpes virus (Wurm *et al.*,

1999). Les adénovirus sont largement utilisés pour le développement de vaccins vectorisés contre le virus HIV, le virus de l'hépatite C, les sous types H1N1 et H5N1 du virus Influenza, l'Epstein Barr virus (Appaiahgari *et al.*, 2015).

➔ *Les vecteurs de type poxvirus* : ce sont des virus à ADN double brin qui se répliquent entièrement dans le cytoplasme. L'efficacité d'expression des gènes étrangers dépend des promoteurs utilisés, le virus de la vaccine du genre *Orthopoxvirus* a été utilisé pour l'expression de la glycoprotéine G du virus de la rage (Blancou *et al.*, 1986), mais aussi pour l'expression la glycoprotéine 160 du virus HIV (Graham *et al.*, 1992) et la prothrombine humaine. Depuis, plusieurs autres virus appartenant aux genres *Orthopoxvirus*, *Avipoxvirus* ou *Capripoxvirus* sont utilisés pour exprimer diverses protéines amenant à la construction de vaccins vectorisés recombinants (Mackett *et al.*, 1982).

➔ *Les vecteurs rétroviraux* : ce sont des virus à ARN, le plus utilisé est un virus d'origine murine « Moloney murine leukemia virus M-MuLV ». Les vecteurs rétroviraux possèdent de nombreuses propriétés intéressantes incluant une délivrance efficace du gène d'intérêt ainsi qu'une stabilité du génome intégré, avec une capacité d'intégration dépassant les 10kb. De plus le génome viral des rétrovirus est facile à manipuler et possède un large tropisme cellulaire (Falkner *et al.*, 2004; Hu, 2014; Appaiahgari *et al.*, 2015).

En conclusion, la production de protéines dans ce type de système reste très onéreuse et difficile à mettre en œuvre comparé au système bactérien et aux autres systèmes eucaryotes disponibles. Dans ces systèmes, une contamination virale d'origine animale ne peut pas être totalement écartée (Bisbee. *et al.*, 1993; Wurm *et al.*, 1999). Le rendement même s'il a fortement augmenté reste encore faible (en 1986, 50mg/l pour atteindre 4,7 g/l en 2004).

- Les animaux transgéniques

Les animaux transgéniques sont utilisés pour la production de protéines recombinantes dans le lait, œufs, sang, urine, plasma, glandes salivaires et le liquide séminal. Le lait constitue pour le moment le meilleur système pour la production de protéines recombinantes. Les animaux faisant l'objet de cette production sont généralement les ovins, caprins, souris, lapins, bovins, porcs, et quelques animaux aquatiques. Le caprin est considéré comme un modèle intéressant, de par son entretien à faible coût, son rendement important en lait et sa prolificité précoce et

rapide (Brem *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 2013). L'avantage de produire des protéines recombinantes chez les animaux transgéniques réside dans le faible coût de production représentant 1/10 du coût de production en cellules de mammifères avec un fort rendement et une bonne qualité de la protéine synthétisée. De nombreuses modifications post traductionnelles telles que la glycosylation peuvent avoir lieu. La possibilité de produire plusieurs transgènes chez un même animal est aussi un avantage majeur (McKown, 1999; Dove, 2002).

- Les plantes transgéniques

Les plantes transgéniques sont une alternative attractive aux systèmes de production conventionnels tels que les bactéries, les levures, les cellules animales et les cellules d'insectes. Les vecteurs d'expression utilisés dérivent de différentes plantes. Le tabac est très utilisé, suivi de la pomme de terre, du blé, des tomates, du riz et du maïs (Stoger *et al.*, 2002). Les plantes transgéniques peuvent être produites de deux manières, soit par insertion du gène d'intérêt au sein d'un virus naturellement retrouvé chez les plantes, soit par insertion du gène directement au niveau de l'ADN de la plante. Ce système de production est généralement utilisé pour la production d'anticorps, de vaccins et dans le domaine biopharmaceutique (production d'anticoagulants, d'inhibiteurs de la thrombine, d'hormones de croissance, des protéines simples telles que l'interféron ou l'albumine sérique) (Stoger *et al.*, 2002; Walmsley *et al.*, 2003). Différents antigènes ont été exprimés dans différents vecteurs d'expression dérivant de plantes, l'antigène de surface du virus de l'hépatite B ainsi que le domaine N terminal de la protéine S du coronavirus ont été produits dans la plante de pommes de terre, la protéine F de *Pseudomonas aeruginosa* a été exprimée dans la plante de tabac et la sous unité B de la toxine cholérique dans la plante de tomates (Walmsley *et al.*, 2003; Rigano *et al.*, 2009). De plus, des études immunologiques sur des animaux ont montré que les protéines antigéniques produites au niveau des chloroplastes des plantes induisent une réponse immune protectrice (Koya *et al.*, 2005; Arlen *et al.*, 2008). La protéine A27 du virus de la vaccine a également été produite avec succès, sous une forme soluble et dans de larges quantités dans les chloroplastes des plantes (Rigano *et al.*, 2009). Cette protéine produite est similaire à la protéine native retrouvée dans les particules virales et dans les cellules infectées par le virus de la vaccine. De plus la protéine A27 exprimée dans ce système a pu former des oligomères et a pu être reconnue par les sérums d'individus infectés par des Orthopoxvirus suggérant que la protéine a conservé certains épitopes antigéniques présents dans la protéine native (Rigano *et al.*, 2009).

Les plantes transgéniques présentent de nombreux avantages, c'est un système d'expression économique qui ne requiert pas de matériel coûteux contrairement à la culture de cellules mammifères extrêmement délicate et très coûteuse. Il possède une capacité de production rapide et à grande échelle avec un risque minimal de contamination avec les pathogènes d'origine animale ou humaine. De plus la production dans ce système ne nécessite pas une purification ultérieure et les protéines produites possèdent des modifications post-traductionnelles. Des protéines complexes peuvent aussi être produites dans ce système en les assemblant sous leur forme active (Hood., 2002; Walmsley *et al.*, 2003).

Les inconvénients des plantes transgéniques incluent une possible contamination avec les pesticides, les herbicides ou les métabolites toxiques de plantes. Les protéines étrangères sont rapidement dégradées dans les tissus de plantes, en effet certaines protéines sont dégradées dans les deux heures, et dans la plupart des cas, le taux de protéines accumulées est insatisfaisant et est en général compris entre 0,01 et 0,004% des protéines solubles totales. Cependant cette protéolyse a pu dans certains cas être évitée grâce à l'ajout de lait écrémé (Fitzgerald, 2003; Nuttall *et al.*, 2003; Walmsley *et al.*, 2003; de Virgilio *et al.*, 2008).

Le tableau 12 récapitule les avantages et les limites de tous les systèmes d'expression de protéines recombinantes que l'on vient de citer.

Tableau 12. Les différents systèmes de production de protéines recombinantes et leurs caractéristiques (Bertolini *et al.*, 2016).

	Systèmes de production					
	Bactéries	Levures	Baculovirus	Plateforme transgénique		
				Cellules CHO	Plantes	Animaux
Rendement	+++++	+++++	+++	++	+++++	+++++
Investissement	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Coût	+++++	+++++	++	++	+++++	++++
Flexibilité	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Conservation	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Stabilité	+++++	+++++	++++	+++	+++++	+++++
Récolte	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Modifications post traductionnelles	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Purification	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Contamination	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Disponibles sur le marché	++++	+++	+++	+++++	+	+++

3.2. Etude de l'antigénicité

La reconnaissance du caractère antigénique d'une protéine peut être abordée par plusieurs méthodes d'analyse. Elle consiste à mettre en évidence la présence d'épitopes dans la séquence de la protéine en question qui peut être confirmée par une réponse humorale de l'hôte. Pour cela, plusieurs techniques sont utilisées, deux exemples sont présentés dans ce manuscrit, la technique de Western Blot et la technique d'immunofluorescence.

3.2.1 La technique de Western blot (WB)

Le Western Blot appelé aussi « protein blotting » ou « immunoblotting » (Jensen, 2012; Kurien *et al.*, 2015; Bass *et al.*, 2017) est une technique d'immuno-détection des protéines développée en 1979 par Towbin à partir du Southern blot et du Northern blot, utilisés respectivement pour la détection d'ADN et d'ARN. Il permet l'identification, la quantification, la détermination de la taille des protéines mais permet aussi d'identifier les interactions avec d'autres protéines et leurs modifications post traductionnelles (clivage, phosphorylation, glycosylation, méthylation). L'identification et la reconnaissance des protéines étudiées par un sérum spécifique confirment le caractère antigénique des molécules analysées par cette technique.

Plusieurs aspects doivent être considérés lors de la réalisation d'un WB : (a) Extraction des protéines suivie de leur dénaturation (b) Séparation électrophorétique sur un gel de polyacrylamide (PAGE), la concentration du gel ainsi que la migration des protéines dénaturées et chargées négativement se fait selon la taille de la protéine d'intérêt, (c) Transfert à une membrane permettant l'immobilisation des protéines séparées sur gel.

La technique de Western blot (WB) présente l'avantage de pouvoir distinguer plusieurs protéines ayant des poids moléculaires différents. Cependant, cette technique longue et assez coûteuse ne permet pas une quantification précise de la protéine d'intérêt. Des techniques complémentaires telles que l'ELISA ou la spectrométrie de masse permettent une quantification protéique en lien avec le WB (Hu *et al.*, 2005).

3.2.2 La technique d'immunofluorescence

Cette technique immunologique peut être utilisée selon deux approches : soit en immunofluorescence directe ; où un anticorps fluorescent est utilisé directement pour identifier l'antigène cible, soit en immunofluorescence indirecte (IFA) réalisée en de deux étapes distinctes : une liaison de l'antigène cible à un anticorps primaire spécifique puis à un second anticorps (dit anticorps secondaire) couplé à une fluorescéine reconnaissant le complexe antigène-anticorps primaire. Cette technique est utilisée pour mettre en évidence le caractère antigénique d'une protéine (Ghanadan *et al.*, 2015).

3.3. Etude de l'immunogénicité

Elle consiste à mettre en évidence la présence de protéines immunogènes. Ces dernières ont la propriété d'induire une réponse immunitaire de type cellulaire et/ou humorale dans des conditions *in vivo* et *in vitro*. L'étude de l'immunogénicité des protéines est principalement basée sur des expérimentations animales qui sont coûteuses et incluent des protocoles généralement longs et lourds. En lien avec la nécessité sur le plan éthique de limiter le recours à l'expérimentation animale, plusieurs laboratoires ont adopté la stratégie des 3R (Remplacement, Raffinement et Réduction) en cherchant des alternatives telles que les outils bio-informatiques, la culture cellulaire *in vitro*, l'utilisation d'autres organismes comme les vertébrés inférieurs (zebra fish), les invertébrés (*Drosophila melanogaster*) ou des micro-organismes (Rusche, 2003; Giacomotto *et al.*, 2010; Doke *et al.*, 2015).

II. Exemple d'étude : Les protéines du genre *Capripoxvirus* (A27, L1, A33 et B5)

Les études sur la caractérisation des protéines du genre *Capripoxvirus* sont trop peu nombreuses. Le choix des protéines étudiées a été donc basé sur des rapports traitant des propriétés immunogéniques des protéines les plus étudiées chez un virus représentant la famille des *Poxviridae* : le virus de la vaccine (VACV). L'étude du cycle viral du virus de la vaccine a mis en évidence le rôle joué par certaines protéines (Hooper *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2007; Kaeffer *et al.*, 2014) :

(i) onze protéines sont associées à la surface membranaire des MV, les gènes codant pour les protéines : A14.5L, E10R, I5L, A13L, A27L, A9L, A14L, A17L, L1R, D8L et H3L. Parmi ces 11 protéines, 5 sont la cible des anticorps neutralisants : les protéines A27L, L1R, H3L, D8L et A17L. Parmi ces 5 protéines, les 3 protéines codés par les gènes A27L, D8L et H3L sont des antigènes majeurs immunodominants et représentent des molécules d'adhésion qui se lient aux glycosaminoglycanes, l'héparan sulfate (A27 et H3) et la chondroïtine sulfate (D8).

(ii) cinq protéines sont associées à la membrane lipidique bicouche des EV : les protéines A33, A34, F13, B5 et A56. Parmi ces protéines, les deux protéines A33 et B5 codés respectivement par les gènes A33R et B5R représentent des antigènes majeurs.

Ceci est confirmé par bon nombres d'études. En effet, l'infection par le virus de la vaccine induit la production d'anticorps dirigés contre les antigènes majeurs incluant des protéines présentes

au niveau du virion enveloppé extracellulaire (EV) telles que les protéines A33 (Galmiche *et al.*, 1999), B5 (Bell *et al.*, 2004), ou au niveau du virion mature intracellulaire (MV) telles que les protéines A27, L1, D8 et H3 (Rodriguez *et al.*, 1985; Wolffe *et al.*, 1995; Ichihashi *et al.*, 1996; Hsiao *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2007). L'homologue de la protéine D8 du virus de la vaccine étant absent chez les trois virus du genre *Capripoxvirus*, ce gène n'a pas été retenu pour notre étude (Tulman *et al.*, 2001; Tulman *et al.*, 2002). Beaucoup de travaux ont pointé l'importance du gène H3L et notamment de ses orthologues P32 et LSDV074 respectivement chez les GTPV/SPPV et le virus LSD (Carn *et al.*, 1994; Chand *et al.*, 1994; Heine *et al.*, 1999; Bhanot *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010). Même si la plupart de ces études ont plutôt confirmé une antigénicité de la protéine, elles ont aussi révélé une absence de reconnaissance par certains sérums positifs. En outre, ces travaux ont mis en évidence une certaine difficulté de production selon les différents systèmes utilisés ainsi qu'un problème de stabilité de la protéine recombinante produite. Ce gène n'a pas été donc retenu pour notre étude.

Les quatre protéines sur lesquelles les travaux de thèse vont porter seront donc plus précisément détaillées. Elles sont décrites comme immunogéniques, deux d'entre elles sont localisées sur la membrane des MV (A27 et L1) et les deux autres sur la membrane des EV (B5 et A33) (Figure 15).

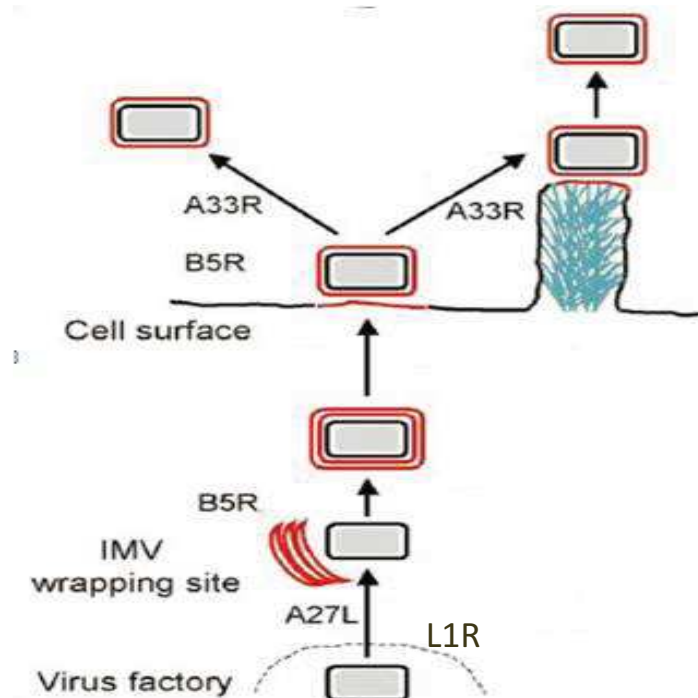


Figure 15. Implication des 4 protéines d'intérêt A27 , A33, B5, L1 dans le cycle viral du virus de la vaccine (Smith *et al.*, 2002).

1. La protéine A27 (VACV)/LSDV117 (CaPV)

La protéine A27 du VACV est représentée chez le genre *Capripoxvirus* (CaPV), par la protéine LSDV117 avec une identité en acides aminés de l'ordre de 33% entre les deux protéines (Tulman *et al.*, 2001). Des orthologues existent au sein de la famille des *Poxviridae* (Lai *et al.*, 1990). En particulier, entre les différents membres du genre *Capripoxvirus*, un pourcentage d'identité en acides aminés de 95% est observé entre les séquences de la protéine appartenant au virus LSD et ceux du GTPV/SPPV (Tulman *et al.*, 2002). Par la suite, l'analyse des séquences nucléotidiques de ce gène entre les souches virales de GTPV et de SPPV a révélé une identité nucléotidique (nt) de 95,3 à 100% et une identité en acides aminées (aa) variant de 92,2 à 100% (Dashprakash *et al.*, 2015). La LSDV117 est aussi une protéine hautement conservée en intra-espèce. L'analyse des souches de GTPV révèle une analogie de 98,4 à 100% en (nt) et de 96,6 à 100% en (aa). Ces chiffres sont comparables à ceux obtenus avec les souches de SPPV (Dashprakash *et al.*, 2015).

1.1. Structure de la protéine A27

L'intégralité des données relatives à la structure de la protéine A27 provient de travaux portant sur la protéine A27 du virus de la vaccine, les données structurales sur les orthologues des *Capripoxvirus* n'étant pas disponibles. Etant donné le faible degré de conservation, ces données ne peuvent être extrapolées à son homologue présent chez les *Capripoxvirus*.

La protéine A27 du virus de la vaccine est une protéine membranaire localisée sur l'enveloppe virale des virions matures intracellulaires (MV) et organisée sous forme de trimère (Rodriguez *et al.*, 1985). Elle s'assemble sous cette forme en utilisant l'interface de la partie N terminale (NTR). La forme trimérique est constituée de 2 brins en hélices α parallèles et un brin en hélice α antiparallèle. Deux formes trimériques peuvent s'assembler pour former un hexamère en utilisant l'interface de la partie C terminale (CTR). La protéine A27 de la vaccine possède un unique site de glycosylation. Cependant, les travaux de Rodriguez mettent en évidence une forme non glycosylée de la protéine native (Rodriguez *et al.*, 1987). La forme monomérique de la protéine présente une taille apparente de 14kDa (Vazquez *et al.*, 1999).

L'étude de l'architecture structurale de la protéine A27 du virus de la vaccine a permis de mettre en évidence quatre domaines fonctionnels distincts décrits comme suit (Figure 16) :

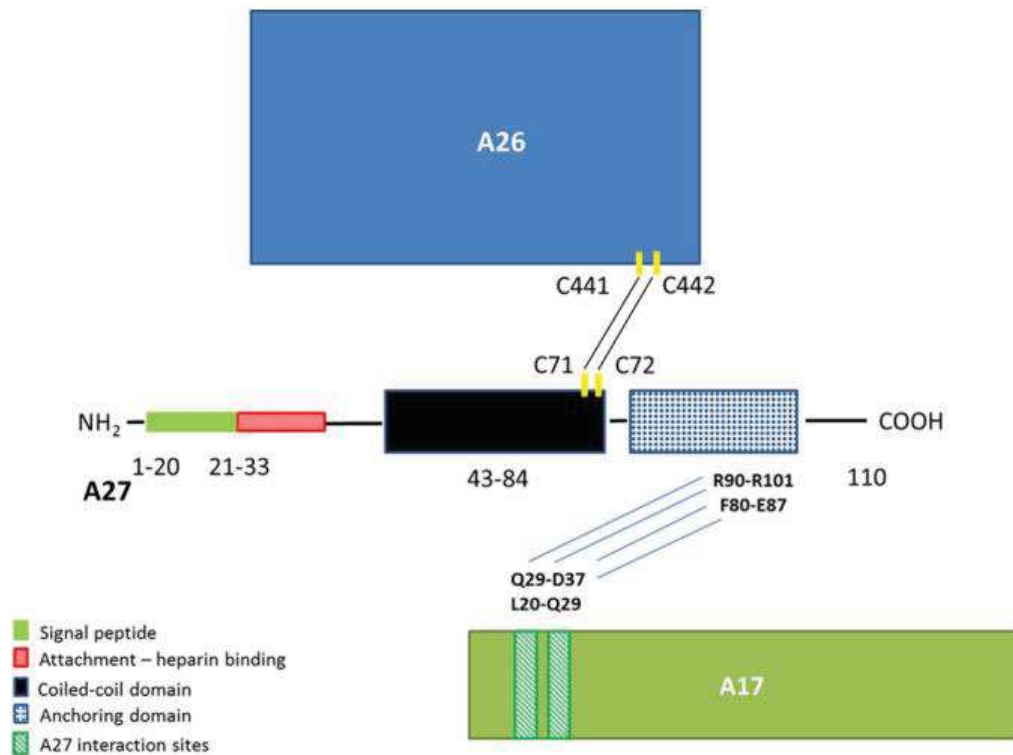


Figure 16. Domaines fonctionnels et interactifs de la protéine A27 (Hughes *et al.*, 2014).

(i) Le domaine « Signal peptide » ici en vert correspondant au peptide signal situé en partie N terminale composé d'une séquence de 20 acides aminés (Takahashi *et al.*, 1994).

(ii) Le domaine « heparin binding », ici en rouge, riche en arginine et lysine et organisé en hélice α . Ce domaine agit comme site d'attachement aux glycosaminoglycanes (GAGs) (Howard *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). L'interaction au niveau de ce domaine se produit via l'héparan sulfate et ceci au niveau des acides aminés 21 à 33. L'attachement à l'héparine requiert la séquence conservée KKPE au sein de l'HBD (Heparin Binding Domain) du VACV (Chung *et al.*, 1998; Vazquez *et al.*, 1999).

(iii) Le domaine « coiled-coil CCD » ici en noir correspondant à la troisième partie fonctionnelle de la protéine A27, est formé par une région super enroulée impliquant 41 résidus. Le domaine CCD contient deux cystéines contiguës (C71-C72) responsables de l'hétéro-oligomérisation avec la protéine A26. L'interaction se fait grâce à deux ponts disulfures formés entre les résidus C71 et C72 de la protéine A27 et les résidus C441 et C442 de la protéine A26 (Ching *et al.*, 2009).

(iv) Le domaine « leucine zipper LZD» ici en bleu est responsable de l'ancrage de la protéine A27 à la membrane virale, il est localisé en partie C terminale à partir du résidu 85. C'est à ce niveau qu'ont lieu les différentes interactions de la A27 avec d'autres protéines virales (Chu *et al.*, 2005). La protéine ne possédant pas de région transmembranaire, elle doit interagir avec la protéine membranaire A17 pour s'ancrer dans la membrane à travers des liaisons non covalentes qui se font au niveau des deux sites. Le domaine leucine Zipper se substitue à un domaine transmembranaire pour assurer cette fonction d'ancrage (Howard *et al.*, 2008).

La protéine A27 du virus de la vaccine interagit donc en complexe avec les protéines A17 et A26. En effet, en association avec la protéine A17, elle peut médier la fusion cellulaire. Ce complexe sert aussi de support à la membrane virale pour la protéine A26 (Howard *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014) (Figure 16).

1.2.Fonctions et interactions

Les informations incluses dans ce chapitre proviennent également de résultats de travaux réalisés sur la protéine A27 du virus de la vaccine. Les données fonctionnelles sur les *Capripoxvirus* n'étant pas disponibles.

La protéine A27 intervient à plusieurs niveaux au cours du cycle viral :

(i) Rôle majeur dans l'entrée du virus par la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Comme cela a été décrit antérieurement, cette action est surtout médiée par la partie NH2 terminale de la protéine, c'est à dire le domaine HBD. L'initiation de la fusion est la conséquence d'une relation étroite établie rapidement après l'attachement viral entre la protéine et les composants cellulaires. Ainsi, la protéine A27 va s'attacher spécifiquement à la cellule via l'héparan sulfate retrouvé à la surface cellulaire de l'hôte infecté. Cet héparan sulfate qui est un glycosaminoglycane est un médiateur général pour l'entrée des poxvirus (Chung *et al.*, 1998; Vazquez *et al.*, 1999). La délétion de la partie N terminale de la protéine a mis en évidence une inhibition au niveau de l'attachement et de la fusion des particules virales étudiées. Par contre ces virions mutés en la protéine A27 arrivent à entrer dans la cellule hôte, suggérant qu'il existe des mécanismes alternatifs ne faisant pas intervenir la protéine A27 (Ichihashi *et al.*, 1994).

(ii) Implication dans le transport intracellulaire des particules MV des « virus factory » au site de formation des WV en deux phases. Au cours de la première phase, la protéine est requise

pour le transport des MV des « virus factory » au site de leur enveloppement via les microtubules (Ward, 2005). Au cours de la seconde phase, la protéine catalyse l'enveloppement des IMV par les membranes de l'appareil de Golgi pour former les WV (Ward, 2005). La délétion de la protéine A27 n'affecte pas la production des MV mais il y aura un défaut de leur transport ainsi qu'une incapacité d'enveloppement par des membranes additionnelles suivie d'une formation moindre des EV (Chang *et al.*, 2013).

(iii) Intervention dans la dissémination virale par la fusion cellule à cellule qui a lieu tardivement au cours de l'infection, et par la libération du virion extracellulaire hors de la cellule (Gong *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1990; Sanderson *et al.*, 2000). Cette protéine est aussi essentielle à la libération des virions extracellulaires enveloppés EV de la cellule infectée. En effet il a été observé une incapacité des virions présentant une mutation de la protéine A27 dans sa partie N terminale, à être libérés de la cellule infectée. Dans ces conditions les MV sont produits mais la formation des EV reste très limitée (Rodriguez *et al.*, 1990).

1.3. Etude de l'antigénicité de la protéine A27

La reconnaissance par les anticorps spécifiques de la protéine de la A27 du virus de la vaccine est réalisée au niveau de trois régions structurales : le domaine responsable de la formation des EEVs (résidus 1 à 29), le domaine « Heparin Binding » (résidus 21-33) et le domaine de fusion (résidus 29-43) (Berhanu *et al.*, 2008). Kaeffer et ses collaborateurs ont démontré qu'un groupe d'anticorps monoclonaux protecteurs neutralisants interagit avec la région peptidique 31-40 qui se trouve près du site de liaison au GAGs interférant ainsi avec sa fonction et son adhésion (Kaeffer *et al.*, 2016).

Le domaine HBD contient un épitope reconnu par un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre MPXVA29 protéine homologue à la protéine A27 du Monkeypox virus (Hughes *et al.*, 2014). Cet anticorps bloque l'attachement de la protéine à l'héparine et est spécifique de MPXV et ne reconnaît pas la protéine A27 de VACV.

Seules deux études travaillant sur la protéine A27 des Capripoxvirus ont pu mettre en évidence l'antigénicité de cette protéine chez le goat poxvirus (Zheng *et al.*, 2009) ainsi que chez le sheep poxvirus (Chervyakova *et al.*, 2016). La A27 du goatpoxvirus a été correctement reconnue par un sérum anti-GTPV positif confirmant son antigénicité (Zheng *et al.*, 2009). Le même constat est observé pour la protéine A27 du sheep poxvirus exprimée en système procaryote et qui a

été reconnue par un anti-sérum provenant de chèvres expérimentalement infectées avec le SPPV (Chervyakova *et al.*, 2016).

1.4. Etude de l'immunogénicité de la protéine A27

La protéine A27 chez le virus de la vaccine a été prouvée par de nombreuses études comme étant une protéine immunogène. C'est sous la forme native trimérique que la protéine est immunogène (Lai *et al.*, 1990). Diverses formulations de la protéine ont permis d'induire une réponse immune majoritairement humorale avec sécrétion d'anticorps neutralisants (Lai *et al.*, 1991; Demkowicz *et al.*, 1992; Rudraraju *et al.*, 2010; Perino *et al.*, 2013), mais aussi cellulaire, avec activation des mécanismes de défense cellulaire innée chez l'hôte infecté (IFNs, cellules NK) (Lai *et al.*, 1991) et acquise (LT CD4 et CD8) (Tang *et al.*, 2006; Rudraraju *et al.*, 2010).

L'immunogénicité de la protéine A27 chez les capripoxvirus a été démontrée par deux études (Zheng *et al.*, 2009; Chervyakova *et al.*, 2016). La première travaillant sur la protéine A27 du goatpoxvirus, en immunisant des souris à deux reprises (J0 et J21) avec la protéine produite dans un système eucaryote, a pu obtenir un titre d'anticorps spécifique (ELISA) deux fois plus important que chez des souris vaccinées avec la souche GTPV-AV41. Suite à un test de séroneutralisation, les auteurs ont pu mettre en évidence un taux d'anticorps neutralisants important surtout après le boost. Le même constat est observé chez des chèvres immunisées avec la même construction (Zheng *et al.*, 2009). La deuxième étude a traité de la protéine A27 du sheep poxvirus (SPPV 117) exprimée en système procaryote. Des lapins immunisés avec cette construction ont pu produire un titre d'anticorps qui a permis de neutraliser le SPPV en culture cellulaire (Chervyakova *et al.*, 2016).

2. La protéine L1 (VACV)/ LSDV60 (CaPV)

La protéine L1 est très peu étudiée chez le genre *Capripoxvirus* et a été pour la première fois décrite chez le virus de la vaccine en 1989 (Franke *et al.*, 1989). La protéine L1 est hautement conservée chez les virus du genre *Orthopoxvirus* présentant une identité en acides aminés de l'ordre de 99% entre les différents membres. Ce rapport d'identité en acides aminés varie avec les orthologues de la protéine L1 des capripoxvirus (LSDV60) et les fowlpoxvirus, respectivement, il n'est que de 66% et 52% (Su *et al.*, 2007).

2.1. Structure

A nouveau, la plupart des données sur la structure de la protéine L1 proviennent de travaux réalisés sur le virus de la vaccine. Même si la protéine L1 est la plus homologue parmi les quatre protéines étudiées, l'extrapolation des données structurales ci-dessus est à considérer avec prudence.

La protéine L1 du virus de la vaccine est une protéine transmembranaire exprimée tardivement au cours de l'infection. Elle est localisée essentiellement à la surface des virions matures (MV) et est associée exclusivement aux membranes primaires entourant le core du virion. Elle a une masse moléculaire apparente de 25 à 29 kDa. C'est une protéine myristoylée en partie N terminale c'est-à-dire qu'elle contient l'acide myristique C14 lié à un résidu glycine G2 de la partie NH₂ terminale. Ce résidu, qui est conservé chez tous les poxvirus, joue un rôle central dans cette modification et son remplacement par l'acide aspartique ou l'alanine inhibe la modification post-traductionnelle. Les 13 premiers résidus de la partie N terminale influencent l'efficacité de cette modification (Ravanello *et al.*, 1993; Ravanello *et al.*, 1994).

L'analyse structurale de la protéine L1 du virus de la vaccine révèle une partie NH₂ terminale (1-185) représentant l'ectodomaine de la protéine qui est exposé à la surface du virion mature. En partie C terminale se trouve un domaine hydrophobe (résidus 186-204) impliqué dans l'ancrage de la protéine à la membrane (Ravanello *et al.*, 1993; Ravanello *et al.*, 1994).

C'est une protéine active sous forme monomérique, elle contient trois ponts disulfures intramoléculaires connectant respectivement les six cystéines C34-C57, C49-C136 et C116-C158 qui sont conservées chez les poxvirus (Su *et al.*, 2007). La formation des particules virales infectieuses et le repliement de la protéine sont sous la dépendance de cinq de ces cystéines (Wolffe *et al.*, 1995; Blouch *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2007).

La structure cristallographique de la protéine montre une unité asymétrique composée de deux molécules. L'unité est formée d'un ensemble de cinq brins en hélices α et d'une paire de brins en feuillets β (β 1- β 3, β 2- β 4) qui sont liés par des boucles se trouvant au sommet de la molécule. Les brins en feuillets β sont stabilisés par la présence d'un pont disulfure entre β 2 et β 3 (Figure 17). L'étude de sa structure révèle une cavité hydrophobe localisée en proximité de l'extrémité N-terminale, susceptible d'héberger et protéger le groupement myristate.

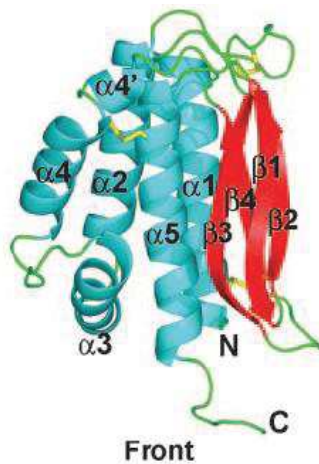


Figure 17. Structure cristallographique de la protéine L1 (Su *et al.*, 2005).

2.2. Fonctions et interactions

A nouveau, les informations relatives aux fonctions de la protéine L1 ont été principalement obtenues dans le cadre de travaux réalisés sur le virus de la vaccine.

La protéine L1 agit à plusieurs niveaux au cours du cycle infectieux du virus de la vaccine. Ses principaux rôles sont décrits comme suit :

- (i) Elle intervient au cours de la morphogénèse virale et est une protéine essentielle à la formation des particules infectieuses. La délétion de cette protéine est létale dans la mesure où, en son absence, seuls des virions immatures sont observés avec absence de plaque de lyse (Ravanello *et al.*, 1994).
- (ii) La L1 comme toute protéine myristoylée, est impliquée dans l'assemblage des virions et dans l'infection virale (Ravanello *et al.*, 1994; Maurer-Stroh *et al.*, 2004; Foo *et al.*, 2012).
- (iii) La protéine joue un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule hôte en interagissant avec le complexe entrée/fusion (EFC) dont elle ne fait cependant pas partie. Elle interagit avec la protéine virale F9 qui est aussi requise pour l'entrée du virus et pour la fusion (Ichihashi *et al.*, 1994; Bisht *et al.*, 2008). Des anticorps anti-L1 inhiberaient l'entrée virale (Ichihashi *et al.*, 1994).
- (iv) La protéine est essentielle à l'entrée virale en jouant le rôle de récepteur viral pour les protéines, RBP « Receptor Binding Protein ». La forme soluble de L1 bloque

l'entrée virale à l'étape d'adsorption et l'attachement par une compétition avec les virions pour les récepteurs autres que les GAGs se trouvant à la surface des cellules (Foo *et al.*, 2009). La partie N terminale de la protéine comporte des régions critiques pour l'entrée virale et l'infectivité du virus (Foo *et al.*, 2012).

2.3. Etude de l'antigénicité de la protéine L1

La protéine L1 du virus de la vaccine est une cible majeure des anticorps neutralisant ciblant les virions matures. Deux sites antigéniques distincts ont été mis en évidence (Aldaz-Carroll *et al.*, 2005). Le premier site est reconnu par un premier groupe d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent un épitope conformationnel discontinu comprenant les deux premières boucles de la protéine liées par un pont disulfure (C34-C57) (Figure 18, épitope 1). Ainsi, dans les conditions réduites, cet épitope n'est plus reconnu par ces deux anticorps.

Un deuxième groupe d'anticorps monoclonaux reconnaît un épitope linéaire (aa 118 à 128) (Figure 18 ; épitope 2) ; ces monoclonaux étant capable de neutraliser les virions matures avec une efficacité moindre en comparaison du premier. L'action de ces deux groupes d'anticorps ne démontrant pas de compétition, les deux sites épitopiques ne semblent donc ni chevauchant ni voisins (Figure 18) (Wolffe *et al.*, 1995; Aldaz-Carroll *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2007). D'autre part Keaver et ses collaborateurs ont décrit trois autres groupes d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine L1 (Kaeffer *et al.*, 2014). Ils mettent en évidence un épitope conformationnel, organisé autour d'un résidu clé, l'Asp35 dont la substitution abolit l'effet de neutralisation (Kaeffer *et al.*, 2014).

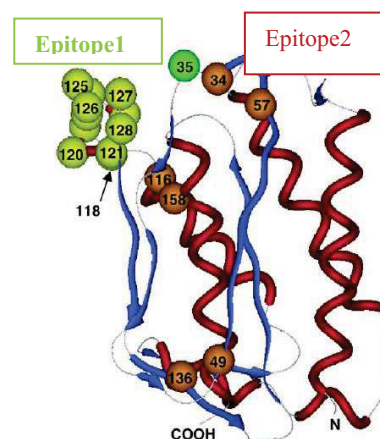


Figure 18. Localisation des épitopes neutralisants de la protéine L1 (Aldaz-Carroll *et al.*, 2005).

Deux études ont permis de démontrer l'antigénicité de la protéine L1 chez les Capripoxvirus ; plus précisément chez le goat poxvirus, en effet, la protéine exprimée dans un système eucaryote a pu être correctement reconnue par un sérum anti GTPV positif par WB (Zheng *et al.*, 2009) ainsi que le sheep poxvirus, puisque la protéine exprimée en système procaryote a pu être reconnue par un sérum provenant de caprins expérimentalement infectés avec le sheep poxvirus (Chervyakova *et al.*, 2016).

2.4. Etude de l'immunogénicité de la protéine L1

Le caractère immunogénique de la protéine L1 chez le virus de la vaccine a été démontré par plusieurs travaux. En effet, la protéine L1 a induit une immunité protectrice associée à l'induction d'anticorps neutralisants en étant utilisée comme composant de vaccins sous unitaires et/ou vaccins à ADN aussi bien chez les souris que chez les primates (Fogg *et al.*, 2004; Hooper *et al.*, 2004; Heraud *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont travaillé sur l'amélioration de l'immunogénicité de L1 par la délétion par exemple de la partie C terminale hydrophobe de la protéine et l'ajout d'un peptide signal (Shinoda *et al.*, 2009) ou d'une séquence tPA « Tissue plasminogen activator signal » en partie N terminale (Golden *et al.*, 2008). Ces modifications ont été accompagnées d'une amélioration de la production d'anticorps neutralisants chez des souris immunisées avec ces protéines recombinantes, ces animaux étaient protégées contre un challenge léthal d'*Orthopoxvirus* (Golden *et al.*, 2008; Shinoda *et al.*, 2009). Par ailleurs, d'autres auteurs ont opté pour l'ajout d'adjuvants tels que les sels d'aluminium (Xiao *et al.*, 2013) ou QS-21 (Fogg *et al.*, 2007) aux formulations des vaccins contenant la protéine L1, ce qui a nettement amélioré la réponse humorale induite et s'est accompagné de niveau de protection plus élevés. L'effet observé était attribué par les auteurs de ces travaux à une interaction privilégiée entre les adjuvants et la protéine L1, aboutissant à une augmentation de l'immunogénicité de cette dernière (Fogg *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2013).

Une seule étude ayant démontré l'immunogénicité de la protéine L1 chez les capripoxvirus est celle de Chervyakova en 2016. Cette étude a traité de la protéine L1 du sheep poxvirus (SPPV 60) exprimée en système procaryote. Des lapins immunisés avec cette construction ont pu produire un taux d'anticorps qui a permis de neutraliser le SPPV en culture cellulaire tout en inhibant l'effet cytopathique observé (Chervyakova *et al.*, 2016).

3. La protéine A33(VACV)/LSDV122(CaPV)

La protéine A33 est présente chez tous les membres des *Chordopoxvirinae* à l'exception du genre *Avipoxvirus* (Roper *et al.*, 1996). Elle présente une extrémité N terminale fortement conservée, en particulier entre les différents virus du genre *Orthopoxvirus*. Ainsi, la protéine A33 du virus de la vaccine présente une identité en acides aminés de 90 et 94% avec ses homologues des virus Ectromelia et de la variole respectivement. Ce pourcentage d'identité en acides aminés chute à 30% entre la A33 du virus de la vaccine et celle des *Capripoxvirus* (Tulman *et al.*, 2002).

3.1. Structure de la protéine A33

L'ensemble des données présentées ici proviennent des travaux réalisés sur le virus de la vaccine. Le faible pourcentage d'identité de la protéine entre le virus de la vaccine et ceux du genre *Capripoxvirus* ne permet pas d'extrapoler ces données.

La protéine A33 du virus de la vaccine est une glycoprotéine membranaire intégrale de type II (la partie NH₂ est en intracellulaire) exprimée à la surface des EV. Elle se présente généralement sous forme de dimères. Chaque monomère est constitué de cinq brins de feuillets β et deux brins d'hélices α (Su *et al.*, 2010). L'ectodomaine de la protéine A33 est formé par deux monomères possédant un domaine « C type lectin-like domain CTDLs » (Su *et al.*, 2010). Les membres de la superfamille des CTDLs sont retrouvés chez plusieurs organismes. Un groupe de protéines de type II contenant le domaine CTDL dont la structure est connue sont les récepteurs membranaires de cellules tueuses NK (Natural killer) du système immunitaire innée composés de dimères de CTDLs (Zelensky *et al.*, 2005).

La protéine A33 de la vaccine possède deux sites de glycosylation (N et O) au niveau de chaque monomère ainsi que six cystéines dont cinq se trouvent dans le domaine extracellulaire et une dans la queue cytoplasmique. Ces six cystéines sont conservées parmi les membres de la sous famille des *Chordopoxvirinae* (Su *et al.*, 2010). Les cystéines en position 100, 109, 126 et 180 sont responsables de la formation de ponts intramoléculaires alors que la cystéine en position 62 est requise pour la formation de ponts disulfures intermoléculaires impliqués dans la liaison des deux monomères de la protéine A33. La dernière cystéine C36 qui est présente sur la queue cytoplasmique est palmitoylée (Roper *et al.*, 1996; Grosenbach *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2010) (Figure 19). Durant l'infection, la protéine A33 se présente sous forme d'homodimère ou de

tétramère, avec un rôle moindre de cette dernière dans l'infection (Chan *et al.*, 2010). Dans les conditions réduites et non réduites, la protéine migre respectivement sous forme d'une bande diffuse de 23 à 28 kDa (taille prédite de 21kDa) et 55 kDa. La différence de taille de la forme réduite observée peut être due à la glycosylation (Roper *et al.*, 1996).

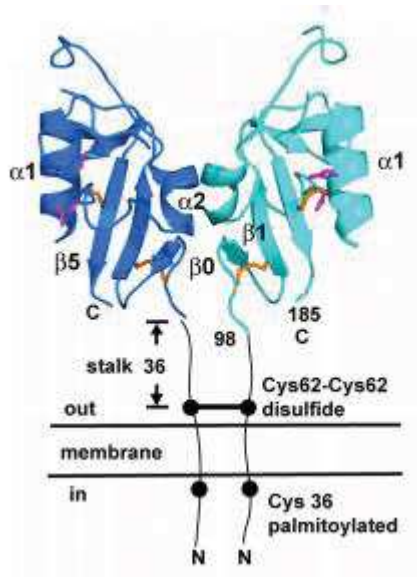


Figure 19. Structure cristallographique de la protéine A33 (Su *et al.*, 2010).

3.2. Fonctions et interactions de la protéine A33

A nouveau, les données présentées dans ce chapitre proviennent essentiellement des études du virus de la vaccine.

La protéine A33 est exprimée précocement et tardivement au cours de l'infection et possède de nombreuses modifications post-traductionnelles parmi lesquelles la phosphorylation, la N et O glycosylation et la palmitoylation (Krupovic *et al.*, 2010). Plusieurs fonctions ont été décrites chez la protéine A33 de la vaccine :

- (i) Elle possède un rôle important dans la dissémination virale, en effet, la délétion de cette protéine a engendré un défaut de formation des queues d'actine qui sont responsables de la dissémination de cellule à cellule. Cette dissémination est un phénomène contribuant à une résistance à l'action des anticorps. L'explication avancée reposerait sur l'intervention de microfilaments d'actines qui "pousseraient" les particules virales dans les cellules voisines sans les exposer aux anticorps (Law *et al.*, 2002).

- (ii) Durant l'infection virale, A33 coordonne l'incorporation des protéines virales au sein des membranes de l'WV afin de les présenter à la surface des particules virales, avec son domaine « C type lectin like » (Su *et al.*, 2010).
- (iii) La protéine possède aussi un rôle dans la morphogenèse et la sortie des WV et EV leur permettant d'infecter d'autres cellules, ainsi que dans la rétention des CEV en collaboration avec d'autres protéines (Chan *et al.*, 2010).
- (iv) A33 serait critique dans la répulsion des EV super-infectants, c'est-à-dire qu'elle participe avec d'autres protéines (A36) au marquage des cellules infectées ce qui va induire la répulsion des virions vers les cellules encore saines ce qui contribue à la dissémination rapide du virus (Doceul *et al.*, 2010; Breiman *et al.*, 2013).

Les interactions de la A33 du virus de la vaccine avec les autres protéines virales ont fait l'objet de nombreux travaux.

A33 forme ainsi un complexe avec les protéines A34, A36 et B5 stabilisant leur présentation à la surface des virions enveloppés, cette interaction peut être médiée par les ponts disulfures, ce complexe étant responsable de la formation des microfilaments d'actine au niveau des WV. En l'absence de A33, la A36 reste localisée dans les membranes de l'appareil de golgi et ne se retrouve pas au niveau des WV. La A33 coordonne donc la localisation de A36 sur la membrane des WV, l'interaction entre les deux protéines se fait par leur deux domaines cytoplasmiques (Wolffe *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2003). La protéine A33 interagit aussi avec la B5 pour former les microfilaments d'actine, l'interaction entre ces deux protéines se fait par le domaine transmembranaire de B5 (Katz *et al.*, 2003; Perdiguero *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2010). Enfin, en l'absence de A33, la protéine A34 s'accumule au niveau de l'appareil de Golgi avec une glycosylation altérée (Breiman *et al.*, 2013).

3.3. Etude de l'antigénicité de la protéine A33

La protéine A33 du virus de la vaccine comporte plusieurs épitopes d'intérêt : (i) un premier épitope se trouvant à la partie C terminale accessible à la surface des EV retrouvé (résidus 99 à 185), est reconnu par trois anticorps monoclonaux différents, anticorps conférant une protection dans un modèle animal murin. Aucune compétition n'est observée entre ces différents anticorps ce qui signifie qu'ils reconnaissent des épitopes différents (Chen *et al.*, 2007). (ii) Un second

épitope (aa117-120) est reconnu par un anticorps monoclonal Mab-1G10, conférant une protection par voie active et passive dans le même modèle animal.

L'intégration du peptide (aa 117-120) de la protéine A33 dans un vaccin sous unitaire pourrait donc induire un haut niveau de protection. Plus tard, He et al, ont montré que le résidu D115 en plus du résidu L118 contribuent à la formation de cet épitope (Hooper *et al.*, 2003; Lustig *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; He *et al.*, 2012).

L'antigénicité de la protéine A33 chez les capripoxvirus a pu être démontrée par deux études. La première travaillant sur la protéine du goatpoxvirus a pu démontrer que celle-ci est correctement reconnue par un sérum positif anti GTPV (Zheng *et al.*, 2009). Une deuxième étude travaillant sur la protéine A33 du sheep poxvirus (SPPV122) exprimée en *E. coli* montre qu'elle est correctement reconnue par un sérum provenant de chèvres expérimentalement infectées avec SPPV (Chervyakova *et al.*, 2016).

3.4. Etude de l'immunogénicité de la protéine A33

Contrairement aux autres protéines étudiées dans les chapitres précédents, la protéine A33 du virus de la vaccine n'induit pas la production d'anticorps neutralisants (Galmiche *et al.*, 1999). Il a aussi été établi que la protection induite par une vaccination avec la protéine A33 n'est pas corrélée au titre d'anticorps dans le sérum (Fang *et al.*, 2006). La protection induite par cette protéine semblerait plutôt due à une lyse directe des cellules infectées médiée par le complément (Hooper *et al.*, 2003). Comme le montre la figure 20, les anticorps anti-A33 se lieraient aux membranes externes des WV et EV ce qui provoque une agglutination virale induisant l'activation du complément et la lyse de la membrane externe des EV exposant ainsi les MV aux anticorps neutralisants anti-L1. Un tel effet synergique pourrait expliquer pourquoi un vaccin comprenant les protéines A33 et L1 protégerait mieux qu'un vaccin comprenant seulement l'une de ces deux protéines (Galmiche *et al.*, 1999; Fogg *et al.*, 2004; Lustig *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2011).

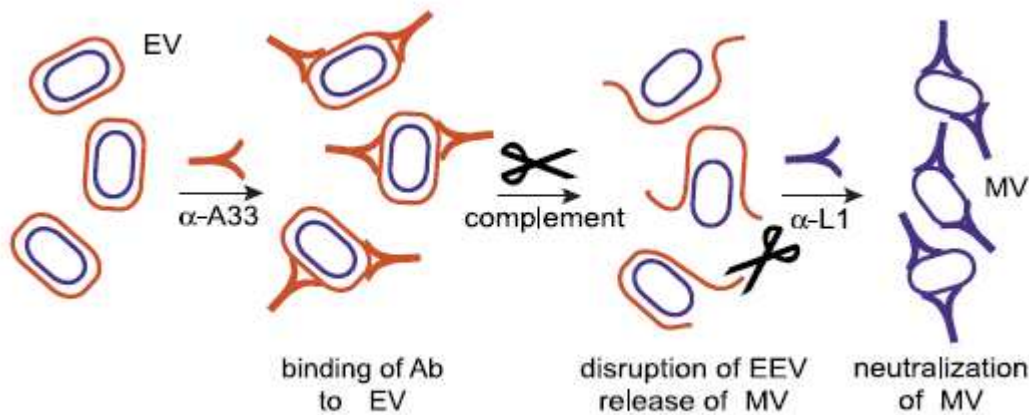


Figure 20. Lyse médiée par le complément des EV et des MV (Lustig *et al.*, 2004).

Dans ce cadre, Galmiche et collaborateurs ont montré qu'un vaccin ADN A33 induisait 100% de survie chez des souris après un challenge intranasal de virus de la vaccine. Hooper a confirmé cette hypothèse en démontrant que la protéine A33 était un bon candidat vaccinal (Galmiche *et al.*, 1999; Pulford *et al.*, 2004). Les travaux de Paran (2013), ont pu mettre en évidence une région protectrice impliquée dans l'induction d'une réponse immune chez des souris immunisées avec un recombinant exprimant A33 et challengées avec le VACV, une analyse plus détaillée a démontré que le résidu L118 jouait un rôle crucial dans cette protection avec un rôle compensatoire des résidus 117 et 120 (Paran *et al.*, 2013).

Deux études travaillant sur la protéine A33 des Capripoxvirus ont pu déterminer son immunogénicité. Pour cela, des souris immunisées avec la protéine A33 du goat poxvirus exprimée dans un système eucaryote ont pu développer un titre en anticorps spécifique 8 fois plus important que chez des souris immunisées avec la souche GTPV-AV41. Des chèvres immunisées avec la même construction ont pu développer un titre en anticorps deux fois plus important par rapport au groupe de chèvres vaccinés avec la souche GTPV-AV41. Par ailleurs, ces chèvres ont pu être partiellement protégées contre un challenge avec une souche virulente de goatpoxvirus AV40 (Zheng *et al.*, 2009). Par ailleurs, des lapins immunisés avec la protéine recombinante A33 du sheep poxvirus (exprimée en *E. coli*) ont pu produire des anticorps possédant une activité neutralisante vis-à-vis du sheep poxvirus (Chervyakova *et al.*, 2016), contrairement à ce qui a été décrit pour la A33 de la vaccine qui a échoué à neutraliser le virus de la vaccine *in vitro* (Galmiche *et al.*, 1999).

4. La protéine B5 (VACV)/LSDV141 (CaPV)

La protéine B5 est décrite essentiellement chez les virus du genre *Orthopoxvirus*, particulièrement chez le virus de la vaccine ; même si on la retrouve chez certains genres de la famille des *Poxviridae* avec des spécificités structurelles et fonctionnelles différentes (Bratke *et al.*, 2013). C'est une protéine hautement conservée, notamment avec l'homologue B6 du virus de la variole et du buffalopoxvirus, avec qui elle présente une identité en acides aminés respective de 93,4% et 98% (Engelstad *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2007). Ce pourcentage d'identité en acides aminés chute à 30% avec son homologue (LDSV141) du capripoxvirus.

4.1. Structure

Peu de données intéressant la structure de la protéine B5 chez les Capripoxvirus sont disponibles, la plupart des données présentées ci-dessous sont relatives à la structure de la protéine B5 du virus de la vaccine.

La protéine B5 du virus de la vaccine est une glycoprotéine membranaire de classe I (partie COOH est en intracellulaire) présente uniquement à la surface des virions extracellulaires enveloppés EV. Elle présente une taille apparente de 42 kDa (monomère) en conditions réduites et de 84 kDa en conditions non réduites (dimères) (Isaacs *et al.*, 1992).

C'est une protéine glycosylée et acétylée qui présente une homologie structurale avec un groupe de protéines impliqués dans la régulation de l'activation du complément (Engelstad *et al.*, 1992). L'alignement avec la séquence de C3L (codant pour une protéine de contrôle du complément : VCP) met en évidence un agencement semblable des deux protéines à l'exception du domaine transmembranaire (TM) (Bratke *et al.*, 2013) (Figure 21).

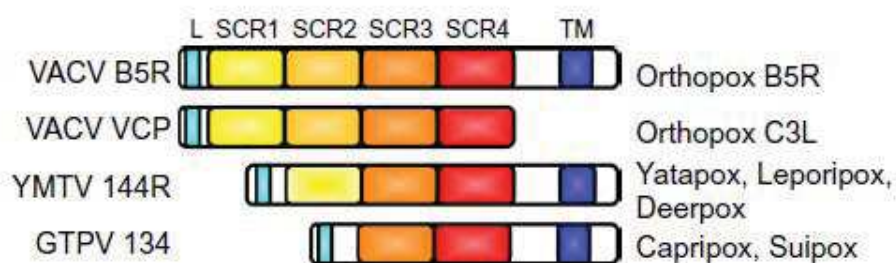


Figure 21. Organisation des domaines de B5R et VCP (Bratke *et al.*, 2013).

Sur le plan structural, la protéine B5 du virus de la vaccine se présente comme suit :

- (i) un peptidesignal en partie N terminale qui sera clivé au cours de l'infection virale (Isaacs *et al.*, 1992)
- (ii) un ectodomaine représenté par 4 domaines SCR « Short Complement like repeat », domaines que l'on retrouve chez les protéines eucaryotes de contrôle du complément. Les travaux de Bratke *et al.*, démontrent que la protéine B5 chez les capripoxvirus possède seulement deux domaines (SCR3 et SCR4) sur les 4 domaines (Figure 21) (Herrera *et al.*, 1998)
- (iii) une région (résidus 256-275), séparant les parties N et C terminale de la protéine, notée « STALK» sur la figure 22 (Aldaz-Carroll *et al.*, 2005) requise pour la rupture de la membrane des EV lors de son contact avec les glycosaminoglycanes permettant ainsi la libération du core au sein du cytosol de la cellule hôte (Roberts *et al.*, 2009).
- (iv) un domaine hydrophobe, situé en partie C terminale, comprenant un domaine transmembranaire favorisant l'ancrage de la protéine dans la membrane et une courte queue cytoplasmique. Cette partie C terminale inclue deux cystéines impliquée dans une modification post-traductionnelle : la palmitoylation qui est la forme la plus courante d'une S acétylation. La mutation des deux cystéines ou la délétion de la partie C cytoplasmique inhibe cette palmitoylation engendrant une diminution de l'interaction avec les protéines A33 et F13 et un défaut de transport intracellulaire de B5 (Lorenzo *et al.*, 2012).

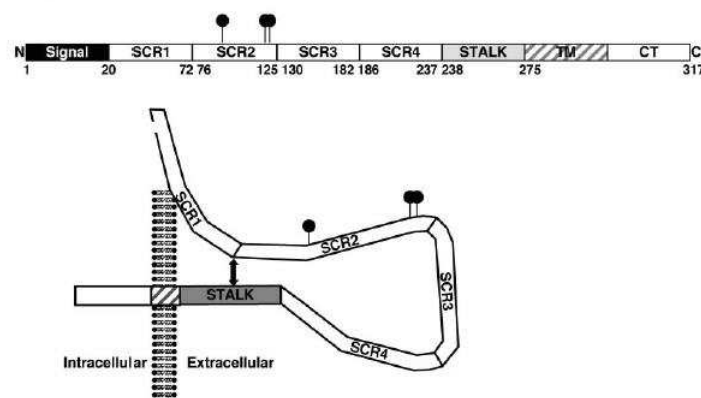


Figure 22. Organisation schématique de la structure de B5 du virus de la vaccine (Aldaz-Carroll *et al.*, 2005).

4.2. Fonctions et interactions de la protéine B5

La protéine du virus de la vaccine agit à plusieurs niveaux au cours du cycle du virus de la vaccine et possède plusieurs rôles décrits comme suit :

- (i) un rôle d'enveloppement des particules MVs. La délétion et/ou la mutation de la protéine B5 a mis en évidence un défaut d'enveloppement des MV par les membranes de l'appareil de Golgi, les EV ne sont plus détectés ni dans le cytoplasme ni à la surface des cellules infectées (Isaacs *et al.*, 1992; Galmiche *et al.*, 1999).
- (ii) un rôle dans la libération des virions ainsi que dans la dissémination virale. Ce rôle n'est pas observé chez les mutants présentant une délétion de la protéine B5, par absence de la formation de syncytium (Galmiche *et al.*, 1999).
- (iii) un rôle dans la morphogenèse des EV ; la délétion de la protéine B5 induit une diminution de la production des virions enveloppés (Chan *et al.*, 2010). Vu sa similarité avec les protéines du contrôle du complément, la protéine B5 pourrait protéger les EEV et les cellules infectées de la lyse médiée par le complément de l'hôte. La portion carboxyterminale et plus précisément le domaine transmembranaire permettant l'incorporation de la protéine B5 au sein des EV alors que la queue cytoplasmique est nécessaire pour la stabilité et un transport efficace de la protéine de l'appareil de golgi à la membrane plasmique (Engelstad *et al.*, 1993; Wolffe *et al.*, 1993; Perdiguero *et al.*, 2006).
- (iv) Rôle essentiel dans le cycle viral du virus de la vaccine : en effet, sa délétion affecte le cycle viral, la morphogenèse et la libération des particules matures aboutissant à un phénotype atténué des souches virales délétées (Engelstad *et al.*, 1993; Stern *et al.*, 1997).
- (v) Des rôles divers en interaction avec d'autres protéines ; ainsi l'incorporation de la protéine A33 au sein des virions enveloppés ne peut se faire qu'en interaction avec la protéine B5, par le biais du domaine transmembranaire et du « stalk ». Son rôle dans la formation des microfilaments d'actine nécessite une interaction avec la protéine A33 (Perdiguero *et al.*, 2006). Une autre entité avec laquelle la protéine B5 interagit est la protéine A34. En effet, les deux protéines sont fonctionnellement

dépendantes l'une de l'autre. Breiman et al. ont ainsi mis en évidence que l'absence de la protéine B5, affecte la localisation et la stabilité de la protéine A34, cette dernière s'accumulant dans le réticulum endoplasmique avec une glycosylation altérée (Breiman *et al.*, 2013). Inversement, Early démontre que l'absence de la protéine A34 empêche l'incorporation de la protéine B5 au sein des virions (Earley *et al.*, 2008). Dans ce cas, la protéine B5 se retrouve dans le réticulum endoplasmique (RE), la protéine A34 étant requise pour un transport de la protéine B5 du RE vers la région juxtanucléaire où aura lieu l'enveloppement des MV.

4.3. Etude de l'antigénicité de la protéine B5

Des travaux concernant le virus de la vaccine ont démontré que la protéine B5 était une cible majeure des anticorps neutralisant les EV. Cette activité neutralisante est en grande partie dépendante du complément, et plus particulièrement des composants C3 et C1q. Les anticorps dirigés contre la protéine B5 induisent une lyse importante des cellules infectées (Benhnia *et al.*, 2009).

Aldaz Carroll et collaborateurs ont identifié deux sites majeurs de neutralisation virale, le premier se situe à la jonction entre les domaines SCR1 et SCR2, et le deuxième se situe au niveau du « stalk » (Galmiche *et al.*, 1999; Aldaz-Carroll *et al.*, 2005). Ces mêmes sites ont été confirmés par les travaux de Berhanu comme étant deux sites majeurs de neutralisation (aa 51 à 90 et aa 221 à 280) (Berhanu *et al.*, 2008). Law et collaborateurs ont démontré que le SCR1 constituait un épitope majeur de neutralisation. En effet la présence de ce domaine rend le virus très sensible aux anticorps anti-B5 (Law *et al.*, 2001). Par ailleurs, Bell et collaborateurs ont montré qu'un virus recombinant délété des 4 SCR devenait résistant à la neutralisation par les anticorps (Bell *et al.*, 2004). Il semble que les deux domaines SCR3 et 4 ne soient pas reconnus par les anticorps induits par la protéine B5, ceci pourrait être expliqué par l'hypothèse avancée étant qu'ils ne seraient pas exposés à la surface de la protéine B5 (Aldaz-Carroll *et al.*, 2005). Un épitope conformationnel allant des résidus 20 à 130 a été reconnu par des anticorps anti B5 générés chez le chimpanzé et l'homme (Chen *et al.*, 2006).

Plusieurs auteurs ont montré l'existence de différences de propriétés antigéniques entre la protéine B5 de la vaccine et son homologue B6 chez le virus de la variole ainsi que l'absence de réactions sérologiques croisée, probablement attribuables à des différences d'exposition épitopiques entre les protéines B5 et B6 (Aldaz-Carroll *et al.*, 2007).

Seule une étude a pu mettre en évidence l'antigénicité de la protéine B5 chez les capripoxvirus particulièrement chez le goat poxvirus. En effet, la protéine correctement exprimée dans un système eucaryote a pu être reconnue par un sérum positif anti-GTPV confirmant donc son antigénicité (Zheng *et al.*, 2009).

4.4. Etude de l'immunogénicité de la protéine B5

Le caractère immunogène de la protéine B5 a été démontré dans le cadre d'essais de vaccination et d'immunisation passive. Chez la souris, la vaccination par un vaccin ADN exprimant la protéine B5 induit une protection variant de 37% à 80% après un challenge intrapéritonéal ou intranasal avec une souche virulente du virus de la vaccine (Galmiche *et al.*, 1999; Hooper *et al.*, 2003). La réponse immunitaire induite serait de type cellulaire avec activation du système immunitaire innée qui consiste en une forte réponse en IFN γ (Pulford *et al.*, 2004). D'autre part, la délétion de la protéine B5 engendre une diminution importante du niveau global d'anticorps neutralisants dirigés contre les EEV induits ; toutefois, une immunité protectrice est observée chez les animaux immunisés (Yokote *et al.*, 2015). En effet le vaccin « LC16m8 », défectueux en protéine B5 a protégé des souris saines et immunodéprimées contre un challenge avec le virus de la vaccine mais aussi contre le virus de la variole et le monkeypoxvirus (Kennedy *et al.*, 2011; Meseda *et al.*, 2013; Yokote *et al.*, 2015). Ainsi dans le cadre des travaux réalisés sur cette souche atténuée Lc16m8, la protéine B5, si elle est importante, n'apparaîtrait cependant pas indispensable pour l'induction d'une immunité protectrice (Kidokoro *et al.*, 2005; Saijo *et al.*, 2006).

L'étude de Zheng en 2009, est la seule à avoir permis de déterminer l'immunogénicité de la protéine B5 chez les capripoxvirus notamment chez le goatpoxvirus (Zheng *et al.*, 2009). Pour cela, des souris immunisées avec la protéine exprimée dans un système eucaryote ont pu développer un titre en anticorps spécifique 8 fois plus important que chez des souris immunisées avec la souche GTPV-AV41. En outre, des chèvres immunisées avec la même construction ont pu développer un titre en anticorps équivalent au groupe de chèvres vaccinés avec la souche GTPV-AV41. Par ailleurs, ces chèvres ont pu être partiellement protégées contre un challenge avec une souche virulente de goatpoxvirus AV40 (Zheng *et al.*, 2009).

Cadres et objectifs

L'état des connaissances sur les infections à *Capripoxvirus* en général, et, en Tunisie en particulier, présenté en première partie de ce manuscrit a permis de souligner l'importance du virus responsable de la variole ovine ou clavelée cliniquement décrite pour la première fois en Tunisie en 1798 par Gilbert (Lefèvre, 1983) (Partie I). Depuis l'isolement de l'agent responsable du sheep poxvirus « souche Zaghouan » en 1974, la clavelée est l'une des principales maladies ovines rapportées par les services vétérinaires Tunisiens (Ramisse *et al.*, 1978).

Ces travaux de thèse s'articulent en deux objectifs. Le premier est une description analytique de la variole ovine sous tous ses aspects en Tunisie (Partie II). Le deuxième concerne la caractérisation de quatre gènes identifiés comme immuno-dominants chez le genre *Capripoxvirus* (par analogie au virus de la vaccine) et pouvant être la source de stratégies vaccinales alternatives et innovantes (Partie III).

La clavelée engendre d'importantes pertes économiques que ce soit en Tunisie elle-même ou dans les pays d'Afrique du Nord voisins de la Tunisie touchés également par la maladie (Algérie, Maroc, Libye). Ces pertes sont dues d'abord à la chronicité des événements sanitaires liés à la maladie qui freine et interdit le commerce international des animaux malades et des produits dérivés mais aussi aux importants coûts des programmes de contrôle mis en place par les services vétérinaires des pays concernés. Dans cette grande région d'Afrique du Nord, l'outil le plus fiable et durable pour la lutte contre la variole est la mise en place d'un programme de vaccination basé sur des campagnes de vaccination de masse annuelles. Malgré ceci, en Tunisie, la variole ovine persiste dans les élevages de petits ruminants (Partie II). Une optimisation des outils permettant d'améliorer le contrôle de cette maladie est donc nécessaire. C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail de recherche.

Dans le contexte Tunisien, le développement d'outils vaccinaux optimisés s'avère indispensable pour un meilleur contrôle des infections à *Capripoxvirus* dans les régions infectées. Ainsi, le développement de vaccins sous-unitaires ou l'utilisation de vaccins recombinants vectorisés ciblant d'autres maladies d'intérêt circulant dans une même zone géographique pourraient être une alternative innovante contribuant ainsi à une meilleure gestion de l'ensemble des maladies ciblées en limitant les coûts de vaccination globaux. Le développement et l'optimisation de nouvelles stratégies vaccinales basées soit sur l'amélioration des performances des vaccins existants, soit sur le développement de vaccins sous-unitaires contribueraient à une amélioration de la lutte contre la variole ovine.

Le développement de vaccins sous-unitaires repose sur la caractérisation de gènes codant des protéines immuno-dominantes conférant une immunité protectrice. Ce type de vaccins nécessite la production de protéines recombinantes purifiées et caractérisées comme immunogéniques. Cette stratégie repose donc sur une très bonne caractérisation des protéines immuno-dominantes des capripoxvirus, qui seraient la cible des anticorps neutralisants. Différents systèmes d'expression (*Escherichia. coli*, baculovirus, *Saccharomyces cerevisiae*) de ces protéines sont alors possibles.

Mon second objectif de thèse s'inscrit dans ce cadre et porte sur l'identification et la caractérisation de protéines spécifiques du virus LSD immunogéniques et immunodominantes pouvant induire la production d'anticorps neutralisants chez l'animal vacciné ou naturellement infecté. Par homologie avec les protéines virales des *Orthopoxvirus* et, plus particulièrement au virus de la vaccine, le virus pour lequel un important corps de données est disponible, quatre protéines cibles des anticorps neutralisants ont été identifiées et caractérisées par des analyses *in silico*. Ceci a permis de mettre en évidence le degré de conservation de ces 4 protéines d'intérêt au sein de la famille des *Poxviridae* (Partie III, chapitre 1) mais également par des analyses *in vitro* de leur niveau d'antigénicité suite à leur expression dans deux systèmes d'expression différents : un système de type eucaryote et le système baculovirus (Partie III, chapitres 2 et 3). Enfin, l'identification d'épitopes linéaires ou conformationnels particulièrement pour la protéine A27 (LSDV117) a été réalisée (Partie III, chapitre 4). Une discussion générale suivie de perspectives conclut ce travail de thèse.

Partie II : Etude des infections à *Capripoxvirus*: exemple de la variole en Tunisie

La variole ovine causée par un virus du genre *Capripoxvirus*, est une infection endémique bien connue, elle a des répercussions importantes sur la population des petits ruminants en Tunisie et est responsable de pertes économiques élevées dans les régions d'Afrique du Nord en raison de son enzootie et de la transhumance active des animaux dans certaines régions en Tunisie. Les campagnes de vaccination annuelles pour contrôler la dissémination de la maladie en réduisant le niveau d'endémicité ainsi que les outils de diagnostic et de gestion adaptés à la situation tunisienne sont décrits dans cet article. La distribution saisonnière, temporelle et spatiale des foyers de la variole ovine ainsi que sa manifestation clinique sont abordées dans cette revue. La mise en place de moyens de vaccination individuels, la création d'infrastructures adéquates, la sensibilisation des éleveurs, l'établissement d'un réseau de surveillance sur le terrain et l'amélioration des méthodes diagnostiques de routine devraient constituer les principaux éléments d'un programme d'éradication de la maladie. Les analyses coût-bénéfice des stratégies de surveillance et de contrôle utilisées sont des étapes pour contrôler la persistance de la maladie.

I. Introduction

La dermatose nodulaire contagieuse des bovins, la variole ovine et la variole caprine sont les principales maladies virales qui ont un impact significatif sur l'industrie du bétail et par conséquent sur l'ensemble de l'économie des pays touchés (Murphy *et al.*, 1999; Damon, 2007).

Le virus de la variole ovine (SPPV), de la variole caprine (GTPV) et de la dermatose nodulaire contagieuse (LSDV) appartiennent au genre *Capripoxvirus* (CaPV), un genre appartenant à la famille des *Poxviridae* (Buller *et al.*, 2005). Leur génome qui est composé d'un ADN double brin d'environ 150 kb, code pour au moins 147 gènes (Tulman *et al.*, 2001). Une analyse comparative du génome complet des isolats de SPPV et de GTPV, incluant les isolats pathogènes ainsi que les souches vaccinales atténuées, a mis en évidence le haut degré d'homologie, celui-ci atteint jusqu'à 96% d'identité entre SPPV et GTPV et 97% entre LSDV et les génomes de GTPV et SPPV, suggérant que le SPPV est un ancêtre commun aux virus de la variole caprine GTPV et de la dermatose nodulaire contagieuse LSDV (Le Goff *et al.*, 2009; Lamien *et al.*, 2011a). La classification des différentes souches de SPPV et GTPV, était basée sur l'espèce hôte à partir de laquelle ces souches étaient isolées (ovins, caprins ou les deux), bien que certaines souches n'ont pas de spécificité d'hôte (Le Goff *et al.*, 2009; Lamien *et al.*, 2011a; Lamien *et al.*, 2011b).

Les maladies dues au genre *Capripoxvirus* sont endémiques dans plusieurs régions dans le monde. Le virus de la dermatose nodulaire contagieuse est présent sur tout le continent africain, à l'exception de la Libye, l'Algérie, du Maroc et de la Tunisie, qui sont toujours considérés indemnes de la maladie. Le LSDV est également répandu au Moyen-Orient (Israël, Liban, Palestine, Jordanie, Iran, Irak, Chypre, Turquie) et en Égypte (Kitching, 1986d; Yeruham *et al.*, 1995; Yeruham *et al.*, 2007; Promed, 2012; Mirzaie *et al.*, 2015; Alkhamis *et al.*, 2016), mais aussi dans la région des « Balkans » (Bulgarie, Grèce, Macédoine, Serbie) (Tuppurainen *et al.*, 2015; OIE, 2016; Promed, 2016), alors que les pays de l'Asie de l'Est sont indemnes (Tuppurainen *et al.*, 2012).

Les virus de la variole ovine et caprine sont très répandus en Afrique centrale et en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Libye et Tunisie) (Haegeman *et al.*, 2015), au Moyen-Orient, en Asie centrale et dans le sous-continent indien (Mondal *et al.*, 2004; Bhanuprakash *et al.*, 2006) et la Chine. Plus récemment, le virus s'est propagé aux pays du sud de l'Europe (Bulgarie, Grèce, Turquie) voisins des pays du Moyen-Orient (Carn, 1993; Dadousis, 2003; Kitching, 2004; Babiuk *et al.*, 2008; Mangana *et al.*, 2008; Zangana *et al.*, 2013) (Figure 23).

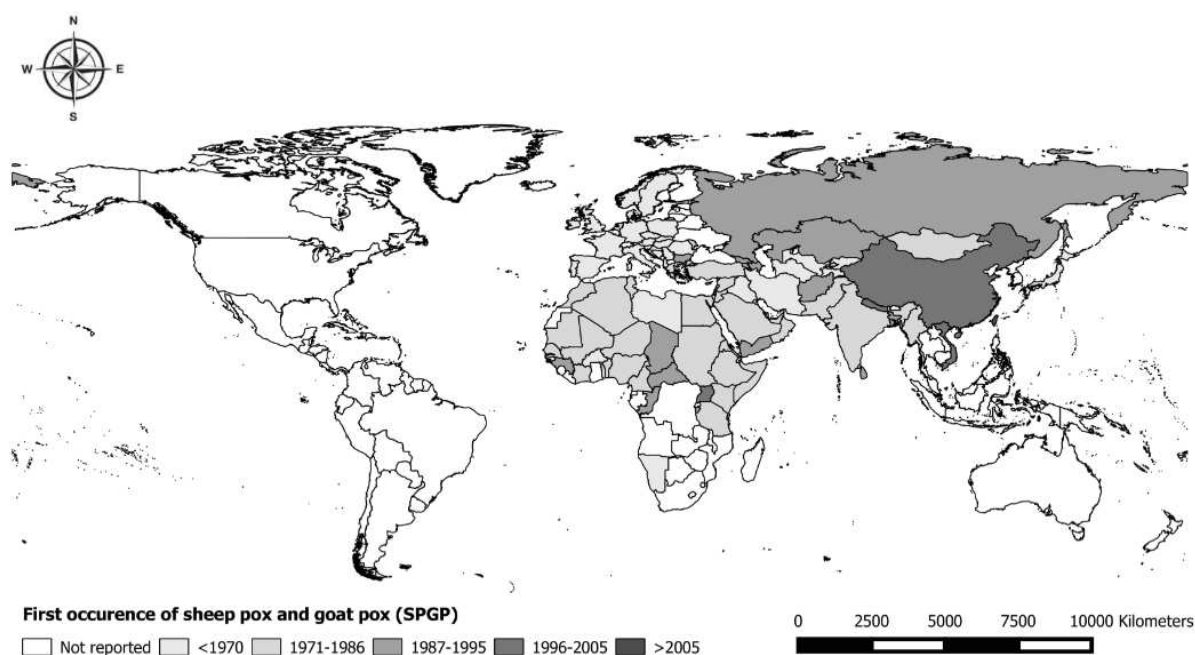


Figure 23. Distribution mondiale des virus de la variole caprine et ovine (1970-2015).

Ces infections virales surviennent principalement dans les pays où l'élevage des petits ruminants est extensif, nomade ou transhumant, et principalement dans les régions où le

mouvement des animaux n'est pas contrôlé. Le commerce international des animaux et de leurs produits (par exemple la laine et le cuir) est un facteur de risque supplémentaire pour l'introduction de ces virus dans les pays indemnes de variole ovine (Tuppurainen *et al.*, 2015; Galea *et al.*, 2016). Les outils spécialisés devraient être harmonisés entre les pays voisins d'Afrique du Nord dans le cadre d'un effort commun visant à lutter contre ces infections dans chaque pays affecté (Domenech *et al.*, 2006).

En Tunisie, l'isolement du virus a été reporté pour la première fois en 1974 (Ramisse *et al.*, 1978), bien que la maladie ait été reconnue depuis longtemps (Balozet, 1931). Depuis, de nombreuses épidémies ont été signalées à travers le pays, causant des pertes économiques considérables en raison de leur nature enzootique malgré des décennies de vaccination pour réduire la transmission de la maladie (Odissev *et al.*, 1995). Jusqu'à présent, la surveillance et la vaccination annuelle sont les seules mesures de lutte contre les infections à capripoxvirus en Tunisie (REMESA, 2012; DGSV, 2015).

Le but de cet article est de mettre en évidence le statut épidémiologique de la variole ovine en Tunisie au cours de ces 25 dernières années et d'étudier les paramètres clés pour réévaluer les stratégies de lutte pour une meilleure prévention et maîtrise de la future émergence de la maladie.

II. La variole ovine : propagation dans les pays du nord de l'Afrique jusqu'en Tunisie

1. La variole ovine en Afrique du Nord

La maladie est connue pour être endémique dans les pays d'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) avec des caractéristiques spécifiques dans chaque pays. La situation épidémiologique de la variole ovine dans un pays donné peut être affectée par le statut sanitaire des pays voisins, raison pour laquelle il est préférable d'investiguer la région dans son ensemble. Le risque de réinfection ou de réintroduction du virus pour les pays voisins est principalement lié au commerce illégal et légal des animaux sur les frontières non contrôlées (Achour *et al.*, 1999). La plupart des données recueillies sont de nature quantitative (nombre de cas signalés, nombre de foyers) et proviennent de la surveillance passive de la maladie. Un foyer est défini comme étant la survenue de cas de maladie en excès par rapport à ce qui est normalement attendu dans une communauté ou une zone géographique donnée ou pendant une

saison. Le nombre de foyers signalés est souvent sous-estimé, sous estimant par conséquent la prévalence réelle de la maladie dans les différents pays de la région. Néanmoins, le nombre de foyers de clavelée au cours des 20 dernières années de chaque pays a été recueilli et a révélé des variations dans les différents pays d'Afrique du Nord (Wahid, 2013; Handistatus, 2016) (Figure 24).

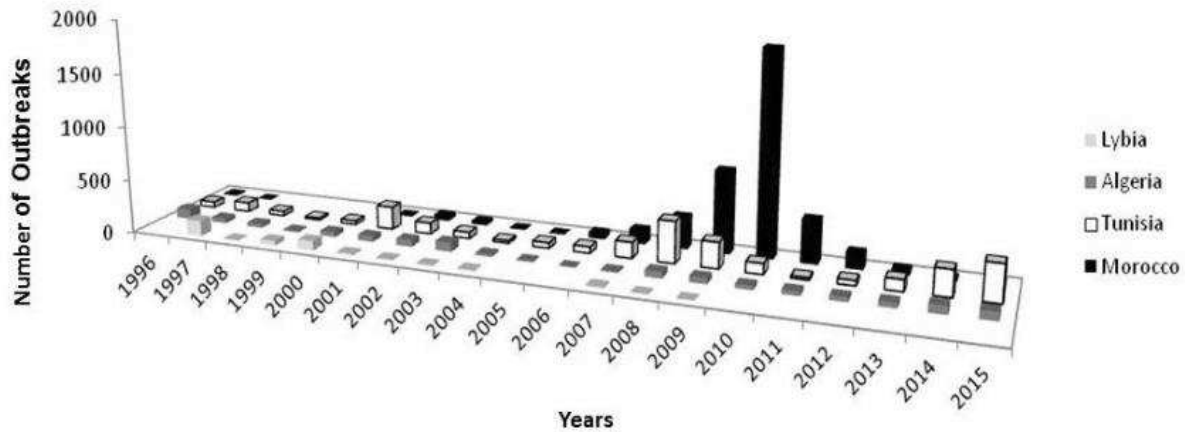


Figure 24. Nombre de foyers de clavelée déclarés dans les pays d’Afrique du Nord (WAHID 2013, Handistatus 2016).

Au Maroc, même s'il n'a pas été possible de rassembler les données disponibles depuis 20 ans, le nombre de foyers de clavelée a diminué au cours de la décennie 1996 - 2006, puisqu'aucun foyer n'a été signalé au cours de la période 1998-2000. Ceci peut être expliqué par le niveau élevé de la couverture vaccinale qui a atteint les 80% (EMPRES, 1999). Une série de flambées épidémiques de Peste des Petits Ruminants s'est produite au Maroc entre les années 2007 et 2011, entravant les campagnes nationales de vaccination et favorisant l'apparition de foyers de variole ovine, conduisant à un pic de 1 890 cas signalés au cours de la période concernée (Wahid, 2013; Handistatus, 2016).

En Tunisie, le nombre de foyers déclarés au cours des 20 dernières années (figure 24) comprenait des pics en 2001, entre 2007 et 2009, et finalement entre 2014 et 2015, avec un pic important en 2008 et 2015.

En Algérie, malgré un programme national de lutte qui s'est poursuivi pendant plusieurs décennies, la variole ovine est toujours considérée comme un problème majeur de santé animale. Le taux de couverture vaccinale a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie 2005-2016, atteignant 78% contre 40% au cours de la décennie précédente 1995-2005

(Achour *et al.*, 1999). Un total de 46 foyers a été enregistré au cours des 20 dernières années (Wahid, 2013; Handistatus, 2016). La réapparition de la clavelée est probablement due soit à une propagation interne dans le pays, soit à des mouvements d'animaux légaux et illégaux à travers des frontières non contrôlées (comme la maladie est endémique dans les trois pays voisins) ou à une combinaison des deux (Achour *et al.*, 1999).

En ce qui concerne la Libye, peu de données sont disponibles pour les 20 dernières années, un manque de données a été enregistré pour les années 2005-2006 et 2010-2016 en raison de problèmes politiques internes (Wahid, 2013; Handistatus, 2016). La variole ovine n'est pas considérée comme une maladie prioritaire affectant l'état de santé des petits ruminants dans ce pays.

2. La Variole Ovine en Tunisie

La clavelée a été signalée comme une maladie contagieuse par Bourgelat en 1763 et a été cliniquement décrite par Gilbert en 1798 (Lefèvre, 1983). Elle est maintenant considérée comme une maladie contagieuse à déclaration obligatoire par l'OIE (Office International des Epizooties). Depuis la création de l'Institut Arloing et de l'Institut Pasteur de Tunis (Pacha-Bey, 1931), la capacité de diagnostic a permis l'isolement et l'identification de l'agent pathogène suivi par le développement d'un vaccin contre la variole ovine en 1950 par le Dr E. Ducloux afin de limiter la propagation du virus en Tunisie (Odissev *et al.*, 1995). Malgré l'ancienne présence de la maladie en Tunisie, la première souche virale isolée a été signalée en 1974 lors d'une épidémie à Zaghouan (Ramisse *et al.*, 1978), grâce à la collaboration entre scientifiques tunisiens et français.

2.1. Distribution temporelle et spatiale de la variole ovine en Tunisie

L'élevage des petits ruminants peut être affecté par différentes maladies infectieuses cutanées (ecthyma contagieux, clavelée, fièvre catarrhale du mouton, Peste des petits ruminants (Fakhfakh *et al.*, 2005; DGSV, 2010). La clavelée est l'une des principales pathologie virale ovine rapportée par les services vétérinaires (Fakhfakh *et al.*, 2005). Un contact important entre les animaux lors des rassemblements autour des points d'eau et pendant la transhumance, associé à une faible couverture vaccinale, sont des facteurs clés de la transmission du virus dans les troupeaux en Tunisie. Des informations détaillées sur la répartition spatiale et

temporelle de ces épidémies peuvent aider à mieux comprendre l'évolution spatiale et temporelle de la maladie et conduire à la conception d'un contrôle adéquat de la maladie.

2.2. Distribution temporelle et saisonnière

La répartition temporelle des épidémies de clavelée au cours des 25 dernières années en Tunisie peut être divisée en trois périodes en fonction des variations du nombre de foyers déclarés, de leurs origines et des mesures de contrôle appliquées à chaque période: (i) la première période entre 1989 et 1995, (ii) la principale période comprise entre 1996 et 2001 lorsque RADISCON (Réseau régional de surveillance et de contrôle des animaux) a été mis en œuvre et (iii) la troisième période allant de 2001 à ce jour (Figure 25).

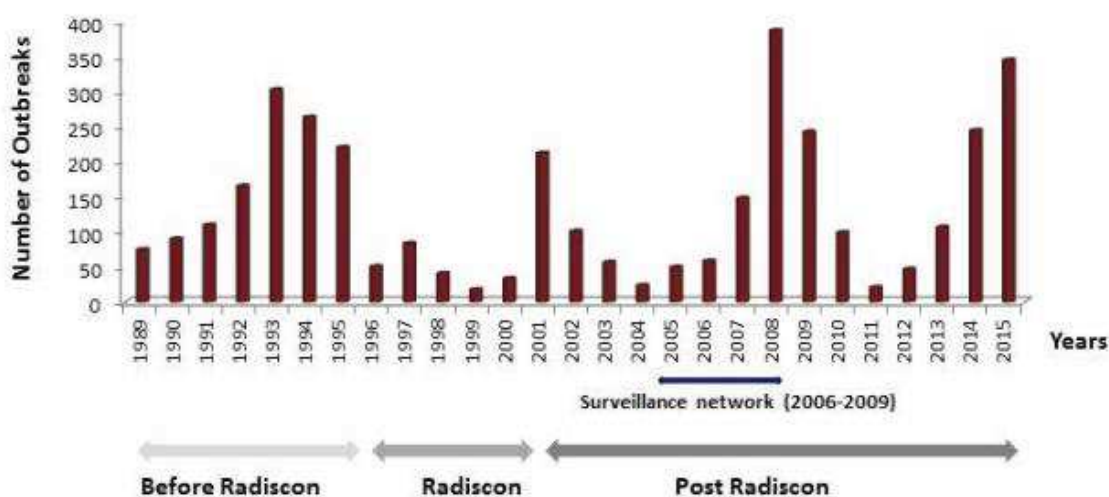


Figure 25. Nombre de foyers de clavelée rapportés en Tunisie entre 1989 et 2015 (WAHID 2013, DGSV 2015, Handistatus 2016).

Au cours de la première période (1989-1995), le nombre moyen de foyers déclarés était de 175, avec un pic de 302 foyers en 1993 et une couverture vaccinale de 43% (Wahid, 2013; Handistatus, 2016). L'épizootie de fièvre aphteuse en 1990 a eu un impact réel sur les campagnes de vaccination contre la variole ovine et peut expliquer l'augmentation considérable des épidémies de variole ovine en 1993 et 1994. En effet, l'introduction du virus de la fièvre aphteuse en 1989 après l'importation de petits ruminants des pays du Moyen-Orient a largement entravé les efforts des services vétérinaires pour poursuivre le programme de vaccination contre la clavelée. Tous les moyens financiers et les efforts humains ont été regroupés pour lutter contre les épidémies de fièvre aphteuse, entravant les programmes de lutte réguliers contre les

maladies des petits ruminants, particulièrement la variole (Kitching, 1998). De plus, comme la campagne de vaccination contre la clavelée entre 1989 et 1995 avait lieu en automne (de septembre à novembre), il était très difficile d'avoir accès à tous les troupeaux qui devaient être vaccinés car cela coïncidait avec la saison des agnelages pour la plupart des brebis. Le taux de couverture vaccinale a chuté à 20,1% en 1994, expliquant malheureusement l'augmentation du nombre de cas de SPPV.

Au cours de la deuxième période, allant de 1996 à 2001, la mise en place du réseau RADISCON pendant cinq ans a contribué à réduire le nombre de cas de variole ovine. En effet, grâce au programme RADISCON, des efforts coordonnés ont été fournis pour assurer une bonne distribution des vaccins dans les quatre pays d'Afrique du Nord, en particulier en Tunisie, et pour identifier les principales zones endémiques afin d'assurer une couverture vaccinale élevée. Au cours de cette période, le nombre moyen de foyers a diminué de façon spectaculaire pour atteindre un niveau faible de 84 foyers en 1997. Le pic de foyers a été signalé en automne, lorsque les ovins sont exposés à diverses conditions géo-climatiques. A la fin du projet RADISCON, des campagnes de vaccination ont été mises en œuvre dans toute la Tunisie, avec un taux de couverture vaccinale de 21% en 1999 et de 59% en 2000 (Figure 26). Il est intéressant de noter que les campagnes de vaccination qui avaient eu lieu en automne, ont été conduites en hiver, principalement au mois de janvier, évitant ainsi la période d'agnelage améliorant ainsi le taux de couverture vaccinale.

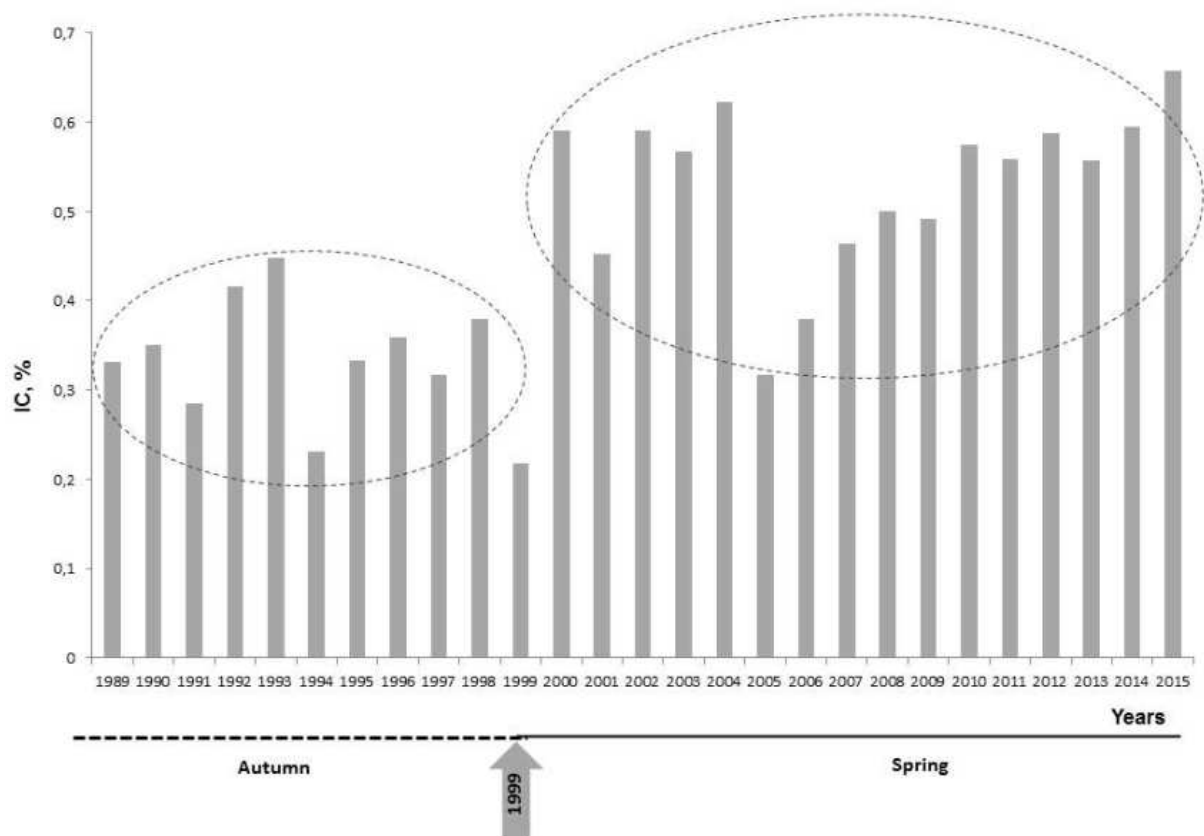


Figure 26. Evolution du taux de couverture vaccinale entre 1989 et 2015 (WAHID 2013, DGSV 2015, Handistatus 2016) et impact de la saison de la campagne de vaccination sur ce taux. Le taux de couverture vaccinale correspond au rapport du nombre total d'animaux vaccinés sur le nombre d'animaux sensibles.

La troisième période, de 2001 à 2016, a connu trois pics majeurs à sept années d'intervalle : 212 foyers en 2001, 386 en 2008 et 344 en 2015. Chaque pic observé était corrélé d'une part, soit à l'introduction d'une maladie émergente ou à la ré-émergence d'une maladie à déclaration obligatoire dans le pays comme la fièvre catarrhale ovine (FCO) en 2001, la Peste des Petits Ruminants et la FCO en 2007-2008 et la fièvre aphteuse en 2014, soit à l'augmentation des mesures de prévention contre les maladies menaçantes telles que la fièvre de la vallée du Rift (FVR). Il est important de mentionner ici que le cycle de renouvellement des troupeaux de petits ruminants en Tunisie est d'environ de six à sept ans correspondant aux années 2001, 2008 et 2015 où les trois principaux pics de la maladie se sont produits au cours de la période 2001-2016. L'introduction de jeunes animaux naïfs qui ne sont pas vaccinés contre la variole ovine dans les élevages sans établir une période de quarantaine est un facteur notable qui peut influencer le pic cyclique des épidémies de clavelée malgré un taux de couverture vaccinale élevé et maintenu.

En raison des épidémies de fièvre catarrhale ovine, de peste des petits ruminants et de fièvre aphteuse en Tunisie, les ressources financières et humaines sont devenues rares, ce qui a entravé le programme de vaccination contre la variole ovine. En fait, la fièvre catarrhale ovine, due à un virus transmis par *Culicoides*, a émergé en 2000, ce qui a entraîné 212 foyers de clavelée en 2001. Six à sept ans plus tard, en 2007 et 2008, l'émergence de la fièvre catarrhale ovine et de la Peste des petits ruminants au Maroc a conduit à la mise en place de plusieurs mesures de contrôle pour prévenir l'introduction de ces virus. Certaines de ces mesures reposaient sur un meilleur contrôle des mouvements de troupeaux aux frontières tunisiennes et sur la surveillance active des animaux par le monitoring et le dépistage des troupeaux sentinelles. Ces activités additionnelles qui n'étaient pas initialement clairement planifiées avaient un impact majeur sur les campagnes de vaccination de routine de la variole ovine. Les activités de surveillance et de dépistage des troupeaux sentinelles ont conduit à un nombre important de cas signalés et déclarés par rapport aux décennies précédentes. La plupart de ces cas ont été déclarés en se basant uniquement sur l'observation des lésions cutanées sans la confirmation par des techniques de laboratoire et pourraient de ce fait être considérés comme des cas faussement positifs puisque d'autres pathogènes auraient pu être à l'origine des lésions cutanées observées (Ghram, 2010).

En ce qui concerne la répartition saisonnière, l'analyse des périodes 2005-2008 et 2013-2015 montre que les épidémies de variole ovine ont généralement lieu pendant l'hiver et l'automne, même si l'on sait que les épidémies de la maladie peuvent survenir toute l'année (Figure 27). Il convient de noter qu'entre 2008 et 2013, aucune donnée n'était disponible et ne pouvait donc pas être incluse dans cette analyse.

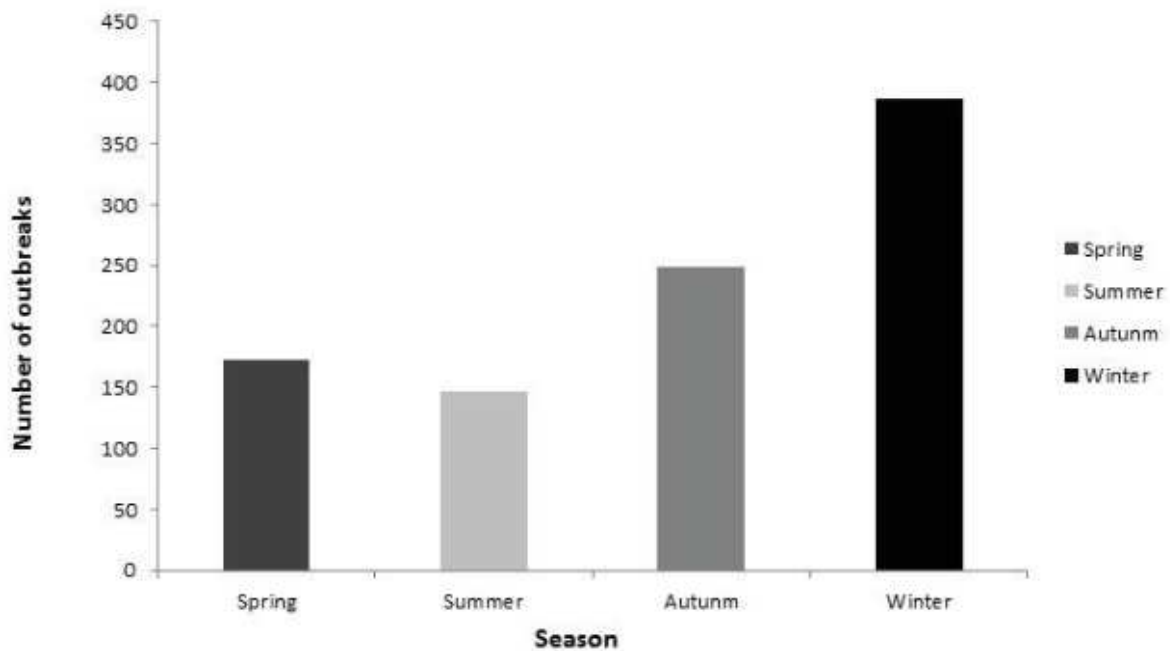


Figure 27. Variation saisonnière des foyers de variole ovine entre 2005 et 2015 (WAHID 2013, Handistatus 2016). Aucune donnée n'était disponible pour la période comprise entre 2008 et 2013.

2.3. Distribution spatiale

En Tunisie, la distribution spatiale de la variole ovine correspond aux différentes zones climatiques du pays, à la répartition de la densité des troupeaux et aux pratiques agro-pastorales (figure 28). Il existe une corrélation positive entre les zones bio-géo-climatiques et le nombre de foyers, puisque les petits ruminants sont répartis selon ces strates bio-géo-climatiques: 37% dans le Nord, 39% dans le Centre et 24% dans le Sud avec un système d'élevage adapté à chaque région (Brahmi *et al.*, 2008). Les zones bio-écologiques et climatiques peuvent être classées en cinq zones distinctes: les zones humides, sub-humides, sub-arides, arides et désertiques (Ben Dhia, 1995).

La zone humide est située dans la partie la plus au nord du pays et comprend les gouvernorats de Jendouba, Bizerte et Béja, où les précipitations varient de 800 à 1 000 mm par an (et peuvent atteindre 1 200 mm par an). La zone subhumide est située entre Zaghouan et le Kef avec des précipitations allant de 400 à 600 mm par an. Les ressources en eau abondantes favorisent le pâturage pour le bétail, ainsi que les cultures fourragères et d'autres ressources provenant des terres agricoles. Le résultat est une plus grande capacité de faire face au changement, et les

éleveurs n'ont pas besoin de faire de longues distances avec leurs troupeaux pour accéder à la végétation sauvage. De telles conditions limitent l'apparition de foyers de variole ovine. Seuls sept foyers de la maladie ont été signalés dans les zones côtières du nord de la Tunisie au cours des 20 dernières années.

Dans la région centrale, les zones sub-arides (de Kasserine à Sousse, y compris Mahdia) et les zones arides (Gafsa, Sfax, Sidi Bouzid, Gabès et Médenine) ont une pluviométrie beaucoup plus faible et l'élevage des troupeaux de bétail est principalement basée sur la transhumance et la recherche de pâturage, cela en l'absence de contrôle par les autorités vétérinaires. Plus de 600 cas cumulatifs de variole ont été signalés entre 1996 et 2015 dans le gouvernorat de Sidi Bouzid, qui accueille le plus grand nombre de petits ruminants dans le pays, à savoir 590 700 têtes (8,15%) après le gouvernorat de Kasserine, qui compte 671 000 têtes (9,26%). Sidi Bouzid est également le site d'un marché hebdomadaire de bétail, connu pour être l'un des centres principaux pour les mouvements d'animaux avec des animaux provenant de plusieurs gouvernorats de Tunisie, favorisant ainsi la transmission des maladies contagieuses. Dans les deux gouvernorats voisins, Kasserine et Kairouan, plus de 300 cas de clavelée ont été notifiés, y compris dans la ville de Kasserine, située à la frontière tuniso-algérienne, où les mouvements incontrôlés d'animaux sont très fréquents (Figure 28).

Les zones côtières situées dans la région centrale du pays ; Sousse, Monastir et Mahdia, reçoivent une quantité raisonnable de précipitations. Les petits ruminants sont élevés selon un mode agro-pastoral sans besoin de transhumance, évitant ainsi le risque de contagion de ces animaux.

Enfin, le sud de la Tunisie, la zone désertique (Gabès, Médenine, Tozeur, Kébili et Tataouine) reçoit moins de 100 mm de pluie par an. Les pâturages à végétation sauvage sont rares. Les troupeaux sont généralement de petite taille (élevage de famille : 3 à 12 animaux). Les animaux sont gardés en permanence en stabulation dans les maisons des éleveurs avec un contact très limité avec d'autres animaux susceptibles d'être une source de maladies infectieuses transmissibles. Ces conditions d'élevage peuvent expliquer le faible nombre de foyers de variole ovine (156) au cours des 20 dernières années (Rondia, 2006).

Les paramètres, tels que le taux de couverture vaccinal, diffèrent énormément d'un gouvernorat à l'autre ayant un impact majeur sur la répartition spatiale des foyers de variole ovine en Tunisie. D'autres paramètres tels que l'absence de foyers officiellement déclarés ou de signalement en

raison d'un accès difficile aux régions éloignées et l'absence de confirmation par les moyens de laboratoire peuvent influencer sur l'estimation de la répartition spatiale des foyers de clavelée dans le pays. En effet, certaines régions montagneuses du nord-ouest du pays sont difficiles d'accès pour les services vétérinaires et, par conséquent, ces régions ne disposent pas d'un suivi sanitaire approprié, incluant les programmes de vaccination, contribuant ainsi à la propagation des maladies.

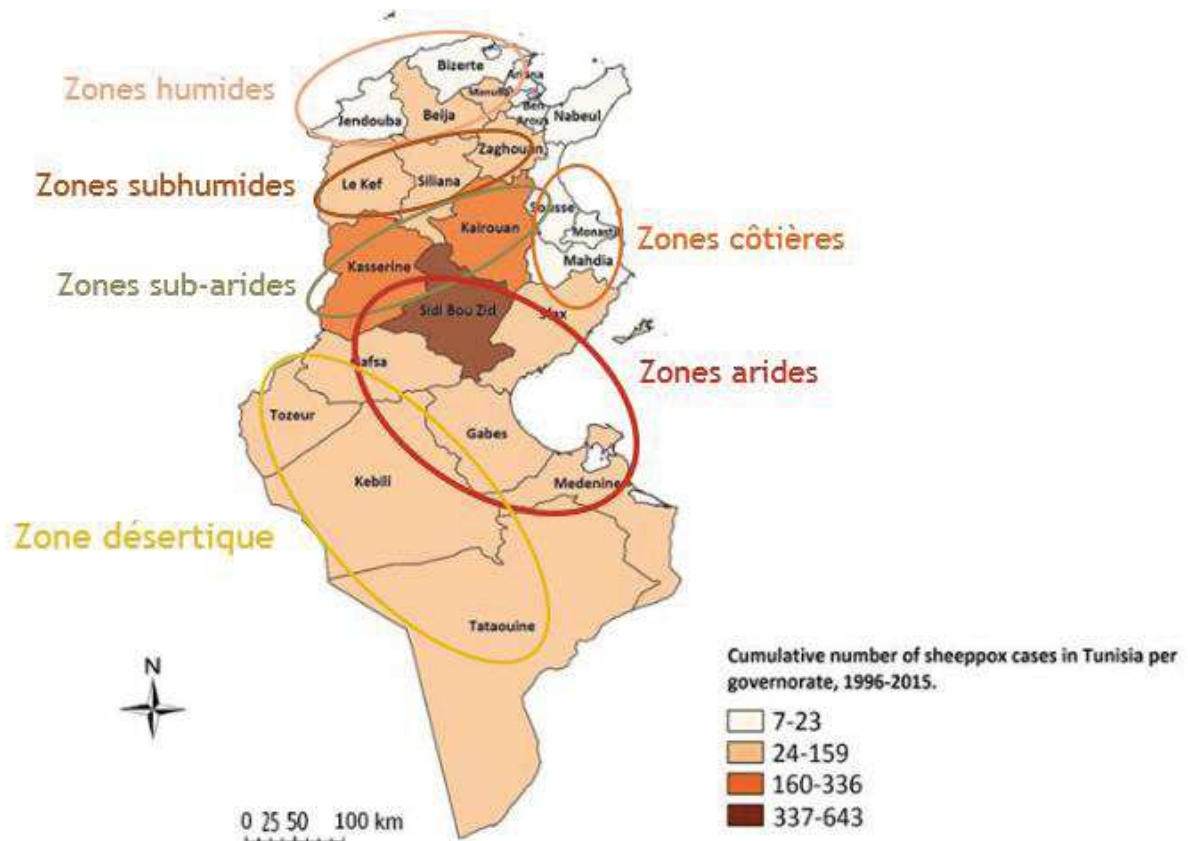


Figure 28. Distribution spatiale des foyers de variole ovine en Tunisie entre 1995 et 2015 (WAHID 2013, Handistatus 2016).

2.4. Mode de transmission

La variole ovine se propage soit par contact direct entre animaux infectés et naïfs, soit indirectement par des aérosols contaminés, par les lésions cutanées ou des muqueuses abrasives, ou par le virus excrété dans les sécrétions nasales, le lait et éventuellement l'urine (Bhanuprakash *et al.*, 2006).

En Tunisie, les foyers de variole ovine sont apparus principalement après un contact étroit et soutenu entre les animaux et plusieurs facteurs permettent la transmission du virus. Ainsi, les endroits où les animaux peuvent se rassembler et sont en contact étroit, tels que les marchés, sont les principales sources de contagion, en particulier pendant certaines périodes de l'année comme la fête religieuse de l'Aïd El Idha (Fèvre *et al.*, 2006; Abdo-Salem *et al.*, 2011). Un autre facteur qui peut influencer la transmission du virus est l'introduction d'animaux naïfs dans un élevage sans aucune période de quarantaine. Dans environ un tiers des fermes de petits ruminants, les éleveurs achètent des béliers pour le renouvellement de leurs troupeaux sans mettre en œuvre la quarantaine. Des troupeaux mixtes (38%) composés d'ovins, de caprins (environ 25% du troupeau mixte) et de bovins sont des facteurs importants contribuant à la persistance du virus dans les élevages (DGSV, 2010). En outre, il n'existe pas de suivi continu des virus de la variole ovine et caprine chez les caprins, représentant un risque significatif de propagation et de transmission du virus et son maintien dans certains troupeaux. De plus, l'inspection sanitaire des vétérinaires privés ou publics peut être entravée par l'accès difficile aux fermes. Enfin, le mouvement des animaux infectés est la cause principale de la propagation des virus du genre *Capripoxvirus* (Kitching, 2004; AHA, 2011).

En Tunisie, la transhumance est principalement pratiquée dans les zones sub-arides et arides et est considérée comme représentant un risque élevé de transmission de la clavelée en l'absence de réglementations et de mesures de contrôle sanitaire pour la surveillance des mouvements des animaux. La stabilité du virus dans l'environnement ainsi que sa persistance dans les croûtes cutanées pendant de longues périodes peut également être une source d'infection pour les animaux naïfs, en particulier dans les zones géo-climatiques arides et sub-arides. La transmission indirecte peut également se produire par les mouvements de l'Homme, par les véhicules, par les animaux sauvages ou par le commerce de peaux mal traitées (EFSA, 2014). Cette transmission indirecte peut aussi se faire par transmission mécanique par les mouches (*Stomoxys calcitrans*), bien que cette dernière voie soit rare (Kitching, 1986d; Mellor *et al.*, 1987; Rao *et al.*, 2000; OIE, 2004). Les virus du genre *Capripoxvirus* suivent les règles des virus de la famille des *Poxviridae* et sont décrits comme étant spécifiques d'hôtes en infectant surtout les ruminants, bien qu'ils puissent parfois infecter et provoquer la maladie chez d'autres espèces animales (McFadden, 2005). SPPV et GTPV provoquent respectivement des maladies cliniques chez les ovins et les caprins. Seuls trois travaux décrivent une infection simultanée des ovins et des caprins au Kenya (Davies, 1976), au Moyen-Orient (Kitching *et al.*, 1986c) et en Inde (Santhamani *et al.*, 2015).

Jusqu'à présent, une seule étude basée sur une surveillance épidémiologique nationale a été menée sur la diversité des isolats de SPPV tunisiens. Des lésions cutanées typiques de variole ovine de 63 ovins ont été prélevées. La caractérisation moléculaire des souches, basée sur les gènes de la thymidine kinase (TK) et des récepteurs des chimiokines couplées à la protéine G (GPCR), a révélé un profil génétique de ces souches identique à celui de la souche vaccinale Romania 65, qui est administrée en routine durant les campagnes de vaccination tunisiennes (Le Goff *et al.*, 2009). Les isolats de terrain tunisiens et de la souche vaccinale Romania 65 forment un groupe homogène malgré la diversité de leur origine géographique.

2.5.Caractéristiques cliniques

La clavelée possède une période d'incubation variant de quatre jours à deux semaines. En Tunisie, la maladie a été surveillée et étudiée principalement chez les ovins malgré le fait que 38% des troupeaux sont mélangés et contiennent 25% de caprins. La variole ovine peut survenir à tout âge, mais les jeunes animaux, de moins de trois mois, sont les plus touchés. Au sein des troupeaux tunisiens, les symptômes commencent souvent par un écoulement nasal et oculaire, une hyperthermie (40°C-42°C), une dyspnée, une dépression et une perte d'appétit avec hypertrophie de tous les ganglions lymphatiques superficiels, en particulier les ganglions pré-scapulaires (Figure 29, panel B). Les lésions nodulaires cutanées et les papules prédominent et sont d'abord observées sur la tête de l'animal, autour des lèvres et des narines et sur les paupières, le développement de ces lésions commence dès le début de la fièvre (Figure 7, panels A et C). Généralement, les lésions cutanées évoluent en une forme maculaire, papuleuse et vésiculaire, jusqu'à la formation de croûtes. Ils peuvent couvrir l'ensemble du corps mais sont plus facilement détectés sur les parties glabres de la peau et les glandes mammaires. Certaines observations cliniques de la maladie ont révélé la présence de papules à la base de la queue et dans la muqueuse labiale (Figure 29, panels A et D). Les animaux peuvent également développer des problèmes respiratoires, incluant une pneumonie bronchique avec un écoulement nasal mucopurulent et des complications digestives. D'autres signes oculaires qui sont moins fréquents peuvent être également observés comme la blépharite et la kérato-conjonctivite.

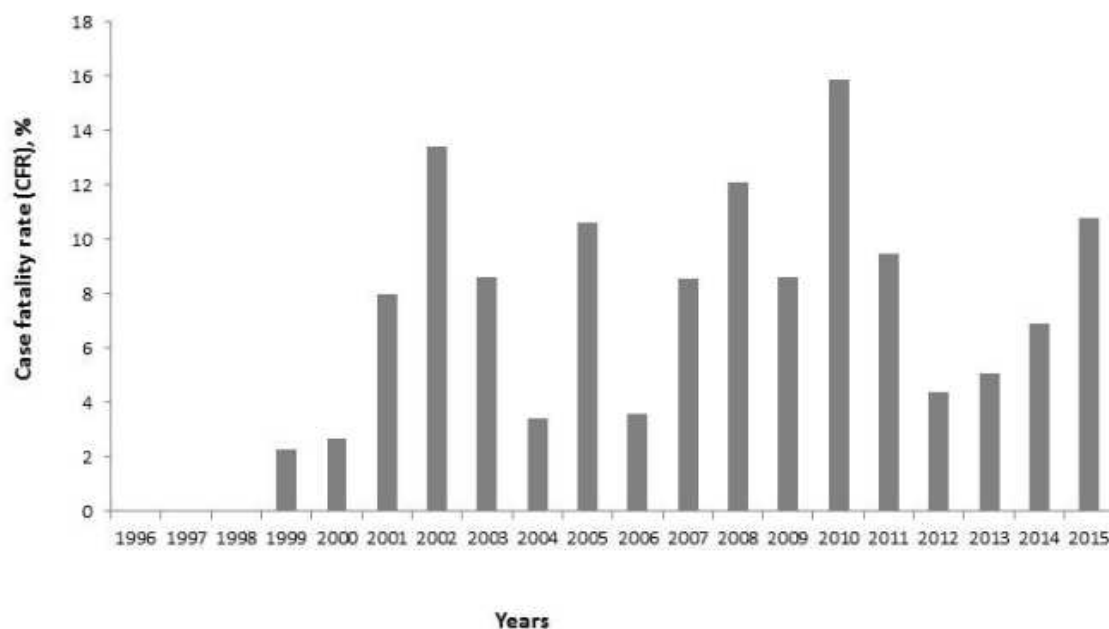


Figure 29. Manifestations clinique de la variole ovine : A. Papules sur la face interne de la queue, B. Ecoulement nasal et oculaire mucopurulent, C. Papules sur la tête, narines et les yeux de l'animal, D. Nodules au niveau de la muqueuse labiale.

En Tunisie, les taux de morbidité et de mortalité sont respectivement de 4,98% et 0,55%. Le taux moyen de létalité observé, correspondant au rapport entre le nombre d'animaux morts et le nombre de cas observés par an, est estimé à 11,09% tous âges confondus (Tableau 13). Cependant, ce taux est généralement élevé chez les agneaux et pourrait avoir atteint la valeur de 15,89% en 2010, les surinfections bactériennes étant les principales sources de mortalité (DGSV, 2010) (Figure 30). Une étude qui a duré trois ans, de 2006 à 2009, a montré que les ovins âgés de plus de deux ans présentaient le taux de morbidité le plus élevé (5,97%) puisque la plupart étaient des animaux non vaccinés (Tableau 13). Les taux de morbidité, de mortalité et de létalité peuvent varier selon les races d'ovins. Cela n'a pas encore été étudié en Tunisie malgré la diversité des races ovines. Les animaux malades mais guéris présenteraient une forte immunité humorale et cellulaire soutenue tout au long de leur vie.

Tableau 13. Description des indicateurs épidémiologiques majeurs de la variole ovine en Tunisie (2006-2009).

Catégorie d'âge des animaux	Toutes catégories d'âge confondues	< 3 mois	De 3 mois à 1 an	Entre 1 et 2 ans	> 2 ans
Taux de morbidité (%)	4.98	4.39	3.96	4.16	5.97
Taux de mortalité (%)	0.55	2.39	0.22	0.66	0.46
Taux de létalité (%)	11.09	48.39	5.47	15.95	7.74

**Figure 30.** Taux de létalité de la variole ovine en Tunisie entre 1996 et 2005 (WAHID 2013, Handistatus, 2016). Le Taux de létalité est le rapport du nombre d'animaux morts sur le nombre de cas rapportés par an.

III. Outils de gestion de la variole ovine

Les programmes de lutte et d'éradication réussis reposent principalement sur la détection précoce du premier cas apparu, l'élimination rapide de tous les animaux infectés et ayant eu un contact avec les animaux malades, un contrôle strict du mouvement des animaux, une quarantaine appropriée et une bonne désinfection. Les lésions cutanées et viscérales causées par le virus sont fortement révélatrices de la maladie. Le diagnostic clinique par un vétérinaire qualifié est la première étape du processus de diagnostic, mais le diagnostic définitif nécessite une confirmation au moyen de techniques de laboratoire. Des campagnes de vaccination doivent être mises en œuvre dans les pays touchés en utilisant un vaccin spécifique de la souche de terrain d'une région donnée.

En Tunisie, tous les foyers de variole enregistrés sont basés sur les lésions cutanées pathognomoniques (papules, nodules et vésicules) facilement détectées sur les parties glabres du corps et les glandes mammaires. En cas de mortalité, un diagnostic post mortem est établi en se basant sur les lésions pulmonaires. Deux laboratoires vétérinaires officiels, l'Institut de Recherche Vétérinaire de Tunis (IRVT) disposant d'une plateforme de recherche sur la variole ovine fonctionnelle et le laboratoire de microbiologie vétérinaire de l'Institut Pasteur de Tunis sont en mesure de diagnostiquer et de confirmer les cas de variole ovine. Les tests de séroneutralisation (SNT) ou les tests d'immunofluorescence (IFAT) sont appropriés pour des études de surveillance sérologiques rétrospectives au niveau du troupeau, mais ces tests ne sont pas suffisamment rapides ou fiables au niveau individuel pour être utilisés comme tests primaires.

1. Outils de diagnostic

En ce qui concerne le diagnostic de la variole ovine, la première technique mise en œuvre a été l'isolement du virus prélevé à partir des lésions cutanées par culture cellulaire en utilisant différents types de cellules primaires (cellules de testicules d'agneau, cellules pulmonaires) ainsi que de lignées cellulaires (ETM, Vero), formant ainsi une banque de souches tunisiennes constituant un point de départ de matériel biologique pour les techniques moléculaires (Mangana-Vougiouka *et al.*, 1999; Binepal *et al.*, 2001; Tuppurainen *et al.*, 2005). La microscopie électronique a également été utilisée pour identifier les virions à partir de papules extraites de lésions cutanées et des cultures cellulaires inoculées par le virus (Fakhfakh *et al.*, 2005) en collaboration avec la Faculté de médecine de Tunis.

Les tests de diagnostic moléculaire jouent un rôle important dans la surveillance de la propagation du virus chez les animaux sensibles. La réaction en chaîne par polymérase (PCR) et les techniques d'amplification alternatives fournissent des tests diagnostiques rapides et sensibles pour la détection du génome du sheep poxvirus. Deux techniques de PCR conventionnelles ont été optimisées en utilisant l'ADN extrait de lésions cutanées, de nodules et de croûtes. Les gènes cibles étaient le gène de la thymidine kinase (Gershon *et al.*, 1989), le gène codant pour le récepteur de chimiokine couplé à la protéine G homologue (Q2 / 3L) appelé récepteur de chimiokine couplée à la protéine G (GPCR) et le gène codant pour le récepteur de l'interleukine (IL8) (Cao *et al.*, 1995; Le Goff *et al.*, 2005; Le Goff *et al.*, 2009). Cependant, les techniques basées sur l'amplification de ces gènes n'ont pas pu différencier les souches de SPPV, GTPV et LSDV (Kitching *et al.*, 1986b; Ireland *et al.*, 1998), ce qui a été considéré comme une contrainte majeure à l'interprétation des données. Entre temps, la technique de PCR a été optimisée et a permis la détection de l'ADN à partir d'écouvillons oculaires et nasaux ainsi que dans les prélèvements de sang (Zro *et al.*, 2014), comme cela a été récemment décrit par la technique LAMP (Zhao *et al.*, 2014; Venkatesan *et al.*, 2016).

Enfin, il est important de noter qu'aucune PCR n'est actuellement effectuée pour la détection et la différenciation du SPPV du GTPV puisque le GTPV n'a pas été signalé en Tunisie à ce jour. Néanmoins, il serait judicieux de renforcer les capacités diagnostiques tunisiennes pour développer une technique de PCR conventionnelle pour la différenciation de ces virus comme cela a été décrit pour la protéine d'enveloppe H3L retrouvée au niveau du virion mature du virus de la vaccine, la P32 étant son homologue chez les capripoxvirus (Heine *et al.*, 1999; Hosamani *et al.*, 2004a; Chan *et al.*, 2014), l'homologue de la protéine codant pour la sous-unité de l'ARN polymérase 30-kDa du virus de la vaccine (RPO30), et l'homologue du gène I3L analogue au virus de la vaccine et la phosphoprotéine de liaison à l'ADN (Lamien *et al.*, 2011a; Venkatesan *et al.*, 2014a; Venkatesan *et al.*, 2014b). Le développement de techniques DIVA, en utilisant une seule technique de PCR capable d'identifier toutes les souches des capripoxvirus, spécialement les souches vaccinales isolées chez les ovins, caprins ou bovins est nécessaire (Orlova *et al.*, 2006).

En outre, les symptômes de la variole ovine ou caprine peuvent être cliniquement confondus avec d'autres infections virales y compris l'ecthyma contagieux, la fièvre catarrhale ovine et la peste des petits ruminants. Malheureusement, malgré les mesures de lutte mises en place depuis leur introduction, tous ces virus affectent les troupeaux tunisiens. Par conséquent, il est urgent

de mettre à disposition des techniques de PCR multiplex permettant de différencier ces maladies virales épidémiques. Peu de techniques ELISA ont été décrites pour la détection d'anticorps dirigés contre les capripoxvirus (Ngichabe *et al.*, 1999; Babiuk *et al.*, 2008; Bhanot *et al.*, 2009; Bowden *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010). Pour la détection de ces anticorps, les techniques d'immunofluorescence indirecte et de séroneutralisation ont été définies comme étant des tests spécifiques capables de différencier les *Capripoxvirus* et les *Parapoxvirus* tout en étant suffisamment sensibles et fiables pour être utilisés dans des études de séroprévalence (Gari *et al.*, 2008; Fagbo *et al.*, 2014; Kitchen *et al.*, 2014; Abera *et al.*, 2015), cependant ce ne sont pas les meilleurs tests pour une surveillance à haut débit.

2. Vaccination

Le principal outil durable et fiable pour lutter contre la variole ovine dans les pays infectés est la mise en place d'une prophylaxie médicale grâce à des campagnes de vaccination annuelles qui ont débuté dans les années 1980 en Tunisie. Les données sur le suivi du programme annuel de vaccination contre la variole ovine dans les troupeaux tunisiens ont été recueillies pour la période 1989-2015 (figure 26).

Deux facteurs ont été identifiés comme clés du succès de toute campagne de vaccination contre la clavelée: (i) la période choisie pour l'administration du vaccin et (ii) le type de vaccins administrés.

2.1. Période de vaccination

En Tunisie, entre 1989 et 1998, les campagnes de vaccination de la variole ovine étaient menées en automne (septembre-novembre) car elles étaient associées à celle de la fièvre aphteuse. En effet, chaque campagne de vaccination nécessite un énorme investissement logistique en ressources humaines, en transport, en communication, en regroupant des animaux pour la vaccination et en veillant à ce que des doses adéquates de vaccin soient disponibles et soient livrées dans le respect des conditions de la chaîne du froid. Toutefois, les éleveurs ne considéraient pas la saison d'automne comme la meilleure saison pour la vaccination et, par conséquent, ne coopéraient pas suffisamment, car la période de vaccination coïncidait avec la période d'agnelage. De plus, cette période de vaccination correspondait à la période de transhumance pendant laquelle la majorité des animaux dans les régions arides et sub-arides échappaient à la vaccination de masse. Ceci explique probablement le faible taux de couverture

vaccinale qui a atteint un maximum de 40% (figure 26) et a contribué à la persistance et à la propagation du virus en Tunisie.

L'échec au cours des 10 premières années de vaccination (période entre 1989-1999), illustré par la faible couverture vaccinale, a conduit les services vétérinaires à modifier la période de vaccination de l'automne (septembre-novembre) au printemps (février à mai) (figure 26). Cette période était beaucoup plus acceptée par les éleveurs, puisqu'elle ne coïncidait ni avec la période d'agnelage ni de transhumance des animaux. Un taux de couverture vaccinal de 59% a été atteint en 2000 et le taux le plus faible de 32% a été enregistré en 2005 (figure 26). La différence significative dans le calendrier des campagnes de vaccination effectuées en automne et au printemps a prouvé que la période de vaccination était cruciale pour le succès de la lutte contre la maladie. Malgré des périodes critiques liées à l'apparition de nouvelles infections, le taux global d'animaux vaccinés a augmenté au cours des années, favorisant un meilleur contrôle de la maladie.

2.2.Type de vaccins administrés

Le type de vaccins et la méthode de vaccination sont des éléments clés d'un programme de vaccination efficace (Gelaye *et al.*, 2015). En Tunisie, avant 1989, l'un des vaccins utilisés était constitué de particules virales extraites de lésions cutanées d'animaux malades et co-administrés avec un sérum hyper-immun (Odissev *et al.*, 1995). À partir de 1989, en Tunisie ainsi qu'au Maroc et en Algérie, une souche virale vivante atténuée a été utilisée comme souche vaccinale, elle a été administrée en respectant la chaîne de froid permettant une immunité forte et durable. La souche utilisée était la souche RM65 produite par l'Institut Tunis Pasteur (Achour *et al.*, 2000). Cette souche, d'origine yougoslave, a été atténuée par 31 passages dans des cellules primaires de rein d'ovins à l'Institut Razi en Iran (Ramyar, 1968; Mahmood *et al.*, 1988). En tant que pays voisins, le Maroc et l'Algérie semblent avoir utilisé le même type de souche vaccinale. De plus, au cours des épizooties de variole ovine, l'Algérie a utilisé la souche Prerego d'origine algérienne adaptée après cinq passages dans des cellules de testicules d'agneau à l'Institut Vétérinaire de Sofia (Mateva *et al.*, 1975). Le calendrier de vaccination dépend de l'âge des animaux et la vaccination des animaux âgés de moins de deux mois nécessite deux injections suivies d'un rappel annuel.

Enfin, pour obtenir un taux de couverture vaccinal global sur le terrain, il est important de concevoir un protocole d'échantillonnage comprenant le nombre de troupeaux vaccinés chaque

année et leur distribution dans les différents gouvernorats tunisiens. Jusqu'à présent, aucune de ces études expérimentales n'a été menée. Bien que le type du vaccin utilisé jusqu'ici en Tunisie soit connu pour avoir produit une réponse immunitaire humorale et cellulaire solide jusqu'à 24 mois (Ramyar, 1968), ces données doivent être validées pour les principales races ovines tunisiennes locales, Queue fine de l'Ouest, Barbarine, Noir de Thibar et Sicilo Sarde.

IV. Stratégies de contrôle et d'éradication de la variole ovine des pays d'Afrique du Nord

1. Pays d'Afrique du Nord

La variole ovine est une maladie contagieuse notifiable et, en tant que telle, elle doit être déclarée à l'OIE. Les stratégies de lutte doivent donc être bien conçues et partagées avec les pays voisins où la maladie sévit. Le programme RADISCON (Réseau régional de surveillance et de contrôle des maladies animales), créé en 1996 pour une période de cinq ans, a mis en place dans les pays affectés, des mesures sanitaires pour lutter contre les maladies infectieuses qui ont eu de graves impacts économiques. Le réseau regroupait 29 pays situés sur deux continents (Afrique du Nord, Corne de l'Afrique, Moyen-Orient, péninsule arabique et Golfe Persique), qui partagent plusieurs maladies endémiques et épidémiques, dont la clavelée, le processus d'éradication de cette maladie a pris fin en 2005. Les principaux objectifs étaient les suivants : (i) accroître les formations visant à analyser les données sur la santé animale, (ii) promouvoir la surveillance active et passive des maladies transfrontalières, (iii) promouvoir une haute qualité de surveillance des foyers permettant l'analyse des risques ; (iv) éradication des maladies d'intérêt telle que la variole ovine, qui affectaient les pays appartenant au réseau.

Même s'il n'a pas été possible d'éradiquer la clavelée dans les pays d'Afrique du Nord au cours du programme RADISCON, la simple existence du réseau a largement amélioré l'état de santé animale au Maroc, en Algérie, en Tunisie et en Libye, amenant à une diminution importante du nombre de foyers de variole ovine dans ces pays (Figure 24). Par exemple, en 1997, un taux de couverture vaccinale de 80% a été atteint au Maroc, alors que ce taux était de 40% en Algérie et de 50% en Tunisie. Les moyens de contrôle (la mise en place d'une base de données relatant le nombre de foyers de variole ovine qui sera partagée entre les pays d'Afrique du Nord, le choix d'un mode de surveillance et du type de vaccin à administrer ainsi que du calendrier de vaccination) doivent être harmonisés et surveillés dans la région d'Afrique du Nord. Cela nécessiterait des efforts importants de la part de chaque pays. Même si le réseau RADISCON

était un excellent exemple d'un effort conjoint entre l'Algérie, le Maroc et la Tunisie, un financement continu est nécessaire pour un contrôle efficace de la maladie, avec un objectif final d'éradication.

2. Tunisie

En Tunisie, depuis 2006, le contrôle de la clavelée reposait principalement sur un programme annuel de vaccination et sur un réseau de surveillance dirigé par les services vétérinaires tunisiens, en collaboration avec des vétérinaires privés sur le terrain. Le but de ce réseau de surveillance est de recueillir des données épidémiologiques détaillées sur les maladies animales et d'étudier les caractéristiques des cas rapportés annuellement pour produire des plans de lutte sur le terrain. Dans ce contexte, le réseau RADISCON a été capable de surveiller les épidémies de variole dans le temps (saisonnalité) et l'espace, ce qui a permis de caractériser les principaux signes cliniques observés chez les troupeaux atteints.

L'organisation du programme de vaccination est liée à plusieurs organes administratifs, dont chacun a son propre objectif principal : i) la direction générale des services vétérinaires (DGSV) décide du moment où les campagnes de vaccination doivent être menées et le type de vaccins à administrer; ii) les 24 commissaires régionaux pour le développement agricole (CRDA) avec l'aide du bureau régional de la production animale, sont en charge des détails de planification relatifs aux actions de terrain pour l'administration des vaccins, (iii) le bureau de l'Elevage et du Pâturage, va aider à l'organisation des campagnes de vaccination sur le terrain. La coordination entre ces trois organes administratifs doit être renforcée pour optimiser les résultats des campagnes de vaccination. Jusqu'à présent, aucune réglementation nationale n'est mise en place pour superviser les plans de lutte contre la variole ovine en Tunisie. Tous les textes existants concernent des maladies qui devraient être déclarées, mais sans mention spécifique de clavelée.

V. Impact économique de la clavelée en Tunisie

La variole ovine cause des pertes économiques importantes dans tous les pays d'Afrique du Nord, ceci revient à la chronicité que la maladie engendre chez les animaux atteints avec une réduction de la production, un retard de croissance, une infertilité ainsi que des avortements allant parfois jusqu'à la mort de l'animal. Son effet se répercute essentiellement sur l'interdiction du commerce international des animaux ainsi que de leurs produits. Pour la

Tunisie, les principales conséquences économiques de la variole ovine sont fortement ressenties par les coûts des programmes de contrôle versés annuellement par les caisses d'état mais aussi par le taux élevé de morbidité par rapport à la mortalité surtout chez les animaux âgés de plus de trois mois. En général, la morbidité dans les régions endémiques est aux alentours de 10% alors que la mortalité varie entre 1 et 3% (Davies, 1991; Yeruham *et al.*, 2007; Babiuk *et al.*, 2008). En Tunisie, le taux de morbidité lié à la variole ovine varie entre 3,96% et 5,97% (Tableau 14).

L'étude décrite ci-dessous, est à notre connaissance la toute première approche qui traite de l'impact économique de la variole ovine au niveau des fermes. Cette étude a été réalisée dans l'Imada de Jelma de la région de Sidi Bouzid (Figure 28), où la transhumance et les mouvements des animaux à travers les frontières avoisinants la Libye et l'Algérie prédomine. Pour cela, un sondage a été effectué sur 90 éleveurs de petits ruminants dans cette zone qui compte en moyenne 300.000 têtes ovines destinés essentiellement à l'engraissement. Un nombre restreint de vétérinaires sanitaires prennent soin des animaux de cette région. Suite à une mobilité exagérée des animaux dans cette zone, un schéma de vaccination annuel ne peut être appliqué. Ce n'est qu'en présence de foyers qu'une vaccination des animaux ait lieu suivie par une deuxième vaccination périfocale. Les flambées de la variole ovine dans cette région entraînent une morbidité de 100% ce qui constitue la principale cause de pertes économiques pour les éleveurs de Jelma.

L'étude réalisée a eu pour objectif de saisir toutes les dépenses assurées par l'éleveur suite à l'apparition de foyers de variole ovine (Tableau 14). L'analyse des données recueillies a montré que :

- Les performances économiques de l'élevage ovin sont faibles dans cette région. En effet, en moyenne les marges brutes annuelles par éleveur sont de l'ordre de 14000 DT équivalent à 6350 dollars/an soit un revenu brut mensuel de 1170 DT/mois équivalent à 531 dollars (Tableau 14). Le revenu brut comprend les charges fixes (amortissement du bétail, dépréciation de l'équipement, etc.) et tout coût supplémentaire, c'est-à-dire la main d'œuvre familiale et la propriété foncière, ceci ne garantit guère la durabilité de ce type d'élevage.
- La situation de l'éleveur se dégrade si on intègre dans le calcul de ces revenus bruts les pertes générées par la variole ovine. En effet ces pertes sont de trois types : le premier est lié à la perte de la valeur commerciale des agneaux malades. L'éleveur est obligé de vendre les animaux

malades à des prix faibles. Le deuxième type de pertes, est représenté par l'augmentation des frais vétérinaires. Enfin, des pertes sont dues au temps alloué par l'éleveur pour s'occuper de ces animaux malades et aussi pour accéder aux services vétérinaires.

- En moyenne, le pourcentage des animaux malades détectés n'excède pas 3 % de la totalité cheptel. Toutefois les dégâts liés sont importants. En effet les pertes de bénéfices bruts peuvent atteindre 2478 DT/éleveur équivalent à 1125 dollars (Tableau 14).

En conclusion, les résultats de cette étude à petite échelle menée dans une région à haut risque d'infection par la clavelée associée à une transhumance active et à un faible taux de couverture vaccinale, ont mis en évidence l'impact négatif de cette maladie sur les revenus des éleveurs. Ces conclusions préliminaires doivent maintenant être validées dans une étude plus exhaustive qui inclut d'autres facteurs dépendants de la maladie qui peuvent influencer l'évaluation de l'impact économique de la maladie.

Tableau 14. Estimation du coût financier annuel de la variole ovine dans les troupeaux étudiés (n = 90 fermes), Jelma, gouvernorat de Sidi-Bouzyd, Tunisie, août-septembre 2016. (TD : dinars tunisiens).

Variables pour les coûts financiers par ferme	Minimum	Maximum	Moyenne	Déviations standard
Dépenses annuelles (DT)	400	19200	7045,78	3832,294
Profit financier des ventes (DT)	3500	168.000	61650,56	33532,569
Pertes dues à la réduction de la valeur commerciale des agneaux atteints	150	1650	705,00	316,765
Pertes dues à l'augmentation des frais vétérinaires	55	605	258,50	116,147
Pertes dues au temps alloué par l'éleveur pour s'occuper de ces animaux malades et aussi pour accéder aux services vétérinaires.	1	11	4,70	2,112
Pertes totales	206	2266	968,20	435,024
Nombre d'animaux vaccinés dans la ferme investiguée	9	471	171,44	94,600
Coût de la vaccination	4,1	212,0	77,150	42,5699
Nombre d'animaux par ferme investiguée	10	480	176,14	95,807
Nombre d'animaux malades par ferme investiguée	1	11	4,70	2,112
Marge brute sans maladie	800	38400	14091,56	7664,587
Marge brute avec maladie	590	35922	13046	7187

VI. Conclusion et perspectives

Actuellement, la variole ovine est toujours considérée comme une maladie virale endémique touchant les petits ruminants en Tunisie. La maladie est présente tout au long de l'année avec une prévalence maximale en automne et en hiver. La vaccination est la seule stratégie actuellement utilisée pour contrôler la maladie avec un faible taux de couverture (50%) en

raison de plusieurs contraintes. Ces contraintes sont liées à l'absence d'une stratégie globale de contrôle entre les quatre pays d'Afrique du Nord ; les frontières sont perméables et les mouvements illégaux d'animaux persistent depuis des décennies. Une deuxième contrainte est le manque d'intérêt national, en effet la variole ovine a perdu de son importance en raison de l'émergence de nouvelles maladies virales dangereuses telles que la fièvre catarrhale ovine et la peste des petits ruminants. En conséquence, cette maladie n'est plus considérée comme une menace réelle par les éleveurs, ce qui a entraîné un manque d'intérêt pour l'organisation des campagnes annuelles de vaccination par les services vétérinaires.

Bien que l'état sanitaire des troupeaux d'ovins touchés par la variole ovine suscite de grandes inquiétudes pour les autorités tunisiennes, toute solution potentielle doit d'abord consister à identifier les points clés qui font actuellement partie de la stratégie de lutte contre la maladie tels que : (i) l'instauration d'un programme de vaccination de masse en l'absence d'identification des animaux, ii) la nécessité d'élaborer une stratégie pour réguler la transhumance et le mouvement incontrôlé des animaux, pour mettre en place des programmes de lutte adaptés à des zones à faible ou à haut risque, et donner la priorité de vaccination dans les zones à haut risque comprenant des zones tampons bien définies (iii) l'ajout des caprins comme espèce cible dans les programmes de vaccination, vu que ces animaux jouent un rôle important dans la propagation du virus dans tout le pays. Une seconde option consiste à analyser le rapport coût / bénéfice des différentes stratégies de lutte : l'abattage des animaux dans le cas d'une épidémie de variole avec une indemnisation versée aux agriculteurs versus la vaccination combinée à une surveillance adéquate qui minimiserait les dommages causés par cette infection virale.

Dans ce contexte, il est important de noter que les autorités vétérinaires dépensent d'énormes coûts pour la mise en place des campagnes de vaccination annuelles contre la variole ovine, ignorant le problème logistique de vacciner seulement les ovins contre les poxvirus malgré la circulation du virus chez les autres animaux au sein des troupeaux tunisiens.

Enfin, l'éradication de la variole ovine en Tunisie dépend principalement de la priorité accordée à la maladie par les services vétérinaires nationaux. Les services vétérinaires de tous les pays d'Afrique du Nord doivent travailler ensemble pour lutter contre la maladie. L'implication des éleveurs eux-mêmes est évidemment la clé du succès de tout programme de lutte contre la clavelée visant à éradiquer cette maladie.

Partie III: Caractérisation des protéines virales du genre *Capripoxvirus*

Chapitre 1 : Analyse structurale *in silico* des quatre protéines

Pour l'étude structurale des quatre protéines du genre *Capripoxvirus* ; L1, A27, B5 et A33, une analyse bio-informatique *in silico* a été dans un premier temps réalisée. La délimitation des domaines fonctionnels et/ou transmembranaires ainsi que la prédiction de la présence de peptide signal ont été effectuées à l'aide d'outils présents sur la plateforme ExPASy, sur CBS prediction servers, ou par des alignements avec le logiciel Geneious entre les protéines du genre *Capripoxvirus* et leurs homologues au sein de la famille des *Poxviridae*. L'analyse de la structure secondaire et tertiaire est réalisée par le serveur Phyre2 et a concerné la protéine A27 du virus LSD du genre *Capripoxvirus*. Cette analyse a été menée en comparaison avec la protéine A27 du virus de la vaccine.

L'analyse *in silico* des quatre protéines d'intérêt est réalisée principalement pour deux objectifs. Le premier vise à délimiter les différents domaines protéiques pour identifier les parties concernées par la stratégie d'expression en système baculovirus-cellules d'insectes (cf chapitre 3). Le deuxième objectif concerne une étude structurale approfondie de la protéine A27 pour sa production dans le système baculovirus suivie de sa caractérisation antigénique.

I. Matériels et méthodes

1. Séquences des gènes d'intérêt utilisées

Les séquences des 4 gènes utilisés pour l'analyse *in silico* appartiennent au virus du Lumpy skin disease, souche Neethling 2490 GenBank : AF325528.1. L'identification des quatre séquences d'intérêt sur GenBank est la suivante :

- L1 (LSDV60) : AAK85021.1
- A27 (LSDV117) : AAK85078.1
- A33 (LSDV122) : AAK85083.1
- B5 (LSDV141) : AAK85102.1

2. Délimitation des domaines protéiques en vue d'une production dans le système baculovirus

La délimitation des domaines protéiques a concerné la recherche d'un domaine transmembranaire et de peptide signal au sein de la séquence de chacune des quatre protéines étudiées. Pour ce fait, nous avons testé deux algorithmes ; TMHMM Server2.0 pour la prédiction des domaines transmembranaires et Signal P pour la prédiction de la présence d'un peptide signal. Ces deux algorithmes ont été aussi utilisés en vue de les valider en les comparant à des études déjà réalisés ayant intéressé les quatre protéines homologues du virus de la vaccine. Suite à cette analyse et pour l'expression ultérieure des protéines dans le système baculovirus-cellules d'insectes, il y aura réflexion sur la délétion de ces domaines.

D'autre part, pour vérifier la conservation des protéines A27, L1, A33 et B5 du genre *Capripoxvirus* avec leurs homologues des différents genres de la famille des *Poxviridae*, des alignements à l'aide des logiciels Geneious et Clustal ont été effectués.

2.1. Prédiction des domaines transmembranaires par TMHMM Server 2.0

Le TMHMM est un serveur appartenant à la plateforme CBS, utilisé pour prédire la présence d'hélices transmembranaires au niveau des protéines. Cette méthode de prédiction est basée sur le modèle de « Hidden markov ». Le serveur permet de discriminer entre les protéines solubles et membranaires avec une grande précision (la sensibilité et la spécificité de ce serveur dépassent les 99%), tout en prenant compte du degré d'hydrophobicité, de la charge et de la longueur des hélices. L'avantage de ce serveur réside dans sa capacité de déterminer la longueur du domaine transmembranaire en déterminant les limites supérieures et inférieures de l'hélice membranaire (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.*, 2001).

2.2. Prédiction de la présence d'un peptide signal par Signal P

Le serveur Signal P prédit la présence d'un peptide signal ainsi que la localisation du site du clivage de ce dernier dans la séquence en acides aminés appartenant à des organismes divers (procaryotes gram positifs et gram négatifs et eucaryotes). Ce système de prédiction est basé sur une combinaison de deux réseaux de neurones artificiels « Neural Network Approach », le premier conçu pour la détection du site de clivage du peptide signal et le deuxième réseau sert à distinguer entre les protéines possédant un peptide signal et les protéines non sécrétées. Le serveur va donc fournir deux scores différents compris entre 0 et 1 pour chaque position dans

une séquence en acides aminés; le S score (différenciation entre peptide signal ou non peptide signal), le résultat de ce score est obtenu en estimant la probabilité d'une position d'un résidu donné appartenant à un peptide signal alors que le C score (site de clivage du PS) est interprété en estimant la probabilité d'une position donnée comme étant la première au sein d'une protéine mature (position + 1 relative au site de clivage), cependant s'il existe plusieurs pics de C score, dans ce cas, pour améliorer la prédiction, on se base sur un troisième score nommé Y score qui est la moyenne géométrique du C score additionné à un dérivé du S score (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen *et al.*, 1997).

2.3. Alignements avec les protéines homologues

Pour la délimitation des domaines des protéines L1, A33 et B5 du virus de la dermatose nodulaire contagieuse, un alignement avec le logiciel Genious (Kearse *et al.*, 2012) est réalisé avec les séquences des protéines homologues appartenant à des virus de genres différents de la famille des *Poxviridae*. Le genre *Parapoxvirus* est représenté par les virus BPSV (Bovine papular stomatitis virus) et OrfV (Orf virus), le genre *Orthopoxvirus* représenté par les virus VACV (vaccinia virus), VARV (Variola virus), MPXV (monkeypox virus), ECTV (Ectromelia virus) et CPXV (Cowpox virus), le genre *Capripoxvirus* représenté par les virus GTPV (Goatpox virus) et SPPV (Sheeppox virus), le genre *Suipoxvirus* représenté par le virus SWPX (Swinepoxvirus) et finalement le genre *Leporipoxvirus* avec les deux virus RFV (Rabbit Fibroma virus) et MYXV (Myxoma virus). Le numéro d'accès de GeneBank des orthologues des protéines L1, A33 et B5 provenant des prototypes cités sont représentés dans le tableau 15.

Les alignements réalisés sous Geneious pour ces trois protéines, sont des alignements bruts qui ne permettent pas de vérifier la conservation des résidus un par un, toutefois ils permettent de mettre en évidence les résidus hydrophobes visant à délimiter les domaines transmembranaires de ces protéines ainsi qu'une vérification de leur conservation globale parmi les différents genres de virus utilisés pour l'alignement. Pour la délimitation des domaines de la protéine A27, nous nous sommes basés sur l'alignement qu'a effectué Chang (2013), ce dernier a réalisé un alignement de la protéine avec ses homologues appartenant aux mêmes virus des différents genres cités plus haut dont les numéros d'accès figurent dans le tableau 15. En outre, un deuxième alignement réalisé avec les logiciels Geneious et Clustal nous a permis de vérifier le taux de conservation de la protéine A27 parmi les différents genres de virus cités plus haut.

Tableau 15. Numéro d'accès des protéines L1, A27, A33 et B5 appartenant aux différents genres de la famille des *Poxviridae*.

Genre	Virus	L1	A27	A33	B5	Référence
<i>Capripoxvirus</i>	LSDV (AF325528.1)	AAK85021.1	NP_150551	AAK85083.1	AAK85102.1	(Tulman <i>et al.</i> , 2001)
	GTPV (EU024478.1)	ABS72327	ABS72324	ABS72325.1	ABS72326.1	(Tulman <i>et al.</i> , 2002)
	SPPV (NC_004002.1)	NP_659632.1	NP_659689	NP_659694.1	NP_659711.1	
<i>Parapoxvirus</i>	BPSV (NC_005337.1)	NP-957956.1	NP_958013	NP-958018.1	Pas d'homologue	(Delhon <i>et al.</i> , 2004)
	ORFV (AY386263.1)	AAR98142.1	AAR98199	AAR98204.1	Pas d'homologue	
<i>Orthpoxvirus</i>	VACV (NC_006998.1)	YP_232970.1	YP_233032	YP_233038.1	YP_233069.1	(Baroudy <i>et al.</i> , 1982; Baroudy <i>et al.</i> , 1982a)
	VARV (DQ441421.1)	ABF23846.1	ABF23908	ABF23914.1	ABF23946.1	(Esposito <i>et al.</i> , 2006)
	MPXV (NC_003310.1)	NP_536507.1	NP_536566	NP_536572.1	NP_536594.1	(Shchelkunov <i>et al.</i> , 2001)
	ECTV (NC_004105.1)	NP_671590.1	NP_671648	NP_671654.1	NP_671674.1	(Mossman <i>et al.</i> , 1995; Wall <i>et al.</i> , 1997; Chen <i>et al.</i> , 2000)

<i>Orthpoxvirus</i>	CPXV (NC_003663.2)	NP_619885.1	NP_619946	NP_619952.1	NP_619980.1	(Pickup <i>et al.</i> , 1982; Parsons <i>et al.</i> , 1990; Hu <i>et al.</i> , 1991; Hu <i>et al.</i> , 1994)
<i>Suipoxvirus</i>	SWPX (AF410153.1)	AAL69796.1	NP_570274	AAL69858.1	AAL69878.1	(Afonso <i>et al.</i> , 2002)
<i>Leporipoxvirus</i>	RFV (NC_001266.1)	NP_051944.1	NP_052004	NP_052010.1	NP_052030.1	(Willer <i>et al.</i> , 1999)
	MYXV (NC_001132.2)	NP_051769.1	NP_051829	NP_051835.1	NP_051858.1	(Cameron <i>et al.</i> , 1999; Johnston <i>et al.</i> , 2005)

3. Analyse structurale de la protéine A27 et prédiction de la surface accessible aux solvants

3.1. Analyse structurale de la protéine A27

Pour prédire la structure secondaire et tertiaire de la protéine A27 du virus LSD, nous avons utilisé le logiciel Phyre2 qui se base sur une modélisation comparative. Le type de modélisation suggère que si deux protéines partagent un pourcentage d'identité de séquence élevé, elles adoptent le même repliement. Son principe consiste à aligner la séquence d'une protéine donnée dont la structure est inconnue avec la séquence d'une ou plusieurs protéines ayant une structure expérimentale connue (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley *et al.*, 2015). Le serveur Phyre 2 contient deux sections essentielles :

- Prédiction de la structure secondaire et des régions désordonnées
- Prédiction de la structure tridimensionnelle

Pour cela, le serveur passe par plusieurs étapes (Figure 31) : (1) La séquence d'intérêt est analysée avec d'autres séquences protéiques de la base de données HHblits, un alignement multiple est par la suite obtenu et est utilisé pour prédire la structure secondaire de la protéine avec PSIPred associé à un alignement et une prédiction de la structure secondaire par le modèle de « Hidden Markov » (2) la structure secondaire obtenue est analysée avec les protéines dont la séquence est connue de la base de données HMM permettant l'obtention de modèles bruts, (3) ensuite le modèle brut est corrigé par l'addition de boucles ou « loops », (4) enfin la chaîne d'acides aminés est ajoutée pour générer le modèle final (Kelley *et al.*, 2015).

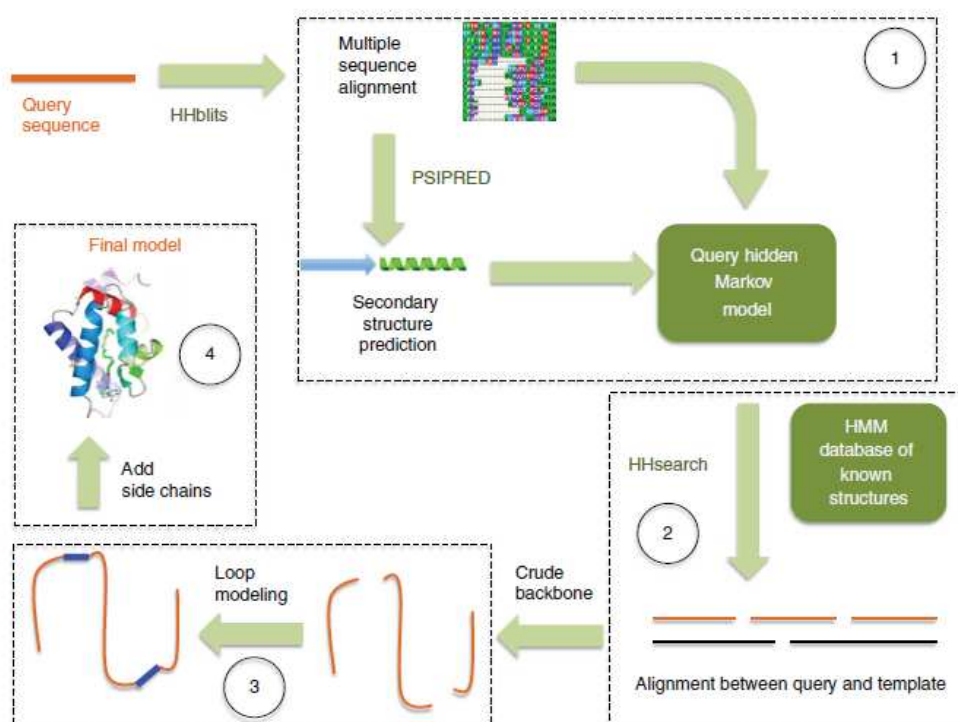


Figure 31. Etapes de prédiction de la structure secondaire et tertiaire de la protéine A27 selon le serveur PHYRE 2 (Kelley *et al.*, 2015).

3.2. Prédiction de la surface accessible aux solvants

Dans la mesure où les résidus amino-acides les plus intéressants biologiquement sont souvent ceux étant les plus exposés et interagissant avec l'environnement, il nous a semblé important d'entreprendre également une étude prédictive ciblant la surface accessible aux solvants. Cette dernière représente une caractéristique critique des propriétés structurales des protéines au même titre que la distance atomique ou l'angle dièdre du squelette.

D'une façon générale, pour prédire les propriétés structurales d'une protéine, une approche consisterait classiquement à réduire ces propriétés à un nombre limité de variable discrètes, par exemple pour la surface accessible aux solvants, à un état enfoui versus un état exposé du résidu étudié. Dans la mesure où la structure des protéines évolue librement dans les trois dimensions de l'espace, il paraissait plus fondé de considérer leur propriétés structurales comme étant plutôt des variables continues et d'attribuer à la surface accessible aux solvants une valeur réelle. Diverses approches prédictives ont donc été développées dans cette direction en vue de déterminer des valeurs continues pour la surface accessible aux solvants (solvent accessible surface area ou ASA) d'un résidu environné des autres acides aminés voisins constitutifs de la

ou des chaîne(s) polypeptidique(s) organisée(s) dans l'espace. Dans des démarches comparatives ou prédictives, l'ASA est convertie en surface relative (relative surface area ou RSA), correspondant au ratio de l'ASA d'un résidu donné localisé dans sa chaîne polypeptide sur l'exposition maximale qu'aurait ce résidu s'il se situait au centre d'un tripeptide de conformation étendue incluant comme acide aminé flanquant la glycine (Gly-X-Gly) ou l'Alanine (Ala-X-Ala) (Samanta *et al.*, 2002).

Pour l'étude de la surface accessible aux solvants relative à la protéine A27, nous avons eu recours au serveur NetSurfP ver.1.1 (Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>), hébergé sur la plateforme CBS prediction servers et qui repose sur une méthodologie générique utilisant un ensemble de réseaux neuronaux artificiels (Petersen *et al.*, 2009). Une étude comparative de cette méthode avec une autre méthode très utilisée pour la prédiction de RSA, Real-SPINE (Dor *et al.*, 2007), a permis de mettre en évidence un avantage de la méthodologie NetsurfP au travers de son indice de confiance ou z-score qui s'est avéré plus informatif que celui de Real-SPINE pour discriminer les bonnes prédictions des mauvaises prédictions et ceci sur la totalité de la gamme/éventail des résidus diversement positionnés (de ceux totalement enfouis à ceux pleinement exposés) (Petersen *et al.*, 2009).

II. Résultats

1. Délimitation des domaines en vue d'une production des protéines dans le système baculovirus

Pour chaque protéine, la prédiction du domaine transmembranaire et du peptide signal est réalisée parallèlement sur le virus LSD et le virus de la vaccine à titre comparatif. Les souches utilisées sont la souche Neethling NI-2490 (AF325528.1) pour LSD et NC_006998.1 pour VACV.

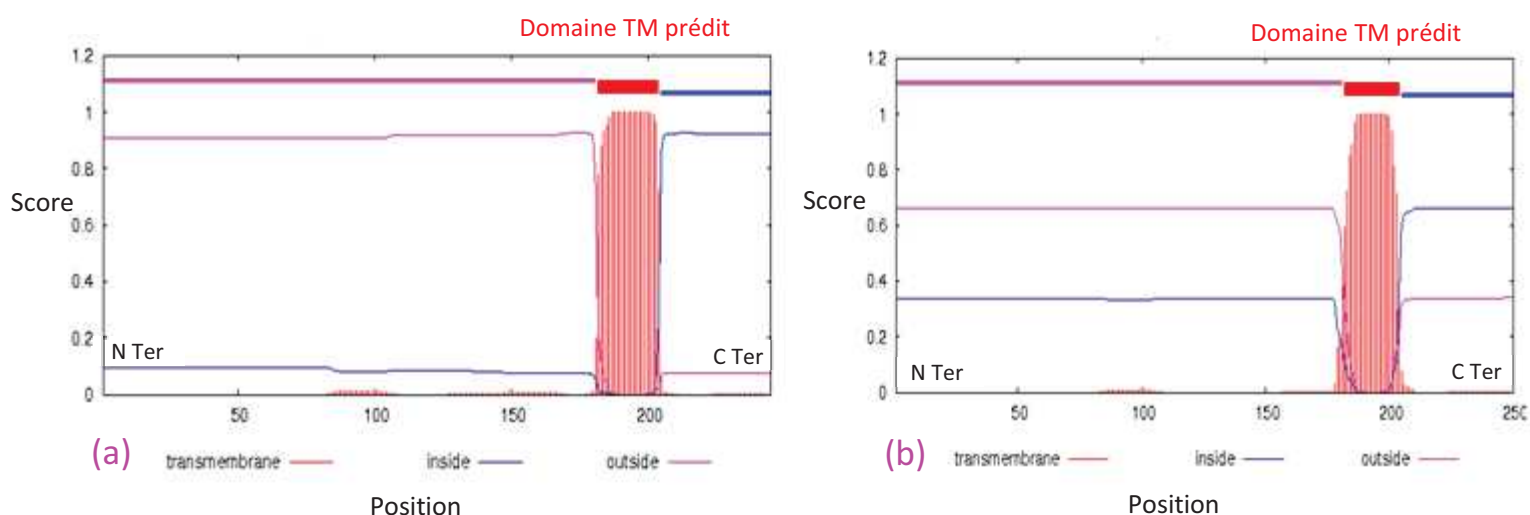
1.1. La protéine L1

1.1.1 Prédiction du domaine transmembranaire

La recherche d'un domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de L1 du virus LSD par le serveur TMHMM 2.0 a révélé la présence d'un domaine transmembranaire à la partie C terminale de la protéine, ce domaine est délimité entre les résidus 186 et 204 (Figure

32. a). Le même travail de prédiction du domaine transmembranaire a été réalisé sur la protéine L1 du virus de la vaccine en vue de valider l'outil utilisé et de comparer le résultat obtenu avec des travaux ayant intéressé la structure de la protéine L1. Le résultat représenté par la figure 32. (b) démontre la présence d'un domaine transmembranaire à la partie C terminale de la protéine possédant les mêmes limites que celui de la protéine L1 du virus LSD suggérant que ce domaine est conservé au sein de ces deux virus.

Des études ayant porté sur la protéine L1 du virus de la vaccine ont bien démontré que L1 est une protéine transmembranaire possédant une région hydrophobe à la partie carboxyterminale de la protéine (résidus 186 à 204) qui est impliqué dans l'encrage de la protéine à travers la membrane (Ravanello *et al.*, 1993; Ravanello *et al.*, 1994) ce qui permet de valider l'outil utilisé.



1.1.2 Prédiction du peptide signal

L'analyse de la présence d'un peptide signal au sein de la séquence de la protéine L1 du virus LSD (AAK85021.1) est réalisée avec le logiciel Signal P, le résultat de cette analyse (figure 33, a) démontre qu'aucun peptide signal n'a été décelé dans la séquence analysée vu que le S score est aux alentours de la valeur zéro (0,097).

Comme pour la prédiction du domaine transmembranaire, l'outil Signal P a voulu être validé en assignant la séquence de la protéine L1 du virus de la vaccine (YP_232970.1). Le résultat (figure 33, b) démontre que le serveur n'a pas détecté la présence d'un peptide signal au sein de la séquence de la protéine L1. Plusieurs travaux peuvent confirmer ce constat puisqu'aucune étude à ce jour ayant travaillé sur la protéine L1 du virus de la vaccine a démontré la présence d'un peptide signal au sein de cette protéine (Ravanello *et al.*, 1994) validant ainsi l'outil de prédiction utilisé.

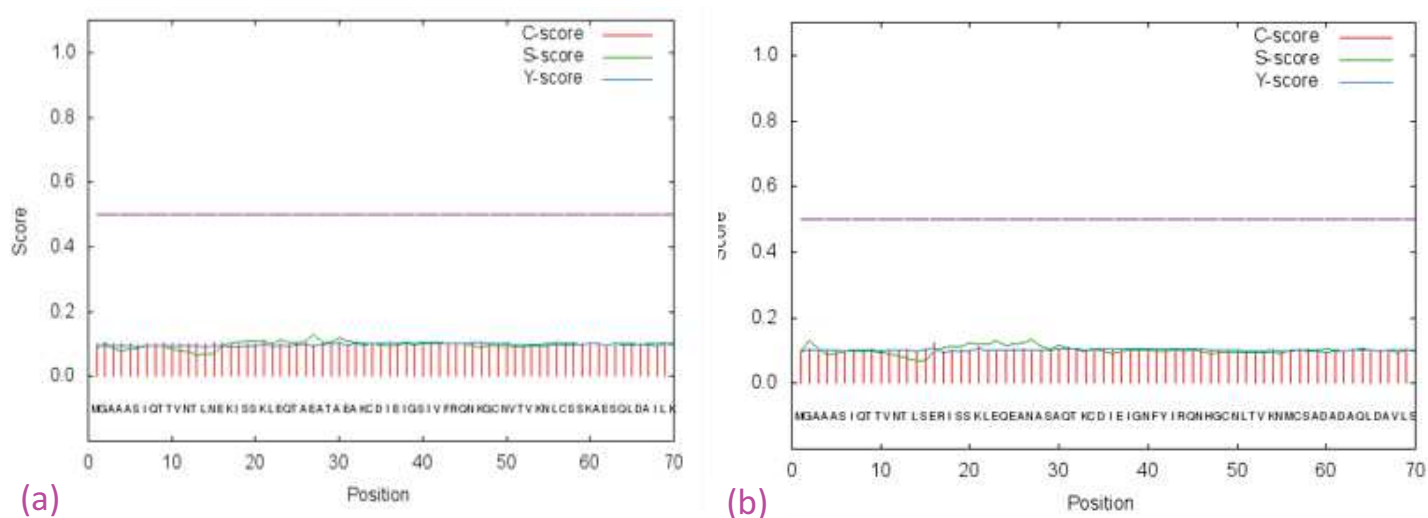


Figure 33. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la L1 du virus LSD (a) et du virus de la vaccine (b) par le serveur Signal P.

1.1.3 Alignements/ Délimitation des domaines

Après avoir vérifié la présence d'un domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de L1 du virus LSD, nous avons voulu vérifier le degré de conservation de cette protéine parmi ses homologues appartenant aux différents genres cités précédemment (cf tableau 15). Pour ce fait un alignement à l'aide du logiciel Geneious est réalisé.

Le résultat de cet alignement est représenté par la figure 35. Nous pouvons noter d'emblée que la protéine L1 possède une même longueur en acides aminés chez tous les genres étudiés (pour les virus du genre *Orthopoxvirus*, elles sont plus longues de 10AA) suggérant une certaine conservation de la protéine L1.

Nous pouvons aussi noter suite à cet alignement que les limites du domaine transmembranaire ainsi que son profil d'hydrophobicité sont conservés chez la protéine L1 chez les différents virus étudiés. Ce domaine étant plus hydrophobe que le reste de la séquence protéique.

La protéine L1 du virus de la vaccine est une protéine transmembranaire comprenant six cystéines responsables de la formation de trois ponts disulfures intramoléculaires, ces cystéines sont aussi importantes dans la relation structure/fonction de la protéine (Blouch *et al.*, 2005). Pour ce fait nous avons voulu vérifier suite à l'alignement réalisé si ces six cystéines sont conservées parmi les différents genres de la famille des Poxviridae, nous pouvons noter que les six cystéines aux positions 34, 49, 57, 116, 136 et 158 sont conservées chez tous les virus des cinq genres étudiés.

A l'issue de cette analyse *in silico*, suivie de l'alignement de la protéine L1 décrit ci-dessus, nous avons pu délimiter les domaines structuraux de la protéine L1 du virus LSD comme le montre la figure 34 suivante.

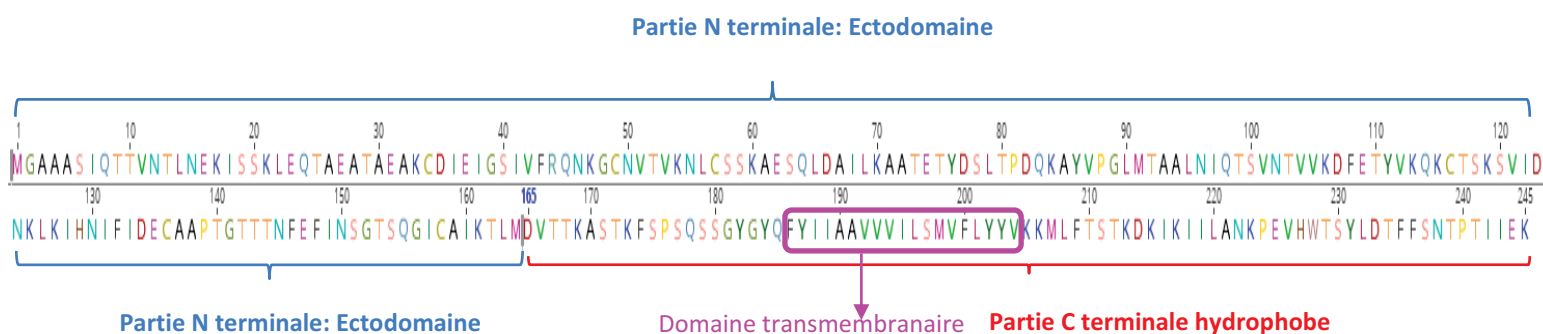


Figure 34. Délimitations des domaines de la protéine L1 du virus LSD.

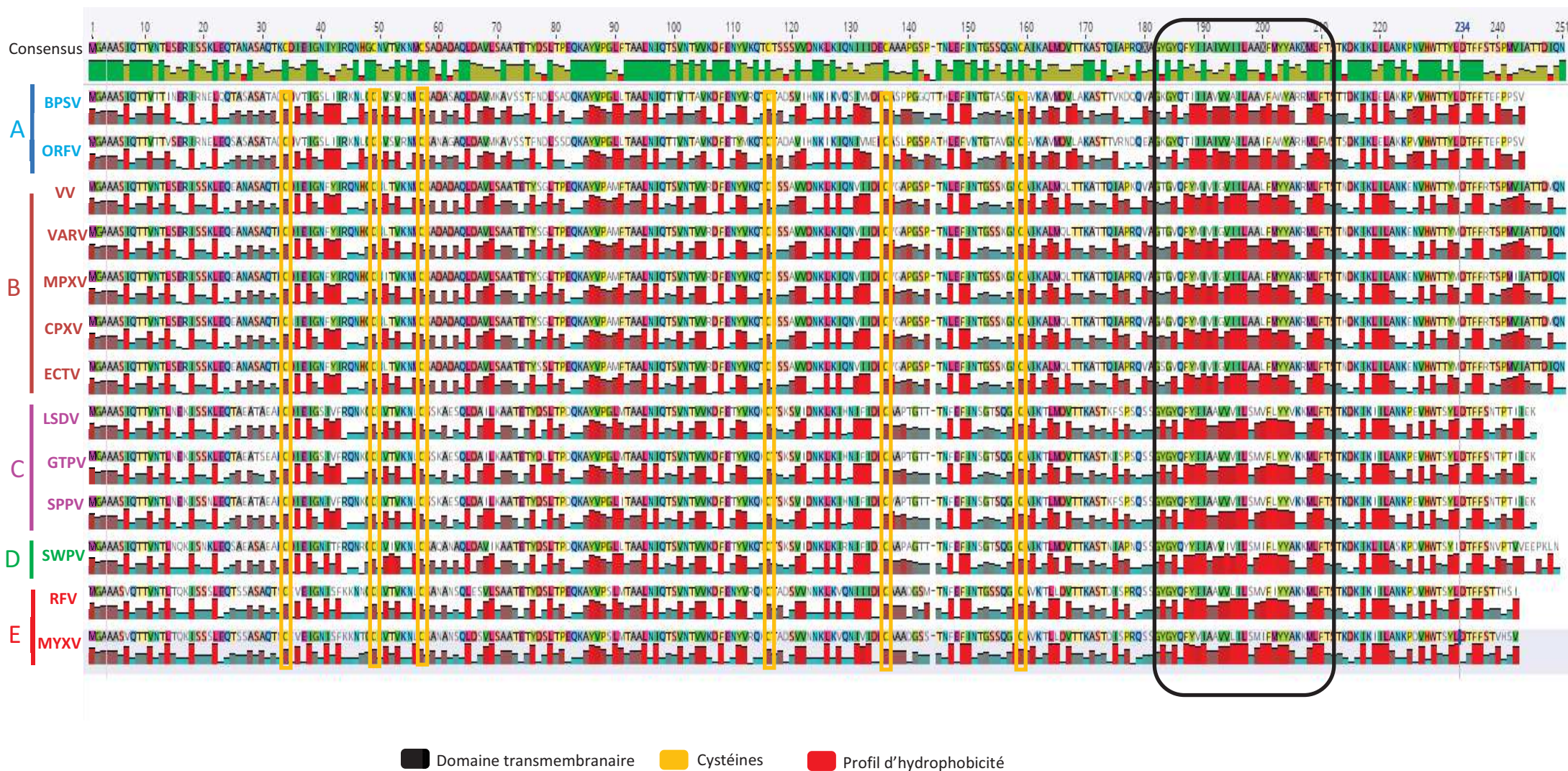


Figure 35. Résultat de l'alignement de la protéine L1 chez différents virus appartenant aux genres *Parapoxvirus* (BPSV et ORFV), *Orthopoxvirus* (VV, VARV, MPXV, CPXV et ECTV), *Capripoxvirus* (LSDV, GTPV et SPPV), *Suipoxvirus* (SWPV) et *Leporipoxvirus* (RFV et MYXV) selon le logiciel Genious.

1.2. La protéine A27

1.2.1. Prédiction des domaines transmembranaires

Le serveur TMHMM 2.0 a été utilisé pour la prédiction de la présence d'un domaine transmembranaire hydrophobe au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD (AAK85078.1). Pour valider l'outil utilisé, le même travail de prédiction de la présence d'un domaine transmembranaire a été réalisé sur la protéine A27 du virus de la vaccine sur laquelle plusieurs travaux ont été déjà effectués dans le but de comparer le résultat obtenu avec ces travaux. Le résultat des deux prédictions est représenté par la figure 36, qui démontre que le logiciel n'a pas détecté la présence d'un domaine transmembranaire au sein des deux séquences protéiques.

Ceci peut être confirmé par diverses études ayant travaillé sur l'analyse structurale de la protéine A27 du virus de la vaccine qui ont toutes démontré que la protéine A27 n'était pas une protéine transmembranaire et qu'elle formait un complexe avec la protéine A17 pour s'ancrer dans la membrane (Chu *et al.*, 2005; Howard *et al.*, 2008), validant ainsi l'outil de prédiction utilisé.

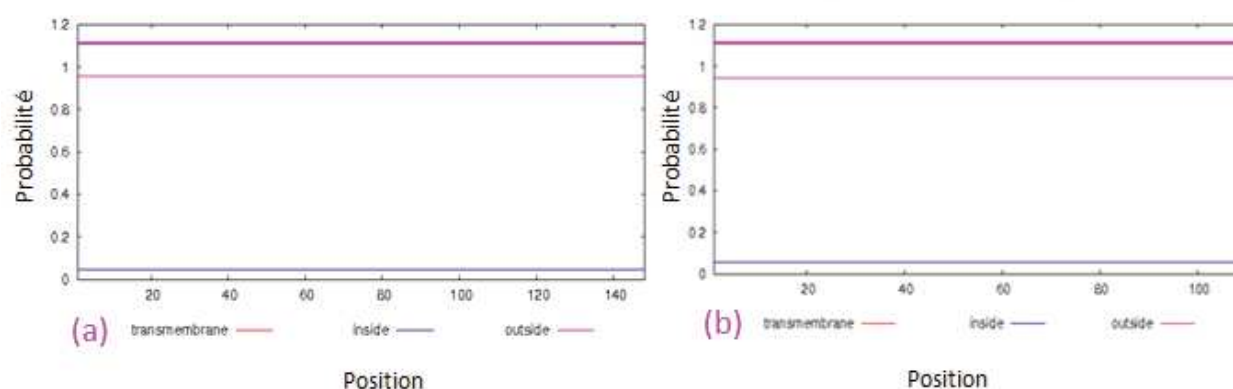


Figure 36. Résultat de prédiction de la présence du domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD (a) et du virus de la vaccine (b) par le serveur TMHMM 2.0.

1.2.2. Prédiction du peptide signal

L'analyse de la présence d'un peptide signal au sein de la séquence de la protéine A27 du virus LSD est réalisée avec le logiciel Signal P. En vue de valider l'outil utilisé, le même travail est

réalisé chez la protéine A27 du virus de la vaccine. Le résultat de cette analyse est représenté par la figure 37 qui montre qu'aucun peptide signal n'a été détecté dans les deux séquences analysées vu que le S score est aux alentours de la valeur zéro (0,120).

Cependant le résultat de prédiction est controversé puisque plusieurs études ayant travaillé sur l'analyse structurale de la protéine A27 chez le virus de la vaccine ont révélé la présence d'un peptide signal à la partie N terminale de la protéine nécessaire pour le « processing » de la protéine (résidus 1 à 20) (Takahashi *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2002).

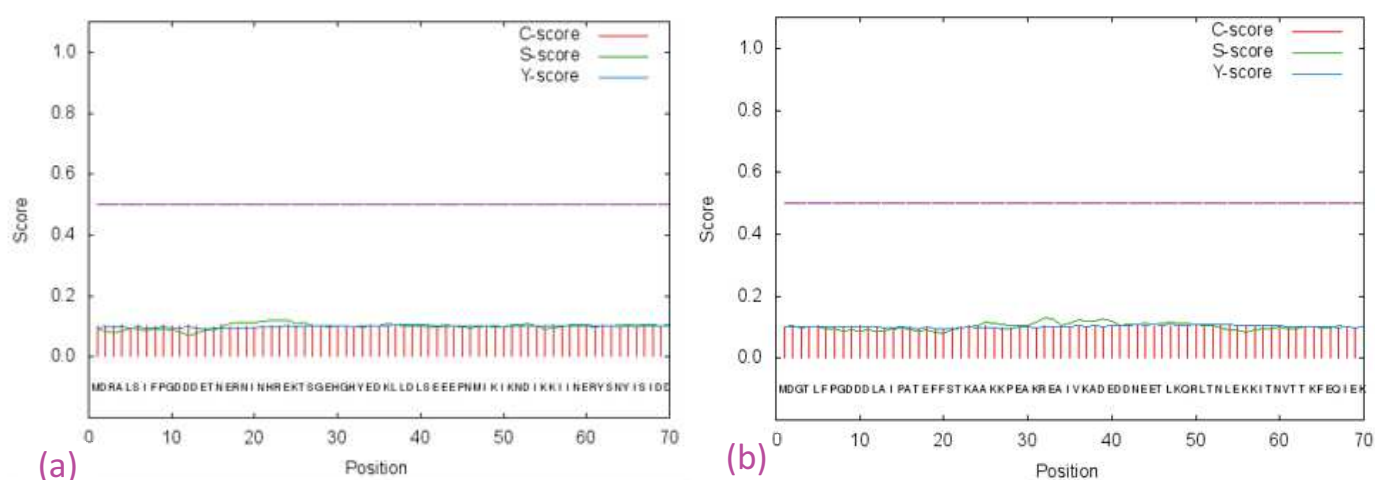


Figure 37. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD (a) et du virus de la vaccine (b) par le serveur Signal P.

1.2.3. Alignements : délimitation des domaines

Une analyse structurale approfondie de la protéine A27 du virus LSD du genre *Capripoxvirus* a été menée dans la partie 2 de ce même chapitre permettant de délimiter les différents domaines de cette protéine.

1.3. La Protéine A33

1.3.1. Prédiction du domaine transmembranaire

La recherche d'un domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de A33 du virus LSD (AAK85083.1) par le serveur TMHMM 2.0 a décelé la présence d'un domaine transmembranaire à la partie N terminale de la protéine (Figure 38, a), ce domaine hydrophobe

est délimité entre les résidus 42 et 71. En outre, un domaine à faible hydrophobicité a été détecté plus à la partie N terminale de la protéine plus précisément au niveau des 20 premiers résidus.

Le même outil a voulu être validé en vérifiant le résultat de la prédiction du domaine transmembranaire sur la séquence de la protéine A33 du virus de la vaccine (YP_233038.1). La figure 38b démontre que le serveur a décelé la présence d'un domaine TM à la partie N terminale de la protéine plus précisément aux résidus 35 à 60.

Ce résultat de prédiction du domaine transmembranaire a pu être confirmé par plusieurs études ayant intéressé la protéine A33 du virus de la vaccine qui ont démontré que cette dernière est une glycoprotéine membranaire intégrale de type II possédant un domaine transmembranaire hydrophobe à la partie N terminale de la protéine et plus particulièrement aux résidus 56 à 60 (Roper *et al.*, 1996; Su *et al.*, 2010).

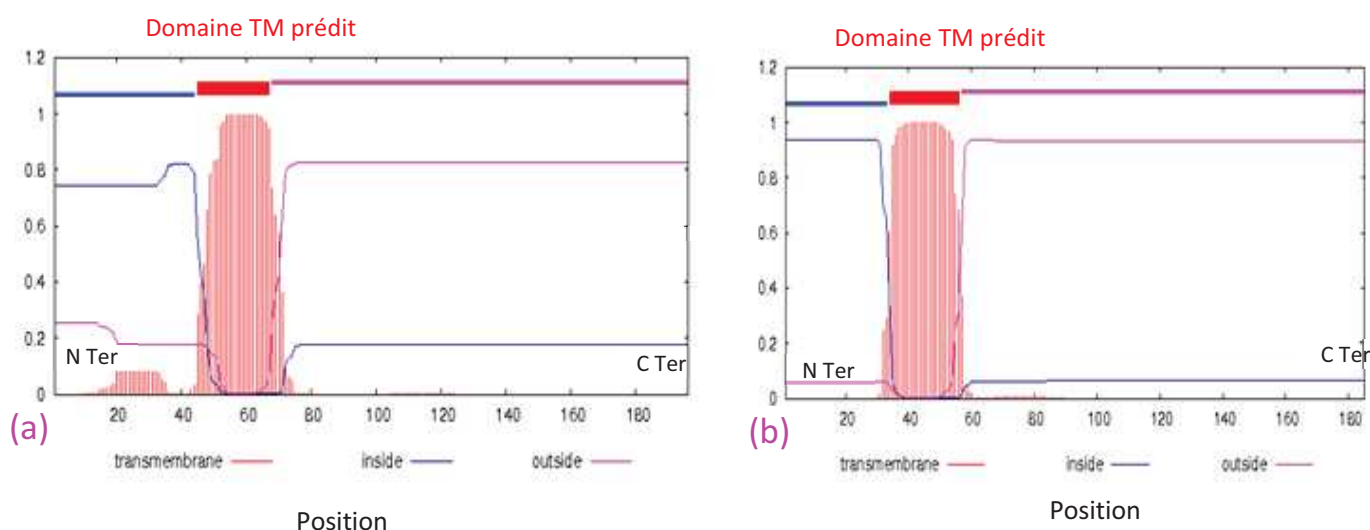


Figure 38. Résultat de prédiction de la présence du domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de la A33 du virus LSD (a) et du virus de la vaccine (b) par le serveur TMHMM 2.0.

1.3.2. Prédiction du peptide signal

L'analyse avec le logiciel Signal P des deux séquences de A33 chez le virus LSD (figure 39, a) et vaccine (figure 39, b) n'a pas détecté la présence d'un peptide signal (S score: 0,138). Ce résultat de prédiction du peptide signal chez la protéine A33 a pu être validé puisque les différentes études ayant intéressé l'analyse structurale de la protéine A33 chez la vaccine n'ont pas démontré la présence d'un peptide signal natif (Roper *et al.*, 1996).

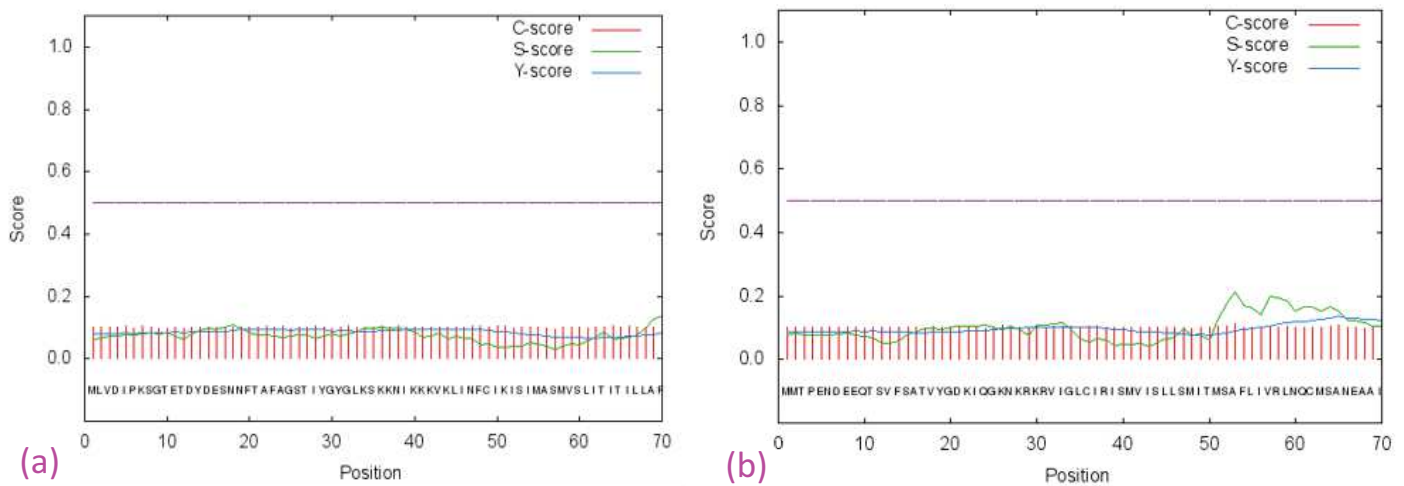


Figure 39. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la A33 du virus LDS (a) et du virus de la vaccine (b) par le serveur Signal P.

1.3.3. Alignements/ Délimitation des domaines

Après avoir vérifié la présence d'un domaine transmembranaire à la partie N terminale de la protéine A33 du virus LSD, nous avons voulu vérifier la conservation de la protéine A33 ainsi que de son domaine transmembranaire parmi plusieurs virus appartenant à différents genres de la famille des *Poxviridae*. Le profil d'hydrophobicité du domaine TM a été aussi vérifié. Pour ce faire et comme le montre la figure 40, un alignement de la totalité de la protéine A33 du virus LSD est réalisé avec ses homologues chez les différents virus cités précédemment.



Figure 40. Résultat de l'alignement de la protéine A33 chez différents virus appartenant aux genres *Parapoxvirus* (BPSV et ORFV), *Orthopoxvirus* (VV, VARV, MPXV, CPXV et ECTV), *Capripoxvirus* (LSDV, GTPV et SPPV), *Suipoxvirus* (SWPV) et *Leporipoxvirus* (RFV et MYXV) selon le logiciel Genious.

Le résultat de l'alignement démontre que la protéine A33 des trois virus du genre *Capripoxvirus* est la plus longue (196 aa) et que celle des virus du genre *Parapoxvirus* est la plus courte (162 aa). Cette légère différence de longueur de la séquence protéique est surtout observée à la partie N terminale de la protéine mais aussi à la partie centrale suggérant que la partie C terminale est peut-être plus conservée. Cet alignement démontre aussi que le domaine transmembranaire de la protéine A33 est conservé, il se retrouve à la partie N terminale chez les différents genres de la famille des *Poxviridae* avec un même profil d'hydrophobicité qui est assez important.

D'autre part, la protéine A33 du virus de la vaccine est une glycoprotéine membranaire composée de six cystéines dont cinq sont responsables de la formation de ponts intramoléculaires au niveau du domaine extracellulaire, et une cystéine participant à la formation de dimères, se retrouve au niveau de la queue cytoplasmique (Su *et al.*, 2010).

Par cet alignement, nous avons voulu vérifier si ces six cystéines jouant un rôle important dans la relation structure-fonction de la protéine A33, sont conservées chez d'autres genres de virus et plus particulièrement chez les capripoxviurs. L'alignement a démontré que les cinq cystéines du domaine extracellulaire sont toutes conservées chez tous les genres utilisés pour l'alignement (*Parapoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Suipoxvirus* et *Leporipoxvirus*) alors que la cystéine responsable de la formation de ponts intermoléculaires se trouvant au niveau de la queue cytoplasmique n'est pas conservée chez les virus appartenant aux trois genres *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* et *Leporipoxvirus* (Figure 40). Notons enfin que ces six cystéines sont conservées chez le virus de la vaccine et les virus du genre *Capripoxvirus*.

Suite à cette analyse *in silico*, suivie de l'alignement de la protéine A33 décrit ci-dessus, nous avons pu délimiter les domaines structuraux de la protéine A33 du virus LSD comme le montre la figure 41 suivante. Néanmoins, la limite entre le stalk et la région extracellulaire de la protéine nécessite encore des investigations pour sa délimitation.

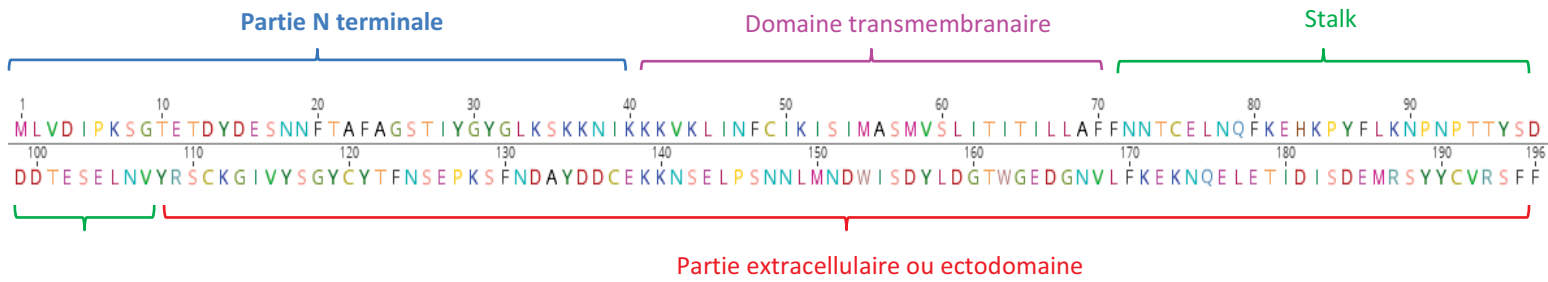


Figure 41. Délimitations des domaines de la protéine A33 du virus LSD.

1.4. La protéine B5

1.4.1. Prédiction du domaine transmembranaire

La recherche d'un domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de B5 du virus LSD (AAK85102.1) par le serveur TMHMM 2.0 a décelé la présence d'un domaine transmembranaire à la partie C terminale de la protéine, ce domaine hydrophobe est délimité entre les résidus 190 et 214 (Figure 42, a). Pour la validation de l'outil utilisé, le même travail est réalisé avec la protéine B5 du virus de la vaccine (YP_233069.1). Le résultat représenté par la figure 42b, démontre que le serveur a détecté la présence de trois domaines transmembranaires d'intensité inégale, le premier se trouve à la partie N terminale de la protéine (20 premiers résidus), un deuxième à la partie centrale de la protéine de faible intensité et un dernier domaine transmembranaire dont l'intensité semble la plus importante à la partie C terminale de la protéine.

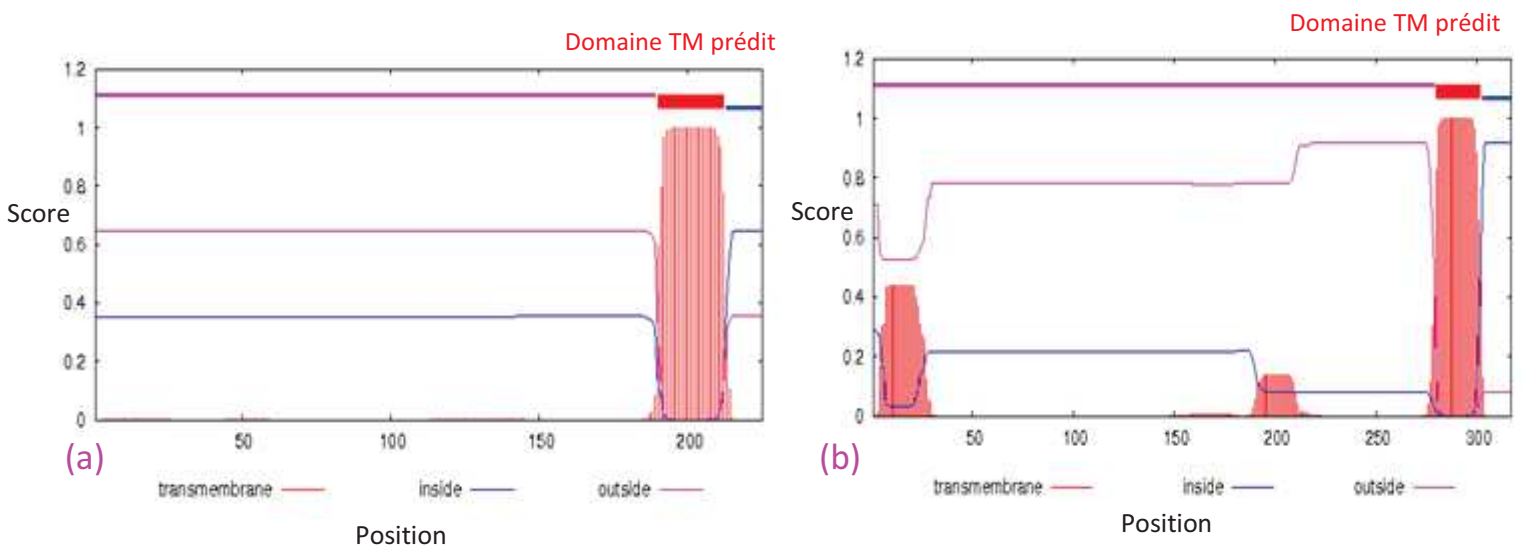


Figure 42. Résultat de prédiction de la présence du domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique de la B5 du virus LSD (a) et du virus de la vaccine (b) par le serveur TMHMM 2.0.

Le serveur THMMH prédit correctement les hélices transmembranaires sur la base du modèle Hidden markov avec une sensibilité et une spécificité de plus de 99%, cependant cette précision chute significativement lors de la présence dans une même séquence de peptide signal et domaine TM ce qui est le cas pour la protéine B5 expliquant ainsi le résultat obtenu. L'utilisation d'un serveur qui est capable de combiner la prédiction de ces deux domaines hydrophobes tel que Phobius serait peut-être plus intéressant (Krogh *et al.*, 2001; Kall *et al.*, 2007). Cependant les domaines transmembranaires détectés par le serveur utilisé ont une intensité inégale, on peut noter que le domaine hydrophobe détecté à la partie C terminale de la protéine (Résidus 280 à 300) est de loin le plus important. En effet plusieurs études ayant travaillé sur la protéine B5 du virus de la vaccine ont révélé la présence d'un domaine transmembranaire à la partie C terminale de la protéine et plus précisément au niveau des résidus 275 à 303 (Isaacs *et al.*, 1992; Herrera *et al.*, 1998; Aldaz-Carroll *et al.*, 2005).

1.4.2. Prédiction du peptide signal

L'analyse de la présence d'un peptide signal par le logiciel Signal P concernant la B5 du virus LSD (figure 43, a) et celle de la vaccine (figure 43, b) a révélé un même résultat. D'une part ; l'existence d'un peptide signal à la partie N terminale des deux protéines et plus précisément au sein des 20 premiers acides aminés (S score à 0.920), et d'autre part le site de clivage du peptide signal prédit se trouve entre l'acide aminé à la position 19 et 20 (C score à 0.470).

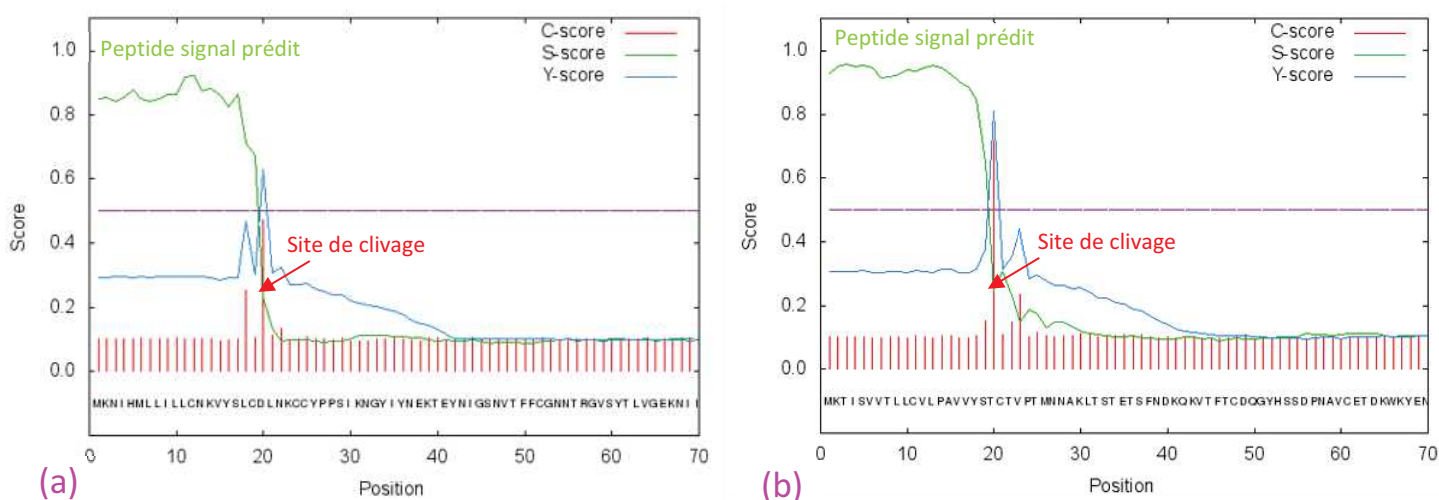


Figure 43. Résultat de prédiction de la présence du peptide signal au sein de la séquence protéique de la B5 du virus LSD (a) et du virus de la vaccine (b) par le serveur Signal P.

Des études ayant travaillé sur l'analyse de la structure de la protéine B5 du virus de la vaccine ont pu établir la présence d'un peptide signal à la partie N terminale de la protéine allant de l'acide aminé 1 à 19 validant ainsi l'outil de prédiction utilisé (Herrera *et al.*, 1998; Aldaz-Carroll *et al.*, 2005). L'analyse des protéines B5 des virus LSD et VACV par le serveur Signal P démontre que le peptide signal est conservé chez ces deux virus.

1.4.3. Alignements : Délimitation des domaines

Nous avons voulu vérifier le degré de conservation de la protéine B5 parmi différents virus de la famille des Poxvirus. Un alignement de la protéine à l'aide du logiciel Genious comme décrit précédemment est réalisée. Cet alignement nous a aussi permis, de délimiter le domaine transmembranaire de la protéine B5, ainsi que d'étudier son profil d'hydrophobicité et son degré de conservation parmi la famille des *Poxviridae* (Figure 44).

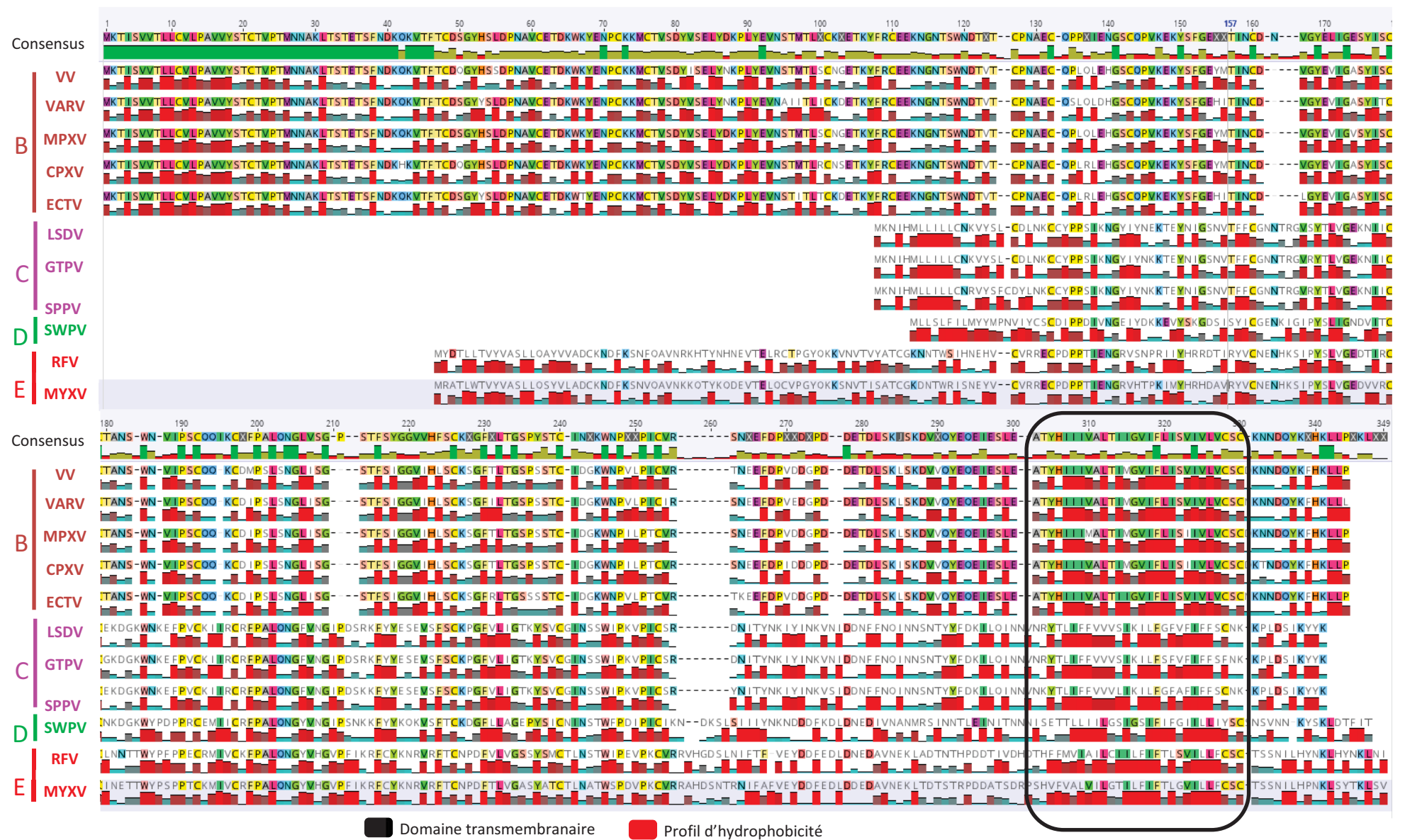


Figure 44. Résultat de l'alignement de la protéine B5 chez différents virus appartenant aux genres *Parapoxvirus* (BPSV et ORFV), *Orthopoxvirus* (VV, VARV, MPXV, CPXV et ECTV), *Capripoxvirus* (LSDV, GTPV et SPPV), *Suipoxvirus* (SWPV) et *Leporipoxvirus* (RFV et MYXV).

Le résultat de cet alignement nous permet d'abord de dire que la protéine B5 du genre *Capripoxvirus* est la plus courte (225 aa) suivie de celle des *Leporipoxvirus* (299 aa), la B5 des virus du genre *Orthopoxvirus* étant la plus longue (317 aa). La longueur de la protéine étant la même pour les virus du même genre signifie que la protéine B5 est conservée parmi les virus du même genre. On note une divergence dans la partie N terminale de la protéine par rapport à la partie C terminale qui semble plus conservée ainsi qu'une différence dans la longueur de la protéine parmi les différents virus alignés. Cette divergence qui est observée entre les genres est due à une différence dans la structure de l'ectodomaine de la protéine. En effet, les travaux de Bratke ont démontré que la partie extracellulaire de B5 des *Orthopoxvirus* est constituée de quatre domaines SCR (Short complement repeat), pour trois chez les *Leporipoxvirus* et deux chez les *Capripoxvirus/Suipoxvirus*. Notons que ce sont les SCR3/4 que nous retrouvons plutôt à la partie C terminale et représentent donc les domaines conservés parmi ces virus expliquant pourquoi la partie N terminale est beaucoup moins conservée que la partie C terminale (Bratke *et al.*, 2013).

Suite à cet alignement, nous avons voulu délimiter le domaine transmembranaire chez ces différents virus. On peut remarquer que ce domaine est conservé parmi les différents genres, et que chez tous les virus utilisés pour cet alignement, ce domaine se trouve à la partie C terminale de la protéine B5 validant ainsi l'outil utilisé (THMMH). Ce domaine transmembranaire conserve aussi le même profil d'hydrophobicité qui est assez important.

Ainsi par cette analyse *in silico*, nous avons pu délimiter les différents domaines protéiques de la B5 du virus LSD comme le montre la figure 45.

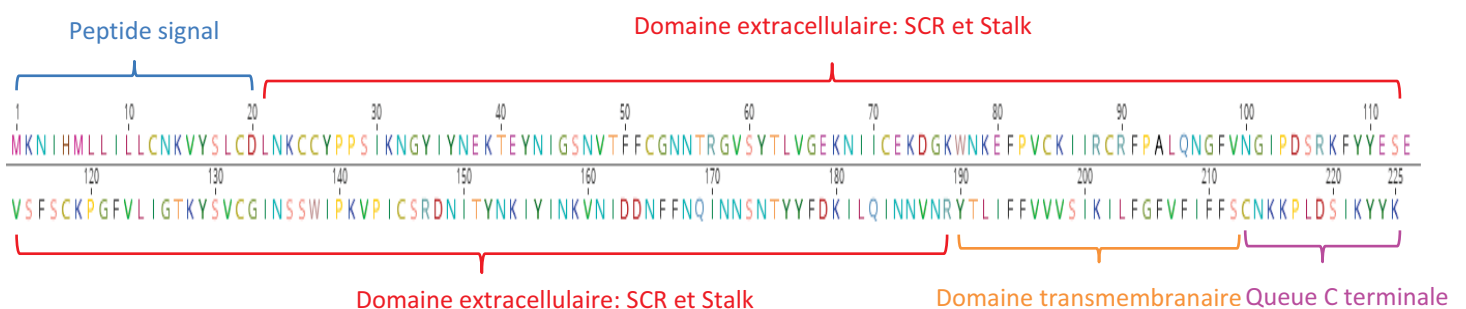


Figure 45. Délimitation des domaines de la protéine B5 du virus LSD

2. Analyse structurale de la protéine A27

Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a travaillé sur la prédiction structurale de la protéine A27 du virus LSD ni par analyse expérimentale ni par des outils bioinformatiques. L'analyse structurale de la protéine A27 a concerné l'étude de sa structure primaire, secondaire et tertiaire. L'étude de la structure primaire de la protéine est réalisée suite à des alignements effectués sous le logiciel Geneious mais aussi en comparant nos résultats avec des alignements réalisés par d'autres travaux. L'analyse de la structure secondaire et tridimensionnelle de la protéine A27 du virus LSD est réalisée par le logiciel Phyre 2 en comparaison avec la structure secondaire et tertiaire de la protéine A27 du virus de la vaccine obtenue par le même logiciel.

2.1. Prédiction de la structure primaire

L'étude de la structure primaire de la protéine A27 est réalisée en se basant sur deux types d'alignements. Le premier alignement résulte de celui des travaux de Chang (Figure 46), le deuxième alignement (Figure 47) est réalisé à l'aide des logiciels Genious et Clustal visant à vérifier le taux de conservation de la protéine parmi les différents genres de virus cités dans le tableau 15.

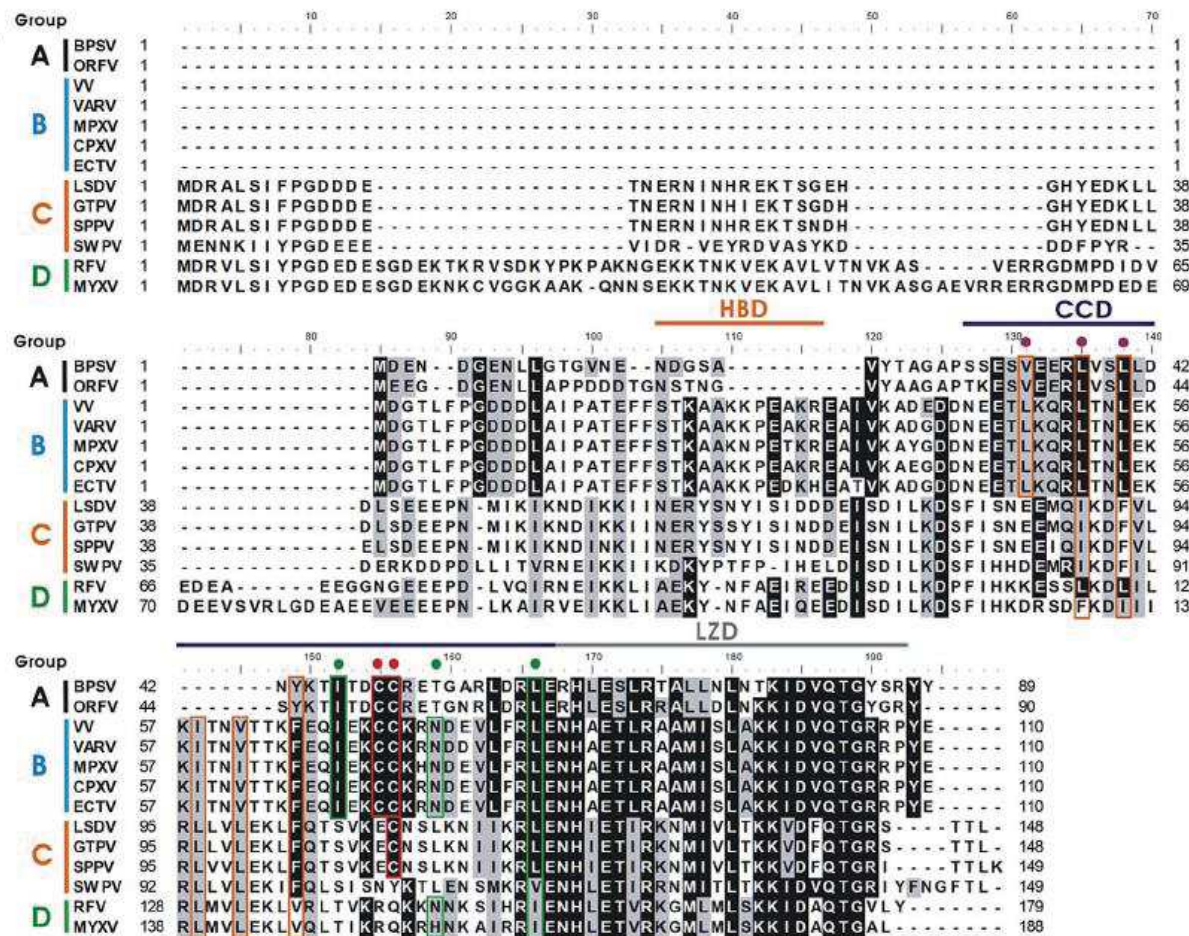


Figure 46. Alignement de la séquence protéique de la protéine A27 provenant de différents genres. A. Parapoxvirus, B. Orthopoxvirus, C. Capripoxvirus et D. Leporipoxvirus (Chang *et al.*, 2013).

L'alignement réalisé par Chang sur la protéine A27 appartenant à des virus de genres différents de la famille des Poxviridae démontre un taux de conservation distinct pour les parties N et C terminale de la protéine. Suite à cet alignement, on peut noter que la protéine A27 est plus courte chez les virus du genre *Parapoxvirus* et *Orthopoxvirus* (110 acides aminés) (groupes A et B) chez qui la protéine est conservée. Par contre chez les virus du genre *Capripoxvirus* et *Leporipoxvirus* (groupes C et D), la protéine est plus longue (148 acides aminés), démontrant un taux de conservation moins important. Cette différence dans la longueur de la protéine est observée à la partie N terminale, alors que la partie C terminale comprenant les domaines CCD et LZD semble plus conservée. Dans cet alignement, les résidus identiques et similaires sont respectivement notés en noir et en gris, nous pouvons remarquer que les résidus les plus conservés sont le plus retrouvés dans le domaine LZD, à moindre degré le domaine CCD alors que les résidus du domaine HBD sont faiblement conservés.

D'après les travaux de Chang, plusieurs résidus ont été identifiés comme étant importants pour la fonction de la protéine mais aussi dans l'assemblage de cette dernière.

Au niveau du domaine HBD, quatre résidus KKPE (26 à 29) ont été identifiés comme étant responsables de la liaison de la protéine avec la cellule hôte. La divergence de la partie N terminale de la protéine des virus du genre *Orthopoxvirus* avec les quatre autres genres (*Capripoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* et *Leporipoxvirus*) ne nous permet pas de vérifier la conservation de ces résidus au sein de ce domaine.

La conservation plus importante pour les deux domaines CCD et LZD de la protéine A27 nous a permis de vérifier la conservation de certains résidus importants dans la fonction de la protéine.

Au niveau du domaine superenroulé CCD, les mêmes travaux de Chang, ont démontré que neuf résidus hydrophobes étaient responsables de l'assemblage de la protéine A27 de la vaccine, contribuant ainsi à la formation de la structure super-enroulée de la protéine (six résidus Leu47, Leu51, Leu54, Ile58, Val61, Phe65 : responsables de la formation de trimères et trois résidus Ile68, Asn75 et Leu82 : responsables de la formation d'hexamères) (Chang *et al.*, 2013). Nous nous sommes donc intéressés à vérifier la conservation de ces résidus hydrophobes entre le virus de la vaccine et les virus du genre *Capripoxvirus* afin de vérifier si les fonctions d'assemblage sont conservées. Suite à cet alignement, nous pouvons noter que la majorité de ces résidus ne sont pas conservés entre le virus de la vaccine et les virus du *Capripoxvirus*, seuls les résidus Phe65 et Leu82 sont conservés. Toujours dans le domaine CCD, nous pouvons aussi remarquer que les deux cystéines C71-C72 du virus de la vaccine responsable de la formation de ponts intermoléculaires avec la protéine A26 (Chang *et al.*, 2013), sont conservées parmi le groupe A et B, alors qu'une seule est conservée chez les virus du genre *Capripoxvirus*, enfin aucune d'entre elles ne l'est chez les *Leporipoxvirus*.

Enfin, le domaine leucine zipper de la A27 sert de domaine d'ancrage pour la protéine A17 à travers des liaisons non covalentes qui se font au niveau des deux sites F80-E87 et R90-R101 (Hughes *et al.*, 2014). Nous avons voulu vérifier par cet alignement la conservation de ces résidus, nous remarquons que seul le résidu F80 n'est pas conservé, alors que les trois autres résidus à la position 87, 90 et 101 sont conservés parmi les cinq genres de poxvirus étudiés.

Le deuxième type d'alignement a permis la vérification du pourcentage d'identité entre la protéine A27 de la souche LSD et celle appartenant aux différents virus de l'alignement de

Chang. La protéine présente un degré de conservation élevée en intra-genre variant de 95% à 100% pour les virus du genre *Orthopoxvirus* et *Capripoxvirus* et entre 86 à 80% pour les virus du genre *Parapoxvirus* et *Leporipoxvirus*. Le pourcentage d'identité de la protéine entre le virus de la vaccine et les virus du genre *Capripoxvirus* n'est que de 30,9% reflet de la non conservation de la partie N terminale de la protéine parmi ces deux virus.

		BPSV	ORFV	VV	VARV	MPV	CPXV	ECTV	LSDV	GTPV	SPPV	SWPV	RFV	MYXV
A	BPSV		86.7	36.8	36.8	36.8	36.8	36.8	23.5	23.5	22.1	23.5	25.8	21.5
	ORFV	86.7		38.8	38.8	38.8	38.8	38.8	25.4	25.4	25.4	28.4	27.3	23.1
B	VV	36.8	38.8		98.5	97.1	100	100	30.9	30.9	30.9	32.4	31.8	29.2
	VARV	36.8	38.8	98.5		95.6	98.5	98.5	30.9	30.9	30.9	32.4	31.8	29.2
	MPXV	36.8	38.8	97.1	95.6		97.1	97.1	30.9	30.9	30.9	32.4	31.8	27.7
	CPXV	36.8	38.8	100	98.5	97.1		100	30.9	30.9	30.9	32.4	31.8	29.2
C	ECTV	36.8	38.8	100	98.5	97.1	100		30.9	30.9	30.9	32.4	31.8	29.2
	LSDV	23.5	25.4	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9		100	95.6	61.1	48.5	46.2
	GTPV	23.5	25.4	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	100		95.6	61.1	48.5	46.2
D	SPPV	22.1	25.4	30.9	30.9	30.9	30.9	30.9	95.6	95.6		59.7	48.5	46.2
	SWPV	23.5	28.4	32.4	32.4	32.4	32.4	32.4	61.1	61.1	59.7		53.0	52.3
E	RFV	25.8	27.3	31.8	31.8	31.8	31.8	31.8	48.5	48.5	48.5	53.0		80.0
	MYXV	21.5	23.1	29.2	29.2	27.7	29.2	29.2	46.2	46.2	46.2	52.3	80.0	

Figure 47. Pourcentage d'identité de la protéine A27 appartenant à différents groupes de virus. A. Parapoxvirus (BPSV et ORFV), B. Orthopoxvirus (VV, VARV, MPXV, CPXV et ECTV), C. Capripoxvirus (LSDV, GTPV et SPPV), D. Suipoxvirus (SWPV) et E. Leporipoxvirus (RFV et MYXV).

Concernant la structure primaire de la protéine A27 du LSD, nous avons pu délimiter les domaines protéiques (Figure 48). Cependant cet alignement reste une supposition surtout pour la partie N terminale de la protéine qui n'est pas conservée, mais l'est moins pour la partie C terminale (domaines CCD et LZD) qui elle est plus conservée au sein de cette famille.

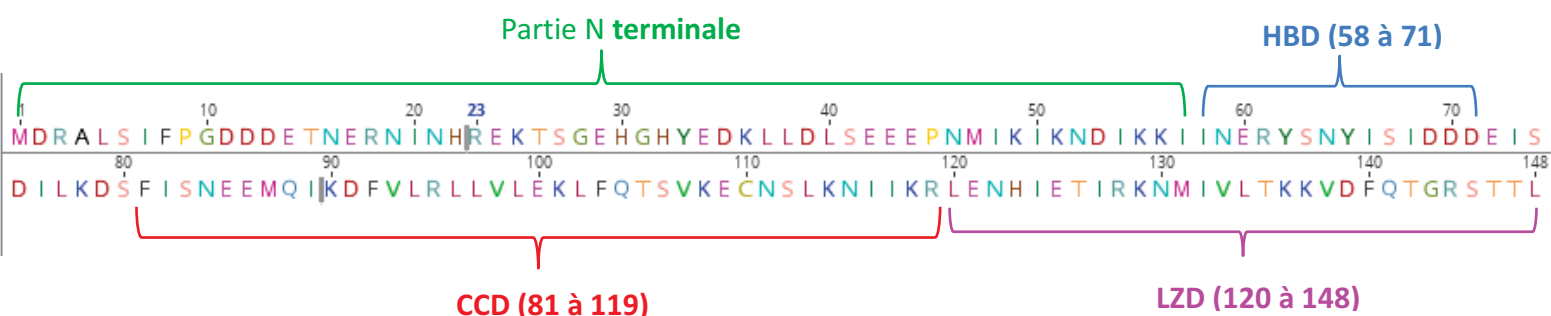


Figure 48. Délimitation des domaines de la protéine A27 du virus LSD.

2.2. Prédiction de la structure secondaire et des régions désordonnées

L'étude de la structure secondaire de la protéine A27 du virus LSD est réalisée en comparaison avec celle du virus de la vaccine par le logiciel Phyre2.

2.2.1. Protéine A27 du virus LSD

L'analyse a concerné la totalité de la séquence protéique, le résultat est représenté par la figure 49 ci-dessous.

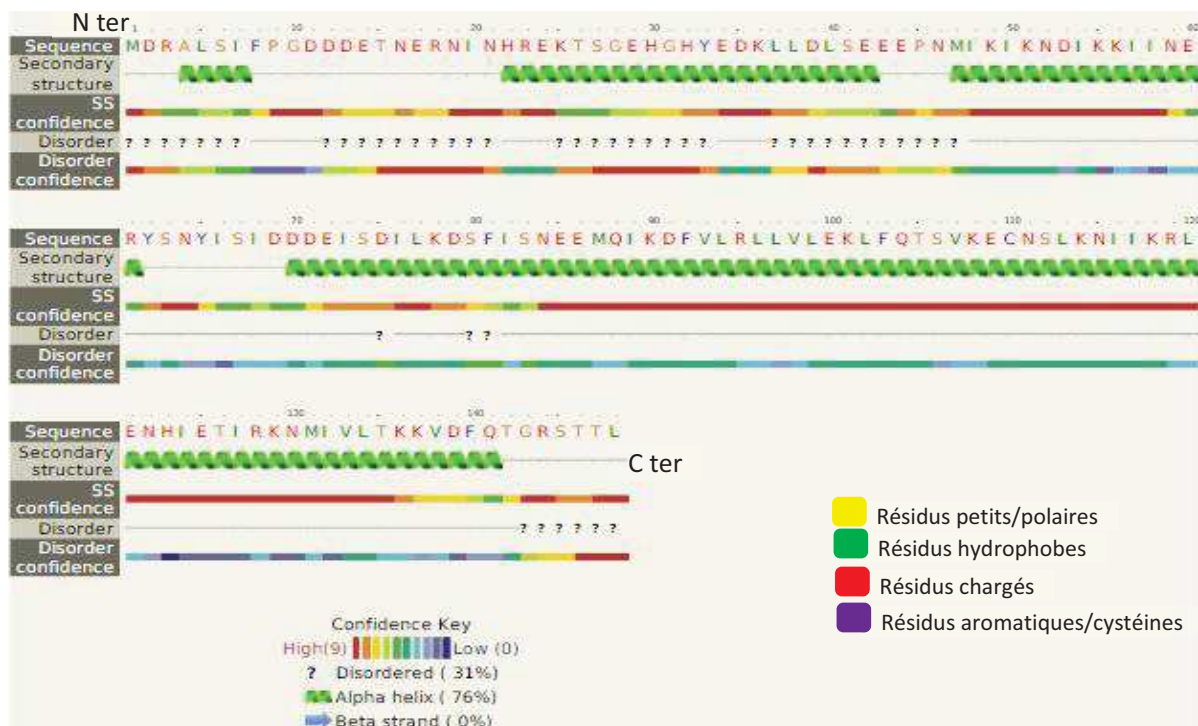


Figure 49. Prédiction de la structure secondaire et des régions désordonnées de la protéine A27 du virus LSD selon le logiciel Phyre 2.

La prédiction de la structure secondaire met en évidence 76% d'hélices alpha qui sont concentrées à la partie C terminale de la protéine. En effet le domaine CCD ainsi que la majorité de l'extrémité de la partie C terminale (domaine supposé LZD) sont constitués d'hélices alpha. Ceci est d'autant plus vrai, que la présence d'hélices au niveau de la partie C terminale a été prédite avec un taux de confiance important atteignant un score de 9.

A côté des hélices alpha, la protéine est composée de 31% de régions désordonnées. Ces régions sont majoritairement situées à la partie N terminale de la protéine et sont prédits avec un indice

de confiance moyen (6 à 5). Aucune structure composée de feuillet β a été prédite pour la protéine A27 du virus LSD.

2.2.2. Protéine A27 du virus de la vaccine

La structure secondaire de la protéine A27 du virus de la vaccine a déjà été élucidée par plusieurs travaux (Lin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2013). L'analyse effectuée sur la A27 du virus de la vaccine est réalisée dans un objectif de valider la démarche entreprise avec la protéine A27 du virus LSD.

Le résultat de l'analyse est représenté par la figure 50, qui démontre que la protéine est constituée à 76% d'hélices alpha que nous retrouvons majoritairement à la partie C terminale de la protéine couvrant la totalité des domaines CCD et LZD. Ceci a été prédit avec un haut degré de confiance (score 9). Concernant les régions désordonnées, elles ont été prédites à un pourcentage de 37% et se retrouvent majoritairement à la partie N terminale de la protéine, ces régions sont prédites avec indice de confiance d'environ 8.

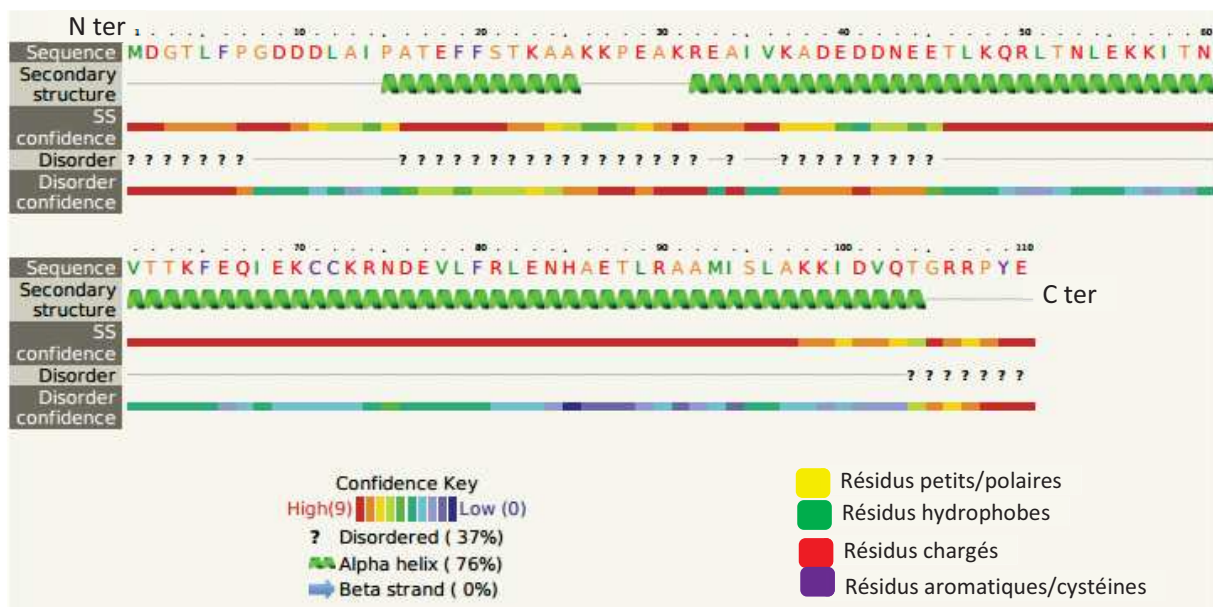


Figure 50. Prédiction de la structure secondaire et des régions désordonnées de la protéine A27 du virus de la vaccine selon le logiciel Phyre 2.

Ce résultat de prédiction de la structure secondaire de la protéine A27 de la vaccine d'une part concorde avec les travaux réalisés (Lin *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2013), permettant ainsi de valider l'outil de prédiction Phyre2 utilisé. D'autre part, l'analyse de la structure des deux protéines A27 du LSD et de la vaccine suggère une certaine conservation de la structure secondaire des deux protéines.

2.3. Prédiction de la structure tertiaire

L'étude de la structure tertiaire de la protéine A27 du virus LSD est réalisée en comparaison avec celle du virus de la vaccine par le logiciel Phyre2.

2.3.1. Protéine A27 du virus LSD

L'analyse a débuté par des alignements permettant d'identifier des « templates » ou modèles dont la structure tridimensionnelle est connue. A partir de la séquence protéique introduite, le logiciel utilise une banque de données où plusieurs structures déjà connues sont disponibles pour trouver un modèle se rapprochant le plus possible de la protéine à analyser.

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
1	c3vopC	 Alignment		97.7	32	PDB header: viral protein Chain: C; PDB Molecule: protein a27; PDBTitle: structure of vaccinia virus a27
2	d2c0sa1	 Alignment		17.7	32	Fold: ROP-like Superfamily: BAS1536-like Family: BAS1536-like
3	c3j89A	 Alignment		14.1	50	PDB header: synthetic peptide Chain: A; PDB Molecule: synthetic peptide; PDBTitle: structural plasticity of helical nanotubes based on coiled-coil2 assemblies
4	c3j89L	 Alignment		14.1	50	PDB header: synthetic peptide Chain: L; PDB Molecule: synthetic peptide; PDBTitle: structural plasticity of helical nanotubes based on coiled-coil2 assemblies
5	c3j89J	 Alignment		14.1	50	PDB header: synthetic peptide Chain: J; PDB Molecule: synthetic peptide; PDBTitle: structural plasticity of helical nanotubes based on coiled-coil2 assemblies

Figure 51. Résultat de l'analyse des domaines par le logiciel Phyre 2

Comme le montre la figure 51, un seul appariement avec un seuil de confiance atteignant les 97,7% (c3vopc) a été repéré à la partie centrale de la protéine et le modèle qui a été utilisé est la protéine A27 du virus de la vaccine. Les autres appariements ont développé un indice de confiance faible (< 18%). Ces appariements sont essentiellement localisés à la partie centrale de la protéine mais ne seront pas conservés pour une modélisation ultérieure de la protéine d'intérêt. C'est donc l'appariement c3vopc qui servira de modèle pour la prédiction ultérieure de la structure tridimensionnelle de la protéine.

La partie qui a pu donc être modélisée dans la séquence de la A27 du virus LSD est colorée en jaune. Pour cette partie C terminale de la protéine, le logiciel Phyre2 a utilisé la protéine A27 du virus de la vaccine comme modèle et plus précisément les résidus 42 à 84 qui ont permis d'obtenir un bon indice de confiance qui a atteint les 97,7% avec un taux de couverture de 46% de la protéine soit 31 résidus (Figure 52).

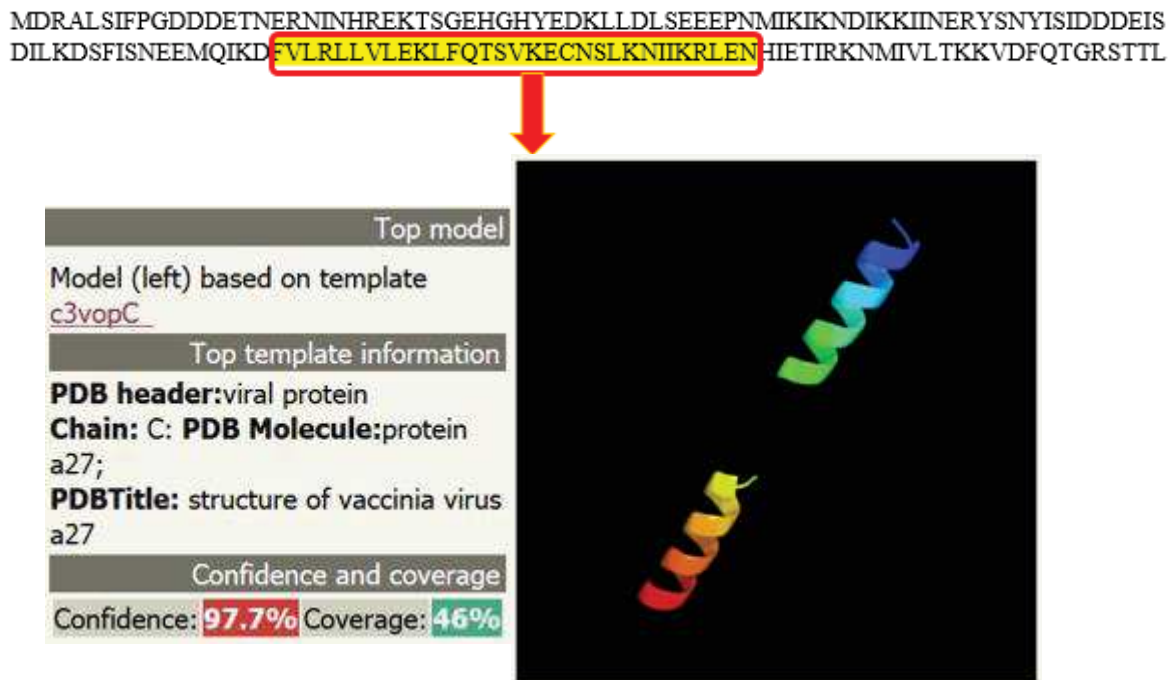


Figure 52. Prédiction de la structure tridimensionnelle de la partie C terminale de la protéine A27 du virus LSD

Le résultat de la modélisation tridimensionnelle de cette partie de la protéine correspondant au domaine CCD démontre que la protéine A27 du virus LSD sous sa forme monomérique est constituée d'une unique hélice alpha.

2.3.2. Protéine A27 du virus de la vaccine

La structure tertiaire de la protéine A27 du virus de la vaccine, particulièrement le domaine CCD, ayant été déjà été prédite par des études expérimentales d'autres travaux, nous avons voulu valider encore une fois le logiciel Phyre 2 en analysant la structure tridimensionnelle de la partie C terminale de la protéine A27 du virus de la vaccine incluant les domaines CCD et LZD. Cette structure a pu être établie avec un haut degré de confiance soit 99,3% mais n'a pu couvrir que 62% de la partie C terminale de la protéine soit 42 résidus (Figure 53). La

modélisation en 3D de cette partie de la protéine a révélé comme pour la protéine A27 du virus LSD que la forme monomérique est formée d'une unique hélice alpha. Ceci est concordance avec les travaux de Chang qui a cristallisé une forme tronquée de la protéine A27 du virus de la vaccine (AA 21-84) pour étudier sa structure tridimensionnelle et a démontré que la forme monomérique de la protéine se plie en une seule hélice alpha (Chang *et al.*, 2013) validant ainsi l'outil de prédiction utilisé.

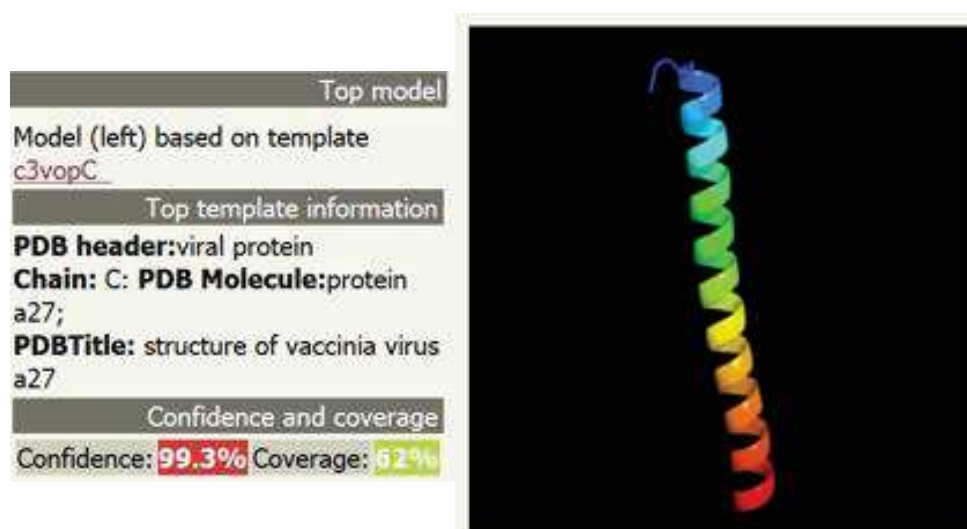


Figure 53. Prédiction de la structure tertiaire de la protéine A27 du virus de la vaccine par le logiciel Phyre 2.

2.4. Surface d'accessibilité des résidus

Pour l'étude de la surface d'exposition et d'accessibilité des résidus de la protéine A27, le logiciel NetSurfP est utilisé. Le résultat fourni par ce serveur est la prédiction de la surface des résidus selon deux classes : enfouis ou exposés. Le résultat consiste en l'obtention de deux valeurs prédictives ASA (surface accessible) et ARA (surface relative), à cette prédiction est associée un Z score permettant de déterminer la fiabilité de la prédiction.

2.4.1. Protéine A27 du virus LSD

L'analyse est d'abord réalisée sur la protéine A27 du virus LSD. Le résultat est représenté par le tableau où les champs jaunes représentent les résidus exposés (Tableau 16).

Le tableau nous a permis de faire ressortir les résidus exposés et enfouis qui sont représentés par la figure 54 dans la séquence protéique de A27.

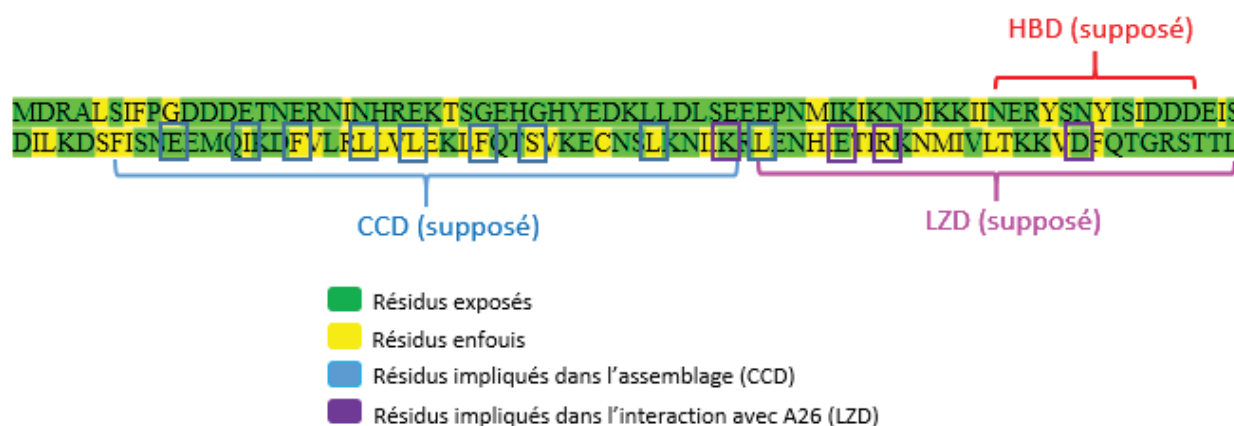


Figure 54. Nature de l'exposition des résidus de la séquence protéique de la protéine A27 du virus LSD par le serveur NetSurf

Nous pouvons noter qu'au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD, la fréquence des résidus exposés (67%) est supérieure à celle des résidus enfouis (33%). Nous nous sommes intéressés à l'exposition des résidus importants dans la fonction de la protéine cités plus haut, pour cela nous nous sommes basés sur l'alignement de Chang.

La divergence de la partie N terminale de la protéine entre les différents virus ne nous a pas permis de vérifier l'homologie de certains résidus du domaine HBD ayant une fonction importante.

Cette divergence étant beaucoup moins importante pour la partie C terminale de la protéine, nous nous sommes permis d'établir une homologie entre les résidus ayant une fonction importante au niveau des deux domaines CCD et LZD.

Concernant le domaine CCD de la protéine de la vaccine, 9 résidus hydrophobes sont responsables de l'assemblage de la protéine. Chez le virus LSD et selon l'alignement de Chang, ces résidus se trouvent aux positions E85, I89, F92, L96, L99, F103, S106, L113 et L120. Huit résidus sur neuf ne sont pas exposés. Chez la A27 de la vaccine, deux cystéines contiguës sont responsables de l'interaction avec la protéine A26, comme nous l'avons cité plus haut, une seule cystéine est conservée (position 110) ; l'analyse démontre que ce résidu est enfoui.

Enfin, au niveau du domaine Leucine Zipper de la protéine A27 du virus de la vaccine, quatre résidus sont responsables de son interaction avec la protéine A17, leurs homologues chez les virus LSDV sont les résidus aux positions respectives K118, E125, R128 et R139. Seul le résidu à la position R128 est enfoui alors que les trois autres sont exposés.

Tableau 16. Résultat de la prédiction de la relative surface d'accessibilité des acides aminés de la protéine A27 du virus LSD à partir de NetSurfP (C1. Nature du résidu, (E : exposé, B :enfoui), C2. Résidu, C3. Surface relative, C4. Surface accessible et C5. Zscore)

C1	C2	C3	RSA	ASA	Z score	C1	C2	C3	RSA	ASA	Z	C1	C2	C3	RSA	ASA	Z score	C1	C2	C3	RSA	ASA	Z score
E	M	1	0.754	150.935	-0.730	E	L	38	0.378	69.212	-0.234	E	D	75	0.446	64.312	0.513	E	S	112	0.350	41.067	0.806
E	D	2	0.632	91.057	-1.441	E	D	39	0.590	85.048	-0.318	B	I	76	0.093	17.168	0.495	B	L	113	0.123	22.595	-0.115
E	R	3	0.549	125.652	0.003	E	L	40	0.305	55.827	-0.060	B	L	77	0.099	18.109	0.020	E	K	114	0.574	118.113	0.099
E	A	4	0.308	33.898	-0.806	E	S	41	0.589	69.019	-0.597	E	K	78	0.511	105.092	0.631	E	N	115	0.569	83.272	0.790
B	L	5	0.238	43.578	-0.222	E	E	42	0.662	115.599	-0.012	E	D	79	0.517	74.514	-0.641	B	I	116	0.062	11.489	-0.017
E	S	6	0.312	36.590	-0.700	E	E	43	0.520	90.827	-0.595	B	S	80	0.317	37.211	-1.598	B	I	117	0.068	12.580	-0.401
B	I	7	0.166	30.691	-0.252	E	E	44	0.505	88.276	-0.522	B	F	81	0.215	43.130	-0.831	E	K	118	0.477	98.119	1.504
B	F	8	0.157	31.430	0.736	E	P	45	0.428	60.719	-1.321	B	I	82	0.153	28.324	-0.141	E	R	119	0.290	66.295	1.216
E	P	9	0.309	43.890	-0.872	E	N	46	0.496	72.644	-0.241	E	S	83	0.376	44.055	-0.122	B	L	120	0.037	6.830	0.051
B	G	10	0.322	25.357	-1.452	B	M	47	0.098	19.550	-0.698	E	N	84	0.559	81.838	0.135	E	E	121	0.354	61.879	0.409
E	D	11	0.508	73.217	-0.507	E	I	48	0.361	66.822	0.745	E	E	85	0.456	79.646	-0.868	E	N	122	0.502	73.478	0.773
E	D	12	0.636	91.705	-0.746	E	K	49	0.489	100.587	0.840	E	E	86	0.352	61.582	-0.120	B	H	123	0.111	20.282	0.500
E	D	13	0.606	87.368	-0.992	B	I	50	0.065	11.932	0.112	E	M	87	0.383	76.678	-0.151	B	I	124	0.066	12.154	-0.399
E	E	14	0.550	96.137	-0.208	E	K	51	0.275	56.526	0.547	E	Q	88	0.377	67.332	1.128	E	E	125	0.477	83.297	0.720
E	T	15	0.640	88.823	-0.098	E	N	52	0.504	73.727	0.064	B	I	89	0.047	8.677	0.090	B	T	126	0.229	31.707	0.784
E	N	16	0.422	61.752	-0.410	E	D	53	0.326	46.933	0.340	E	K	90	0.357	73.517	1.267	B	I	127	0.052	9.675	0.564
E	E	17	0.662	115.686	-1.273	B	I	54	0.027	5.088	-0.008	E	D	91	0.468	67.453	1.156	B	R	128	0.213	48.823	0.585
E	R	18	0.513	117.523	0.340	E	K	55	0.339	69.671	0.952	B	F	92	0.053	10.717	0.786	E	K	129	0.428	88.040	0.882
E	N	19	0.565	82.745	0.301	E	K	56	0.501	103.117	1.601	B	V	93	0.108	16.569	-0.186	B	N	130	0.178	26.074	-0.715
B	I	20	0.150	27.676	-0.018	B	I	57	0.144	26.585	0.655	E	L	94	0.267	48.814	0.229	B	M	131	0.060	11.946	0.673
E	N	21	0.502	73.434	-0.135	B	I	58	0.051	9.361	0.432	B	R	95	0.191	43.831	0.963	B	I	132	0.130	24.124	0.160
E	H	22	0.414	75.307	-0.525	E	N	59	0.497	72.688	0.491	B	L	96	0.040	7.287	0.317	E	V	133	0.305	46.878	0.399
E	R	23	0.592	135.476	-0.189	E	E	60	0.621	108.436	-0.345	B	L	97	0.145	26.531	1.024	B	L	134	0.080	14.575	0.070
E	E	24	0.415	72.448	-0.841	E	R	61	0.480	109.943	0.229	B	V	98	0.205	31.508	0.956	B	T	135	0.132	18.295	-1.031
E	K	25	0.384	78.968	0.136	B	Y	62	0.150	32.119	0.541	B	L	99	0.046	8.441	0.852	E	K	136	0.466	95.836	0.336
B	T	26	0.205	28.364	-0.405	E	S	63	0.631	73.977	-0.549	B	E	100	0.233	40.688	0.187	E	K	137	0.456	93.840	0.425
E	S	27	0.443	51.955	-0.491	E	N	64	0.557	81.530	-0.675	E	K	101	0.478	98.407	0.670	B	V	138	0.091	13.987	0.656
E	G	28	0.511	40.231	-1.032	B	Y	65	0.177	37.782	-0.333	B	L	102	0.204	37.389	0.591	E	D	139	0.448	64.499	0.237
E	E	29	0.610	106.567	-0.822	E	I	66	0.340	62.882	0.002	B	F	103	0.061	12.223	0.822	B	F	140	0.186	37.310	-0.101
E	H	30	0.561	102.064	-0.886	E	S	67	0.485	56.830	-0.132	E	Q	104	0.341	60.885	1.406	E	Q	141	0.434	77.602	-0.351
E	G	31	0.378	29.756	-1.482	B	I	68	0.122	22.552	-0.487	E	T	105	0.331	45.868	0.470	E	T	142	0.382	53.039	-0.202
E	H	32	0.533	97.007	-0.281	E	D	69	0.444	64.024	0.146	B	S	106	0.084	9.892	-0.051	E	G	143	0.317	24.948	-1.558
E	Y	33	0.295	62.956	0.187	E	D	70	0.570	82.137	-0.379	B	V	107	0.104	15.923	-0.225	E	R	144	0.438	100.325	0.010
E	E	34	0.613	107.109	0.464	E	D	71	0.613	88.276	-1.327	E	K	108	0.586	120.602	1.045	E	S	145	0.306	35.828	-1.661
E	D	35	0.565	81.474	-1.219	E	E	72	0.510	89.045	-0.070	E	E	109	0.308	53.720	0.249	E	T	146	0.406	56.298	-0.569
E	K	36	0.488	100.382	0.315	B	I	73	0.095	17.519	-0.808	B	C	110	0.094	13.184	0.017	E	T	147	0.572	79.378	-1.202
E	L	37	0.343	62.877	-0.591	E	S	74	0.270	31.703	0.018	E	N	111	0.510	74.723	0.275	E	L	148	0.580	106.161	-1.219

2.4.2. Protéine A27 du virus de la vaccine

Le même logiciel NetSurfP a été utilisé pour l'étude de la surface d'exposition et d'accessibilité des résidus de la protéine A27 du virus de la vaccine. Le résultat est représenté par le tableau 17.

Au sein de la séquence de la protéine A27 de la vaccine, les résidus exposés et enfouis sont représentés dans la figure 55.

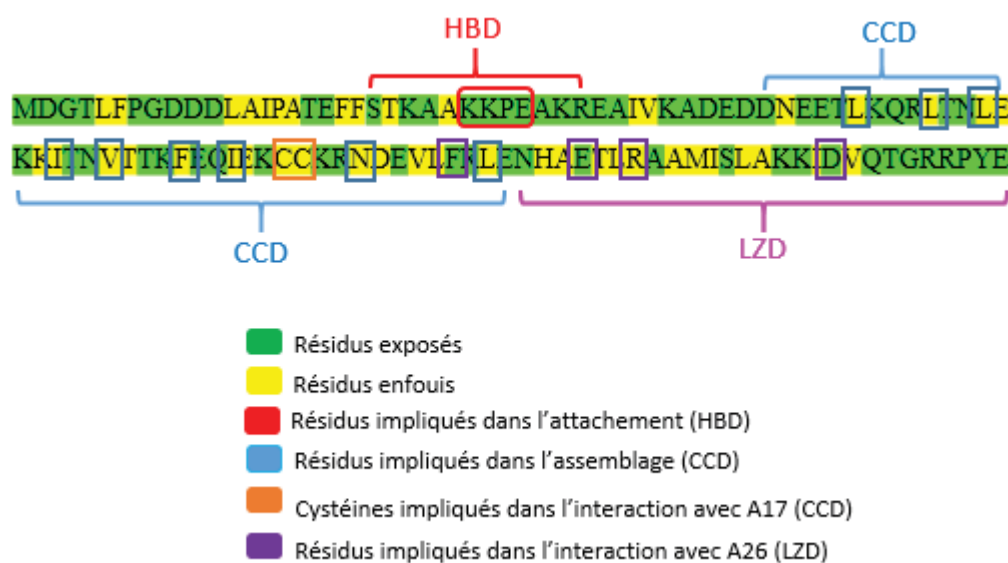


Figure 55. Nature de l'exposition des résidus de la séquence protéique de la protéine A27 du virus de la vaccine par le serveur NetSurf

Tableau 17. Résultat de la prédiction de la relative surface d'accessibilité des acides aminés de la protéine A27 du virus de la vaccine à partir de NetSurfP (C1. Nature du résidu, (E : exposé, B : enfoui), C2. Résidu, C3. Surface relative, C4. Surface accessible et C5. Z score).

C1	C2	C3	RSA	ASA	Z score	C1	C2	C3	RSA	ASA	Z score	C1	C2	C3	RSA	ASA	Z score
E	M	1	0.730	146.133	-1.037	E	A	38	0.354	38.956	0.485	E	R	74	0.409	93.684	0.954
E	D	2	0.640	92.282	-1.765	E	D	39	0.363	52.323	-0.015	B	N	75	0.099	14.464	0.157
E	G	3	0.368	28.977	-2.218	E	E	40	0.606	105.956	0.293	E	D	76	0.563	81.071	-0.366
E	T	4	0.534	74.094	0.457	E	D	41	0.582	83.837	-1.292	E	E	77	0.619	108.069	0.676
B	L	5	0.214	39.220	-0.912	E	D	42	0.619	89.198	0.400	B	V	78	0.106	16.354	0.188
B	F	6	0.220	44.054	0.344	B	N	43	0.208	30.393	-0.962	B	L	79	0.055	10.052	0.365
E	P	7	0.587	83.366	-0.281	E	E	44	0.502	87.734	0.133	E	F	80	0.469	94.068	1.544
E	G	8	0.349	27.498	-1.851	E	E	45	0.520	90.914	-0.955	E	R	81	0.271	62.059	1.179
E	D	9	0.508	73.160	-0.798	E	T	46	0.509	70.640	1.021	B	L	82	0.039	7.068	-0.050
E	D	10	0.524	75.480	-1.590	B	L	47	0.107	19.628	-0.170	E	E	83	0.361	63.084	0.466
E	D	11	0.471	67.813	-0.913	E	K	48	0.406	83.514	0.955	E	N	84	0.514	75.176	1.151
B	L	12	0.272	49.767	-0.748	E	Q	49	0.456	81.513	-0.233	B	H	85	0.105	19.118	0.492
B	A	13	0.282	31.087	-0.809	E	R	50	0.368	84.226	1.309	B	A	86	0.062	6.876	-0.170
B	I	14	0.141	26.103	0.332	B	L	51	0.036	6.592	-0.274	E	E	87	0.468	81.795	0.854
B	P	15	0.195	27.656	0.001	E	T	52	0.408	56.548	1.582	B	T	88	0.185	25.590	0.861
B	A	16	0.172	18.943	-1.066	E	N	53	0.496	72.673	1.159	B	L	89	0.048	8.752	0.662
E	T	17	0.419	58.088	-0.521	B	L	54	0.079	14.538	0.788	B	R	90	0.183	41.861	0.576
E	E	18	0.404	70.509	0.032	B	E	55	0.127	22.100	-0.479	E	A	91	0.425	46.802	1.234
B	F	19	0.185	37.130	-1.023	E	K	56	0.387	79.606	0.825	B	A	92	0.130	14.315	-0.432
B	F	20	0.270	54.149	-0.544	B	K	57	0.227	46.632	0.827	B	M	93	0.054	10.865	0.630
E	S	21	0.411	48.204	-0.916	B	I	58	0.037	6.753	0.062	B	I	94	0.125	23.033	-0.216
B	T	22	0.263	36.534	-0.142	E	T	59	0.222	30.819	1.154	E	S	95	0.393	46.001	0.801
E	K	23	0.395	81.354	0.620	E	N	60	0.283	41.475	1.287	B	L	96	0.069	12.671	-0.151
E	A	24	0.387	42.625	-1.152	B	V	61	0.039	6.010	0.436	B	A	97	0.140	15.450	-0.598
B	A	25	0.262	28.916	-1.020	B	T	62	0.183	25.382	0.170	E	K	98	0.448	92.215	0.186
E	K	26	0.593	121.960	-0.694	E	T	63	0.583	80.890	1.029	E	K	99	0.394	80.984	0.041
E	K	27	0.406	83.473	-0.000	E	K	64	0.257	52.947	0.769	B	I	100	0.068	12.506	0.543
E	P	28	0.585	82.941	-0.592	B	F	65	0.068	13.607	0.732	E	D	101	0.348	50.176	-0.096
E	E	29	0.569	99.387	0.123	E	E	66	0.485	84.817	1.722	B	V	102	0.205	31.524	-0.205
E	A	30	0.390	42.989	-0.967	E	Q	67	0.365	65.260	1.513	E	Q	103	0.375	66.975	-0.450
E	K	31	0.508	104.496	0.424	B	I	68	0.037	6.771	-0.276	E	T	104	0.336	46.659	-0.475
E	R	32	0.461	105.523	-0.261	B	E	69	0.169	29.472	-0.030	E	G	105	0.424	33.345	-1.805
E	E	33	0.653	114.114	-0.208	E	K	70	0.604	124.305	1.255	E	R	106	0.364	83.356	0.067
E	A	34	0.425	46.791	0.043	B	C	71	0.143	20.077	0.461	E	R	107	0.393	89.882	-0.149
B	I	35	0.198	36.630	-0.626	B	C	72	0.073	10.319	-0.402	E	P	108	0.468	66.438	-0.229
B	V	36	0.235	36.043	0.224	E	K	73	0.559	115.027	0.880	E	Y	109	0.369	78.898	-0.988
E	K	37	0.607	124.942	0.976							E	E	110	0.883	154.260	0.577

Suivie à cette analyse, nous pouvons noter que les résidus exposés représentent 60% de la totalité des acides aminés de la protéine, les épitopes enfouis ne représentent que 40%. Nous avons voulu vérifier la nature d'exposition des résidus ayant un rôle important dans la fonction de la protéine.

Au niveau du domaine HBD, les résidus KKPE (26 à 29) ont été identifiés comme étant responsable de l'interaction et l'attachement de la protéine A27 du virus de la vaccine à l'héparan sulfate de la cellule hôte participant à la pénétration du virus. L'analyse par le serveur Netsurf démontre avec un faible Z score que ces résidus sont exposés signifiant que la probabilité que ces résidus soit réellement exposés est faible.

Concernant le domaine CCD, neuf résidus hydrophobes ont été identifiés comme contribuant à l'assemblage de la protéine (Leu47, Leu51, Leu54, Ile58, Val61 et Phe65 à l'interface NTR et les résidus Ile86, Asn75 et Leu82 à l'interface CTR) (Chang *et al.*, 2013). L'analyse de l'exposition des résidus par Netsurf démontre que ces neuf résidus sont enfouis (Buried) avec une prédiction faible pour ceux en position 47, 51, 68 et 82. Les deux cystéines aux positions 71 et 72 responsables de la formation de ponts intermoléculaires avec la protéine A26 sont enfouies.

Enfin, au niveau du domaine Leucine Zipper, les résidus F80, E87, R90 et R101 sont responsables de la liaison de la protéine A27 avec la protéine A17. Seul le résidu R90 est enfoui alors que les trois autres sont exposés. Le score de prédiction des trois résidus F80, E87 et R90 est important (>1) signifiant que ce résultat est fiable.

Conclusion :

A l'issue de ce premier chapitre de la partie expérimentale, l'analyse structurale des quatre protéines d'intérêt qui a été surtout approfondie pour la protéine A27 chez le virus LSD, nous a permis de délimiter les différents domaines protéiques à partir d'études *in silico* et des alignements réalisés. Ces analyses nous ont permis de noter différents degrés de conservation chez ces protéines. La protéine L1 est la plus conservée parmi les différents membres des poxvirus, suivie des protéines A33, A27 puis B5. En outre, la délimitation des différents domaines de ces protéines nous a conduit à choisir les régions d'intérêt tout en éliminant les domaines hydrophobes pour les constructions ultérieures en vue de produire les quatre protéines dans le système baculovirus (Partie III, Chapitre 3).

Chapitre 2 : Expression des protéines en système eucaryote

L'analyse *in silico* des 4 protéines L1, A27, A33 et B5 abordée dans le chapitre 1 a permis d'aboutir à leur caractérisation structurale et à la vérification de leur degré de conservation parmi plusieurs virus appartenant à la famille des *Poxviridae*. Néanmoins cette caractérisation structurale n'a été approfondie que pour la protéine A27. Ce deuxième chapitre consacré à l'expression des protéines d'intérêt en système eucaryote a nécessité la production par PCR de leurs quatre gènes respectifs suivi de leur clonage dans un vecteur d'expression plasmidique pCI-neo. Ceci est réalisé à l'aide d'un clonage à bouts francs par l'enzyme SmaI. Une fois les différents clones obtenus, le pouvoir antigénique des quatre protéines exprimées est testé par immunofluorescence indirecte et Western Blot en présence de différents sérums provenant d'animaux éprouvés par des Capripoxvirus. Egalement, l'expression des protéines est vérifiée par la mise en évidence de leurs transcrits par RT-PCR.

I. Matériel et méthodes

1. Clonage des gènes sous pCI-neo

1.1. Plasmides employés

Le vecteur plasmidique employé pour l'expression eucaryote de chacune des 4 protéines est le vecteur pCI-neo (Promega, USA), vecteur qui possède le promoteur précoce/tardif du cytomégalovirus humain (CMV) nécessaire à l'expression en cellules de mammifères des inserts clonés, ainsi que le promoteur précoce SV40 (Simian Virus). Ce vecteur contient également un site de clonage multiple (MCS, Multiple cloning site) comportant les sites de différentes enzymes de restriction permettant l'insertion de gènes étrangers dans ce vecteur. En effet, de part et d'autre du MCS, se trouvent les promoteurs T3 et T7 qui permettent la transcription du plasmide par l'ARN polymérase à partir des brins sens et anti sens des inserts d'ADN clonés. En aval du MCS, se trouve le signal de polyadénylation tardif SV40 qui a pour rôle l'amélioration de la stabilité des ARN messagers en ajoutant à la partie 3' de l'ARN transcrit environ 250 résidus d'adénosine. Le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) permet de sélectionner les clones ayant intégré les inserts d'intérêt (Figure 56).

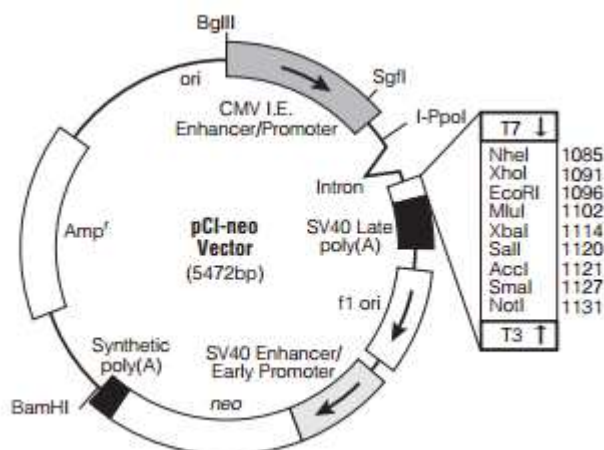


Figure 56. Carte de restriction enzymatique du vecteur d'expression pCI-neo (Promega, USA) ayant permis l'expression des 4 protéines L1, A27, A33 et B5.

1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont les bactéries *Escherichia coli* chimio-compétentes BL21, les bactéries E Coli Top10 (One Shot TOP10 Chemically competent E.coli, Invitrogen), les XL-10 (ultracompetent XL-10 gold, Agilent technologies) et les E coli DH5α dont la compétence chimique a été préparée comme suit.

Une culture de bactéries DH5α non compétentes a été d'abord réalisée dans 3ml de milieu LB sans ampicilline à 37°C pendant 18 à 24 heures à 220rpm. Le lendemain, 1ml de cette culture a été mélangé dans 99 ml de milieu LB pendant environ 2h à 37°C à 220 rpm jusqu'à obtenir une densité optique au spectrophotomètre comprise entre 0,4 et 0,5, indiquant que les bactéries sont en croissance exponentielle. A ce stade, la culture est centrifugée (2000rpm 20 minutes à +4°C), 16,5 ml de RF1 (composition en annexe 3) sont ajoutés au culot, le mélange est incubé dans la glace 15 minutes puis centrifugé, ensuite 2,5 ml de RF2 (composition en annexe 3) sont ajoutés au culot et incubés dans la glace pendant 15 minutes. Enfin le mélange est réparti dans des Cryo tubes de 200 µl qui vont être congelées à -80°C.

Les bactéries sont cultivées en milieu LB (Luria-Bertani) sélectif avec ampicilline (Sigma, USA) à une concentration de 100µg/ml sous agitation (220 rpm) à 37°C (Annexe 1).

1.3. Amplification et digestion du plasmide pCIneo

La mise en culture du plasmide pCI-neo est effectuée à partir de billes conservées à -80°C (microbilles, cryotubes, Microbank, Prolab Diagnostics)ensemencées sur du milieu LB additionné d'ampicilline à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, l'ADN plasmidique des colonies qui ont poussé a été extrait par mini-préparation en utilisant le kit : PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA). Un dosage de l'ADN par lecture d'absorbance à 260 nm a été réalisé par le nanodrop (ND-1000, ThermoScientific, France).

Afin de pouvoir cloner les différents inserts, le vecteur a été digéré « en blunt » au niveau du site MCS par l'enzyme de restriction SmaI (Biolabs, UK) (2 unités, 1 heure à 25°C, tampon 4). L'inactivation enzymatique de SmaI a été réalisée par une incubation de 20 minutes à 65°C. Le vecteur linéarisé a pu ensuite être déphosphorylé avec une unité de CIP (Calf intestine phosphatase) (Biolabs, UK) ou Antarctic Phosphatase (NEB) (Biolabs, UK) pendant 1 heure à 37°C.

La bande d'intérêt représentant l'ADN plasmidique digéré et linéarisé est d'abord extraite et purifiée à partir du gel grâce aux kits GFX PCR DNA et Gel Band Purification (GE Health Care, France) puis dosé sur gel agarose 1% au regard d'un poids moléculaire de 1kb (Biolabs, France).

1.4. Production des insertsL1R, A27L, A33R et B5R

1.4.1. Définition des amorces

Les différentes amorces présentées dans le tableau 18 ont toutes été dessinées à partir des ORF (Open Reading Frame) du génome complet du virus LSDV (NCBI/Genbank, NI-2490 Accession number AF325528).

Tableau 18. Liste des amorces utilisées pour le clonage des gènes L1R, A27L, A33R et B5R dans le vecteur d'expression pCI-neo et conditions de PCR. Les conditions de cycle PCR sont identiques (1 cycle à 94°C, 5 min puis 30 cycles [94°C, 45 sec, 55°C à 60.4°C, 45 sec, 72°C, 1min30], 1 cycle à 72°C, 5 min) pour chacun des 4 gènes à l'exception du Tm utilisé variant de 55°C et 60.4°C.

Gène amplifié	Nom de l'amorce	Séquence (5'- 3')	Taille amplicon	Tm (PCR)
L1R (LSDV60)	PrFL1R	TGTAGCTATTTAAATGGGAGCAG	755 bp	58.3
	PrRevL1R	CACTTTTATTTTCTATGATTGTTGG		
A27L (LSDV 117)	prFA27	TACTCACTCATAGTGTGTACTTCG	584 bp	60.4°C
	prRevA27	TTTCGCAATCAACTCATTGAGAT		
	FwA27Mut1	AAACGTCAGTAAAAGAATGCAATTCATAAAAAA TATTATTAAGATTAGAAAATCATATAGAAAC		60°C
	RevA27Mut1	GTTTCTATATGATTTTCTAATCTTTTAATAATATTT TTTAGTGAATTGCATTCTTTTACTGACGTTT		
A33R (LSDV122)	PrFA33pCINeo	TATGTTAGTTGATATTCCAAAGAGTGG	680 bp	56°C
	PrRevA33pCINeo	TGCAGAAGCACGTTTAATCTTAT		
B5R (LSDV141)	PrFB5RpCINeo1	CATGAAAAATATACATATGTTATTG	785 bp	55°C
	PrRevB5RpCINeo	TCTTCACCGTTTCCTCTCCA		
Universelles	pCMVsens	TCAATATTGGCCATTAGC		
	oligopCMV F	CTATTGACGTCAATGACGGTAAATG		
	CMV Forward	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG		
	T3Pr	ATTAACCCTCACTAAAGGGA		
pCI-neo	PrF PCIneo-ChimInt	CTCTCCACAGGTGTCCACTC		
	PrRevSeqInspCIneo	TTCACTGCATTCTAGTTGTGGT		

L'identification des ORF codant pour les 4 protéines LSDV60, LSDV117, LSDV122 et LSDV141 respectivement homologues aux protéines L1, A27, A33 et B5 du virus de la vaccine ont été réalisés. Les séquences ont été analysées sous Geneious (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), Primer3, Primer3 plus (Untergasser *et al.*, 2012) et Netprimer (www.premierbiosoft.com/netprime) de façon à définir des amorces sense (Forward) et anti-sense (Reverse) s'hybridant respectivement sur les parties 5' et 3' en prenant en compte la température de fusion, pourcentage en GC, la stabilité en 3', la formation d'homodimères et d'hétérodimères ou de structures secondaires. Cependant la majorité des amorces dessinées aux extrémités 3' et 5' de chaque gène n'ont pas été acceptées par ces différents logiciels vu leur richesse en nucléotides A et T particulièrement pour la protéine B5. Parmi les amorces dessinées toutes rejetées, nous avons donc été obligé d'accepter "les moins mauvaises" localisées en amont et en aval des régions codantes (CDS), soit dans les régions intergéniques soit débordant sur les gènes flanquants (Figure 57).



Figure 57. Représentation schématique de la limite de positionnement des amorces générées pour chacun des 4 gènes (LSDV60/L1R, LSDV117/A27, LSDV122/A33 et LSDV141/B5R).

1.4.2. Production des amplicons

Après plusieurs optimisations, l'amplification des 4 inserts est réalisée avec l'enzyme Cloned *Pfu* DNA Polymerase (Vivantis, Malaysia) vu sa fidélité et son taux faible d'erreur qui sont deux caractéristiques importantes lors d'un clonage. La réaction est réalisée dans un volume final de 50 µl du mélange réactionnel contenant 100 ng d'ADN génomique KS1, une concentration de 20 µM de chacune des deux amorces spécifiques sense et anti-sense, 100 µM de dNTP, Tampon Pfu 10x (50mM Tris-HCl), 5mM MgCl₂ et 2,5 unités Cloned pfu DNA polymerase (Vivantis, Malaysia) selon le programme cité dans le tableau 18 en thermocycleur 2720/2700 (Applied Biosystems, France).

Les amplicons de la taille attendue sont découpés sur le gel, purifiés grâce au kit QIA Quick Gel extraction Kit (Qiagen, France) et quantifiés par dépôt sur un gel d'agarose à 1,5% en comparaison d'un poids moléculaire de 100 bp (Biolabs, Ozyme, France).

1.5. Clonage des inserts produits dans le vecteur pCI-neo

Le clonage des inserts passe par une étape de ligation, une étape de transformation et une dernière étape de criblage des colonies produites.

1.5.1 Ligation

Pour cloner les gènes d'intérêt dans le pCI-neo, la formule suivante a été appliquée :

$$[\text{insert}] = \frac{50\text{ng vecteur} \times \text{taille insert en pb}}{\text{Taille du vecteur en pb} \times \text{rapport de ligation}}$$

L'étape de ligation a été réalisée avec 2 unités de T4DNA ligase (Biolabs, Ozyme, France) en tampon 10X à une température de 16°C sur la nuit avec différents ratios pour chaque gène. Deux stratégies distinctes ont été utilisées vu la difficulté du clonage en bouts francs :

- Stratégie 1 : Pour le clonage des inserts A33R, B5R et A27L : vecteur pCI-neo digéré par SmaI + insert (naturellement non phosphorylé)
- Stratégie 2 : Pour le clonage de l'insert L1R : vecteur pCI-neo digéré et déphosphorylé + insert phosphorylé (utilisation d'amorces phosphorylées pour la production de l'insert L1R).

Le vecteur pCI-neo digéré par SmaI, déphosphorylé et mis en présence de la ligase est utilisé comme contrôle de ligation mettant en évidence l'efficacité de la déphosphorylation par la CIP. La ligation insert/vecteur a été réalisée selon les ratios représentés par le tableau 19.

Tableau 19. Ratios de ligation testés pour chacun des gènes L1R, A27L, A33R et B5R

Gène à cloner	Ratio testés
L1R	3/1
	5/1
	10/1
A27L	10/1
A33R	6/1
	10/1
B5R	8/1
	10/1

1.5.2 Transformation des produits de ligation

Les souches *Escherichia coli* chimio-compétentes de type BL21 (pour les inserts A33 et B5), Top10 (pour l'insert L1R) ou DH5α (pour l'insert A27) rendues compétentes selon le protocole décrit précédemment ont été utilisées. Le protocole de transformation par choc thermique a été utilisé comme suit. Un volume de 10 µl du produit de ligation correspondant à chaque ratio a été ajouté à un volume de 100 µl de bactéries compétentes, le mélange est incubé 30 minutes dans la glace, puis 2 minutes à 42°C suivi d'une incubation de 2 minutes dans la glace. Ce choc thermique induit la fragilisation de la membrane cytoplasmique des bactéries permettant ainsi l'introduction du vecteur. Un volume de 250 µl de milieu de culture SOC (Super Optimal broth avec glucose) (Thermofisher, France) préchauffé à 37°C est ajouté puis incubé pendant 1 heure à 37°C à 220 rpm (rotations par minute). Un volume de 100 µl de cette culture bactérienne est alorsensemencé sur des boîtes de pétri LB-Agar renfermant l'antibiotique de sélection contenu dans le clone bactérien en question, qui est dans notre cas l'ampicilline à une concentration de 100 µg/ml. Les boîtes seront ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures et examinées le lendemain pour vérifier la présence de colonies.

Des contrôles de transformation ont été ajoutés au cours de cette étape, il s'agit d'une part du vecteur pCI-neo non digéré qui est un contrôle permettant de tester la compétence des bactéries, et d'autre part le vecteur digéré par SmaI et déphosphorylé comme témoin négatif et enfin le pCI-neo digéré par SmaI testant l'efficacité de digestion.

1.5.3 Criblage des colonies

Le criblage des colonies se fait en deux étapes de PCR successives, une première PCR « absence/présence insert » réalisée sur des colonies bactériennes poolées ou individuelles et une seconde PCR « orientation insert » sur les colonies individuelles des pools trouvés positifs en première PCR afin de respectivement sélectionner les colonies positives en insert ainsi que l'orientation de ce dernier.

Ces deux séries de PCR ont été réalisés directement sur la colonie « Colony-PCR » sans une extraction d'ADN au préalable. Les colonies sont prélevées au « toothpick » et étalées sur une boîte quadrillée (pour constituer des stocks) puis trempées dans 20 µl d'eau. Le tube est par la suite placé à 95°C pendant 10 minutes permettant l'éclatement des bactéries et la dénaturation de l'ADN, le tube est placé 5 minutes dans de la glace, enfin 5 µl sont utilisés pour réaliser la première PCR selon le protocole ci-dessous.

➤ PCR absence/présence insert

La première étape du criblage repose sur une réaction de PCR spécifique du gène d'intérêt inséré réalisée sur des pools de 5 colonies pour les clones pCIneo/A33R et pCIneo/B5R ou sur des colonies individuelles pour les gènes pCIneo/L1R et pCIneo/A27L en utilisant les couples d'amorces citées dans le tableau 20. Les contrôles positifs des réactions PCR ont été réalisés avec la souche vaccinale KS1 selon le même programme suivant.

Tableau 20. Liste des amorces utilisées en PCR pour le criblage de la présence de l'insert au sein des colonies transformées avec les inserts L1R, A27L, A33R et B5R.

Insert	PCR présence/absence insert	Tm	Taille amplicon
L1R	OligopCMVFw/T3Pr	58.3°C	1.5 kb
A27L	PrFA27/PrRevA27	56°C	584pb
A33R	PrFA33pCIneo/PrRevA33pCIneo	56°C	680pb
B5R	PrFB5pCIneo1/PrRevB5pCIneo	56°C	785pb

*Les conditions de cycle sont identiques (1 cycle @ 94°C, 5 min puis 30 cycles [94°C, 45 sec, 56°C à 58.3°C, 45 sec, 72°C, 1min30], 1 cycle @ 72°C, 5 min) pour chacun des 4 gènes à l'exception du Tm utilisé.

➤ PCR orientation insert

Pour vérifier le sens de l'insert dans le vecteur, une seconde réaction de PCR sur les clones trouvés positifs en première série est réalisée à l'aide d'une d'amorce sens localisée en amont du gène inséré dans le promoteur CMV (CMV Forward ou OligopCMVFw) et une amorce anti-sens localisée à l'intérieur du gène d'intérêt. Les amorces utilisées ainsi que les conditions PCR sont listés dans le tableau 21.

Tableau 21. Liste des amorces utilisées en PCR pour la vérification de l'orientation de l'insert au sein des colonies transformées avec les inserts L1R, A27L, A33R et B5R.

Insert	PCR présence/absence insert	Tm	Taille amplicon
L1R	oligopCMVF-PrRevL1	60°C	1453 pb
A27L	CMVFw/PrFA27	60°C	1kb
A33R	CMVFw/PrRevA33pCIneo	59°C	1032pb
B5R	CMVFw/PrRevB5RpCIneo	59°C	1122pb

*Les conditions de cycle sont identiques (1 cycle @ 94°C, 2 min puis 30 cycles [94°C,45 sec, 59°C à 60°C, 45 sec, 72°C, 1min30], 1 cycle @72°C, 7 min) pour chacun des 4 gènes à l'exception du Tm utilisé

Les colonies contenant l'insert dans le sens attendu sont mises en culture dans 3 ml de milieu LB contenant 300 µl d'ampicilline à 100 ug/ml overnight à 37°C. L'ADN plasmidique est extrait à partir de 200 µl de cette suspension bactérienne par le kit GenElute™ plasmid miniprep (Sigma, France) pour les gènes A33R, A27L et B5R ou le kit Miniprep PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kit (Invitrogen, life technologies) pour le gène L1R. L'ADN extrait est ensuite dosé au nanodrop puis envoyé en séquençage.

1.5.4 Séquençage

Le séquençage est réalisé (Beckman Coulter, France) avec les amorces spécifiques de chaque gène à savoir PrFB5RpCIneo/PrRevB5RpCIneo, PrFA33pCIneo/PrRevA33pCIneo, PrFA27/PrRevA27 et PrFL1R/PrRevL1R respectivement pour B5R, A33R, A27L et L1R mais aussi avec les deux amorces PrF PCIneo-ChimInt et PrRevSeqInspCIneo positionnées de part et d'autre du MCS du pCI-neo pour avoir la totalité des gènes insérés. Les séquences nucléotidiques et protéiques des différents clones obtenus ont été alignées avec la séquence du

génom de LSDV (Accession Number AF325528) à l'aide du logiciel Geneious (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012).

1.5.5 Mutagenèse dirigée

En fonction des résultats du séquençage, une mutagenèse dirigée a été prévue. Cette dernière est réalisée par le kit « QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit », Agilent technologies. Le principe de cette mutagenèse se résume en trois étapes successives, la première étant la synthèse de deux brins d'oligonucléotides complémentaires portant la mutation désirée permettant la mise en place d'une amplification par PCR en utilisant comme matrice l'ADN parental, cette première étape est suivie d'une seconde étape de digestion par l'enzyme DpnI dégradant l'ADN parental, enfin une transformation permettant de récupérer l'ADN portant la mutation désirée est réalisée.

La première étape de cette mutagenèse dirigée est la synthèse d'un couple d'amorces complémentaires contenant la mutation désirée flanquée de part et d'autre avec la séquence nucléotidique non modifiée. Les deux séquences oligonucléotidiques ont été dessinées sur le serveur d'Agilent (www.agilent.com/genomics/qcpd), et le résultat a été par la suite confronté avec les préconisations du « primer design guidelines ». Le couple d'amorces a été nommé FwA27Mut1/RevA27Mut1 (Tableau 18). Vu la longueur de 67 nt de chacune des amorces dessinée (risque d'augmentation de la formation de structure secondaire et de dimères affectant la réaction de mutagenèse), une optimisation de la PCR a été prévue. Pour cela, un adjuvant DMSO a été ajouté à une concentration de 5% au volume réactionnel contenant 50 ng de l'ADN du clone 9 pCIneo/A27 muté, 125 ng de chaque amorce, tampon 10X, mixdNTP, 1,5 µl « Quick solution reagent » et enfin 1 µl de « Quick change lightning enzyme ». La PCR obéit au protocole suivant cité au tableau 22.

Tableau 22. Protocole d'amplification par PCR de l'ADN du clone 9 pCIneo/A27 avec le couple d'amorces FwA27Mut1/RevA27Mut1

Cycles	Température	Durée
1	95°C	2 minutes 15 secondes
18	95°C	20 secondes
	60°C	10 secondes
	68°C	3 minutes 30 secondes
1	68°C	5 minutes

Suite à cette PCR, le protocole est appliqué selon les indications fournies par le kit. Le lendemain de l'application du protocole, les colonies ayant poussé sur la gélose vont être sélectionnées et analysées par séquençage par deux couples d'amorces PrFpCIneo-ChimInt/PrRevSeqInspCIneo et PrFA27Interm/PrRevA27Interm en vue d'avoir la totalité de la séquence désirée. Cette analyse se fera en comparaison avec la séquence de l'ADN parental.

2. Expression *in vitro* des constructions plasmidiques en système eucaryote

L'expression *in vitro* en système eucaryote des clones plasmidiques pCI-neo construits est évaluée par différentes techniques, l'immunofluorescence indirecte (IFI), la technique de RT-PCR, et le western blot.

2.1. Vérification de l'expression de L1R, A27L, A33R et B5R sous promoteur CMV par immunofluorescence indirecte (IFI).

L'expression des protéines est évaluée par la transfection des clones plasmidiques contenant chacun des 4 gènes en cellules Vero (cellules épithéliales de rein de singe vert) avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen, France) en respectant un ratio 3/1 (ADN plasmidique transfecté/agent lipofectant). Après 48 heures de transfection, les cellules sont fixées avec de l'acétone 80% (Sigma, France). La révélation est réalisée par des un sérum polyclonalspécifique des capripoxvirus. La lecture des résultats se fait au microscope à fluorescence.

2.1.1. Cellules et plasmides

Les cellules épithéliales de rein de singe vert (cellules Vero) cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ en présence de milieu MEM (Minimum Essential Media, Gibco, France) enrichi à 10% en sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco, France), 1% de L-glutamine et 1% (Pénicilline/Streptomycine) sont utilisées pour l'étape de transfection des quatre clones plasmidiques listés dans le tableau 23.

Tableau 23. Liste des plasmides utilisés pour la transfection en cellules Vero

	Identification du plasmide
Plasmides dont l'expression est à évaluer	pCI-neo/A27 (Clone 9 muté)
	pCI-neo/A33
	pCI-neo/ B5
	pCI-neo/L1
Plasmides utilisés comme témoins	pCI-neo
	pCI-neo/ N-PPR
	pEGFP-C1

Le plasmide pEGFP-C1 (Clontech, Ozyme, France) contenant le gène eGFP (Green Fluorescent Protein) sous promoteur CMV et un gène sélectif codant pour la résistance à la kanamycine est utilisé comme contrôle positif de transfection. L'expression de la protéine fluorescente peut être observée directement par lecture au microscope à fluorescence.

Le plasmide pCI-neo N-PPR (vecteur pCIneo portant le gène codant pour la nucléoprotéine N du virus de la peste des petits ruminants) quant à lui est utilisé pour témoigner de l'opérationnalité de la technique d'immunofluorescence, permettant ainsi de valider l'ensemble des étapes de transfection, de l'expression des clones et du marquage par les anticorps monoclonaux. Notons que la transfection réalisée avec ce plasmide sera révélée avec des anticorps spécifiques anti-PPR.

2.1.2. Révélation/anticorps utilisés

La révélation se fait à l'aide d'un sérum polyclonal provenant d'un ovin hyper-immunisé avec une souche vaccinale de capripoxvirus de 1983, c'est un sérum de référence produit par le CIRAD à la date du 20/01/1983 considéré comme un « sérum hyper-immun (SHI) » utilisé aux dilutions 1/80 et 1/160. Un deuxième sérum a été utilisé pour cette révélation ; c'est un sérum polyclonal de chèvre naïve challengée avec une souche de « Yemen goatpoxvirus » lors d'une expérimentation animale conduite en Ethiopie (Caufour *et al.*, 2014), le sérum a été prélevé à 21 jours post infection et a été identifié comme suit (G1 15 D21 10/5/11) (noté ici sérum positif de chèvres), enfin un sérum provenant d'une chèvre séronégative vis-à-vis des Capripoxvirus (produit le 03/08/09) est utilisé eutant que contrôle négatif (noté ici sérum anti-CaPV négatif).

En ce qui concerne les cellules transfectées avec le plasmide pCIneo-N/PPR témoignant de l'opérationnalité de la technique, la révélation se fera à la fois avec des anticorps monoclonaux produits chez la souris anti-PPR couplés à la FITC (dilution 1/200) mais aussi avec des anticorps polyclonaux de chèvre anti-PPR (dilution 1/20, production avril 1995 CIRAD/ENVT).

Enfin, un anticorps polyclonal anti-goat marqué FITC (fluorescein conjugated anti-goat F0250 Dako France) est utilisé à la dilution 1/40 comme anticorps secondaire permettant la lecture au microscope à fluorescence.

Le niveau d'expression de chacun des gènes codant pour les protéines d'intérêt est évalué à partir de la transfection en cellules Vero de chacune des constructions plasmidiques par immunofluorescence indirecte.

2.1.3. Etape de transfection

Des cellules Vero (à raison de 2×10^4 cellules/puits en plaques de culture de 96 puits (NUNC, USA) sont mises en culture à J0. Le jour suivant (J+1), les différentes solutions de transfection sont préparées en milieu OptiMEM (Gibco, France) avec un agent lipofectant, la lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) en se conformant aux conditions décrites par le fournisseur. Brièvement, le mélange ADN/lipofectamine respectant un ratio défini est déposé sur chaque tapis cellulaire. Après 6 heures d'incubation à 37°C sous 5% CO₂, le milieu de transfection est remplacé par 200 µl de milieu MEM (Gibco, France) additionné de 10% SVF. Les plaques sont

incubées de 48 à 72h. La fluorescence émise par les cellules est lue via un microscope à fluorescence (Nikon, éclipse TE300, France).

Le même protocole a été appliqué pour les contrôles positifs (pCIneo/N-PPR et pEGFP) et négatifs (pCI-neo vide) décrits ultérieurement.

Le plan de plaque ayant permis de réaliser le test IFI d'expression des 4 protéines testées est représenté par la figure 58. Il faut noter qu'au moment de cette transfection, seul le clone pCIneo/A27 clone 9 (muté) était disponible et que la mutagenèse dirigée n'avait pas été encore réalisée, le clone A27 qui a été donc inclus dans cette étape de transfection est le clone muté.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A33	1/80	1/160	SHI	L1R	1/80	1/160	SHI	pCIneo	1/80	1/160	SHI
B		1/10	1/20	S+		1/10	1/20	S+		1/10	1/20	S+
C		1/20	1/40	S-		1/20	1/40	S-		1/20	1/40	S-
D	B5	1/80	1/160	SHI	A27	1/80	1/160	SHI	NPC	1/80	1/160	SHI
E		1/10	1/20	S+		1/10	1/20	S+		1/10	1/20	S+
F		1/20	1/40	S-		1/20	1/40	S-		1/20	1/40	S-
G	NPC	SM (1/200)	SP (1/20)	S-								
H	EGFP	NT	SHI	S+			S-					

Figure 58. Plan de plaque de transfection pour le test d'IFI. SHI : sérum hyperimmun, S+ : Sérum positif de chèvre, S- : Sérum négatif, SP : sérum polyclonal anti-PPR, SN : sérum monoclonal anti-PPR.

2.1.4. Test d'immunofluorescence indirecte

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) est réalisé comme suit : le surnageant de culture des plaques de culture contenant les cellules transfectées avec les différents clones plasmidiques porteurs des gènes d'intérêt est éliminé, les cellules sont alors fixées 30 minutes à -20°C avec de l'acétone froid 80% (Sigma, France). Une fois la solution d'acétone éliminée, les plaques sont mises à sécher à l'envers à température ambiante toute la nuit. La révélation du signal immunofluorescent se fait en plusieurs étapes. Une fois les cellules rincées avec du PBS1X (Sigma France) + 0,05% Tween 20 (Sigma, France), une réhydratation avec du PBS 1X pendant 30 minutes sous agitation à température ambiante est réalisée, elle est suivie d'une incubation avec un tampon de blocage (PBS1X, 2% lait écrémé (Gloria, France)) à raison de 50 µl/puits pendant 20 minutes sous agitation. Après trois rinçages en PBS 1X, les sérums dilués dans le

tampon de blocage (50 µl) sont ajoutés pendant 30 minutes à 37°C sous agitation (100 rpm) comme suit: le sérum polyclonal anti-capripoxvirus d'ovin hyper-immunisé (dilutions 1/80 et 1/160), le sérum polyclonal provenant de chèvre challengée (sérum positif de chèvre) (dilutions 1/20 et 1/10) et le sérum contrôle négatif (1/20 et 1/40) sont ajoutés de la même manière dans les puits contenant les cellules transfectées avec les constructions suivantes : pCI-neo/A33, pCI-neo/B5, pCI-neo/A27 (clone 9 muté), pCI-neo/L1, pCI-neo-N-PPR et le pCI-neo vide ainsi qu'aux cellules non transfectées. Les anticorps monoclonaux couplés à la FITC (dilution 1/200) et le sérum polyclonal (dilution 1/20) dirigés contre le virus de la peste des petits ruminants sont ajoutés aux puits transfectés avec le plasmide pCI-neo portant le gène N-PPR. Suite à cette incubation, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS 1X + 0.05% Tween 20, et sont incubées avec une solution de 50 µl d'anticorps secondaires marqués FITC (anti goat-antibody FITC conjugated F0250 Dako France) dilué au 1/40 en tampon blocage (PBS1X, 2% lait écrémé (Gloria, France)) pendant 30 minutes sous agitation à 37°C sauf pour le puits N-PPR où nous avons ajouté l'anticorps monoclonal anti-PPR déjà couplé à la FITC. Après trois rinçages en PBS 1X + Tween 20, 100 µl de PBS 1X sont ajoutés à chaque puits permettant une observation microscope à fluorescence (Nikon, éclipse TE300, France).

En parallèle, une plaque témoin servant de contrôle positif d'immunofluorescence (validation du protocole d'IF) avec des cellules Vero (2×10^4 cellules/puits) infectées avec du capripoxvirus KS1 (100TCID₅₀/puits qui correspond à la quantité virale nécessaire pour avoir des foyers de lyse isolés après 48h d'incubation), titre viral initial de $10^{6,1}$ TCID₅₀/ml dans un volume de 50 µl de MEM sans SVF (volume favorisant un contact optimal entre cellules et le virus). Après 2 heures d'incubation à 37°C sous 5% CO₂, 150 µl de milieu MEM complet à 10%SVF est ajouté à chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 48 heures.

2.2. Evaluation de la transcription en ARN messagers des gènes d'intérêt introduits dans les clones plasmidiques par la technique RT-PCR

Le niveau d'ARN exprimé par chacune des constructions plasmidiques contenant chacun des gènes codant pour les protéines d'intérêt est évalué à partir d'une transfection en cellules Vero des différentes constructions plasmidiques suivie d'une extraction ARN et d'une réaction de RT-PCR.

2.2.1. Cellules et plasmides

Les cellules et les plasmides utilisés pour cette étape de vérification de l'expression des ARN messagers par RT-PCR sont les mêmes que ceux utilisés pour l'étape de transfection pour la réalisation de l'IFI (Tableau 23).

2.2.2. Etape de transfection

L'étape de transfection est similaire en tout point à celle réalisée pour le test IFI, à l'exception près du format utilisé, une plaque 6 puits (1×10^6 cellules/puits). Les conditions d'utilisation de l'agent lipofectant (lipofectamine 2000 (Invitrogen, France)) suivies sont celles décrites par le fournisseur avec un ratio de 1/3 respecté. La totalité des constructions plasmidiques à savoir pCIneo/L1, pCIneo/A33 et pCIneo/B5 sont concernés par cette analyse à l'exception du plasmide pCI-neo/A27/Clone9 ayant initialement une mutation qui a engendré un codon stop, pour la vérification de l'expression des ARN n'a pas été réalisé. Les mêmes contrôles que pour l'IFI ont été utilisés.

2.2.3. Etape d'extraction des ARN totaux

Après 48h d'incubation, la totalité de chaque puits est récolté. Dans un premier temps, le milieu de culture est éliminé suivi d'un rinçage de chaque tapis cellulaire. Ce dernier est par la suite trypsinisé et les cellules récoltées sont centrifugées à une vitesse de 1200 rpm pendant 10 minutes. Par la suite, le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de PBS1X. Le nombre de cellules détermine le volume de tampon de lyse à ajouter lors de l'extraction par le kit RNeasy Mini kit (Qiagen, France) qui permet la purification de l'ARN total à partir des cellules animales mais aussi à partir d'autres tissus. Le principe de ce kit est la combinaison des propriétés d'attachement sélectif à une membrane en silice et la vitesse de la technologie « microspin », le protocole détaillé est joint en annexe 4.

2.2.4. Etape de traitement à la DNase

Cette étape de traitement à la DNase précédée d'une PCR amplifiant un gène constitutif permet d'éliminer l'ADN qui peut avoir été simultanément extrait avec l'ARN. En effet, une fois les ARN extraits, une PCR β actine est effectuée sur tous les échantillons extraits pour évaluer la présence d'ADN génomique contaminant avec les amorces $\beta 1$ et $\beta 2$ qui amplifient le gène de ménage « house keeping gene » β actine de 300 pb. Un ADN contrôle (ADN provenant d'un bélier prélevé le 05/03/2013) est utilisé comme témoin positif. Si ce gène est présent, les

échantillons sont traités par la DNase (Turbo DNA-free™ Kit, Ambion, Life Technologies, France) à raison de 2 unités DNase, tampon 10X Turbo DNase Buffer dans un volume réactionnel de 50 µl. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis l'activité enzymatique de la DNase est stoppée par la DNase Inactivation Reagent contenu dans le kit Turbo DNA-free™ Kit Ambion (Life Technologies, France). Une fois le traitement par la DNase effectué, une deuxième PCR β actine est réalisée pour évaluer l'efficacité de la dégradation de l'ADN contaminant.

2.2.5. Etape de RT-PCR spécifique des gènes d'intérêt

L'amplification des ARN messagers est réalisée avec des amorces spécifiques pour chaque gène (Tableau 24) à l'aide du kit One Step RT-PCR kit (Qiagen, France) sur les extraits ARN traités à la DNase, selon le protocole représenté dans le tableau 25.

Tableau 24. Liste des amorces utilisées pour la vérification de la transcription des ARN

Gène amplifié	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')
L1R	PrFL1RInterm	GATTGATGACAGCGGCCTTA
	PrRevL1R.1	GTTGGTGCAGCACATTTCATC
B5R	PrFB5RInterm	TGTCGATTCCCAGCTTTACAA
	PrRevB5RInterm	TGTCTCTTGAACAAATGGGTACT
A33R	PrFA33Interm_KS1	AATTATGGCATCAATGGTTTCG
	PrRevA33Interm-KS1	CCACGTCCCATCCAAGTAGT
A27L	PrFA27Interm	GACGACGATGAAATTTCTGACA
	PrRevA27Interm	TGTCAGAAATTCATCGTCGTC
pEGFP-C1	E2F	CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG
	E2R	CACGAACTCCAGCAGGACCATG
NPC	NP3	GTCTCGGAAATCGCCTCACAGACT
	NP4	CTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT
β-actine	β act1	ACCAACTGGGACGACATGGAGA
	β act2	AGCTGGTCCTGCTCGAAGTC

Tableau 25. Protocole d'amplification des ARN messagers à partir de l'ARN total extrait

Mélange réactionnel RT-PCR	Conditions d'amplification	Cycles
5x Qiagen One Step RT-PCR Buffer	Transcription reverse 50° 30 minutes	1 fois
dNTPs mix Qiagen	Dénaturation initiale 95°C 15 minutes	1 fois
Amorces forward (10 µM)	Dénaturation 94°C 30 secondes	40 fois
Amorces reverse (10 µM)	Hybridation 56°C 30 secondes	
Q enzyme mix (solution Q)	Elongation 72°C 1 minute	
ARN (2ug)	Elongation finale 72°C 7 minutes	1 fois
Eau (qsp 50 ul)		

2.3.Vérification de l'expression des protéines L1R, A27, A33 et B5R par la technique de Western Blot

Afin d'évaluer l'expression des protéines A27, A33, B5 et L1, en complément du test d'IFI, la technique alternative du western blot a été envisagée. Il faut cependant remarquer la conformation des protéines est susceptible d'être différente entre ces 2 techniques (IFI versus WB).

2.3.1. Etape de transfection

L'étape de transfection est similaire en tout point à celle réalisée pour l'évaluation de la transcription en ARN. Les constructions plasmidiques utilisées sont représentées dans le tableau 26 ci-dessous. Il faut noter qu'à ce stade, une mutagenèse dirigée a été réalisée sur le clone 9 pCIneo-A27 et a généré le nouveau clone non muté pCI-neo/A27mut qui sera utilisé dans cette étape de transfection en vue d'un Western blot. Comme pour les deux techniques précédentes, le plasmide pEGFP et le pCI-neo vide seront respectivement utilisés comme contrôle de transfection, servira de contrôle négatif.

Tableau 26. Quantification des constructions plasmidiques utilisées

Plasmide	Concentration (ng/μl)
pCI-neo/A33	272,4
pCI-neo/B5	256.7
pCI-neo/A27mut	205.2
pCI-neo	222.34
pEGFP	301.22

2.3.2. Préparation des extraits protéiques

Après 72h d'incubation, les cellules sont récoltées et les extraits protéiques provenant des culots cellulaires lysés par l'action d'un tampon de lyse (150mM de NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8), 1% de NP40). Le mélange est incubé 30 minutes dans la glace puis une sonication est réalisée à une vitesse maximale suivie d'une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 minutes à +4°C. Le surnageant de ce lysat est récolté, dénaturé dans du tampon Laemmli (composition en annexe 1) puis placé à 95°C pendant 10 minutes correspond à l'échantillon déposé sur gel de type SDS-PAGE suivi d'un Western blot.

2.3.3. Analyse des protéines

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire dans un milieu dénaturant avec un gel de séparation à 15% (composition en annexe 1) et un gel de concentration à 6% (composition en annexe 1). La migration est réalisée d'abord sous une tension de 80 volts pendant 15 minutes puis sous une tension de 120 volts pendant 1h30, tout ceci dans un tampon de migration 1X (composition en annexe 1). Après migration, les protéines contenues dans le SDS-PAGE sont soit soumises à une coloration au bleu de Coomassie soit transférées sur une membrane de nitrocellulose pour subir une détection par immunoblot.

➤ Coloration au bleu de Coomassie

Les protéines séparées sur le gel SDS-PAGE sont soumises à une coloration au bleu de Coomassie (7.5% acide acétique, 50% éthanol, bleu de Coomassie, 40% eau distillée) pendant

la nuit à température ambiante. Le lendemain, le gel subit plusieurs lavages dans une solution de décoloration (10% acide acétique glacial, 40% méthanol et 50% d'eau distillée) jusqu'à apparition des bandes à différentes tailles. Un marqueur de poids moléculaire (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermofischer scientifique) est déposé sur le gel SDS-PAGE et permettra d'identifier comparativement la taille des bandes présentes dans les lysats cellulaires testés.

➤ Western blot

La technique de western blot repose sur la reconnaissance de protéines déposées puis migrant au sein d'un gel SDS-PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) et transférées sur une membrane par des anticorps primaires spécifiques des protéines d'intérêt révélés par des anticorps secondaires anti-espèce marqués peroxydase.

Les lysats protéiques à analyser et un marqueur de poids moléculaire coloré (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermofischer scientifique) sont d'abord séparés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés (électro-transfert) sur une membrane de nitrocellulose (NitroBind de MSI Micron separation INC). Le transfert s'effectue sous une tension de 100 mA pendant 1h15 minutes dans un tampon de transfert (composition en annexe 1). La membrane est ensuite incubée dans une solution de saturation composée de 5% de lait écrémé en poudre (Gloria, France) dans du tampon PBS1X-0,05% de Tween 20 (Sigma, France) pendant 1h30 à température ambiante. Après des lavages dans du PBS1X + Tween 20 0,05%, la membrane est incubée avec les sérums positifs constituant les anticorps primaires qui proviennent d'un sérum caprin infecté par la souche virulente Yemen Goat pox en Ethiopie prélevé à J28 post infection, nommé G5 18 d28 17/5/2011 (Group 5, Day 28) (Caufour *et al.*, 2014). Ce sérum est dilué au 1/100^{ème} dans une solution contenant 5% de lait écrémé dans du PBS 1X à +4°C pendant la nuit. Les complexes protéines-anticorps formés sont détectés par un anticorps secondaire anti-IgG de chèvre couplés à la peroxydase (Dako, polyclonal anti-goat ig/HRP conjugated, P0160) dilué au 1/4000^{ème} dans le même tampon pendant 2 heures à température ambiante. La révélation des bandes se fait grâce au substrat de la peroxydase (DAB) (Sigma Aldrich) et du peroxyde d'hydrogène à 30% en PBS1X (Sigma, France).

II. Résultats

Cette partie relate les résultats obtenus pour l'expression des quatre protéines en système eucaryote, à savoir le clonage des différents gènes d'intérêt dans le vecteur d'expression plasmidique pCI-neo ainsi que leur expression *in vitro*.

1. Clonage des gènes sous pCI-neo

Le clonage en bouts francs des gènes codant pour les protéines L1, A27, A33 et B5 dans le vecteur pCI-neo est réalisé en plusieurs étapes successives. Selon l'ordre chronologique des étapes effectuées, les résultats sont exposés.

1.1. Production et digestion du pCIneo

Le résultat de la digestion du vecteur pCI-neo par SmaI est représenté par la figure 59. L'ADN plasmidique du pCI-neo est présent sous deux formes quand il est non digéré (1), une forme relâchée (a) et une forme super enroulée (b) alors que le plasmide digéré par SmaI/linéarisé (2) ne présente qu'une seule bande à 5,5 kb. Rappelons que la digestion par SmaI donne des extrémités à bouts francs.

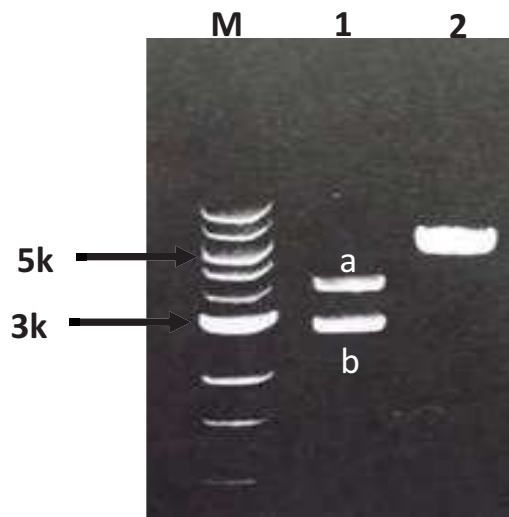


Figure 59. Résultat de la digestion du plasmide pCIneo par SmaI (gel d'agarose 1%). M : Marqueur de poids moléculaire 1kb (Biolabs, France), 1 : pCI-neo non digéré, 2. pCI-neo digéré par SmaI.

1.2. Production des inserts

Après plusieurs optimisations, l'amplification des gènes L1R A27L, A33R et B5R à partir de l'ADN de la souche virale atténuée KS1 (Kenya sheepox 1) a permis d'obtenir des amplicons spécifiques et à la taille attendue de 750pb, 584pb, 680pb et 780pb respectivement pour L1R, A27L, A33R et B5R (Figure 60).

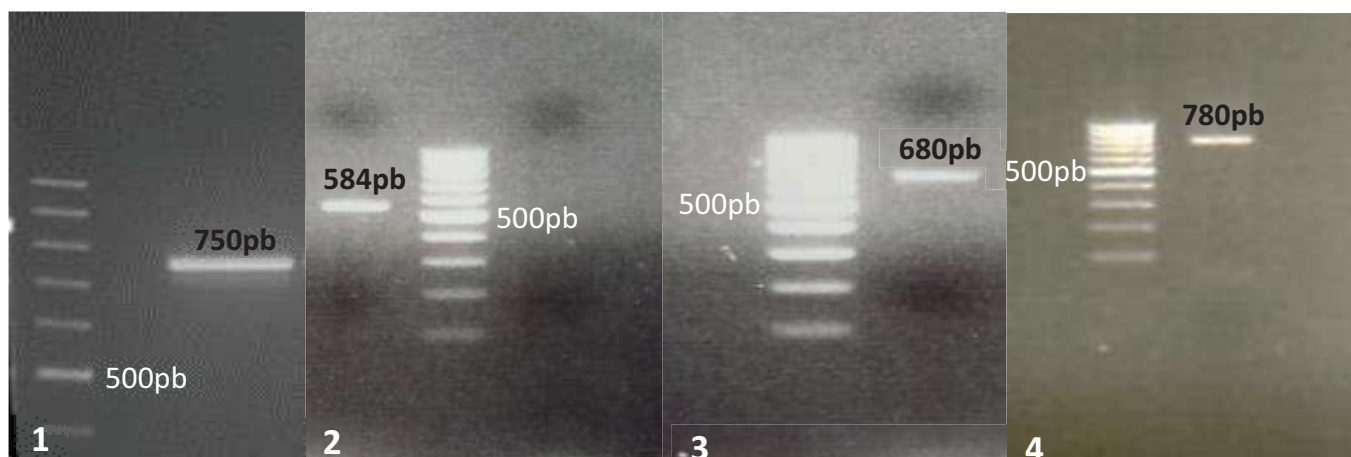


Figure 60. Gel d'agarose 1% présentant l'amplification par PCR des inserts L1R, A27L, A33R et B5R à partir de l'ADN génomique KS1 sur gel d'agarose 1,5% (1. L1R, 2. A27L, 3. A33R et 4. B5R)

Les bandes obtenues sont découpées sur le gel, purifiées grâce au kit QIA Quick Gel extraction Kit (Qiagen, France) puis quantifiées sur gel.

1.3. Criblage des colonies transformées

Suite à une série d'optimisation de rapport de ligation insert/vecteur et de transformation, les colonies obtenues pour chaque insert ont fait l'objet de deux PCR successives en vue de vérifier la présence de l'insert puis de son orientation dans le vecteur pCI-neo.

1.3.1. Insert L1R

Pour le produit de ligation pCIneo/L1R, 20 colonies ont été obtenues pour les trois ratios 3, 5 et 10. Une première série de réactions PCR visant à vérifier la présence de l'insert L1R est réalisée avec le couple d'amorces OligopCMV forward/T3Pr, sur les 20 colonies individuelles obtenues avec le ratio 10/1, 8 colonies ont été trouvées positives parmi les 20 testées. Un amplicon de 1,5 kb est attendu (Figure 61, A).

Par la suite, la vérification de l'orientation de l'insert L1R dans le vecteur pCIneo est réalisée avec une deuxième série de PCR sur ces 8 colonies avec un deuxième couple d'amorces OligopCMVF/PrRevL1R, un amplicon d'environ 1,4 kb est attendu (Figure 61, B). Les colonies positives ont fait l'objet d'une pré-culture en vue d'extraction de l'ADN plasmidique.

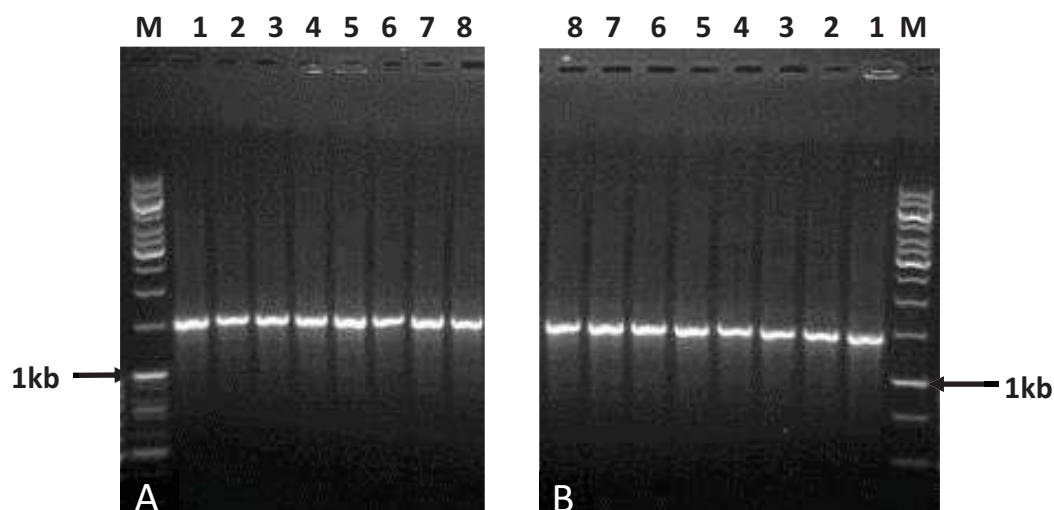


Figure 61. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt L1R (Gel agarose 1.2 %) A. PCR absence/présence insert, B : PCR orientation insert, M: Marqueur 1 kpb (Generuler, ThermoScientific, France), 1 à 8 : colonies testées

1.3.2. Insert A27

A l'issue de la transformation du produit de ligation A27/pCIneo avec l'unique ratio 10/1, 16 colonies ont été obtenues. Une première série de réactions PCR spécifiques du gène A27 a été réalisée sur les seules 16 colonies individuelles (contrairement aux autres gènes dont les colonies ont été traitées en pools). La figure 62 (A) illustre les 11 colonies positives présentant une taille d'amplicon de 584 pb. Un amplicon de plus forte intensité est obtenu avec les colonies No 1, 4, 9, 11 et 14.

La seconde série de PCR orientation de l'insert A27, est par la suite réalisée sur les 5 colonies positives No 1, 4, 9, 11 et 14 a permis d'évaluer le sens de l'insert A27 dans le vecteur pCIneo, seulement trois des cinq colonies (Nos 4, 9 et 11) présentent l'insert dans le sens d'orientation souhaité (Figure 62, B). Les colonies 4 et 11 présentant un amplicon de faible intensité, seule la colonie 9 a été choisie et a fait l'objet d'une pré-culture bactérienne en vue d'extraction d'ADN plasmidique.

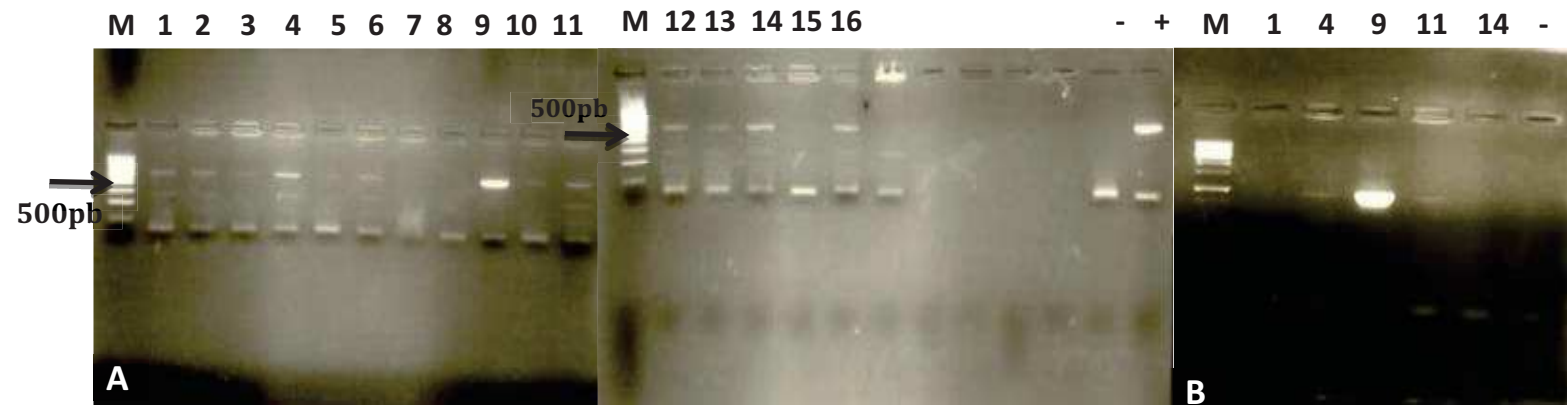


Figure 62. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A27L (Gel agarose 1.2 %) A. PCR absence/présence insert, B : PCR orientation insert, M. Marqueur moléculaire 100 pb (Biolabs, France), 1 à 16. Colonies testées, (+). Contrôle positif (KS1), (-). Contrôle négatif (eau)

1.3.3. Insert A33 :

Suite à la transformation du produit de ligation pCIneo/A33, 85 colonies ont été obtenues avec le ratio 6/1, ces colonies ont été poolées en 17 pools de 5 colonies en vue d'une première PCR spécifique du gène A33 vérifiant la présence de l'insert, 3 pools sur les 17 testés sont positifs. La même réaction PCR insert A33 a été réalisée ensuite sur les 15 colonies individuelles correspondant aux trois pools détectés PCR positifs: seulement 4 colonies (Colonies No 2, 8, 9 et 14) contiennent l'insert A33 (Figure 63, A).

Une seconde série de « PCR orientation insert A33 » sur ces quatre colonies positives a permis d'évaluer le sens d'insertion ou d'orientation de l'insert A33 dans le vecteur pCI-neo. Seules les colonies 8, 9 et 14 présentent l'insert orienté dans le sens souhaité (amplicon à 1kb) (Figure 63, B).

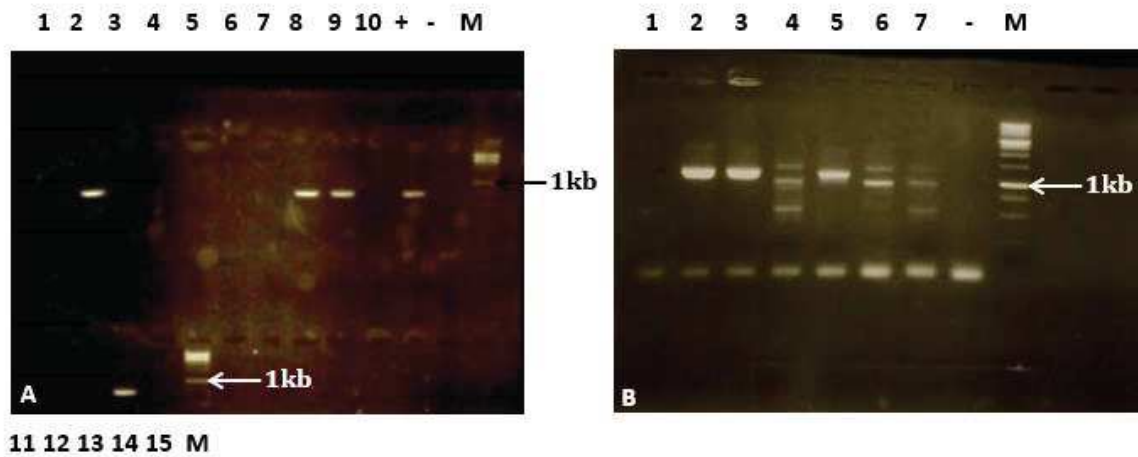


Figure 63. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A33R (Gel agarose 1.2 %) A. PCR absence/présence insert, B : PCR orientation insert, M. Marqueur de poids moléculaire 1kb (Biolabs, France), A : 1 à 15 : colonies No 1 à No 15, +. Contrôle positif (KS1), -. Contrôle négatif (eau). B : 1. Colonie 7, 2. Colonie 8, 3. Colonie 9, 4. Colonie 10, 5. Colonie 14, 6. Colonie 15, 7. Colonie 16.

1.3.4. Insert B5R

Concernant l'insert B5R, 90 et 70 colonies ont été respectivement obtenues avec les deux ratios 8/1 et 10/1. Une première PCR « absence/présence insert » est réalisée sur les colonies du ratio 10/1 qui ont été poolées en 5 colonies (18 pools de 5 colonies). Le pool 5 a été choisi pour une PCR individuelle sur les 5 colonies (colonies No 20 à 24), comme le montre la figure 64 (A), les 5 colonies présentent toutes un amplicon à la taille attendue de 780 pb.

Une seconde série de « PCR orientation insert B5R » est par la suite réalisée sur ces cinq colonies. La figure 64 (B), illustre l'obtention d'un amplicon de 1122 pb pour 4 colonies testées (colonies No 20, 21, 22 et 24). L'ADN plasmidique de ces colonies a été extrait.

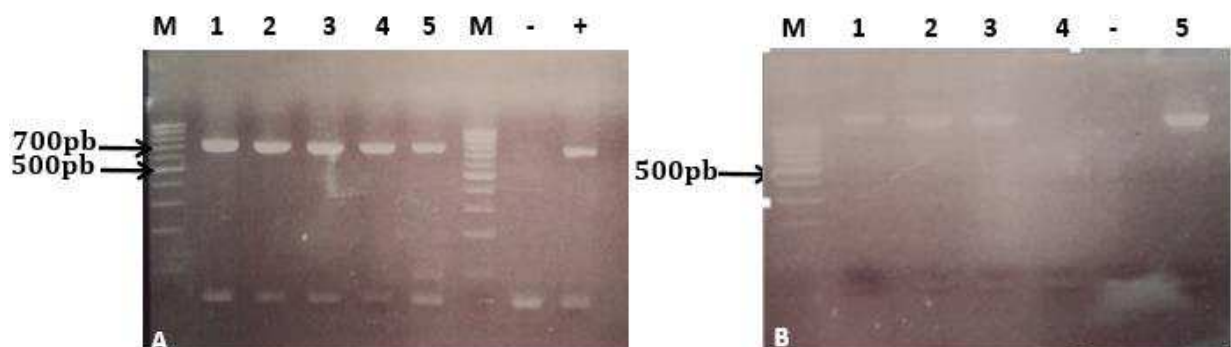


Figure 64. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt B5R (Gel agarose 1.5 %) A. PCR absence/présence insert, B : PCR orientation insert, M. Marqueur de poids moléculaire 100 pb (Biolabs, Ozyme, France), 1. Colonie 20, 2. Colonie 21, 3. Colonie 22, 4. Colonie 23, 5. Colonie 24, (+). Contrôle positif (KS1), (-) Contrôle négatif (eau).

1.4. Séquençage

Le résultat du séquençage est vérifié par un alignement des séquences des clones plasmidiques pCI-neo/L1R, pCI-neo/A33 et pCI-neo/B5R avec la séquence LSDV (NCBI/Genbank Accession Number AF325528) qui n'a révélé aucune mutation ni délétion. En revanche, pour le clone 9 pCIneo/A27 la situation est différente. L'alignement a révélé une mutation du nucléotide Thymine en Adénosine en position nucléotidique 374. Cette mutation s'est avérée silencieuse puisqu'elle n'a provoqué aucun changement en acides aminés. En effet les deux codons TCA et TCT codent pour le même acide aminé, la sérine. De plus, le séquençage a révélé une délétion d'un nucléotide adénosine en position 513 (Figure 65, A) qui modifie l'acide aminé Asparagine en Isoleucine avec la création d'un codon stop en position 120 (en acides aminés) comme le montre la figure 65, B.

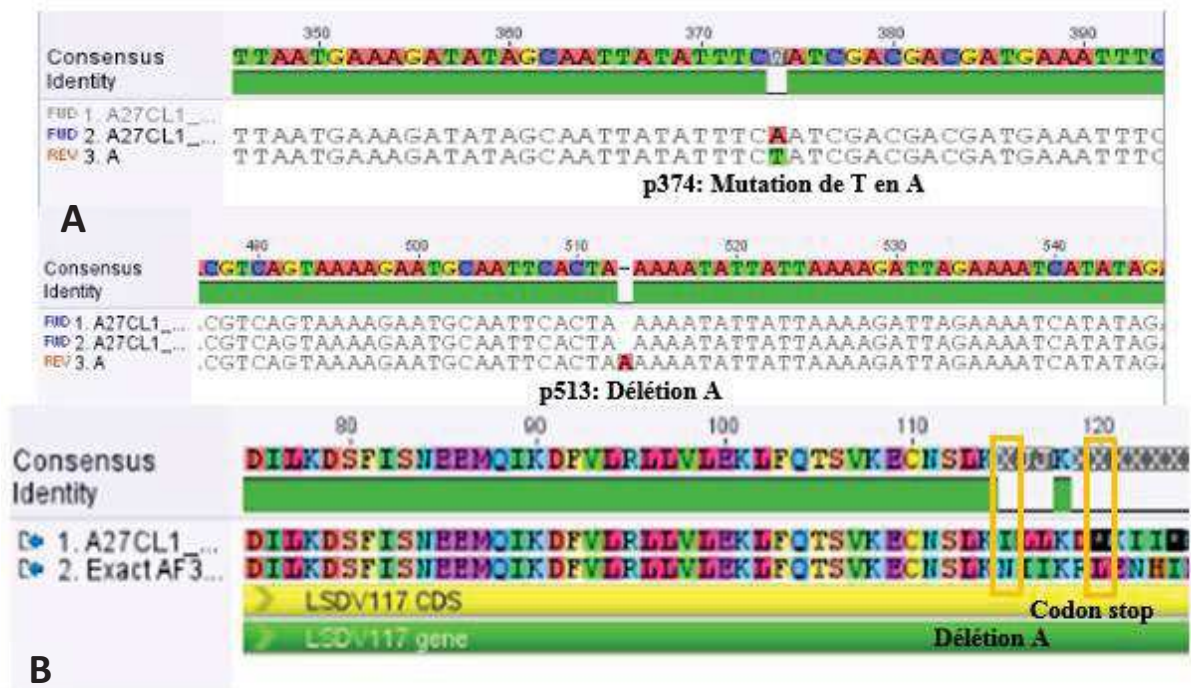


Figure 65. Alignement de la séquence en nucléotides (A) et en acides aminés (B) du clone pCI-neo/A27 avec la séquence LSDV (Genbank AF325528).

1.5. Mutagenèse dirigée

Suite aux résultats du séquençage, une mutation a concerné le clone 9 du pCIneo/A27. Une mutagenèse a été donc effectuée sur ce clone muté suite à laquelle plusieurs colonies ont été obtenues. L'ADN de trois colonies a été extrait en vue d'une vérification par séquençage et ceci

par rapport à la séquence de l'ADN parental. Le résultat final obtenu a engendré deux clones corrigés. Des stocks sur billes sont constitués à partir de ces deux colonies qui seront nommées A27mut/pCIneo.

2. Expression *in vitro* des constructions plasmidiques en système eucaryote

Le résultat de l'expression *in vitro* en système eucaryote des clones plasmidiques construits est évalué par différentes techniques, l'immunofluorescence indirecte (IFI), la technique de RT-PCR, et le western blot.

2.1. Vérification de l'expression des 4 gènes par immunofluorescence indirecte

En obéissant au schéma de plaque présenté dans la partie méthodologie (Figure 58), les résultats de l'IFI sont représentés par la figure 66 suivante. Rappelons que seul le clone pCIneo/A27 clone 9 (muté) était disponible et que la mutagenèse dirigée n'avait pas été encore réalisée.

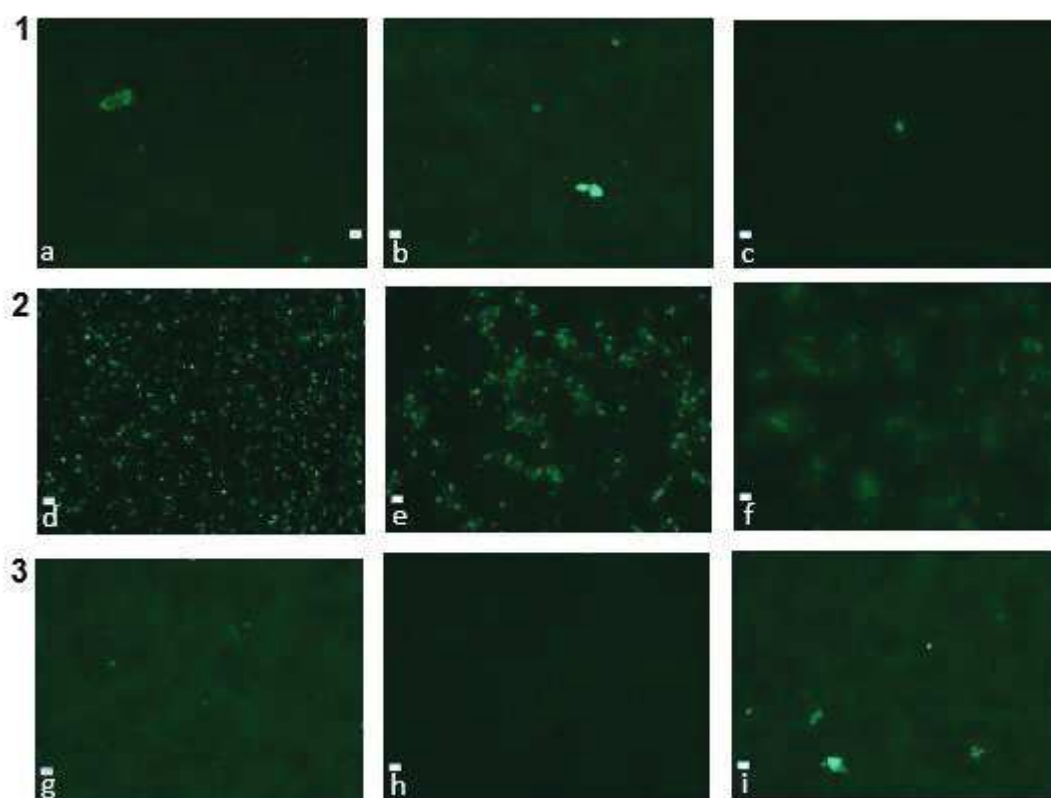


Figure 66. Détection par immunofluorescence de l'expression transitoire des constructions plasmidiques dans les cellules Vero (grossissement x 20):

(1) Témoins négatifs : (a) pCI-neo avec sérum négatif ; (b) pCI-neo/N-PPR avec le sérum positif de chèvres ; (c) cellules non transfectées révélées avec sérum hyper immun ovin anti-capripoxvirus (SHI)

(2) Témoins positifs : (d) Témoin positif de transfection avec peGFP (Grossissement 2,5 fois) ; (e) pCI-neo/N-PPR révélé avec les anticorps monoclonaux anti- PPR (1/200) ; (f) Cellules infectées par le virus KS1 révélées avec le SHI

(3) Constructions plasmidiques : (g) pCI-neo/A33 révélé avec sérum positif de chèvres ; (h) pCI-neo/B5 avec sérum SHI ; (i) L1/pCI-neo avec sérum positif de chèvres

Comme le montre la photo 2d, le puits transfecté avec le plasmide peGFP-C1 témoin de transfection présente une fluorescence verte intense signe du succès de transfection. Le deuxième témoin indiquant l'opérationnalité de la technique qui consiste au plasmide pCI-neo exprimant le gène codant pour la nucléoprotéine N du virus de la PPR a été exprimé et reconnu par les anticorps monoclonaux (dilutions 1/200) et polyclonaux (1/20) spécifiques anti-PPR, seule la révélation avec l'anticorps monoclonal anti-PPR est représentée par la photo 2e confirmant ainsi l'opérationnalité de la technique. Enfin, pour valider le test d'immunofluorescence, une plaque contrôle d'infection contenant des cellules Vero infectées avec le virus KS1 réalisée en parallèle des plaques de transfection a été révélée par le sérum hyper immun d'ovin anti-capripoxvirus (SHI) (photo 2f). Aucun signal n'est détecté pour les contrôles négatifs (transfection avec pCI-neo, pCI-neo/ NPPR et cellules non transfectés) suite aux incubations à la fois avec le SHI, le sérum positif de chèvre et le sérum négatif, conditions 1.a, 1.b et 1.c. Les témoins positifs et négatifs permettent de valider le test d'IFI réalisé. Aucun signal de fluorescence n'a été obtenu pour les constructions plasmidiques pCIneo/L1, pCIneo/A33 et pCIneo/B5 transfectées dans les cellules Vero et révélés à la fois avec le sérum hyperimmun d'ovins et le sérum positif de chèvre comme le montrent les photos 3.g, 3.h et 3.i. (pCIneo/A33, pCIneo/L1 avec SHI non présentés et pCIneo/B5 avec sérum positif de chèvres non présenté).

2.2. Evaluation de la transcription en ARN messagers des gènes d'intérêt par RT-PCR

Le niveau d'ARN exprimé par chacune des constructions plasmidiques contenant chacun des gènes codant pour les protéines d'intérêt est évalué à partir d'une transfection en cellules Vero de chacune des constructions plasmidiques suivie d'une extraction ARN et d'une réaction de RT-PCR. Rappelons qu'à ce stade le nouveau clone A27 non muté n'était pas disponible, de ce fait on n'a pas inclus le clone 9 pCIneo/A27 muté.

Dans un premier temps, l'extraction des ARNs totaux vérifiés par la PCR β actine a révélé une contamination des extraits par de l'ADN (Figure 67, A), la présence d'amplicons de 300 pb dans les différents extraits en témoigne. Le traitement des extraits par de la DNase suivi par une PCR β actine illustré par la figure 67B met en évidence l'absence de toute contamination par de l'ADN.

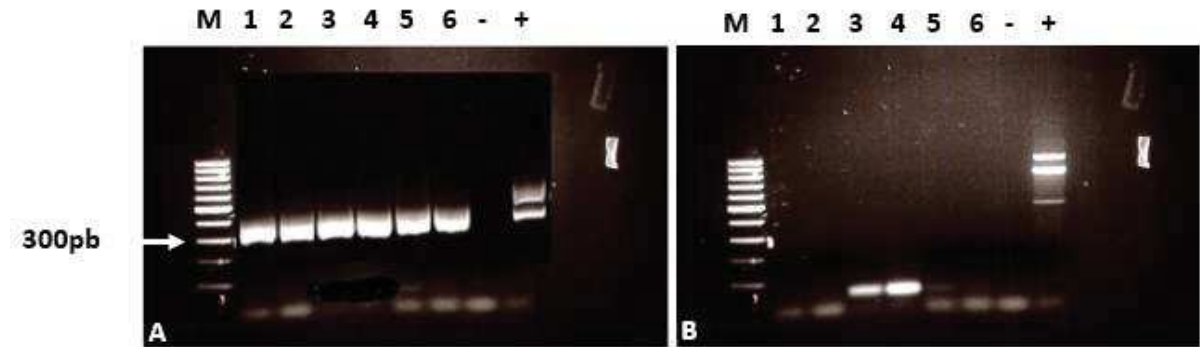


Figure 67. Gel d'agarose présentant l'amplification PCR β actine réalisée sur des ARN extraits (A) Avant traitement par la DNase (B) Après traitement par la DNase. 1. A33, 2. B5, 3. L1, 4. NPC, 5. EGFP, 6. pCI-neo, 7. Témoin négatif, 8. Témoin positif.

Une fois l'ADN génomique contaminant éliminé des extraits d'ARN, une réaction de RT-PCR est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques dessinées internes aux gènes d'intérêt (Tableau 24). Le résultat de la RT-PCR illustré par la figure 68 à partir d'extraits d'ARNs obtenus met en évidence la transcription des ARN pour les quatre gènes d'intérêt L1, A27, A33 et B5 mais aussi pour nos témoins utilisés (pEFGP, pCIneo/NPPR).

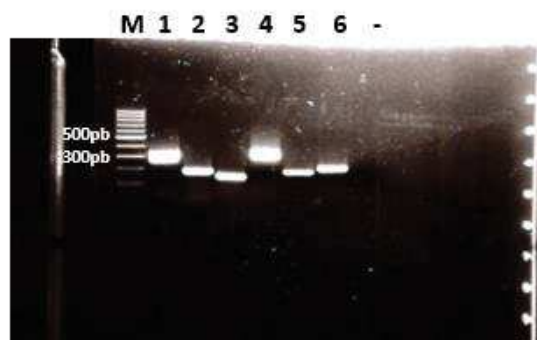


Figure 68. Gel d'agarose présentant l'amplification par RT-PCR des différents gènes L1R, A33R, B5R à partir des extraits ARN issus des tapis cellulaires de transfection: 1. A33, 2. B5, 3. L1, 4. NPPR, 5/6. EGFP, - Témoin négatif.

2.3. Vérification de l'expression des protéines L1, A27, A33 et B5 par la technique de Western Blot

Les résultats interprètent l'analyse par immunoblot effectuée à partir de lysats cellulaires récoltés suite à une transfection des constructions plasmidiques pCIneo/B5, pCIneo/A33 et pCIneo/A27 mut (clone obtenu après mutagenèse) sur des cellules Vero. Deux témoins négatifs sont représentés par un lysat cellulaire obtenu à partir de cellules transfectées avec le pCIneo vide et un lysat cellulaire de cellules non transfectées.

2.3.1. Coloration au bleu de coomassie

Les profils protéiques des lysats cellulaires récoltés suite à la transfection avec les constructions plasmidiques pCIneo/A27 mut, pCIneo/A33 et pCIneo/B5 sont représentés par la figure 69. Ils semblent similaires pour nos trois protéines d'intérêt (A27, A33 et B5) mais aussi pour les deux témoins négatifs utilisés (cellules transfectées par le pCIneo vide et cellules non transfectées). Le profil observé est une multitude de bandes pouvant correspondre aux différentes protéines cellulaires. Néanmoins aucune bande prédominante n'apparaît à une taille précise pour aucun des lysats cellulaires.

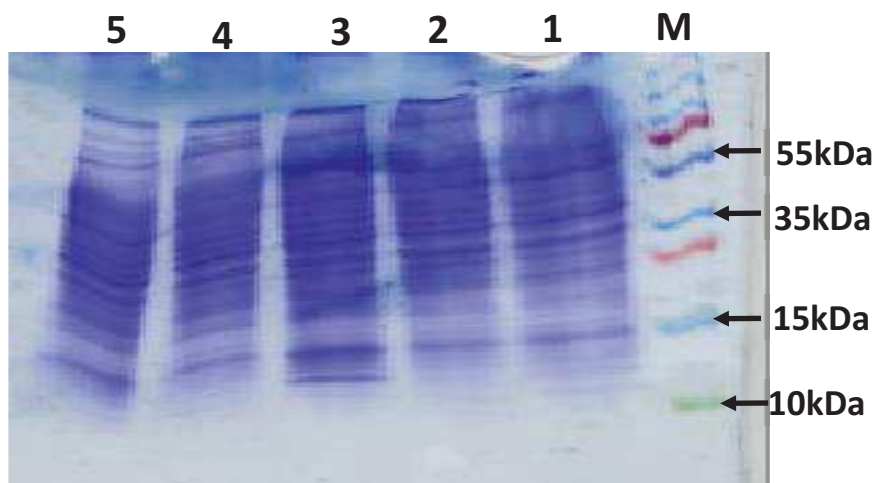


Figure 69. Gel de polyacrylamide (6-15%) coloré au bleu de Coomassie. M. Marqueur de poids moléculaire, 2. A27 muté 3. A33, 4. B5, 5. pCI-neo (témoin négatif), NT. Cellules non transfectées (témoin négatif).

2.3.2. Immunoblot

Comme le montre la figure 70, le profil des différents lysats protéiques obtenus des constructions plasmidiques pCIneo/A33, pCIneo/A27 mut et pCIneo/B5 mais aussi du pCIneo

vide et des cellules non transfectées (témoins négatifs) sont tous similaires. En effet, la révélation par le DAB n'a pu mettre en évidence de bandes aux tailles attendues (14 kDa pour la A27, 21 kDa pour la A33, 42 kDa pour la B5). Plusieurs bandes non spécifiques sont présentes, une bande d'environ 50 kDa est prédominante dans tous les échantillons y compris le puits correspondant aux cellules non transfectées (témoin négatif).

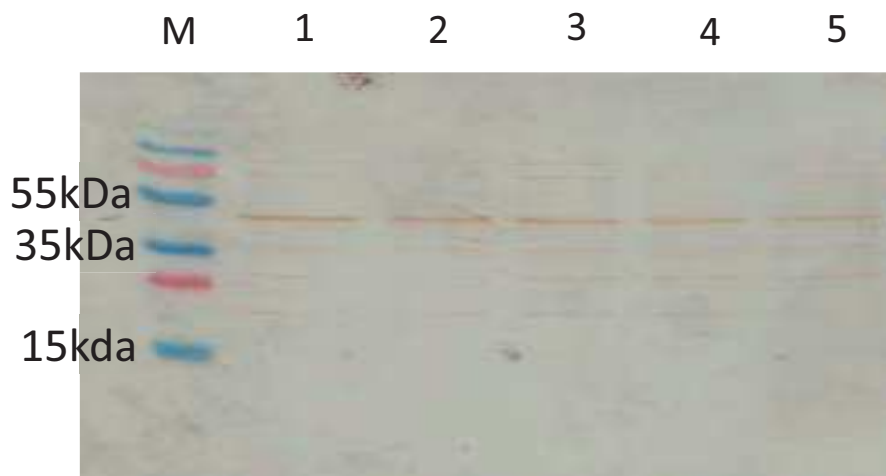


Figure 70. Analyse par immunoblot des lysats protéiques : 1.pCIneo/A27mut, 2. pCIneo/A33, 3. pCIneo/B5, 4. pCIneo vide (témoin négatif), 5. Cellules non transfectées (témoin négatif).

Conclusion :

L'évaluation de l'expression des protéines en système eucaryote n'a pas concluante ni en immunofluorescence ni en Western blot pour aucune des protéines d'intérêt. En revanche, le niveau de transcription a été évalué par RT-PCR et validé pour l'ensemble des protéines testées soit trois des quatre protéines (A33, B5, L1R). Par ailleurs, il a donc été envisagé d'évaluer l'expression de ces mêmes protéines en système baculovirus-cellules d'insectes (Chapitre 3).

Chapitre 3 : Production des protéines en système baculovirus

Suite à l'analyse *in silico* réalisée dans le Chapitre 1 qui a permis la caractérisation structurale des différentes protéines d'intérêt, une analyse plus approfondie est effectuée en exprimant les gènes codant pour les quatre protéines dans deux systèmes d'expression différents: le système eucaryote (Chapitre 2) et le système baculovirus-cellules d'insectes BEVS (Chapitre 3).

L'expression des protéines en système eucaryote n'étant pas concluante, nous avons essayé d'identifier quel système serait le plus adapté pour la production des protéines d'intérêt. Notre choix s'est basé sur plusieurs études bibliographiques ayant travaillé sur des protéines apparentées du genre *Orthopoxvirus* ayant opté pour l'expression de leurs protéines dans le système BEVS et ont obtenu des formes solubles ainsi que des quantités suffisantes de leur protéine d'intérêt.

Le système BEVS est un système d'expression dans lequel le gène codant pour la protéine d'intérêt est délivré aux cellules d'insectes par le phénomène de recombinaison homologue. Le processus d'expression de protéines recombinantes dans le système BEVS comporte trois étapes clés :

- (i) Clonage du gène d'intérêt (ou une partie) dans le vecteur de transfert du baculovirus choisi : l'analyse *in silico* caractérisant la structure primaire des quatre protéines (chapitre 1) ainsi qu'une analyse bibliographique approfondie a permis de choisir les régions de chacune des protéines à exprimer en système d'expression baculovirus. Les régions transmembranaires pouvant poser un problème de solubilité vu leur hydrophobicité ont été identifiées et sont de préférence à éliminer des constructions. Il a été choisi pour certaines protéines d'ajouter un peptide signal celui de la mellitine par exemple, et d'ajouter un Tag Histidine qui facilitera la purification et la détection de la protéine sur colonne Histidine.
- (ii) Génération et amplification des virus recombinants : les cellules d'insectes sont cotransfectées avec le plasmide de transfert portant le gène d'intérêt et l'ADN du baculovirus linéarisé. Le surnageant de cotransfection est considéré comme étant le stock viral initial (P1) qui sera ensuite amplifié pour une production à grande échelle ; pour une amplification efficace, un faible MOI (Multiplicity of infection :

nombre de particules virales/nombre de cellules) est requis. Les virus recombinants seront ensuite titrés par la technique MTT.

- (iii) Production protéique : les cellules d'insectes sont infectées avec le passage choisi du baculovirus recombinant à un MOI élevé permettant d'avoir toutes les cellules infectées en même temps. Les paramètres à prendre donc en considération durant cette étape est la quantité de virus et le temps d'infection. Notons que cette production n'a concerné à ce stade que la protéine A27. La production des autres protéines étant en cours.

I. Matériel et méthodes

La production de quatre protéines d'intérêt dans le système baculovirus-cellules d'insectes est basée sur un système de recombinaison homologue utilisant le gène de la polyhédrine. Le kit commercialisé par Clontech (BacPAKTMBaculovirus Expression System) a été choisi. La production s'est faite en trois étapes distinctes qui ont débuté par un clonage directionnel dans le vecteur de transfert pBacPAK8. Suite à ce clonage, une deuxième étape de production de baculovirus recombinants est réalisée par la cotransfection des constructions plasmidiques obtenues au cours de la première étape avec l'ADN viral du baculovirus digéré (BacPAK6) au sein de cellules d'insectes. Enfin, une troisième et dernière étape consistera à la production proprement dite des protéines d'intérêt. Les principales étapes sont schématisées dans le diagramme 71 ci-dessous.

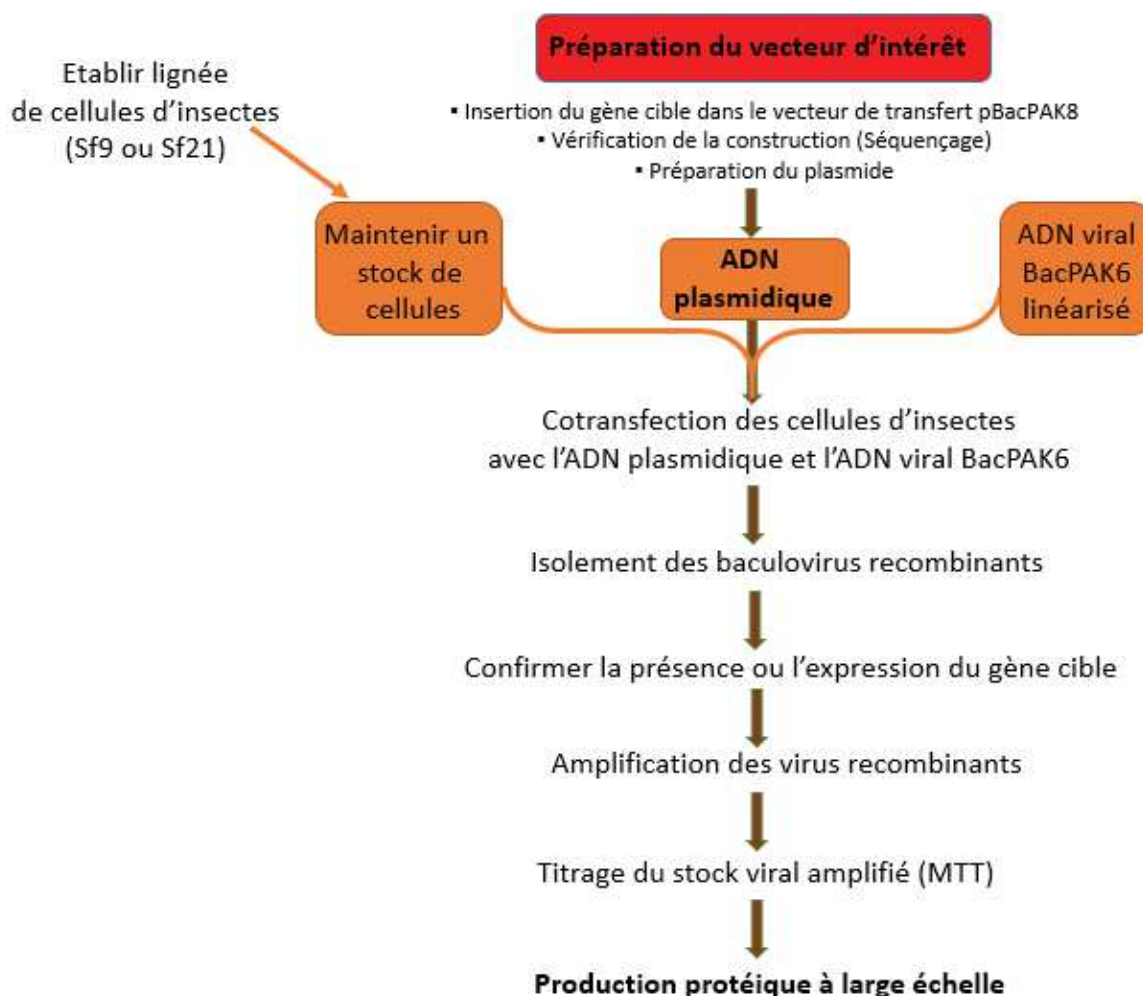


Figure 71. Diagramme décrivant les étapes permettant l'expression protéique dans le système BacPAK™ Baculovirus.

1. Clonage des 4 gènes en vecteur de transfert pBacPAK8

Le clonage des 4 gènes codant pour les protéines d'intérêt dans le vecteur de transfert du baculovirus pBacPAK8 (Clontech, France) a nécessité une analyse structurale complète des protéines (Chapitre 1) en plus d'une analyse bibliographique approfondie visant à choisir les parties à insérer dans le vecteur de transfert en vue d'éliminer tout domaine hydrophobe de la construction pouvant poser un problème de solubilité des protéines dans le système BEVS.

Le travail a débuté par la synthèse d'un plasmide synthétique comprenant l'ORF de la protéine A27 additionné de la séquence de la mellitine (pUC-A27) avec de part et d'autre deux enzymes de restriction PstI et NotI permettant l'extraction du gène en question. Ensuite pour un clonage directionnel dans le vecteur pBacPAK8, les deux plasmides ont été doublement digérés par PstI/NotI permettant la ligation/transformation en vue d'obtenir le clone pBacPAK8/A27. Une

fois vérifié par séquençage, ce vecteur nous servira pour le clonage des trois autres gènes par une double digestion BclI/NotI en vue de récupérer le vecteur pBacPAK8 et la séquence de la mellitine.

Une fois les régions à exprimer des autres gènes produits par PCR et doublement digérés par les mêmes enzymes, une ligation suivie de transformation permettent d'obtenir les clones pBacPAK8/A33, pBacPAK8/L1 et pBacPAK8/B5.

Les principales étapes de la stratégie de clonage utilisée sont représentées par la figure 72.

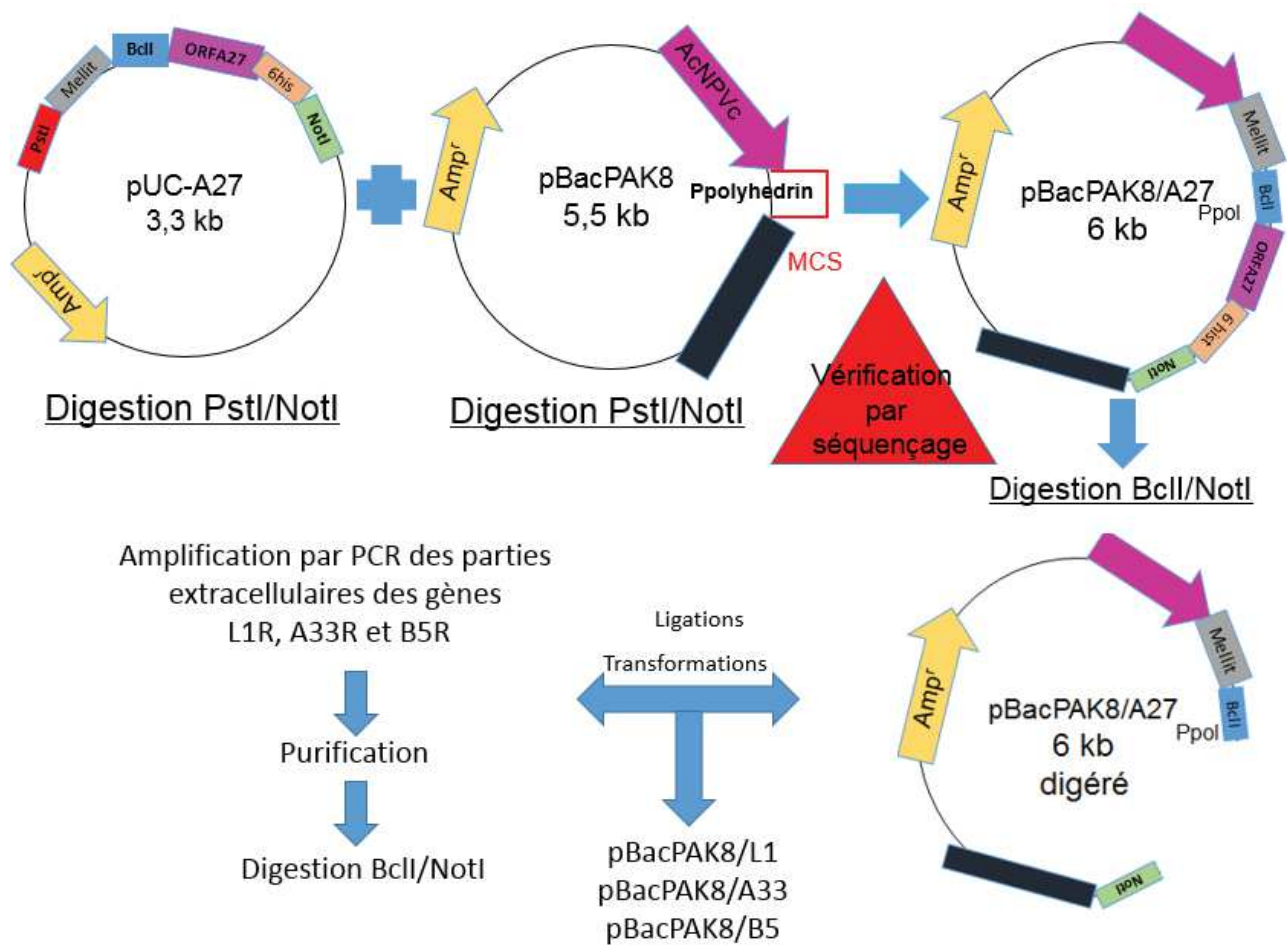


Figure 72. Stratégie de clonage utilisée pour l'obtention des clones pBacPAK8/A27, pBacPAK8/L1, pBacPAK8/A33 et pBacPAK8/B5.

1.1. Clonage du gène A27 dans le vecteur de transfert pBacPAK8

1.1.1 Préparation des plasmides

➤ **Plasmides utilisés**

- pUC-A27

pUC-A27 est le plasmide au sein duquel le gène synthétique codant pour la protéine A27 produit par la société PROTEOGENIX (Schiltigheim, France) a été inséré.

Le design du gène synthétique a nécessité un bon nombre de réflexions. La première réflexion s'est portée sur la partie des gènes à produire, suite aux analyses structurales *in silico* réalisées dans le chapitre 1 et suite à une recherche bibliographique approfondie, la A27 est la seule protéine parmi les quatre protéines d'intérêt qui ne possède pas de domaine transmembranaire, nous avons donc décidé de la produire en totalité dans le système BEVS, cela ne nécessitant pas d'exclusions de domaines hydrophobes, le choix s'est porté sur cette protéine à produire en premier en la synthétisant dans le plasmide pUC.

Par la suite, nous avons d'une part décidé de sécréter la protéine par l'addition de la séquence du peptide signal de la mellitine (Tessier *et al.*, 1991) en amont de l'ORF de la protéine A27 c'est-à-dire à sa partie N terminale. D'autre part, notre choix s'est porté sur une purification à l'aide d'histidines tags, pour ce fait et se basant sur des travaux réalisés, nous avons décidé d'ajouter la séquence de six histidines tags à la partie C terminale de la protéine.

Pour un clonage dirigé de la séquence du gène A27 additionné de la séquence de la mellitine et des histidines tags dans le vecteur de transfert du baculovirus pBacPAK8, il a fallu ajouter de part et d'autre du gène synthétique deux enzymes de restriction retrouvés dans le MCS du vecteur de transfert. Cependant, le site de restriction de ces deux enzymes ne devait pas figurer dans la séquence de la protéine A27. Notre choix s'est fait sur l'ajout des enzymes PstI et NotI respectivement en position N et C terminale du gène à synthétiser.

Une dernière réflexion était basée sur le fait qu'on pouvait utiliser la séquence de la mellitine du gène synthétique pour le clonage des trois autres gènes (L1R, A33R et B5R) dans le vecteur de transfert pBacPAK8 et pour ne pas avoir à dessiner des amorces avec des queues flottantes trop longues. Nous avons fait le choix d'ajouter la séquence d'une troisième enzyme de restriction juste en aval de la séquence de la mellitine. Le choix de cette enzyme était difficile

vu qu'il fallait respecter plusieurs conditions : (i) Le site de clivage du peptide signal de la mellitine fait toujours intervenir la séquence peptidique suivante YIYAD (Tyr, Ile, Tyr, Ala, Asp), (ii) La séquence de cette enzyme ne doit pas se retrouver ni dans le vecteur pBacPAK8, ni dans la séquence de la mellitine ni dans nos quatre inserts. La seule séquence qui pouvait respecter ces points était la séquence de l'enzyme BclI (T[^]GATCA).

Ayant été très difficile de trouver une enzyme pouvant respecter toutes ces conditions, le choix de BclI s'est fait en dépit de l'existence de sa séquence dans l'insert L1R. Comme nous allons l'expliquer plus tard, une mutagenèse dirigée était donc nécessaire pour modifier la séquence du site de restriction qu'on retrouve dans le gène L1R.

Néanmoins, il a fallu faire quelques modifications pour pouvoir respecter les différentes conditions citées (i) le dernier nucléotide du dernier codon (GCG) de la séquence de la mellitine « G » a dû être modifié en « T » qui coïncide avec le premier nucléotide de l'enzyme BclI tout en conservant le même acide aminé qui est l'alanine. (ii) Pour respecter le même cadre de lecture en ayant effectué le changement du nucléotide précédent ; l'ajout d'un nucléotide juste en aval de la séquence de BclI était nécessaire. Ce nucléotide est à ajouter après les bases C et A. Deux possibilités se présentaient, soit ajouter un T/C pour avoir un codon qui code pour l'histidine (H) ou A/G et avoir comme acide aminé la Glutamine (G). Notre choix s'est orienté vers la Glutamine (CAA ou CAG), car l'histidine possède un noyau pentavalent et aromatique et risque de provoquer un encombrement alors que la glutamine est plus flexible dans l'espace.

Finalement, le gène synthétique, encadré par les deux enzymes de restriction PstI et NotI (respectivement en 5' et 3') a été dessiné comme suit (Figure 73).

En position N terminale du gène synthétique, immédiatement après le site PstI, se trouve la séquence du peptide signal de la mellitine (Tessier *et al.*, 1991). Le site de restriction de l'enzyme BclI se trouve en aval de la séquence de la mellitine. Pour respecter le cadre de lecture, le nucléotide « A » a dû être ajouté juste en aval de la séquence de BclI. Par la suite, la séquence de la protéine A27 dans son intégralité (LSDV117, AAK85078.1) est ajoutée.

Enfin, en position C terminale, il a été décidé de placer une queue polyhistidine (six résidus d'histidine) constituant un tag permettant une purification ultérieure sur colonne spécifique suivie du site de restriction de l'enzyme NotI.

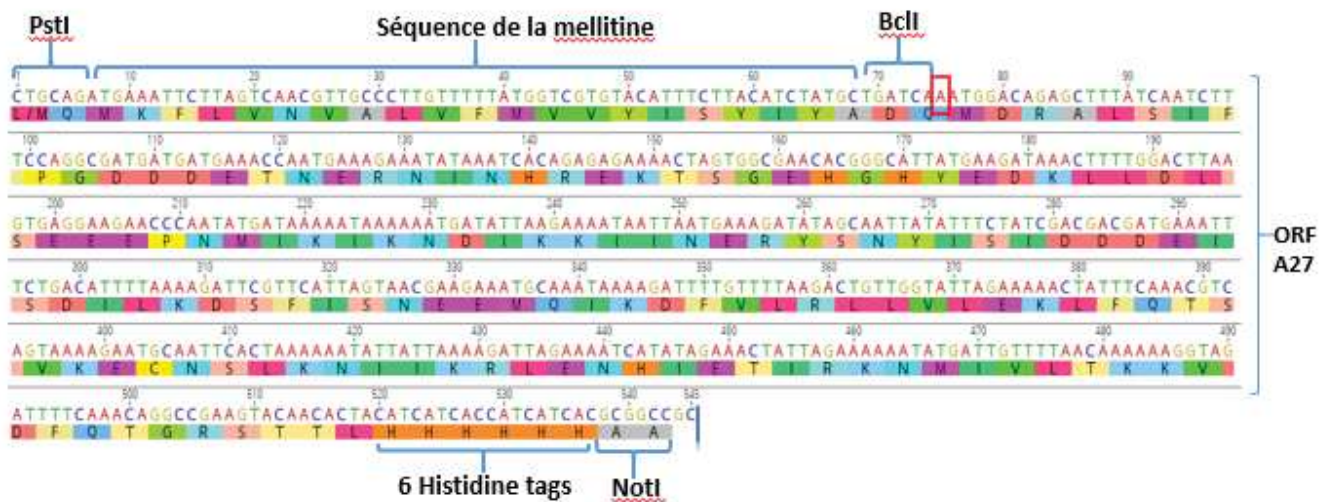


Figure 73. Séquence nucléotidique et en acides aminés du gène synthétique A27 à insérer dans le vecteur pUC.

- pBacPAK8

Le plasmide pBacPAK8 est un vecteur de transfert, de 5.5Kb, utilisé dans le kit (BacPAKTMBaculovirus Expression System, Clontech, France). Il possède un site de clonage multiple (MCS) permettant l'insertion du (des) gène(s) d'intérêt sous le contrôle du puissant promoteur tardif de la polyhedrin, en vue de l'expression de gènes étrangers en cellules d'insectes à un niveau très élevé. En aval du promoteur et du MCS, se trouve le signal de polyadénylation qui permet l'ajout d'environ 250 adénosines à l'extrémité 3' de l'ARN transcrit augmentant ainsi sa stabilité et améliorant sa traduction en protéines (Figure 74).

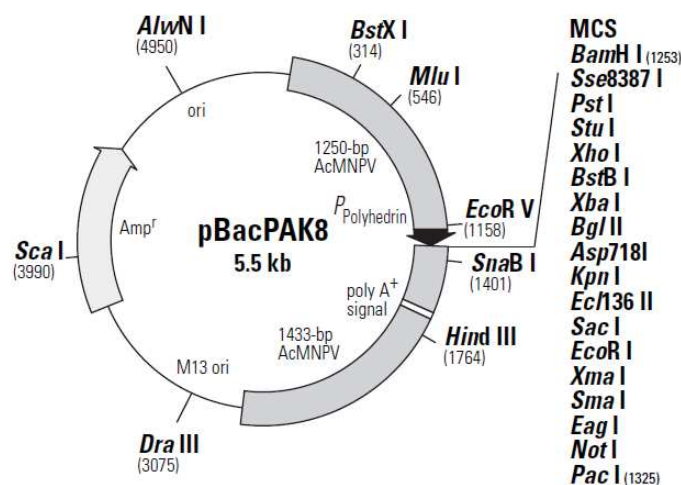


Figure 74. Carte de restriction du vecteur de transfert pBacPAK8 (Clontech, France).

➤ Double digestion des plasmides

La première étape du clonage est une double digestion simultanée par PstI (Biolabs, Ozyme, France) et NotI (Biolabs, Ozyme, France) des vecteurs pUC-A27 et pBacPAK8 réalisé dans le tampon Cut Smart (Biolabs, Ozyme, France) pendant 1 heure à 37°C laissant des extrémités cohésives. Suite au dépôt des produits PCR sur gel d'agarose à 1,5%, une découpe des bandes présentes à la taille attendue sur le gel suivie de leur purification avec le kit QIA Quick Gel extraction Kit (Qiagen, France) ont été réalisées. Les bandes purifiées sont ensuite dosées au Nanodrop (ND-1000, ThermoScientific, France).

1.1.2 Ligation insert/vecteur

Une ligation entre l'insert A27 additionné de la séquence de la mellitine et des histidines tags provenant de la double digestion du pUC-A27 et du vecteur de transfert pBacPAK8 est réalisée selon deux ratios: 6/1 et 8/1 avec la T4 DNA ligase (Biolabs) à 16°C pendant une nuit. Des ratios élevés étaient à privilégier vu que l'insert n'avait pas une taille importante. Des contrôles de ligation ont été inclus comme décrit précédemment dans le chapitre 2.

1.1.3 Transformation bactérienne

Les bactéries DH5alpha rendues compétentes sont préparées selon le protocole suivant : les bactéries sont d'abord étalées sur une gélose LB-Broth sans antibiotique à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le lendemain, une pré-culture à partir d'une colonie est réalisée dans 5 ml de LB à 37°C pendant 16 heures à 220 rpm. 1 ml de la pré-culture obtenue est mis en culture dans 100ml de LB pendant environ 2 heures jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,5 à 0,6. La culture est ensuite centrifugée à +4°C pendant 15 minutes à 3500 rpm et le culot est resuspendu dans 3 ml de TSS (0,17 g LB-Broth, 1g PEG6000 et 0,5 ml de MgCl2 1M) et 0,5 ml de DMSO froid. Le mélange est ensuite réparti dans des cryotubes et sera conservé à -80°C. Par ailleurs, le niveau de compétence des bactéries DH5α a été évalué avec les plasmides pBacPAK8 et pUC-A27. L'efficacité de transformation s'exprime en nombre de transformants (en cfu) par µg de DNA plasmidique selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de colonies}}{10\text{pg ADN}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{Volume total en } \mu\text{l}}{\text{X } \mu\text{l ensemencés}} \times \text{Facteur de dilution}$$

Le nombre de colonies obtenues après cette transformation test est très important (>200 colonies) indiquant la bonne compétence des bactéries DH5 α obtenue après le traitement par DMSO.

Les produits de ligation de chacun des deux ratios (pBacPAK8/A27) ont été par la suite transformés selon le même protocole décrit dans le chapitre 2 (p 196). Les produits de transformation sont étalés sur des boîtes d'agar LB avec ampicilline à 50 μ g/ml incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Le vecteur pBacPAK8 digéré et non digéré ont respectivement servi de contrôle négatif et positif de cette étape de transformation.

1.1.4 Criblage des colonies

Les colonies ayant poussé suite à la transformation des produits de ligation sont criblées par pools de cinq colonies par une PCR avec la One Taq Quick Master Mix with GC buffer (Biolabs, Ozyme, France) visant la recherche du gène A27 avec le couple d'amorces Bac1 et Bac2 (Tableau 27) retrouvé de part et d'autre du MCS (Multiple cloning site) du vecteur de transfert pBacPAK8.

Le vecteur pBacPAK8 et de l'eau ont respectivement servi de témoin positif et négatif de la réaction PCR. Le cycle d'amplification ainsi que les séquences des amorces utilisées sont notés dans le tableau 27.

Tableau 27. Séquences des amorces et conditions d'amplification permettant le criblage des colonies transformées.

Amorces	Séquence nucléotidique (5'-3')	Conditions d'amplification (30 cycles)		
Bac1	AACCATCTCGCAAATAAATA	Dénaturation initiale	94°C	30 secondes
		Dénaturation	94°C	30 secondes
Bac2	ACGCACAGAATCTAGCGCTT	Hybridation	55°C	30 secondes
		Elongation	68°C	1 minute
		Elongation finale	68°C	5 minutes

Les clones bactériens détectés PCR positifs par la présence sur gel d'agarose d'une bande à la taille attendue (730 bp) sont sélectionnés et placés en pré-culture dans 5 ml LB additionné d'ampicilline à une concentration de 100 μ g/ml pendant toute la nuit à 37°C et 220 rpm, en vue

d'une extraction de l'ADN plasmidique réalisée avec le kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, France) en suivant les instructions du fabricant.

Les clones ont été par la suite quantifiés au Nanodrop (ND-1000, ThermoScientific, France). Les extraits plasmidiques ont été ré-analysés par la même PCR Bac1Bac2 suivi d'un séquençage pour vérifier la présence et l'orientation de l'insert.

1.1.5 Séquençage

L'ADN du plasmide pBacPAK8/A27 obtenu a été séquençé par la méthode de Sanger avec le Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) sur séquenceur capillaire ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) au service de séquençage à l'Institut Pasteur de Tunis à l'aide du couple d'amorces Bac1/Bac2. Les séquences obtenues sont analysées et alignées grâce au logiciel Geneious (<http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012).

1.2. Clonage des gènes L1R, A33R et B5R dans le vecteur de transfert pBacPAK8

Le clonage de ces trois gènes dans le vecteur de transfert du baculovirus a nécessité la double digestion BclI/NotI du vecteur pBacPAK8/A27 obtenu dans la partie 1 en vue de récupérer le vecteur de transfert pBacPAK8 additionné de la séquence de la mellitine. Cependant, comme nous l'avons expliqué plus haut, la présence de la séquence de l'enzyme de restriction BclI au sein de la séquence de l'insert L1R a nécessité la réalisation d'une mutagenèse dirigée avant de procéder au clonage avec le kit « QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit », Agilent technologies.

Cette mutagenèse dirigée a débuté par le design sur le site d'Agilent (www.agilent.com/genomics/qcpd) d'un couple d'amorces nommé FL1R_Mut et RevL1R_Mut portant la mutation désirée consistant au changement du nucléotide T par le nucléotide C éliminant donc la séquence du site BclI.

FL1R_Mut (45 mer) : 5'-catatgattcacttactctga**c**caaaaagcatatgttcaggat-3'

RevL1R_Mut (45 mer) : 5'-atcctggaacatatgctttt**g**tcaggagtaagtgaatcatatg-3'

Par la suite, une PCR a été réalisée avec ce couple d'amorces sur le plasmide pCIneoL1R (clone 1, produit au chapitre 2) selon le cycle d'amplification indiqué dans le tableau 28.

Tableau 28. Protocole d'amplification par PCR de l'ADN du clone pCIneo/L1 avec le couple d'amorces FL1R_Mut et RevL1R_Mut.

Cycles	Température	Durée
1	95°C	2 minutes
18	95°C	20 secondes
	60°C	10 secondes
	68°C	3 minutes 15 secondes
1	68°C	1 minute

Suite à cette PCR, le reste du protocole a été suivi en conformité aux indications du fabricant avec une digestion par l'enzyme DpnI et une transformation avec les bactéries XL-10 Gold.

Suite à la transformation, une centaine de colonies sont obtenues. Huit colonies ont été sélectionnées pour la vérification de la suppression du site BclI par séquençage avec les amorces PrF PCIneo-ChimInt/ PrRevSeqInspCIneo couvrant la zone incluant le site BclI.

En contrôle négatif pour le séquençage, était inclus le plasmide parental pCIneoL1R. Suite à ce séquençage, une sélection finale de deux colonies numérotées 1 et 8, porteuses du plasmide pCIneoL1RMut est réalisée. En parallèle, l'ADN de ces colonies a été extrait par le kit d'extraction GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, France).

Une seconde étape intermédiaire découle du choix du site BclI dont l'enzyme de restriction est sensible à la méthylation et qui oblige donc à produire les ADN plasmidiques dans des bactéries déficientes en méthyltransférases qui sont les bactéries NEBiolabs C2925 dam-/dcm- (dam methylation sensitivity, dcm methylation sensitivity)

L'ADN pBacPAK8-A27 a dû être amplifié au sein de cette bactérie, et pour cela une transformation préalable a été réalisée selon le protocole décrit précédemment (cf chapitre 2), avec vérification par séquençage de la conformité de la séquence du plasmide produit par les deux couples amorces Bac1/Bac2 et PrFA27Interm/PrRevA27Interm permettant la lecture du gène inséré au moins deux fois.

Suite aux deux étapes intermédiaires décrites ci-dessus, nous sommes passés au clonage proprement dit des gènes L1R, A33R et B5R dans le vecteur de transfert pBacPAK8, cela est réalisé en plusieurs étapes communes aux trois gènes : (i) production des inserts par PCR (ii)

double digestion insert/vecteur par BclI/NotI (iii) Ligation insert/vecteur puis transformation (iv) criblage des colonies par PCR (v) séquençage.

1.2.1. Production des inserts L1R, A33R et B5R

➤ Design des amorces

Le design des amorces utilisées pour la production des trois gènes d'intérêt est réalisé en fonction de la partie du gène choisie pour être produite. Cela a nécessité une caractérisation structurale *in silico* des gènes (chapitre 1) en combinaison d'une étude bibliographique qui ont abouti à des prises de décision comme l'exclusion de la partie transmembranaire et l'ajout du tag His en position C ou N terminale. La liste des amorces dessinées est représentée dans le tableau 29.

Tableau 29. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la production des inserts L1R, A33R et B5R.

Amorces	Séquence nucléotidique
L1FwBac	5'-ATATAATGATCAATGTTGGAGCAGCCGCAAGT-3'
L1RevBac	5'-ATATAAGCGGCCGCATGATGGTGATGATGGTGTTGATATCCGTATCCCGAA-3'
FA33Bac	5'-CGCCGATCAACATCATCATCATCATCAATAATACATGTGAATTA-3'
RevA33Bac	5'-CGCCGCGGCCGCAAAAAAGATCTTACAC-3'
FB5Bac	5'-ATATAATGATCAACACCATCATCACCATCATGTGATTAAATAAATG-3'
RevB5Bac	5'-ATATATGCGGCCGCTCTGTAAACATTATTTATTTG-3'

(en rouge : nucléotides stabilisant les amorces, en bleu : enzymes de restriction, en jaune : nucléotide ajouté pour le respect du cadre de lecture, en vert : séquence des six histidines tags)

- Amorces L1

Suite à l'analyse structurale *in silico* de la protéine LSDV60 réalisée au chapitre 1 ainsi qu'à des analyses bibliographiques, nous avons identifié un domaine transmembranaire hydrophobe pouvant poser un problème de solubilité, nous avons donc pris l'option de déléter la portion C terminale de cette protéine et d'exprimer que la portion extracellulaire dans le système baculovirus. Pour cela, des amorces sens (Forward) et anti-sens (Reverse) ont été dessinées de part et d'autre de la partie extracellulaire d'intérêt.

D'autre part, nous avons fait le choix d'ajouter en position C terminale la séquence de six histidines tags nécessaires à une purification ultérieure. Pour ce fait leurs séquences ont été

ajoutées à l'amorce. Pour un clonage directionnel dans le vecteur de transfert du baculovirus, les séquences des deux enzymes de restrictions BclI (TGATCA) et de NotI (GCGGCCGC) ont été ajoutées respectivement à l'amorce Forward et l'amorce Reverse. Juste en aval de la séquence du site BclI (amorce forward), le nucléotide A a été ajouté correspondant au nucléotide ajouté au gène synthétique permettant de respecter le cadre de lecture.

Enfin des nucléotides A et T ont été ajoutés en position 5' des amorces Forward et reverse pour augmenter la stabilité des amorces. Les amorces forward et reverse sont respectivement nommées L1FBac et L1RevBac (Tableau 29).

- Amorces A33

Après avoir analysé *in silico* la séquence de la souche LSDV122 permettant de délimiter les différents domaines de la protéine A33 (Chapitre 1), nous avons choisi d'exprimer seulement sa partie extracellulaire en éliminant son domaine transmembranaire et sa partie C terminale. Pour cela, des amorces sens et anti-sens ont été dessinées de part et d'autre de la partie extracellulaire d'intérêt.

Ayant choisi d'insérer des Histidines Tags en partie N terminale de la protéine, la séquence de ces six histidines a donc été ajoutée à la partie 5' de la séquence de l'amorce Forward. Afin de faciliter le clonage dans le pBacPAK8, les séquences de BclI et de NotI ont été ajoutées respectivement à l'amorce Forward et à l'amorce Reverse.

Juste en aval de la séquence du site BclI (amorce forward) et pour respecter le cadre de lecture, le nucléotide A a été ajouté (cf paragraphe 1.1). Enfin aux extrémités 5' des amorces Forward et Reverse, ont été ajoutés des nucléotides de cytosine (C) et guanine (G) pour augmenter la stabilité des amorces. Ces amorces ont été ensuite contrôlées pour la formation d'auto-dimères, d'hétérodimères et d'hairpin loop sur « oligoanalyzers » (Owczarzy *et al.*, 2008). Les amorces Forward et Reverse sont respectivement nommées FA33Bac et RevA33Bac (Tableau 29).

- Amorces B5

Suite à l'analyse *in silico* de la protéine LSDV141 (Chapitre 1), nous avons fait le choix d'une part d'exclure le domaine transmembranaire de notre construction pour prévenir la rétention membranaire, ainsi que le peptide signal natif pour n'exprimer que l'ectodomaine de la

protéine. Pour cela, des amorces sens (Forward) et anti-sens (Reverse) ont été dessinées de part et d'autre de la partie extracellulaire d'intérêt.

D'autre part, nous avons pris l'option d'ajouter en position N terminale la séquence des six histidines tags qui a été donc ajouté à la position 5' de l'amorce forward. Ensuite, pour un clonage dirigé dans le vecteur de transfert du baculovirus, les séquences de BclI et de NotI ont été ajoutées respectivement à l'amorce Forward et l'amorce Reverse. Juste en aval de la séquence du site BclI (amorce forward), le nucléotide A a été ajouté pour respecter le cadre de lecture. Enfin des nucléotides A et T ont été ajoutés en position 5' des amorces Forward et reverse pour augmenter la stabilité des amorces. Les amorces forward et reverse sont respectivement nommées FB5Bac et RevB5Bac (Tableau 29).

➤ Production des inserts par PCR

Trois PCRs avec l'enzyme Cloned Pfu polymérase ayant une haute fidélité ont été réalisées pour l'amplification des domaines extracellulaires des inserts L1R, A33R et B5R respectivement avec les amorces L1FwBac/L1RevBac (matrice pCIneoL1Rmut), FA33Bac/RevA33Bac (matrice KS1) et FB5Bac/RevB5Bac (matrice pCIneoB5R) concentrées à 20 uM selon les programmes représentés dans le tableau 30. Il faut noter que pour l'amplification des trois inserts, l'ajout de 5mM de Mg²⁺ au mix PCR a été déterminant pour l'optimisation des PCR.

Tableau 30. Cycles d'amplifications PCR permettant d'amplifier la partie extracellulaire des gènes L1R, A33R et B5R.

Cycles (30 cycles)	L1R	A33R	B5R
Dénaturation	94°C	94°C	94°C
initiale	2 minutes 15sec	2 minutes	2 minutes
Dénaturation	94°C 45 sec	94°C 45 sec	94°C 30 sec
Hybridation	56°C 45 sec	55°C 45 sec	56°C 45 sec
Elongation	72°C 2 min	72°C 1 min	72°C 2 min
Elongation	72°C	72°C	72°C
finale	7 minutes	5 minutes	7 minutes
Taille amplicon	550pb	400pb	500pb

Les trois amplicons d'intérêt correspondant à la taille attendue ont été obtenus suite au dépôt du produit d'amplification sur gel agarose 1%, puis découpés et purifiés avec le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, France).

1.2.2. Double digestion du vecteur pBacPAK8/A27 et des inserts produits par BclI/NotI

Pour récupérer le vecteur de transfert pBacPAK8 additionné de la séquence de la mellitine, le vecteur pBacPAK8/A27 produit en première partie et transformé en bactéries C295 dam-/dcn- (condition indispensable pour permettre une digestion BclI) a été doublement digéré par BclI/NotI. Les trois inserts produits ont été aussi doublement digérés par les mêmes enzymes. Pour cela deux stratégies différentes ont été utilisées pour cette double digestion :

- Stratégie 1: Digestion des inserts L1R et B5R produits par PCR ainsi que le vecteur pBacPAK8/A27 d'abord avec l'enzyme NotI (Biolabs, Ozyme, France) dans le tampon 3.1 (Biolabs) sur la nuit à une température de 37°C suivi d'une digestion dans le même tampon avec BclI (Biolabs) à 50°C pendant 2h00.
- Stratégie 2 : Digestion de l'insert A33R produit par PCR et le vecteur pBacPAK8/A27 d'abord avec NotI en tampon 3.1 pendant 1 heure à 37°C, par la suite une inactivation est réalisée à 65°C pendant 20 minutes. Une précipitation en acétate de sodium/éthanol a été réalisée selon le protocole détaillé en annexe 2. Le produit de précipitation est par la suite digéré par la deuxième enzyme BclI (2 unités) pendant 1 heure à 50°C.

Les produits de digestion sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier s'ils ont bien été doublement digérés. Les deux bandes d'intérêt sont ensuite découpées à partir du gel, purifiées puis quantifiées.

1.2.3. Ligation/Transformation

Une ligation entre les différents inserts et le vecteur de transfert doublement digéré est réalisée avec la T4 DNA ligase (Biolabs, Ozyme, France) à une température de 16°C pendant une nuit selon les ratios suivants :

- L1R et B5R : Ratios 3/1, 5/1, 7/1 et 10/1
- A33R : Ratios 8/1 et 10/1

Par la suite, les différents produits de ligation ont été transformés avec les bactéries DH5α pour le produit de ligation A33/pBacPAK8-A27 et les bactéries NEB10b plus (NEB, France) pour B5-L1/pBacPAK8-A27 selon le protocole décrit précédemment (Chapitre 2). Les colonies obtenues ont été criblées par PCR en vue de mettre en évidence l'insert d'intérêt au sein du vecteur de transfert du baculovirus.

1.2.4. Criblage par PCR

Le criblage des colonies a été réalisé au moyen de "colony-PCR" selon le même protocole décrit au chapitre 2. Les colonies issues de la transformation des trois produits de ligation A33/pBacPAK8 et B5/pBacPAK8 ont été sujettes à une PCR avec le couple d'amorces Bac1/Bac2 retrouvés de part et d'autre du MCS du vecteur pBacPAK8 mettant en évidence la présence de l'insert. Pour le produit pBacPAK/L1, une PCR est réalisée avec le couple d'amorces pFL1rInterm/Bac2 à cheval entre l'insert et le vecteur de transfert. Les différents cycles d'amplification sont détaillés dans le tableau 31.

Tableau 31. Cycles d'amplifications utilisés pour le criblage des colonies issues de la transformation des trois produits de ligation L1/pBacPAK8, A33/pBacPAK8 et B5/pBacPAK8.

Construction	Amorces	Conditions d'amplification (30 cycles)	Taille amplifiée
A33R	Bac1/Bac2	94°C 2 mn	680 pb
		94°C 30 secondes	
		55°C 30 secondes	
		68°C, 1 mn	
		68°C, 5 mn	
L1R	pFL1rInterm/ Bac2	95°C 5mn	351 pb
		94°C 1 mn	
		55°C 1mn	
		72°C 1 mn	
		72°C 7 mn	
B5R	Bac1/Bac2	95°C 5mn	745 pb
		94°C 1 mn	
		50°C 1mn	
		72°C 1 mn	
		72°C 7 mn	

Les clones bactériens détectés positifs par PCR sont sélectionnés et placés en pré-culture dans 5 ml de LB + ampicilline 100 µg/ml O/N à 37°C et 220 rpm. Une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée grâce au kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, France).

1.2.5. Séquençage

Le séquençage des clones positifs pBacPAK8-A33 est réalisé avec les amorces Bac1 et Bac2 au service de séquençage de l'Institut Pasteur de Tunis selon le même protocole décrit précédemment pour le gène A27. Le séquençage des plasmides issus des colonies pBacPAK8-L1R a été réalisé avec deux couples d'amorces Bac1/Bac2 et PrFL1RInterm/PrRevL1R.2, et pour les colonies pBacPAK8-B5R avec les amorces Bac1/Bac2 et PrFB5RInterm/PrRevB5RInterm par GENEWIZ, UK (ancien Beckman Coulter Genomics).

2. Production des baculovirus recombinants

Les quatre constructions plasmidiques obtenus dans la première partie, représentés par le vecteur de transfert du baculovirus pBacPAK8 exprimant les 4 gènes codant pour les protéines L1, A27, A33 et B5 vont servir de matrice pour la production des baculovirus recombinants. Ces plasmides cotransfectés avec de l'ADN viral linéarisé du baculovirus dans des cellules d'insectes nous permettra par le phénomène de recombinaison homologue d'obtenir les baculovirus recombinants.

Le surnageant de cotransfection est considéré comme étant le stock viral initial (P1) qui sera ensuite amplifié pour une production à grande échelle. Pour une amplification efficace, un faible MOI (Multiplicity of infection : nombre de particules virales/nombre de cellules) est requis. Dans la mesure du possible, le principe directeur qui a été suivi a été de limiter les passages successifs afin de limiter la probabilité d'apparition de mutations dans le génome des recombinants baculovirus.

Les virus recombinants seront ensuite titrés par la technique MTT. Le protocole suivi suit les instructions du fabricant du kit BacPAK™ Baculovirus Expression System (Clontech, France) (Figure 71).

2.1. Etape de transfection

Cette première étape de transfection est suivie en conformité avec le protocole du fabricant ("construction of a recombinant viral expression vector" p19-p20, BacPAK™ Baculovirus

expression system User Manual) de façon quasi identique pour les 4 constructions et recombinants.

Brièvement, pour la transfection des vecteurs de transfert pBacPAK8/L1R, pBacPAK8/A27, pBacPAK8/A33, et pBacPAK8/B5R, une concentration de 1.10^6 cellules d'insectes Sf9 (Agate Bioservices, Alès, France ou UMR CMAEE, France) ou Sf21 (Clontech, France) (pour pBacPAK8/B5R) par puits sur une plaque de culture de type P6 (Corning Costar, France) en milieu BacPAK Grace's Basic Medium (Gibco, France) est préparée.

Après une incubation de 1 à 2 heures à 27°C, le milieu est remplacé avec le même type de milieu puis incubé 10 à 30 minutes à température ambiante. Durant la phase d'incubation, chacun des différents plasmides de transfert (pBacPAK8/A27, pBacPAK8/A33, pBacPAK8/L1R et pBacPAK8/B5R) est mis en contact avec l'ADN viral linéarisé du baculovirus (BacPAK6 digéré par Bsu36 I, kit BacPAKTMBaculovirus Expression System (Clontech, France). Ensuite la Bacfectin (agent transfectant ou réactif de transfection) est ajoutée à chaque tube puis le mélange ADN-bacfectin est incubé 15 minutes à température ambiante, le mélange est enfin ajouté au centre des puits.

La plaque est par la suite incubée pendant 5 heures à 27°C, puis 1,5 ml de milieu de Grace complet additionné d'antibiotiques (Anti-anti, Invitrogen, France) est ajouté à chacun des puits. Finalement la plaque est incubée pendant 5 jours à 27°C.

Trois types de contrôle négatifs ont été inclus lors de cette transfection visant à établir un meilleur suivi comparatif visuel vis-à-vis des puits transfectés ; qui consistent au milieu BacPAK grace avec et sans Bacfectin ainsi que du milieu complet additionné de sérum de veau fœtal sans Bacfectin.

Cinq jours après, le surnageant de chacun des puits à tester est récolté et transféré dans un tube stérile puis conservé à +4°C. Outre les réactifs utilisés lors de la transfection, ces surnageants sont susceptibles de contenir les virus recombinants produits par recombinaison homologe entre l'ADN viral du baculovirus et le vecteur plasmidique de transfert au sein des cellules transfectées, ceci correspond au **passage n°1 ou P1**.

2.2. Amplification virale

2.2.1. Amplification du baculovirus recombinant A27

L'amplification du passage 1 du baculovirus recombinant obtenu suite à la transfection du plasmide pBacPAK8/A27 est réalisée au sein du laboratoire de Microbiologie Moléculaire, Vaccinologie et Développement Biotechnologique de l'Institut Pasteur de Tunis disposant de système de culture de cellules d'insectes en suspension décrit comme suit.

Le baculovirus recombinant produit en passage P1 est amplifié en erlenmeyer stérile de 125ml (Dutscher, France) avec 2.10^6 cellules Sf9/ml dans 20 ml de volume final de milieu Sf-900 II-SFM (Serum Free Media) (Gibco, France). Un volume de 500 μ l du passage P1 est ajouté aux cellules et le mélange est incubé pendant 72 heures à 27°C sous agitation (150 rpm). Après 72 heures, la viabilité des cellules d'insectes infectées est évaluée par comptage en cellule de Malassez au bleu de trypan (CI23850, LABOSI). Ensuite, le contenu de l'erlenmeyer est centrifugé à 1200 rpm pendant 5 minutes à +4°C, le surnageant est récupéré puis 2% de sérum de veau fœtal est ajouté pour une stabilisation du virus: le mélange constitue le **passage P2**, il correspond à l'amplification du P1 et est supposé contenir un titre viral plus élevé que celui-ci.

Le passage P2 est amplifié à son tour de la même façon que le passage P1 à l'exception prêt que le volume final contenu dans l'erlenmeyer est de 200 ml de milieu Sf-900 II avec 500 μ l du passage P2. De la même manière le mélange est incubé pendant 72 heures puis un comptage de la viabilité cellulaire est réalisé. Suite à ceci, une centrifugation à 1200 rpm à +4°C pendant 5 minutes est effectuée puis 2% de SVF est ajouté au surnageant : c'est le **passage P3**. C'est à partir de ce passage P3, après avoir vérifié la présence du baculovirus recombinant par PCR et le titre de la production que la production de la protéine d'intérêt est réalisée.

2.2.2. Amplification des baculovirus recombinants B5, L1 et A33

Contrairement à l'amplification du baculovirus recombinant A27 qui est réalisée en système de culture sous agitation, l'amplification des baculovirus recombinants L1, A33 et B5 s'est faite en système de culture statique en amplifiant les différents passages dans des plaques P6 ou dans des flasques de culture T25 ou T75.

Brièvement, à J-1 de l'infection, une distribution des cellules en tapis est réalisée (sf9 ou sf21 selon les recombinants) de façon à obtenir après 24h00 une quasi-confluence de 80-90% (puits

de P6: 1×10^6 , T25: 3.5×10^6 , T75 : 7×10^6). Le lendemain, jour de l'infection, le milieu de culture est éliminé et le support est rincé pour éliminer le surnageant.

Par la suite, une inoculation avec un volume du passage correspondant (puits de P6: 500ul, T25: 1 ml, T75 : 3ml) est réalisée. Soit l'inoculum est suffisant en volume pour permettre de recouvrir entièrement le tapis soit il est rallongé avec du milieu de culture pour atteindre ce volume. L'inoculum est incubé pendant minimum 2 heures à 27°C avec agitation manuelle toutes les 15 minutes. A la fin de l'incubation, le milieu de Grace complet (milieu de Grace supplémenté additionné de 5% de SVF) ou le milieu Sf-900™ II SFM est ajouté et les cellules sont observées quotidiennement. L'interruption de l'infection a lieu lorsque les cellules du tapis ne sont plus viables. Le surnageant est alors récolté ainsi que le tapis (gratté au moyen d'un cell scraper ou pipette), centrifugé (1500 rpm, 10mn) et stocké à 4°C. Ce surnageant est ensuite utilisé au passage suivant.

Le tableau 32 ci-dessous résume les différents passages dans différents supports effectués pour l'amplification des trois recombinants L1, A33 et B5.

Tableau 32. Synthèse des différents passages et supports utilisés pour l'amplification des baculovirus recombinants. P6 plaque 6 puits, T25 flasque de 25cm², T75, flasque de 75cm²

Recombinant	Passage	Support plastique
L1	P1 → P2	P6
	P2 → P3	P6
	P3 → P4	T25
	P4 → P5	T75
A33	P1 → P2	T25
	P2 → P3	T75
B5	P1 → P2	P6
	P2 → P3	P6
	P3 → P4	T25

2.3. Vérification de la présence du baculovirus recombinant dans les cultures par PCR

Pour vérifier que le baculovirus recombinant A27 et A33 ont bien été produits et sont présents dans les passages successifs, une PCR avec le couple d'amorces Bac1 et Bac2 retrouvés de part et d'autre du MCS du vecteur de transfert pBacPAK8 est réalisé sur les surnageants de culture extraits par le kit d'extraction Viral Gene-Spin™ viral DNA/RNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Tunisie). Le vecteur de transfert pBacPAK8/A27 et de l'eau ont respectivement servi de témoin positif et de contrôle négatif.

Alternativement pour les baculovirus recombinants B5 et L1, les surnageants des différents passages sont testés directement en PCR après avoir procédé à une lyse pendant 1 heure à 60°C dans une solution de lyse (10mM Tris HCl à pH8.3, KCl (50mM), MgCl₂ (2.5mM), Tween20 (0.5%, Triton-X100 (0.5%), protéinase K (recombinant PCR grade, Roche, France, 60ug/ml). Les lysats cellulaires obtenus sont soumis à une dénaturation (15mn/95°C) pour enfin être placés dans la glace avant de procéder aux tests PCR avec le couple d'amorces Bac1/Bac2. Les PCR sont réalisés selon le cycle d'amplification suivant :

Tableau 33. Cycles d'amplification PCR (30 cycles) des baculovirus recombinants des différents passages avec les amorces Bac1 et Bac2.

Dénaturation initiale	94°C 2 min
Dénaturation	94°C 30 sec
Hybridation	55°C 30sec
Elongation	72°C 30sec
Elongation finale	72°C 5 min

2.4. Titrage par la méthode MTT

Le titrage du stock de baculovirus a concerné le recombinant A27 (passage 3), il est nécessaire pour avoir une MOI précise dans le but de produire la protéine d'intérêt. Ce titrage est performé par une technique utilisant la viabilité cellulaire basée sur le clivage du noyau tetrazolimum du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, USA) par une déshydrogénase mitochondriale retrouvée au sein des cellules viables. Cette enzyme

résulte en la libération de cristaux de magenta insolubles permettant la quantification objective des cellules viables à l'aide d'un spectrophotomètre (Graentzdoerffer *et al.*, 2003).

La première étape de ce titrage est l'obtention d'une croissance exponentielle de cellules d'insectes à une viabilité dépassant les 95%. Pour ce fait, une suspension cellulaire de Sf9 préparée à 2.10^6 cellules / 5 ml de milieu Sf-900 II, en présence de 0,05% de gentamycine (Sigma, France) est réalisée. Un volume de 50 µl/puits est réparti en plaque 96 (plaque 1 : suspension cellulaire) (Nunc, France) en duplicat.

La deuxième étape consiste en la préparation d'une dilution au 1/100 de la suspension virale à titrer. Dans une plaque de type P96 (plaque 2), la suspension virale diluée est ajoutée en colonne 1 à raison de 100 µl /puits. Ensuite, de la colonne 2 à la colonne 12, un mélange de 90 µl de milieu Sf-900 II avec gentamycine est déposé dans chaque puits. Une dilution sérielle de colonne en colonne est réalisée en prenant 10 µl des puits de la colonne 1 vers les puits de la colonne 2 pour obtenir la dilution 10^{-1} et ainsi de suite jusqu'à la colonne 12 pour atteindre la dilution 10^{-12} du virus. Enfin, un volume de 10 µl de chacune de ces colonnes est transféré aux colonnes correspondantes de la plaque P96 contenant la suspension cellulaire (plaque 1). La plaque est alors incubée pendant 6 jours à 27°C.

Après 6 jours d'incubation à 27°C, un volume de 10 µl d'une solution de diméthylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, France) à 5g/l est ajouté à chacun des puits de la plaque P96 puis incubé pendant 2 heures à 27°C sous agitation douce. Par la suite, la plaque est centrifugée à 2000 g pendant 10 minutes et le surnageant est éliminé. Un volume de 50 µl de DMSO (Diméthylsulfoxyde) (Sigma, France) permettant la solubilisation des cristaux de magenta (produit du clivage du noyau tetrazolimum du MTT) est ajouté à chaque puits suivi d'une mesure d'absorbance à 570 nm (LAB systems Multiskan, RC).

Pour déterminer le TCLD₅₀, les données obtenues à partir des absorbances sont traitées par le logiciel Sigmaplot 5.0 (SPSS, USA) en utilisant l'équation suivante :

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left[\frac{D}{D_0} \right]^b}$$

Y représente l'absorbance, Y₀ l'absorbance minimale (concentration minimale de cellules viables détectée), a est l'absorbance maximale, D est la dilution, D₀ est la dilution pour laquelle

on a obtenu une réponse de 50% et b est un facteur de dénivellation. Enfin, pour obtenir le titre viral $TCLD_{50}/ml$, la formule suivante est appliquée par le logiciel.

$$TCLD_{50}/ml = \frac{1}{D_0 V}$$

V est le volume de la dilution virale ajoutée à chaque puits.

3. Production de la protéine d'intérêt

La production des protéines en système BEVS a concerné pour l'instant la protéine A27 à partir du passage 3 du baculovirus recombinant pBacPAK8/A27 qui a été amplifié en système en suspension. Premièrement, il s'agissait de déterminer les conditions optimales de culture cellulaire (MOI, densité, temps) pour la production de la protéine d'intérêt, une optimisation a été donc nécessaire. Les différentes conditions choisies seront discriminées à l'aide d'une révélation de la protéine produite (sans purification) au moyen d'un anticorps anti-histidine après migration sur gel SDS PAGE et WB. Suite à cette optimisation, une production avec la condition choisie sera refaite à plus large échelle.

3.1. Production de la protéine sous différentes conditions (temps, MOI et densité cellulaire).

Pour que la production de la protéine d'intérêt se fasse dans les meilleures conditions, les cellules d'insectes doivent être infectées de façon synchrone nécessitant une forte multiplicité d'infection, MOI (multiplicity of infection). La densité cellulaire et le temps de récolte des cellules infectées sont aussi des facteurs importants.

Ces trois facteurs sont donc testés, avec des MOI de 5, 10 et 20, une densité cellulaire au moment de l'infection par ml de 1, 2 et 4 x 10⁶ de cellules. Enfin, le temps de récolte dépend de la lignée cellulaire choisie et de la protéine ciblée, ne sachant ni initialement si la protéine A27 était sensible ou non à la dégradation ni sa fenêtre d'expression en terme de temps, trois de temps de récolte 48, 72 et 96 heures post infection ont été choisis.

Cette optimisation est réalisée avec un volume donné du passage titré correspondant au nombre de particules virales permettant d'atteindre le MOI recherché (en appliquant la formule suivante : Volume inoculum (P3) = (Densité cellulaire x MOI x Volume final) / Titre viral).

Le volume de l'inoculum prélevé est lui-même complété pour atteindre un volume total de 2 ml. Ceci a été réalisé dans trois plaques P6 (24h, 48h, et 72h pour trois temps de récolte différents) dans 2 ml de milieu Sf-900 II par puits sous agitation à 27°C.

Pour chaque MOI, densité cellulaire et temps de récolte, la viabilité des cellules Sf9 infectées est estimée avec le bleu de trypan. Pour choisir la meilleure condition permettant la production de la protéine d'intérêt, le surnageant des différentes conditions a été récolté puis centrifugé. Une lyse cellulaire des différents culots est par la suite réalisée dans un tampon de lyse (0,1% Triton X100 Protease inhibitor cocktail PMSF (SIGMA, France) en PBS, pH 7,4). Le mélange est centrifugé à 10000 rpm pendant 10 minutes et le surnageant est récolté. Afin de choisir les meilleures conditions de culture pour la production protéique, des immunoblots sont effectués sur le surnageant de culture provenant des différentes conditions et sur les lysats cellulaires correspondants.

Pour ce faire, une migration des différents surnageants de culture et lysats cellulaires a été réalisée sur gel SDS-PAGE (6-15%) en conditions dénaturantes (migration sous une tension de 80 volts dans le gel de concentration pendant 15 minutes puis sous une tension de 120 volts dans le gel de séparation pendant 1h 30) en tampon de migration 1X (Biorad, France). Puis un électrotransfert des protéines séparées présentes sur le gel SDS-PAGE est réalisé sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Protran 0,45 um, GE healthcare, UK) sous une tension de 4000 mA pendant 1 heure. La membrane est ensuite incubée dans une solution de saturation composée de 3% de BSA (Bovine Serum Albumin) en tampon PBS1X-0,2% de Tween20 pendant la nuit à +4°C. Le lendemain, après trois lavages de la membrane avec du PBS1X – 1% Tween 20 sont réalisés, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante sous agitation dans une solution de 3% de BSA dans du PBS1X + 0,2% Tween 20 contenant l'anticorps monoclonal anti-Histidine produit chez la souris couplé HRP (peroxydase) (Sigma, France), dilué au 1/3000^{ème}. La révélation se fait par l'ajout d'un substrat chimio-luminescent de type ECL qui réagit avec l'anticorps secondaire couplé HRP pour métaboliser un produit photosensible 3-aminophtalate qui produit un signal visible sur un film auto-radiographique placé dans une cassette. Pour cela, la membrane est d'abord imbibée dans les deux tampons de détection ECLTM Western Blotting Reagents (GE Healthcare, UK) pendant quelques minutes puis transférée dans une cassette où sont mis en contact la membrane et un film (HyperfilmTM ECL W × L 5 in. × 7 i, Sigma, France) dans l'obscurité totale pendant environ 5 à 10 minutes.

Des tampons de révélation (Developer, 3ZBEK, GE Healthcare) et de fixation (Rapide fixer, EKNCY, GE Healthcare) sont appliqués au film sur lequel une lecture directe est faite.

3.2. Production de la protéine d'intérêt aux conditions optimisées

Une fois les conditions optimales de la production de la protéine A27 évaluées, celle ci est réalisée dans un volume final de 200 ml de Sf-900 II en erlenmeyer de 1 litre sous agitation à 27°C. Quotidiennement, la viabilité cellulaire des cellules d'insectes est estimée. Une fois le temps de production optimal atteint, le surnageant est récolté et clarifié (4°C, 15mn, 3500 rpm), il est ensuite filtré sous 0,22 µm et conservé à -80°C en vue d'une purification ultérieure.

3.3. Etape de purification

La purification de la protéine d'intérêt présente dans le surnageant de culture est basée sur le tag ou queue polyhistidine placé en position N terminale dans la protéine A27 recombinante. Elle est réalisée à l'aide d'une colonne d'affinité "Histidine-Trap"-1ml (GE healthcare, France). La préparation de la colonne suit les instructions du fabricant. Brièvement, la colonne est lavée avec 5 volumes (5ml) d'eau distillée puis équilibrée avec le même volume de Binding Buffer (20mM Sodium Phosphate, 0,5 M NaCl, 20mM Imidazole, pH 7,4) à une vitesse de 1 ml/min. Par la suite, le surnageant de culture (AP : avant purification) est filtré à travers la colonne à la même vitesse. La solution qui n'est pas retenue par la colonne est appelé « Flow Through (FT) ». Une fois que le volume total du surnageant de culture est filtré, la colonne est lavée avec 5 volumes de Binding buffer, le liquide qui passe à travers la colonne est nommé le « Wash (W) ». Enfin, une élution avec 6 volumes d'« Elution Buffer » (20mM Sodium Phosphate, 0,5 M NaCl, 500mM Imidazole, pH 7,4) est réalisée pour obtenir six différentes fractions de 1ml chacune (F1 à F6). Le taux de protéines totales dans les six fractions purifiées, l'Avant Purification, le FT et le W sont dosés par Nanodrop à 260/280 nm et par le kit Bradford (Bradford reagent: B69916, SIGMA) selon les recommandations du fabricant. Les différentes fractions purifiées sont analysées par Western Blot avec l'anticorps anti-histidine couplé à la peroxydase selon le protocole décrit précédemment.

3.4. Production de la protéine A27 avec anti-protéases

En cas où une dégradation de la protéine d'intérêt est observée, il a été envisagé d'ajouter des anti-protéases dans une nouvelle production protéique (réalisée en système statique : viabilité de 80%, 8.10^6 cellules/flasque, MOI de 10). Les cellules sont observées quotidiennement pour la présence d'un effet cytopathique. Le milieu de culture est récolté 72 heures post infection, par centrifugation à 2000 rpm pendant 15 minutes à +4°C puis filtré. A 50 ml de surnageant filtré, une tablette d'anti-protéases (Pierce Protease Inhibitor Tablets, Thermo-Scientific, France) est ajoutée pour avoir une concentration finale de 1X. Le mélange est ensuite purifié à l'aide d'une colonne His-Trap comme décrit précédemment, puis migré sur gel SDS-PAGE, et soumis à un Western Blot avec l'anticorps anti-Histidine et à une coloration au bleu de Coomassie selon les protocoles décrits précédemment (cf paragraphe 3.1). Brièvement, la saturation se fait avec 3% de BSA dans du tampon PBS1X-0,05% de Tween20 pendant une nuit à +4°C. L'anticorps anti-Histidine couplé HRP est dilué au 1/3000^{ème} et incubé pendant 1h30 à température ambiante, le complexe protéines-anticorps est révélé en présence du substrat de la peroxydase (DAB : 3,3'-Diaminobenzidine) dans une solution de PBS1X et du peroxyde d'hydrogène à 30%.

II. Résultats

1. Clonage en vecteur de transfert pBacPAK8 (Clontech, France)

1.1. Clonage du gène A27L dans le vecteur de transfert pBacPAK8

Suite à la double digestion PstI/NotI des deux vecteurs pUC-A27 et pBacPAK8, les produits de digestion ont fait l'objet d'une ligation avec deux ratios 6/1 et 8/1. Les produits de ligation ont par la suite été transformés par les bactéries DH5 α rendues compétentes.

A l'issue de cette transformation, 200 colonies ont été obtenues. Cinquante des 200 colonies ont été sélectionnées et testées par PCR (amorces Bac1/Bac2) par 10 pools de 5 colonies pour vérifier la présence de l'insert A27. Les 10 pools testés sont positifs par PCR Bac1/Bac2. Seules les colonies du pool 8 (colonies 36 à 40) ont été choisies pour être testées individuellement par la même PCR. Comme le montre la figure 75, un amplicon de 730 pb a été amplifié pour chacune des colonies confirmant la présence de l'insert. L'ADN plasmidique des colonies Clone 39 et Clone 40 a été extrait, dosé puis séquencé.

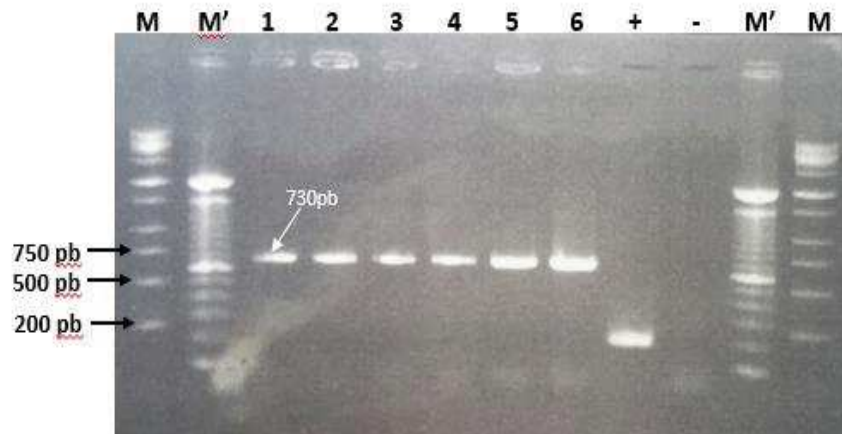


Figure 75. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A27L (Gel agarose 1.5 %). Puits 1 à 6 : Colonies du pool 8 (1. Colonie 36, 2. Colonie 37, 3. Colonie 38, 4. Colonie 39, 5. Colonie 40), +. Contrôle positif : pBacPAK8 non digéré, -. Contrôle négatif (eau), M. Marqueur 1 kpb (Biolabs, Ozyme, France), M'. Marqueur 100 pb (Biolabs, Ozyme, France).

Les séquences nucléotidiques de l'ADN extrait des clones 39 et 40 ont été alignées par Geneious avec la séquence de la protéine LSDV117 de la souche Lumpy skin disease virus NI-2490 (GenBank accession number AAK85078) mais aussi avec celle du gène synthétique commandé (ORF A27 + Mellitine + enzymes de restriction + HisTags) et a révélé 100% d'identité entre les deux séquences. En outre, ce séquençage a permis de vérifier la conservation des séquences des enzymes de restriction ainsi que la séquence de la mellitine ce qui est primordial pour le clonage des trois autres gènes.

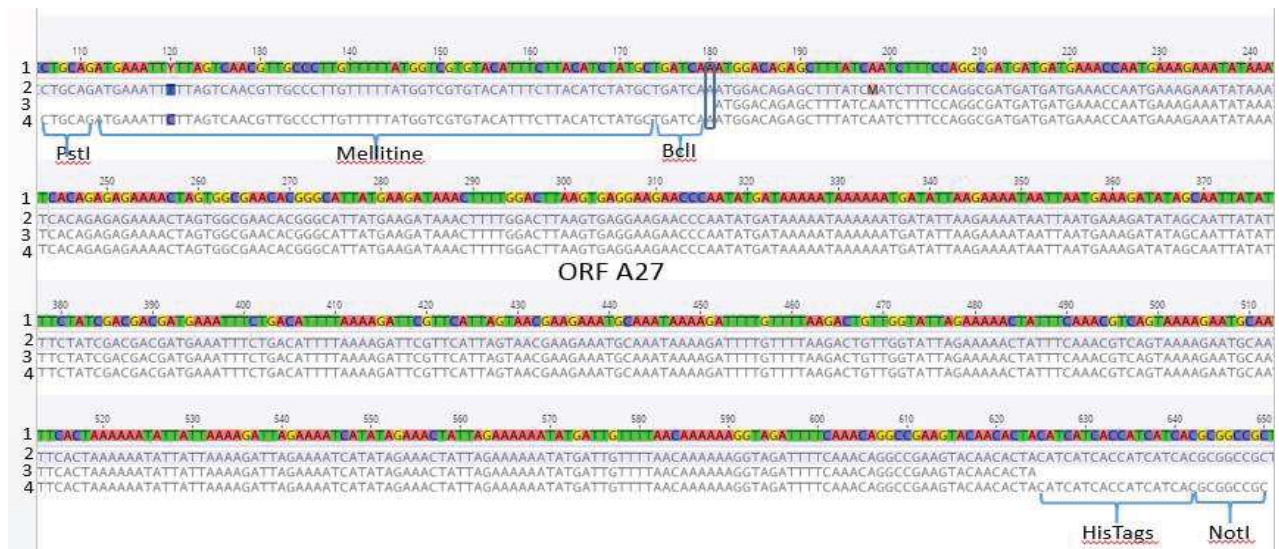


Figure 76. Alignement du clone 40 (2) avec la séquence nucléotidique de LSDV117 (AAK85078) (3) et la séquence du gène synthétique pUC-A27 (4), la zone consensus est représentée en (1).

1.2. Clonage du gène A33R dans le vecteur de transfert pBacPAK8

Premièrement, la partie extracellulaire de la protéine A33 a été produite par PCR avec succès. L'insert produit et le clone pBacPAK8/A27 (issu du clonage de A27 dans pBacPAK8) ont été doublement digérés par BclI/NotI.

La double digestion du vecteur pBacPAK8/A27 par BclI/NotI a permis l'obtention de deux fragments ; le premier est un fragment de 500 pb (Figure 77, a) qui représente l'ORF du gène A27 et les histidines tags, le deuxième est un fragment de taille supérieure à 5 kb (Figure 77, b) représentant le vecteur de transfert pBacPAK8 avec la séquence de la mellitine. Ce fragment d'intérêt a été extrait du gel puis purifié. En parallèle, pour un clonage dirigé, l'insert A33 a été aussi doublement digéré par BclI et NotI en aveugle sans confirmation possible.

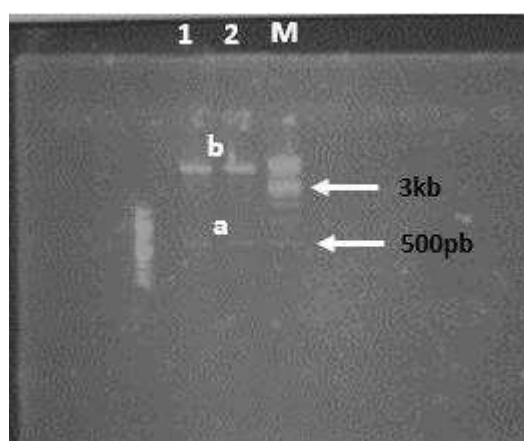


Figure 77. Résultat de la double digestion enzymatique par BclI et NotI du vecteur pBacPAK8/A27 (Gel d'agarose 1%). Puits 1 et 2 ; produits de digestion, M. Marqueur de poids moléculaire de 1 kb, a. ORFA27+Histags, b. Vecteur pBacPAK8+mellitine.

Une fois l'insert et le vecteur doublement digérés, un clonage dirigé est réalisé par ligation insert/vecteur avec les ratios 8/1 et 10/1. Une et huit colonies ont été respectivement obtenues. Elles ont fait individuellement l'objet d'une PCR avec les amorces Bac1 et Bac2 pour vérifier si elles contiennent bien l'insert A33. Comme le montre la photo du gel, un amplicon de 650 pb a été amplifié pour les deux colonies N° 4 et 5 du ratio 10/1 (Figure 78). Le témoin positif représenté par le vecteur pBacPAK8/A27 produit un amplicon à la bonne taille (700pb).

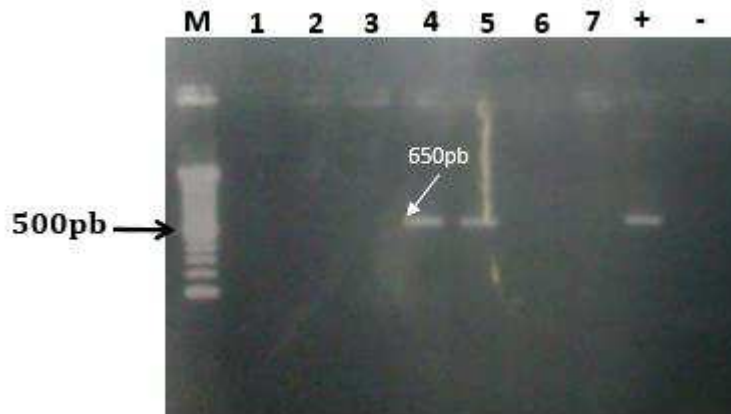


Figure 78. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt A27L (Gel agarose 1.5 %). Puits 1. Colonie du ratio 8/1, Puits 2 à 7. Colonies du ratio 10/1. +. Contrôle positif (pBacPAK8/A27), -. Contrôle négatif (eau).

L'ADN plasmidique provenant des clones 4 et 5 a été séquencé avec les amorces Bac1 et Bac2 (Beckman Coulter, France). Les séquences obtenues ont été alignées avec la séquence nucléotidique (NC_003027) de LSDV 122 (de la souche Neethling NI-2490). Un taux de 100% d'identité a été obtenu avec la séquence d'origine. Le plasmide obtenu est nommé pBacPAK8/A33.

1.3. Clonage du gène L1R dans le vecteur de transfert pBacPAK8

Suite à la production de la partie extracellulaire de la protéine L1, l'insert produit ainsi que le vecteur pBacPAK8/A27 ont été doublement digérés par BclI/NotI pour faire ensuite l'objet de ligations et de transformations. Plusieurs colonies ont été obtenues à partir des différents ratios, dix d'entre elles ont été testées par PCR utilisant le couple d'amorces pFL1rInterm/Bac2. Les 10 colonies testées sont positives en présentant un amplicon à la taille attendue de 350 pb comme le montre la figure 79. 2 colonies ont été sélectionnées pour une extraction d'ADN et vérifiées par séquençage. Le plasmide obtenu est nommé pBacPAK/L1.

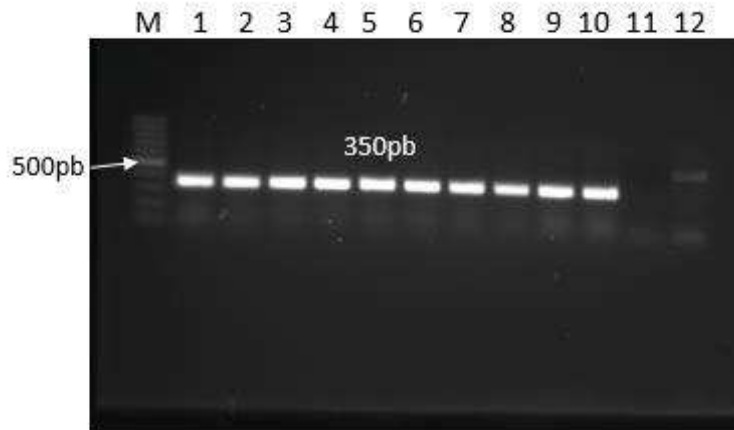


Figure 79. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt L1R (Gel agarose 1.5 %). Puits 1 à 10 : colonies testées, puits 11. Contrôle négatif (eau), puits 12. Contrôle négatif : pCIneo-L1R, M. Marqueur de poids moléculaire 100 pb (Fermentas, France).

1.4. Clonage du gène B5R dans le vecteur de transfert pBacPAK8

La bande d'intérêt représentant la partie extracellulaire du gène B5R produite par PCR a été extraite du gel et purifiée pour être par la suite doublement digérée par BclI/NotI avec le vecteur pBacPAK8/A27 comme décrit précédemment. Des ligations insert/vecteur suivies de transformation ont permis d'obtenir plusieurs colonies dont 16 ont été testées par PCR à l'aide du couple d'amorces Bac1/Bac2. 15 d'entre elles sont positives à la PCR et présentent un amplicon à la taille attendue (745pb) (Figure 80). 2 colonies ont été sélectionnées et vérifiées par séquençage. Le plasmide obtenu est nommé pBacPAK/B5.



Figure 80. Résultat du criblage des colonies transformées pour le gène d'intérêt B5R (Gel agarose 1.5 %). Puits 1 à 16. Colonies testées, 17. Contrôle négatif (eau), 18. Contrôle positif. pBacPAK8/A27, M. Marqueur de poids moléculaire 100 pb (Fermentas, France).

2. Obtention des baculovirus recombinants et titrage

2.1. Obtention des baculovirus recombinants

Les baculovirus recombinants ont été obtenus par le phénomène de recombinaison homologue suite à une cotransfection des différents clones plasmidiques avec l'ADN viral du baculovirus linéarisé. Ceci nous a permis d'obtenir le stock viral initial (passage 1) qui est par la suite amplifié en vue d'obtenir des passages ayant des titres plus élevés en virus. Des PCR sont ensuite réalisées pour vérifier si les différents passages contiennent bien le baculovirus recombinant.

2.1.1. Baculovirus recombinant A27

Une PCR avec les amorces Bac1/Bac2 est réalisée à partir des extraits de surnageants de culture cellulaire à partir des trois passages P1, P2 et P3. Un amplicon de 730 pb est attendu. Le vecteur pBacPAK8/A27 est considéré comme contrôle positif. La figure 81 montre qu'à partir de l'ADN extrait des trois passages, un amplicon à la taille attendue est amplifié attestant d'une part de la présence du plasmide parental dans le surnageant de cotransfection (puits 1), d'autre part, on remarque que la bande correspondant au passage 2 (puits 2) est plus intense que celle de P1 signifiant que le titre viral semble avoir été amplifié lors de l'amplification du stock viral.

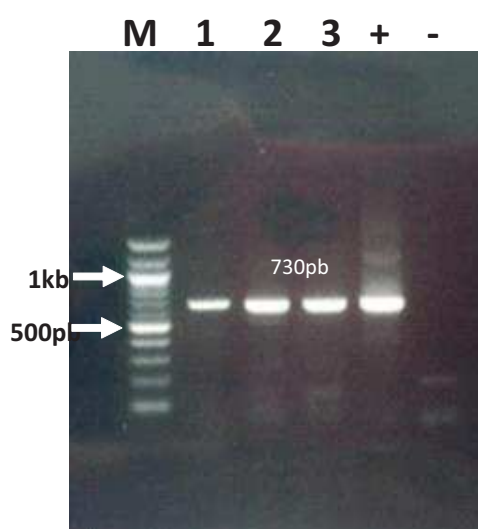


Figure 81. Gel d'agarose 1% présentant l'amplification par PCR de l'ADN extrait des trois passages du baculovirus recombinant A27. 1. Passage 1, 2. Passage 2, 3. Passage 3, (+). Témoin positif : pBacPAK8/A27, (-). Témoin négatif : eau. M. Marqueur de 100pb (Biolabs, Ozyme, France).

2.1.2. Baculovirus recombinant A33

La réaction PCR réalisée avec les amorces Bac1/Bac2 à partir de l'ADN extrait des différents passages P1 à P3 présente un amplicon de 650 pb pour les trois passages P1, P2 et P3 (Figure 82). Cependant, l'intensité des bandes diffère d'un passage à l'autre. Dans le cas du passage P2, la bande est plus intense que celle de P1 laissant penser à une augmentation du titre viral. Le passage P3 présente une bande de faible intensité. Le titre viral du passage 3 ne semble donc pas suffisant en l'état pour permettre une infection avec une MOI élevée en vue de produire la protéine A33. Il faudra refaire une infection à partir du passage 2 où on suspecte la présence du recombinant. Faute de temps, ce travail n'a pu progresser jusqu'à la production de la protéine A33 proprement dite.

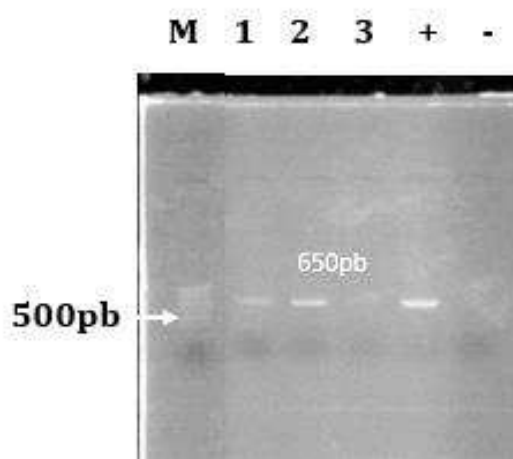


Figure 82. . Gel d'agarose 1% présentant l'amplification par PCR de l'ADN plasmidique extrait des trois passages du baculovirus recombinant A33. 1. Passage 1, 2. Passage 2, 3. Passage 3, (+) : pBacPAK/A33, (-) : eau, M. Marqueur de poids moléculaire 100 pb.

2.1.3. Baculovirus recombinants L1

A l'issue de l'amplification par PCR du baculovirus recombinant L1 à partir du dernier passage 5, on note la présence de bandes intenses (puits 1 et 2). Ce qui signifie la présence du baculovirus d'intérêt (Figure 83).

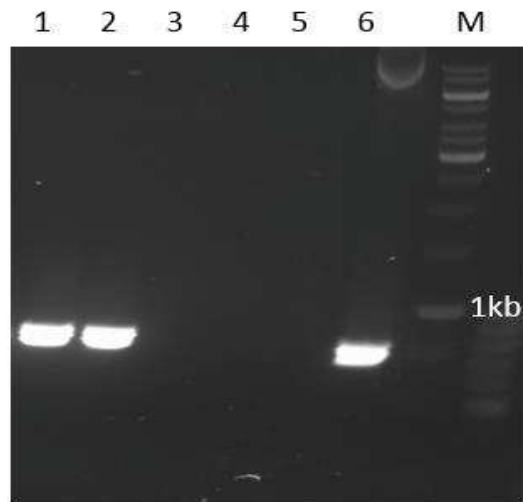


Figure 83. Gel d'agarose 1% présentant les produits d'amplification PCR obtenus à partir du surnageant du baculovirus recombinant L1. 1/2. Passage 5, 3/4. Témoins négatifs (Sf21 non infectées), 5. Témoin négatif (eau), 6. Témoin positif (pBacPAK/B5), M. Marqueur de poids moléculaire 100 pb.

2.1.4. Baculovirus recombinants B5

Une PCR Bac1/Bac2 est réalisée directement à partir du surnageant des différents passages de baculovirus recombinants B5, on note qu'au niveau du passage 4 (bandes 8 et 9), la présence de bandes intenses permettant de constituer un stock de baculovirus suffisant en vue de la production de la protéine d'intérêt.

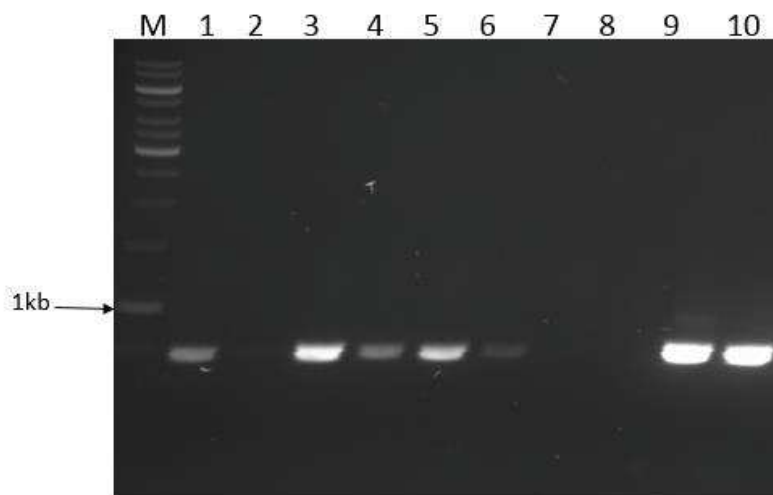


Figure 84. Gel d'agarose 1% présentant les produits d'amplification PCR obtenus à partir du surnageant du baculovirus recombinant B5. 1 à 6: Passages 2, 7/8: Passages 1, 9/10: Passages 4, M : Marqueur de poids moléculaire 100 pb.

Finalement, les stocks concernant les recombinants A27, L1 et B5 ont été obtenus, seul le passage 3 du recombinant A27 a été titré (cf paragraphe suivant). Néanmoins un séquençage de la séquence insérée au sein de chacun des trois baculovirus recombinants est à réaliser pour s'assurer de l'absence de mutations. En ce qui concerne le recombinant A33, des passages supplémentaires sont à effectuer pour obtenir un titre viral plus important, associés à des vérifications par PCR et par un séquençage de la séquence insérée. Les travaux sont aujourd'hui en cours.

2.2.Calcul du Titre par la technique MTT

Comme nous l'avons précisé plus haut, le titrage a concerné le passage 3 du recombinant A27. Les données brutes obtenues suite à la mesure de l'absorbance à 570 nm ont permis, le calcul de moyennes traitées selon les deux formules citées dans la méthodologie par le logiciel Sigma Plot (Sigma, France) qui renseigne sur la dilution du virus qui infecte 50% des cellules. Puisque ce titrage a été fait en duplicat, c'est la moyenne des deux résultats qui nous donne le titre final. Pour la première et la deuxième plaque, l'analyse a respectivement donné un titre de $5,91 \cdot 10^7$ pfu/ml et $2,16 \cdot 10^7$ pfu/ml. Sachant que la suspension virale a été diluée au 1/100, le résultat obtenu est à multiplier par 100 donnant un résultat final respectif pour la première et deuxième plaque de $5,91 \cdot 10^9$ pfu/ml et de $2,16 \cdot 10^9$ pfu/ml.

La moyenne des titres obtenus des deux plaques nous donne un titre viral final du passage 3 du BCV (Baculovirus)/A27 de : **$4 \cdot 10^9$ pfu/ml**.

3. Production de la protéine A27 en système BEVS

La production proprement dite de la protéine A27 est réalisée à partir du passage P3 titré. Cette optimisation a nécessité une considération de trois facteurs distincts : la quantité de virus (MOI), la densité cellulaire et le temps d'infection.

3.1.Optimisation de la production de la protéine A27

Pour évaluer quelle est la meilleure condition de production, deux paramètres ont été pris en compte. Le premier est la viabilité générale d'une population cellulaire infectée pour les différents temps de récolte. Au-dessous de 30% de viabilité, la mortalité cellulaire est importante et est accompagnée de la libération de protéases cellulaires et membranaires influençant ainsi la stabilité de la protéine recombinante. Le second paramètre est la

reconnaissance par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-histidine de la protéine produite dans les surnageants de culture et les lysats cellulaires permettant une quantification des protéines dans les différentes conditions de production.

3.1.1. Optimisation de la production de la protéine d'intérêt A27 par observation de la viabilité cellulaire

Pour estimer la viabilité générale des cellules infectées, un comptage au bleu trypan est réalisé à partir des surnageant correspondants aux différentes conditions de production. Les données obtenues sont représentées dans le tableau 34.

Tableau 34. Résultat des comptages de viabilité cellulaire des cellules d'insectes infectées par P3/A27 en fonction de la MOI, de la densité cellulaire et du temps de récolte.

		MOI (Multiplicity of infection)								
		5			10			20		
	Densité	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶
48 post infection	Nb de cellules (ml)	1.28 10 ⁶	3.96 10 ⁶	6.97 10 ⁶	1.56 10 ⁶	2.49 10 ⁶	5.47 10 ⁶	1.46 10 ⁶	3.11 10 ⁶	7 10 ⁶
	Viabilité (%)	70	70	74	70	68	67	64	62	62
		MOI (Multiplicity of infection)								
		5			10			20		
	Densité	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶
72h post infection	Nb de cellules (ml)	1.49 10 ⁶	3.42 10 ⁶	7.77 10 ⁶	2.10 10 ⁶	3.77 10 ⁶	6.21 10 ⁶	1.67 10 ⁶	3.10 ⁶	9.57 10 ⁶
	Viabilité %	48	41	40	45	37	30	43	38	27
		MOI (Multiplicity of infection)								
		5			10			20		
	Densité	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶	1.10 ⁶	2.10 ⁶	4.10 ⁶
96h post infection	Nb de cellules (ml)	1.8 10 ⁶	5.44 10 ⁶	10.82 10 ⁶	1.4 10 ⁶	4.82 10 ⁶	14.5 10 ⁶	1.79 10 ⁶	3.66 10 ⁶	16 10 ⁶
	Viabilité (%)	24	16	16	17	19	8	18	15	6

Nous pouvons noter que le temps de récolte influence nettement la viabilité cellulaire, en effet pour une MOI et une densité cellulaire constantes, nous remarquons une chute significative de

la viabilité quand le temps de récolte est plus tardif. Par exemple pour une MOI de 20 et une densité cellulaire de 4.10^6 , la viabilité qui était de 62% à 48 h post infection, chute considérablement pour atteindre des valeurs de 27% et 6% respectivement pour 72h et 96h post infection. Le temps de récolte est donc un paramètre important à considérer lors de la production.

Le deuxième facteur à optimiser est la densité cellulaire, nous pouvons noter qu'avec une MOI et un temps de récolte constants, la viabilité cellulaire chute faiblement lors d'une augmentation du nombre de cellules. Même si dans tous les cas de figure, la viabilité a tendance à être plus importante pour une densité cellulaire de 1.10^6 que pour 4.10^6 cellules/ml.

Enfin le dernier paramètre à maîtriser est la MOI (multiplicité d'infection), pour une densité cellulaire et un temps de récolte constants, la viabilité cellulaire n'a pas tendance à changer considérablement. Certes plus la MOI est élevée, plus la viabilité est faible mais l'écart n'est pas considérable. Par exemple pour une densité cellulaire de 1.10^6 cellules/ml récoltés à 72h post infection, la viabilité est de 48%, 45% et 43% respectivement pour une MOI de 5, 10 et 20.

Suite à cette analyse, on peut conclure que le temps de récolte est le paramètre le plus important à optimiser lors de la production protéique. On remarque que pour 96h post infection, (MOI et densité cellulaire confondues), la viabilité est en dessous de 24%. Une mortalité atteignant les 70-80% peut être néfaste pour la stabilité de la protéine, les cellules mortes libérant des protéases et des débris cellulaires, la protéine d'intérêt peut être dégradée ou former des agrégats avec ces débris cellulaires. Néanmoins, ces résultats préliminaires doivent être complétés par une analyse à l'aide d'un immunoblot permettant une quantification comparative de la protéine pour chaque condition.

3.1.2. Optimisation de la production de la protéine d'intérêt A27 par Western blot

Rappelons que la construction plasmidique du gène A27L possède en sa partie C terminale un tag constitué d'une queue poly-histidine, permettant la purification sur colonne His-trap. Cette queue polyhistidine a été mise à profit pour pouvoir marquer la protéine recombinante au moyen d'un anticorps commercial anti-histidine couplé à la HRP. Ce moyen de révélation nous permet de détecter la protéine par immunoblot. Un Western blot révélé par des anticorps anti-histidine couplés à la peroxydase permet donc de visualiser l'expression de la protéine A27 à partir des

différentes conditions de culture (surnageants et lysats cellulaires) et de choisir la meilleure condition de production de la A27.

En gardant en mémoire la présence en partie N-terminale de la protéine recombinante du peptide signal de la mellitine (sécrétion dans le surnageant des cellules infectées), il importait de pouvoir analyser comparativement les conditions de production de la A27, d'une part dans le surnageant de culture (fraction extracellulaire) et au sein même du tapis cellulaire infecté (fraction intracellulaire).

➤ **Western blot sur les fractions extracellulaires**

Le Western blot révélé par les anticorps anti-Histidine est d'abord réalisé sur le surnageant de culture provenant des cellules infectées dans les différentes conditions de MOI, de densité cellulaire et récoltées à différentes heures post infection. Le résultat présenté en figure 85, montre que la protéine d'intérêt est présente dans l'ensemble des surnageants de culture aux différentes conditions. La protéine est visible avec une bande très intense à la taille attendue de 17kDa. La bande la plus intense semble être observée lorsque les cellules sont infectées **à la densité de 2.10^6 de cellules avec un MOI de 10 et récoltées à 72 heures post infection.** Néanmoins cette comparaison reste critiquable vu qu'il s'agit de gels distincts dont les conditions de migration ne sont pas strictement identiques. Une comparaison serait plus significative si les différentes fractions avaient été déposées sur un même gel ce qui est difficile vu le nombre élevé de fractions à analyser.

A part la bande d'intérêt, on observe plusieurs autres bandes non spécifiques de différentes tailles mais d'intensité beaucoup plus faible, ces bandes représentent fort probablement des protéines cellulaires ou membranaires provenant des cellules infectées.

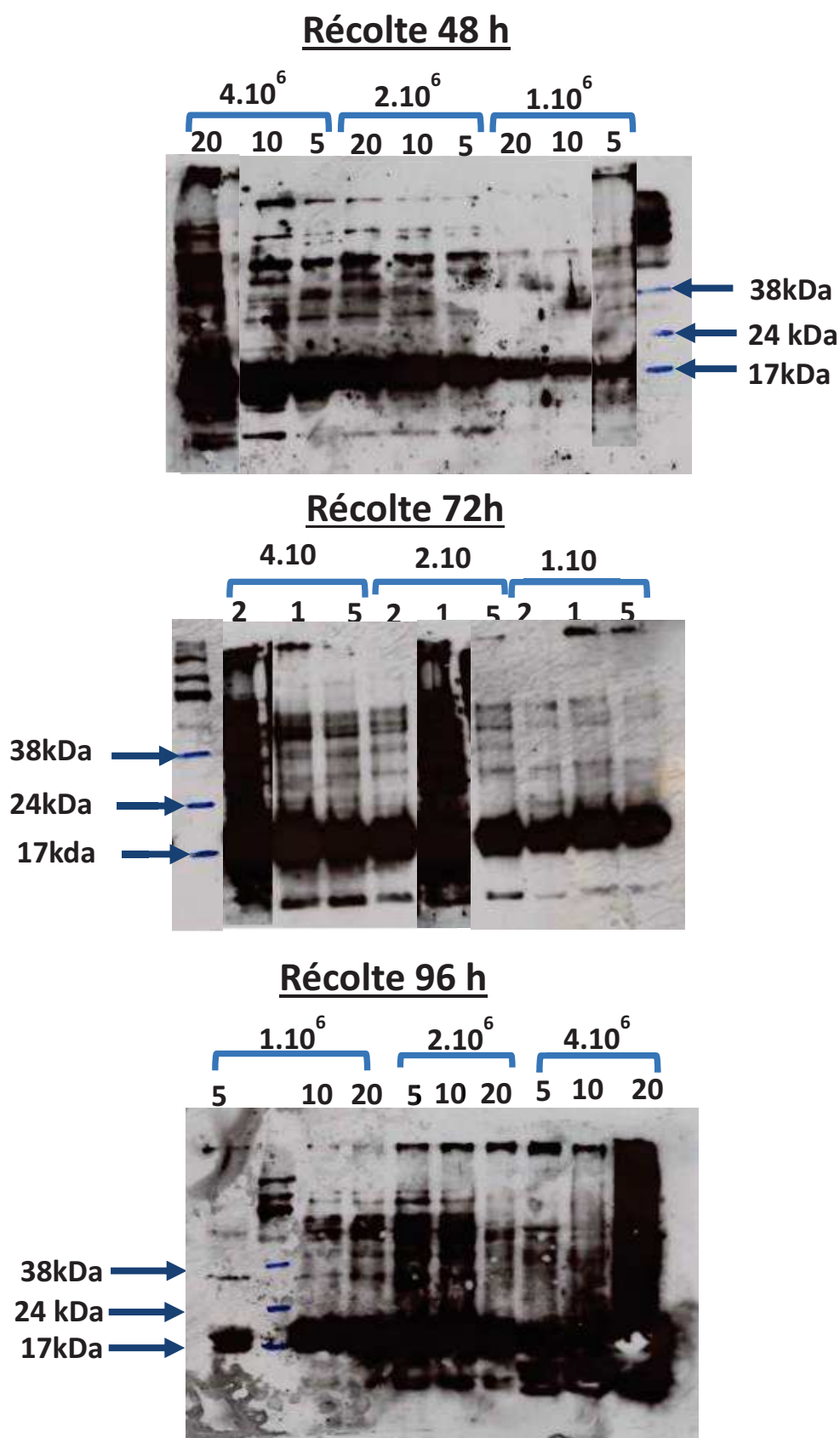


Figure 85. Western blots révélés par des anticorps anti-Histidine à partir des fractions extracellulaires (surnageants de culture) provenant des différentes conditions testées.

➤ Western blot sur les fractions intracellulaires

Ayant choisi d'insérer le peptide signal de la mellitine en partie N terminale de la protéine lui permettant théoriquement ainsi d'être sécrétée, il est apparu nécessaire d'estimer si une partie de la protéine produite pouvait être non sécrétée et ainsi rester dans le cytoplasme des cellules infectées. Pour cela, le culot cellulaire des cellules récoltées à 72 et 96 heures post infection, provenant des différentes conditions de culture (MOI, densité) a été lysé en vue d'un Western blot révélé par des anticorps anti-histidine. La protéine reconnue est présente à la taille attendue (17 kDa) surtout dans le lysat cellulaire des cellules récoltées à 72 heures post infection avec la densité cellulaire de 2.10^6 et une MOI de 5 (Figure 86). Cependant les quantités détectées au sein de la fraction cellulaire nous paraissent nettement inférieures par rapport à celles détectées dans le surnageant ce qui était attendu, nous amenant à considérer plus approprié de travailler avec les fractions extracellulaires.

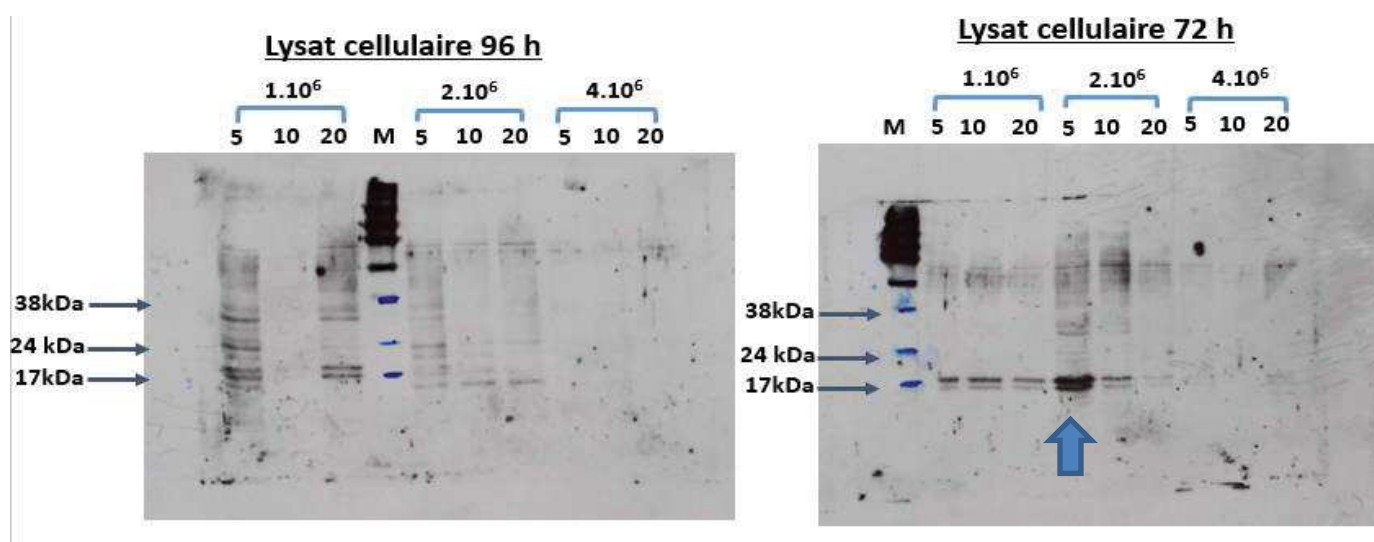


Figure 86. Western blots révélés par des anticorps anti-Histidine à partir des fractions intracellulaires (lysats cellulaires) provenant des différentes conditions testées.

3.2. Production de la protéine A27 en conditions optimisées

Sur la base des résultats précédents (densité cellulaire de 2.10^6 , MOI de 10 et récolte à 72 heures post infection), une production à large échelle est donc réalisée en système de culture en suspension (flasque T75) dans les conditions appropriées (densité cellulaire de 2.10^6 cellules/ml, MOI de 10 et récolte à 72 heures post infection) dans un volume de culture de 200 ml et un volume d'inoculum nécessaire pour avoir un MOI de 10 (P3 titre 4.10^9 pfu/ml), ce volume est ajusté à 3ml avec du milieu Sf900 II permettant de recouvrir le tapis cellulaire. La

viabilité des cellules d'insectes est estimée quotidiennement et est conforme aux résultats obtenus lors de la phase d'optimisation. A 72 heures post-infection, les cellules sont récoltées par centrifugation et le surnageant de culture est filtré. Les protéines produites sont purifiées comme suit.

3.3. Purification de la protéine A27

La purification du surnageant de culture est réalisée à l'aide d'une colonne His-Trap. Les six fractions purifiées obtenues (F1-F6) ainsi que les échantillons d'avant purification (AP), de « Wash » (W) et de « Flowthrough » (FT) sont dosés par absorbance à 260/280 nm (Nanodrop D-1000, Thermofisher, France) et par le kit de Bradford (Bradford reagent : B69916, SIGMA).

Tableau 35. Résultat des dosages des différentes fractions obtenues par lecture d'absorbance à 260/280 nm (nanodrop) et par la technique de Bradford.

Dosage par Nanodrop		
Echantillon	DO 260 nm	DO 280 nm
AP	29,35	19,16
FT	9,44	6,17
W	1,708	1,186
F1	0,254	0,205
F2	0,124	0,135
F3	-0,005	0,039
F4	0,018	0,023
F5	-0,016	0,04
F6	-0,020	-0,007
Dosage des protéines totales : Kit Bradford		
Echantillon	DO à 595 nm	Concentration (mg/ml)
AP	0,081	0,10
FT	0,087	0,114
W	0,058	0,07
F1	0,033	0,04
F2	0,018	0,02
F3	0,004	0,005
F4	0,004	0,005
F5	0,009	0,01
F6	0,002	0,002
Standard	0,228	0,3

Le résultat des dosages par les deux techniques est simultanément représenté par la figure 87 ci-dessous.

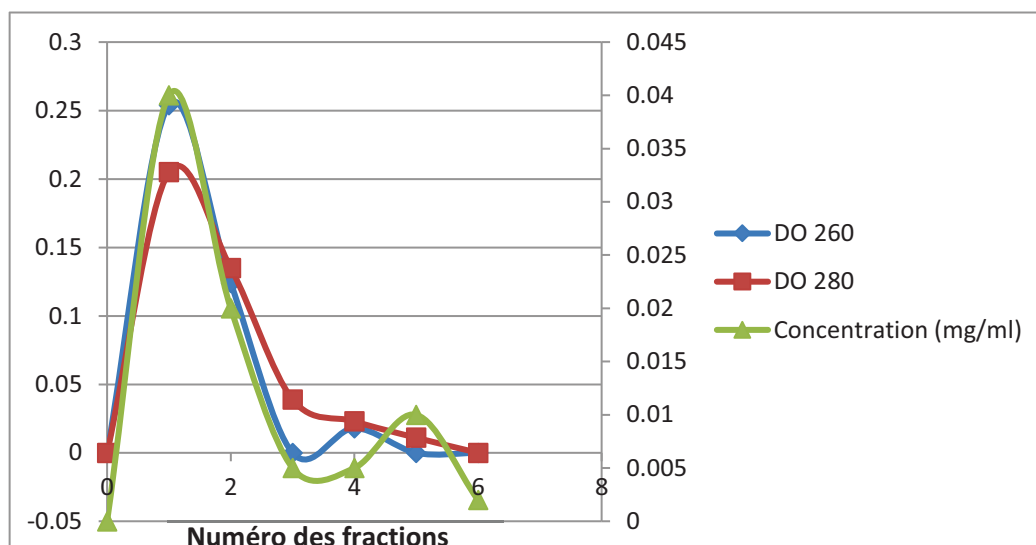


Figure 87. Courbe représentant le résultat simultané du dosage des différentes fractions par lecture d'absorbance au nanodrop (courbe bleue et courbe orangée) et par la technique de Bradford (courbe verte).

Les dosages des différentes fractions purifiées (F1 à F6) par Nanodrop et par le kit Bradford concordent pour indiquer que la protéine A27 purifiée semble être concentrée dans les deux premières fractions purifiées F1 et F2, le pic de production correspondant à la fraction F1. Cette tendance est à confirmer par la technique de Western blot révélé par des anticorps anti-Histidine.

3.4. Analyse par Western blot des différentes fractions purifiées

Les différentes fractions obtenues suite à la purification ont été analysées comparativement par un WB révélé par des anticorps anti-Histidine, le résultat est représenté par la figure 88, on note la présence de bandes attendues à la taille de 17 kDa environ représentant la forme monomérique de la protéine. Par contre, aucune bande n'est détectée dans les fractions AP, W, FT ni même dans les 4 dernières fractions purifiées (F3 à F6). La protéine semble donc concentrée dans les deux premières fractions purifiées F1 et F2 en continuité avec le dosage par Nanodrop et Bradford de ces différentes fractions.

Dans la première fraction F1, trois bandes de taille différentes sont présentes, la première bande est en fait un groupe de deux bandes de taille inférieure à 17 kDa, une deuxième bande plus intense est observée à une taille légèrement plus importante, enfin une troisième bande moins

intense que les deux premières d'environ 50 kDa est présente. Les deux premières bandes sont observées également dans la deuxième fraction F2 purifiée, alors que la troisième bande est absente. Cette dernière pourrait représenter la forme trimérique de la protéine d'intérêt.

Le premier groupe de bandes de taille < 17 kDa représentant la forme monomérique de la protéine A27 serait peut être le résultat de la dégradation de la protéine A27, l'absence de bande d'intérêt dans le puits d'avant purification appuie ce constat. Ce Western blot n'étant pas concluant, une autre production de A27 est réalisée avec ajout d'anti-protéases.

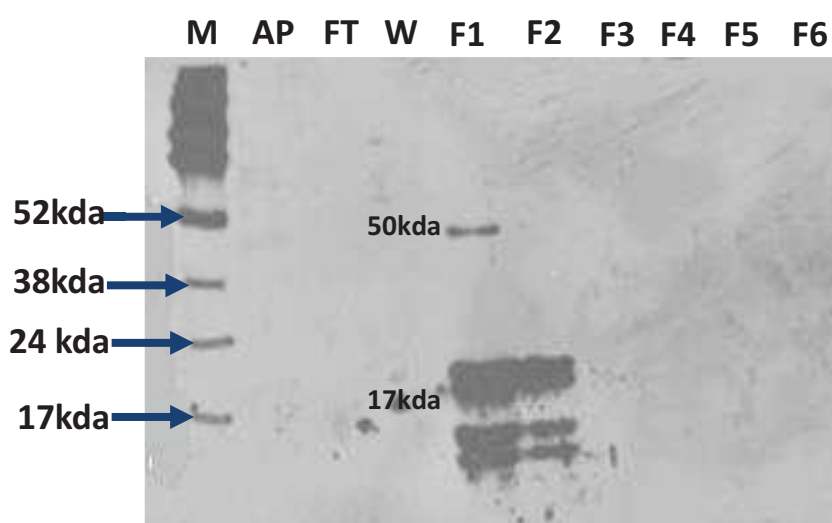


Figure 88. Western blot révélé par des anticorps anti-Histidine à partir des différentes fractions purifiées (AP/ Avant purification, FT : Flowthrough, W/ Wash, F1 à F6/ différentes éluats obtenus suite à la purification).

3.5. Production de la protéine A27 avec ajout d'anti-protéases

Une dégradation protéique étant suggérée sur WB (bandes < 17 KD) et l'hypothèse d'une action de protéases ne pouvant être exclue, une nouvelle production en système statique cette fois est réalisée en ajoutant des anti-protéases lors de la récolte. Soixante-douze heures post infection, les cellules infectées semblent plus volumineuses et arrondies indiquant que l'infection a eu bien lieu par rapport aux cellules témoins non infectées (résultat non représenté). Le surnageant de culture est récolté et les anti-protéases ajoutées, le mélange est filtré et purifié comme précédemment, par la suite une ré-analyse à l'aide d'un dépôt sur gel SDS-PAGE (coloration protéines totales en Bleu de Coomassie et révélation par Western blot) est réalisée.

3.5.1. Coloration SDS-PAGE au Bleu de Coomassie

Un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie est réalisé avec toutes les fractions purifiées (F1 à F6) ainsi que sur les fractions non purifiées (AP, FT et W) obtenus suite à la deuxième production de la protéine en système statique additionnés d'anti-protéases. La figure 89 montre que la protéine est concentrée dans les deux premières fractions purifiées F1 et F2 et qu'elle est présente majoritairement sous forme trimérique (50 kDa) sous forme d'une bande unique et propre détectée entre les bandes 35 et 55 kDa du marqueur moléculaire.

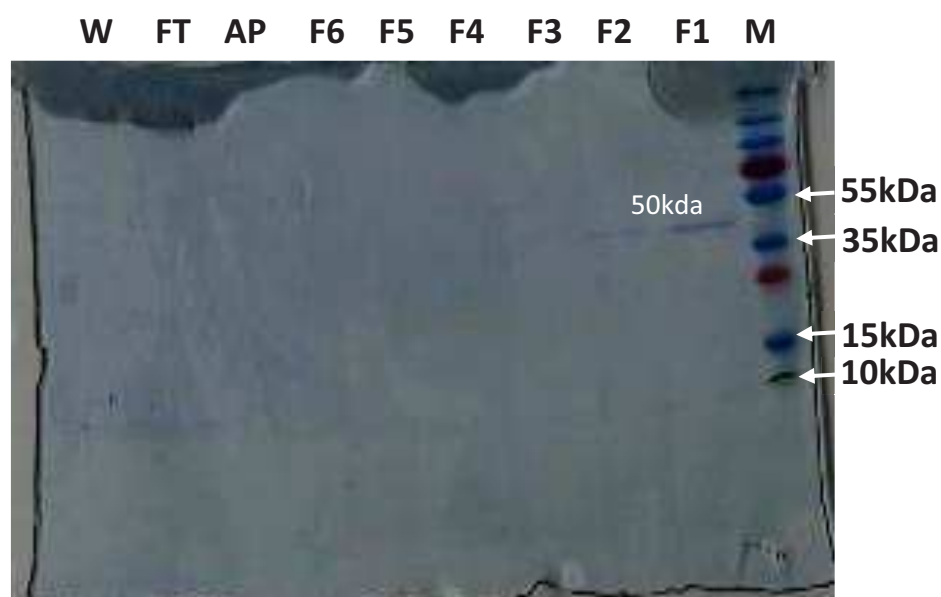


Figure 89. Gel SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie présentant les fractions purifiées (F1 à F6) et non purifiées (AP, FT, W) provenant de la production A27 en présence d'anti-protéases. M, Marqueur moléculaire (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermofischer).

3.5.2. Western blot

Le résultat du Western blot révélé avec les anticorps anti-Histidine incluant les trois premières fractions purifiées (F1, F2 et F3) issues de la deuxième production additionnée d'anti-protéases est représenté par la figure 90. Une bande unique de 17kda représentant la forme monomérique de la protéine est présente, non dégradée dans les deux premières fractions F1 et F2. Les anti-protéases ajoutées lors de la récolte ont été efficaces confirmant donc qu'une dégradation au cours de la production a eu bien lieu.

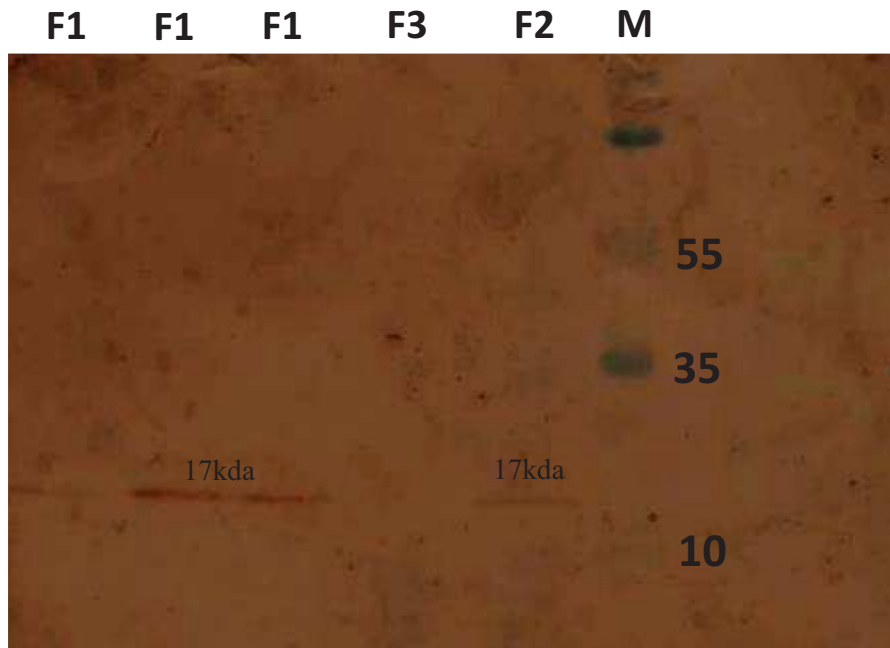


Figure 90. Western blot révélé avec des anticorps anti-Histidine incluant les trois premières fractions purifiées F1 à F3 obtenues à partir de la production A27 avec anti-protéases. M, Marqueur moléculaire.

Conclusion

L'expression des 4 protéines d'intérêt étudiées en système baculovirus-cellules d'insectes a été concluante pour la protéine A27 aboutissant à l'obtention d'une forme soluble, non dégradée et en quantité suffisante de la protéine nous permettant d'étudier son antigénicité vis-à-vis de sérums d'animaux immunisés dans le chapitre suivant (Chapitre 4) visant une plus ample caractérisation de la protéine. Concernant les protéines L1 et B5, des stocks de baculovirus recombinants permettant une production à large échelle ont été obtenus, la production étant en cours. Enfin, pour la protéine A33, des passages supplémentaires sont nécessaires pour obtenir un titre viral plus important permettant une production de la protéine avec une MOI élevée.

Chapitre 4: Etude de l'antigénicité de la protéine A27

L'étude de l'antigénicité de la protéine A27 du virus LSD appartenant au genre *Capripoxvirus* est abordée par deux approches complémentaires : une étude expérimentale et, une analyse *in silico* comme le décrit la figure 91 ci-dessous. Cette démarche reste en continuité avec l'analyse structurale de la protéine A27 étudiée dans le chapitre 1. Ainsi, Ces deux approches combinées auront pour objectif de vérifier d'une part si la protéine A27 du virus LSD est reconnue par des sérums d'animaux immunisés, et d'autre part d'analyser par des techniques expérimentales et des analyses *in silico* quels seraient les épitopes clés de cette reconnaissance.

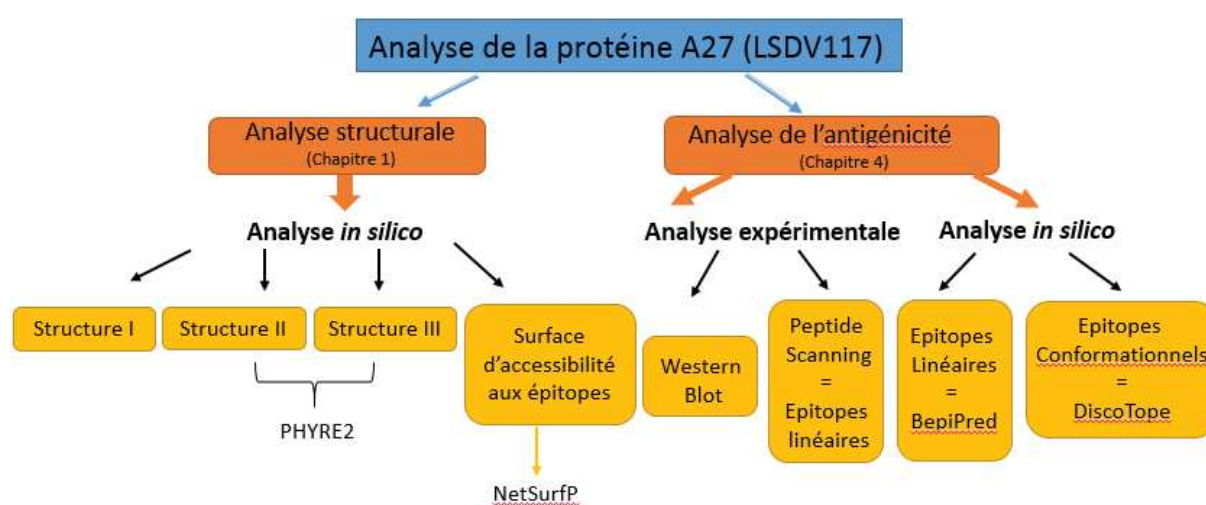


Figure 91. Approches expérimentales et *in silico* pour l'étude de la protéine A27 du virus LSD.

I. Matériels et méthodes

1. Approche expérimentale

L'étude de l'antigénicité de la protéine A27 par la méthode expérimentale est réalisée en deux parties distinctes, d'abord un Immunoblot avec des sérums spécifiques suivi d'un Pepscan visant à déterminer les épitopes linéaires de la protéine A27.

1.1. Western blot

1.1.1 Virus et protéines

Pour étudier l'antigénicité spécifique de A27, la fraction 1 de la protéine purifiée (Partie III, Chapitre 3) a été utilisée pour vérifier si cette dernière est reconnue par les sérums d'animaux infectés.

1.1.2 Sérums et anticorps

Les anticorps primaires utilisés pour le Western blot proviennent de deux groupes de sérums : le premier groupe de sérums provient de 4 chèvres naïves, séronégatives et challengées avec une souche de « Yemen goatpoxvirus » lors d'une expérimentation en Ethiopie (Caufour *et al.*, 2014) numérotées 1, 2, 17 et 18, et qualifiés d' « animaux naïfs éprouvés ». Ces sérums ont été prélevés soit à J21 ou à J28 post infection (post challenge avec Yemen goatpox) et ont été nommés : G5 1 d21 10/5/11 et G5 17 d21 10/5/11 pour les animaux 1 et 17 qui ont été prélevés à J21 soit le 10/5/11, et G5 2 d28 17/5/11, G5 17 d28 17/5/11 et G5 18 d28 17/5/11 pour les animaux 2, 17 et 18 prélevés au 28^{ème} jour soit le 17/5/11 (G5 étant le groupe d'animaux regroupant ces différentes chèvres). Le deuxième type de sérums provient d'ovins hyper immunisés respectivement avec une souche vaccinale de Capripoxvirus de 1988 et de 1982. Enfin, un dernier type de sérums provenant d'un ovin séronégatif a été utilisé comme témoin négatif. Au total, pour vérifier l'antigénicité de la protéine A27, 8 sérums différents ont été utilisés comme anticorps primaire. Ensuite, un sérum anti-goat produit chez un lapin couplé à la peroxydase (DAKO P160, USA) a été utilisé comme anticorps secondaire pour une révélation par un substrat chromogène le DAB (3,3'-Diaminobenzidine).

1.1.3 Réalisation

La fraction F1 de la protéine A27 est dénaturée dans du tampon du Laemmli (Tampon d'échantillon + B mercaptoéthanol : annexe 1) et incubée à 95°C pendant 10 minutes pour être déposée en présence d'un marqueur de poids moléculaire coloré sur un gel d'acrylamide concentré à 6-15% (composition en annexe 1). La migration est réalisée sous une tension de 80 volts dans le gel de concentration pendant 15 minutes puis sous une tension de 120 volts dans le gel de séparation pendant 1h 30 dans un tampon de migration 1X. Après migration, les protéines sont par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose (MSI MICRON SEPARATIONS INC) pour la réalisation d'un immunoblot. Le transfert s'effectue sous une tension de 100 mA pendant 1h15 minutes. La membrane est ensuite incubée dans une solution de saturation (5% lait écrémé + 0,05% Tween20) pendant 1h30 à température ambiante. Après trois lavages (PBS1X, 0,05% Tween20), la membrane est incubée O/N en présence des différents sérums à tester à la dilution de 1/100^{ème} à +4°C dans une solution composée de PBS1X et 5% lait écrémé. Suite à une série de trois lavages, les complexes protéines-anticorps accrochés sur la membrane sont détectés suite à une incubation de 2h en présence d'un anti-

IgG de caprin couplé à la peroxydase (DAKO) dilué au 1/4000^{ème}. La révélation est faite par le substrat de la peroxydase, le DAB qui est repris dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 30%.

1.2. Immunodétection des peptides synthétisés sur membranes spots (Pepscan)

1.2.1. Membrane spot

Pour la réalisation du PepScan, une membrane spot contenant des peptides de la protéine A27 a été synthétisée par les laboratoires Bio-Rad (Montpellier). La membrane est découpée en six bandelettes similaires (Figure 92), chaque bandelette contient 68 peptides de 15 acides aminés chevauchants de deux codons (Figure 93).

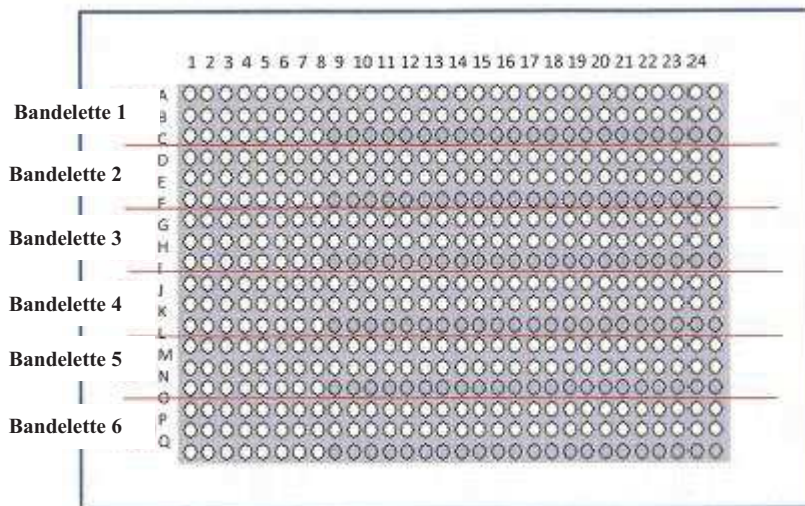


Figure 92. Disposition des six bandelettes, comprenant chacune 68 spots peptidiques au sein de la membrane (puits blancs : présence de peptides, puits bleus : puits vides).

Protéine de 150 aa - Peptides de 15 aa, décalés de 3 (68 peptides) - 6 copies

Bandelette 1		Bandelette 2		Bandelette 3		Bandelette 4		Bandelette 5		Bandelette 6		Séquence
N° de spot	Coordonnées	N° de spot	Coordonnées	N° de spot	Coordonnées	N° de spot	Coordonnées	N° de spot	Coordonnées	N° de spot	Coordonnées	
1	A 1	91	D 1	181	G 1	271	J 1	361	M 1	451	P 1	M-D-R-A-L-S-I-F-P-G-D-D-D-E-T
2	A 2	92	D 2	182	G 2	272	J 2	362	M 2	452	P 2	K-A-L-S-I-T-P-G-D-D-D-E-I-N-E
3	A 3	93	D 3	183	G 3	273	J 3	363	M 3	453	P 3	L-S-I-F-P-G-D-D-D-E-T-N-E-R-N
4	A 4	94	D 4	184	G 4	274	J 4	364	M 4	454	P 4	I-F-P-G-D-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N
5	A 5	95	D 5	185	G 5	275	J 5	365	M 5	455	P 5	P-G-D-D-D-C-T-N-E-R-N-I-N-H-R
6	A 6	96	D 6	186	G 6	276	J 6	366	M 6	456	P 6	D-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K
7	A 7	97	D 7	187	G 7	277	J 7	367	M 7	457	P 7	D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S
8	A 8	98	D 8	188	G 8	278	J 8	368	M 8	458	P 8	T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E
9	A 9	99	D 9	189	G 9	279	J 9	369	M 9	459	P 9	E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G
10	A10	100	D10	190	G10	280	J10	370	M10	460	P10	N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y
11	A11	101	D11	191	G11	281	J11	371	M11	461	P11	N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y-F-D
12	A12	102	D12	192	G12	282	J12	372	M12	462	P12	R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L
13	A13	103	D13	193	G13	283	J13	373	M13	463	P13	K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L-D
14	A14	104	D14	194	G14	284	J14	374	M14	464	P14	S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S
15	A15	105	D15	195	G15	285	J15	375	M15	465	P15	E-T-P-G-D-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N
16	A16	106	D16	196	G16	286	J16	376	M16	466	P16	G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E-P
17	A17	107	D17	197	G17	287	J17	377	M17	467	P17	Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E-P-N-M
18	A18	108	D18	198	G18	288	J18	378	M18	468	P18	D-K-L-L-D-L-S-E-E-P-N-M-I-K
19	A19	109	D19	199	G19	289	J19	379	M19	469	P19	L-L-D-L-S-E-E-P-N-M-I-K-I-K
20	A20	110	D20	200	G20	290	J20	380	M20	470	P20	D-L-S-E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D
21	A21	111	D21	201	G21	291	J21	381	M21	471	P21	S-E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K
22	A22	112	D22	202	G22	292	J22	382	M22	472	P22	E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K-I-K
23	A23	113	D23	203	G23	293	J23	383	M23	473	P23	P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K-I-K-I-N
24	A24	114	D24	204	G24	294	J24	384	M24	474	P24	M-I-K-I-K-N-D-I-K-I-K-I-N-E-R
25	A25	115	D25	205	G25	295	J25	385	M25	475	P25	K-I-K-N-D-I-K-I-K-I-N-E-R-Y-S
26	A26	116	D26	206	G26	296	J26	386	M26	476	P26	K-N-D-I-K-I-K-I-N-E-R-Y-S-N-Y
27	A27	117	D27	207	G27	297	J27	387	M27	477	P27	D-I-K-K-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S
28	A28	118	D28	208	G28	298	J28	388	M28	478	P28	K-I-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-O
29	A29	119	D29	209	G29	299	J29	389	M29	479	P29	I-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D
30	A30	120	D30	210	G30	300	J30	390	M30	480	P30	N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I
31	B 1	121	E 1	211	H 1	301	K 1	391	N 1	481	Q 1	R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D
32	B 2	122	E 2	212	H 2	302	K 2	392	N 2	482	Q 2	S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L
33	B 3	123	E 3	213	H 3	303	K 3	393	N 3	483	Q 3	Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D
34	B 4	124	E 4	214	H 4	304	K 4	394	N 4	484	Q 4	S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D-I-P
35	B 5	125	E 5	215	H 5	305	K 5	395	N 5	485	Q 5	D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S
36	B 6	126	E 6	216	H 6	306	K 6	396	N 6	486	Q 6	D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E
37	B 7	127	E 7	217	H 7	307	K 7	397	N 7	487	Q 7	I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E-M
38	B 8	128	E 8	218	H 8	308	K 8	398	N 8	488	Q 8	D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E-M-Q-I
39	B 9	129	E 9	219	H 9	309	K 9	399	N 9	489	Q 9	L-K-D-S-F-I-S-N-E-M-Q-I-K-D
40	B10	130	E10	220	H10	310	K10	400	N10	490	Q10	D-S-F-I-S-N-E-M-Q-I-K-D-F-V
41	B11	131	E11	221	H11	311	K11	401	N11	491	Q11	F-I-S-N-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R
42	B12	132	E12	222	H12	312	K12	402	N12	492	Q12	S-N-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L
43	B13	133	E13	223	H13	313	K13	403	N13	493	Q13	E-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L
44	B14	134	E14	224	H14	314	K14	404	N14	494	Q14	M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K
45	B15	135	E15	225	H15	315	K15	405	N15	495	Q15	I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F
46	B16	136	E16	226	H16	316	K16	406	N16	496	Q16	D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T
47	B17	137	E17	227	H17	317	K17	407	N17	497	Q17	V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V
48	B18	138	E18	228	H18	318	K18	408	N18	498	Q18	R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E
49	B19	139	E19	229	H19	319	K19	409	N19	499	Q19	L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cys(Acm)-N
50	B20	140	E20	230	H20	320	K20	410	N20	500	Q20	L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cys(Acm)-N-S-L
51	B21	141	E21	231	H21	321	K21	411	N21	501	Q21	K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cys(Acm)-N-S-L-K-N
52	B22	142	E22	232	H22	322	K22	412	N22	502	Q22	F-Q-T-S-V-K-E-Cys(Acm)-N-S-L-K-N-I
53	B23	143	E23	233	H23	323	K23	413	N23	503	Q23	T-S-V-K-E-Cys(Acm)-N-S-L-K-N-I-K-R
54	B24	144	E24	234	H24	324	K24	414	N24	504	Q24	V-K-E-Cys(Acm)-N-S-L-K-N-I-K-R-L-E
55	B25	145	E25	235	H25	325	K25	415	N25	505	Q25	E-Cys(Acm)-N-S-L-K-N-I-K-R-L-E-N-H
56	B26	146	E26	236	H26	326	K26	416	N26	506	Q26	N-S-L-K-N-I-K-R-L-E-N-H-I-E
57	B27	147	E27	237	H27	327	K27	417	N27	507	Q27	L-K-N-I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I
58	B28	148	E28	238	H28	328	K28	418	N28	508	Q28	N-I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K
59	B29	149	E29	239	H29	329	K29	419	N29	509	Q29	I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M
60	B30	150	E30	240	H30	330	K30	420	N30	510	Q30	R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V
61	C 1	151	F 1	241	I 1	331	L 1	421	O 1	511	R 1	E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T
62	C 2	152	F 2	242	I 2	332	L 2	422	O 2	512	R 2	H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K
63	C 3	153	F 3	243	I 3	333	L 3	423	O 3	513	R 3	E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D
64	C 4	154	F 4	244	I 4	334	L 4	424	O 4	514	R 4	I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q
65	C 5	155	F 5	245	I 5	335	L 5	425	O 5	515	R 5	K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G
66	C 6	156	F 6	246	I 6	336	L 6	426	O 6	516	R 6	M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S
67	C 7	157	F 7	247	I 7	337	L 7	427	O 7	517	R 7	V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S-T-T
68	C 8	158	F 8	248	I 8	338	L 8	428	O 8	518	R 8	L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S-T-T-L

Figure 93. Disposition des 68 peptides constituant la séquence protéique de la protéine A27 du virus LSD chevauchants de deux acides aminés au sein des bandelettes.

1.2.2. Sérums et anticorps

Pour la réalisation du PepScan, les six bandelettes contenant les 68 peptides "spottés" de la protéine A27 ont été incubées avec trois groupes de sérums différents issus d'une expérimentation réalisée en Ethiopie (Caufour *et al.*, 2014). Le premier groupe de sérums provient de chèvres naïves qui ont été challengées par une souche de Yemen goatpoxvirus et sera nommé « groupe naïf éprouvé », il est représenté par les animaux 17 et 18. Le deuxième groupe est constitué de 3 sérums appartenant à des caprins « immunisés éprouvés » ; pour cela les animaux numérotés 15, 21 et 28 ont reçu une injection de la souche vaccinale KS1 suivie après trois semaines par deux injections simultanées des deux recombinants H-PPR/KS1 et F-PPR/KS1. Par la suite, ces animaux ont été challengés avec la souche Yemen goatpoxvirus. Quant aux chèvres identifiées 9 et 12, elles ont suivi le même protocole expérimental décrit précédemment à l'exception de la première immunisation par KS1 qui n'a pas eu lieu. Le troisième groupe de caprins est constitué de chèvres séronégatives, il représente le contrôle négatif de l'épreuve de PepScan. La totalité des sérums expérimentés par le Pepscan ont été utilisés à la dilution 1/100. La révélation est effectuée par un anticorps anti-goat (H&L) produit chez un lapin couplé à la phosphatase alcaline (605-4502-Rockland) à la dilution 1/1000.

1.2.3. Réalisation

Avant de procéder à l'immunodétection, la membrane est d'abord réhydratée dans un bac contenant de l'éthanol pendant 2 minutes à température ambiante, ensuite la membrane contenant les 68 peptides synthétisés est placée dans un bac en polypropylène propre pour y être lavée trois fois avec du tampon TBS (composition en annexe 1) pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation. Par la suite, la membrane est incubée dans un tampon de saturation (Tampon TBS-T 0,1% + Blocking buffer 10X + saccharose) pendant une nuit à température ambiante. Le lendemain, la membrane est lavée une seule fois avec du TBS-Tween 20 0,1% pendant 10 minutes sous agitation. Une fois la membrane lavée, elle est incubée avec l'anticorps primaire dilué au 1/100 dans le tampon de saturation pendant 1h 30 minutes sous agitation à 37°C, ensuite la membrane est lavée trois fois avec du tampon TBS-Tween 20 0,1% pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation puis incubée avec l'anticorps secondaire (anti-goat couplé à la phosphatase alcaline) à la dilution 1/1000 dans du tampon de saturation pendant 1h à température ambiante sous agitation. La membrane est par la suite lavée deux fois avec du tampon TBST pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation puis

avec le tampon CBS (composition en annexe 1) deux fois pendant 10 minutes avant d'être révélée. Pour ce fait, la membrane est incubée de 1 à 30 minutes avec le substrat de la phosphatase alcaline (75µl MgCl₂ + 60µl BCIP + 90µl MTT dans 15ml CBS) à température ambiante sous agitation. La membrane est enfin lavée trois fois rapidement avec de l'eau pure.

Pour pouvoir tester tous les sérums, les bandelettes ont été régénérées et le travail s'est déroulé en 2 jours (D1 et D2). La régénération a débuté en incubant les bandelettes trois fois dans du diméthylformamide (DMF) pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation, suivi de trois lavages avec de l'eau pendant 2 minutes. Elles sont ensuite incubées trois fois dans du Regen A (composition en annexe 1) additionné de β-mercaptoéthanol à 0,1% pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation suivi de trois incubations de 10 minutes dans du Regen B (composition en annexe 1). Les bandelettes sont enfin lavées trois fois avec de l'éthanol pendant 10 minutes pour chaque lavage. La succession des bains dans les différents réactifs permet de décrocher les anticorps sériques fixés aux peptides spottés mais aussi les anticorps secondaires conjugués ainsi que le substrat coloré, régénérant une bandelette vierge. Les précautions d'utilisation sont détaillées dans l'annexe 5.

L'incubation des différentes bandelettes (identifiées "b1", "b2", "b3", "b4", "b5" et "b6") avec les différents sérums s'est faite comme indiquée dans le tableau 36 ci-dessous :

Tableau 36. Répartition des bandelettes du test Pepscan (b : bandelettes)

	Animal	Jour 1	Jour 2
Animaux naïfs éprouvés	17	b3	-
	18	b2 et b6	b2
Animaux immunisés éprouvés	9	-	b5
	12	-	b6
	15	b4	-
	21	-	b3
	28	-	b4
Animaux séronégatifs		b1 et b5	b1

2. Analyse *in silico* : Prédiction des épitopes B

Les épitopes sont des régions se trouvant à la surface des protéines, on en distingue deux types : les épitopes B qui sont reconnus par les anticorps et les épitopes T qui font réagir les lymphocytes T. Nous nous sommes intéressés à la prédiction des épitopes B de la protéine A27 du virus LSD des Capripoxvirus. Les épitopes B sont des parties de protéine qui se lient aux anticorps et peuvent être de deux types : soit des épitopes linéaires (continus ou séquentiels) constitués d'une suite contiguë d'acides aminés représentant 10% du nombre total des épitopes, alors que 90% des épitopes sont des épitopes conformationnels ou discontinus qui sont composés de plusieurs fragments dispersés le long de la séquence et rassemblés dans une proximité spatiale lorsque la protéine est repliée sous sa structure tertiaire ou quaternaire (Van Regenmortel, 2001).

Pour l'étude de ces épitopes, deux approches complémentaires ont été utilisées, une première étude des épitopes a été faite par une technique expérimentale de « peptide scanning » (paragraphe 1.2) associée à une analyse *in silico* de prédiction des épitopes. Même si les épitopes linéaires sont rares par rapport aux épitopes discontinus, leur identification est une première étape dans la recherche des déterminants antigénique au sein d'une protéine donnée.

2.1. Epitopes continus ou linéaires :

Pour la prédiction des épitopes B linéaires, nous avons utilisé le serveur Bepipred1.0, hébergé au sein de la Plateforme CBS Prediction servers. Ce serveur utilise un algorithme d'apprentissage basé sur la combinaison du modèle de Markov caché (Hidden Markov Model) et de l'échelle de propension à l'hydrophilicité établie par Parker et al, (échelle de propension évaluée comme étant la plus performante en comparaison aux autres échelles testées) (Parker *et al.*, 1986). Lorsque cette méthode est testée sur des données de validation, elle démontre une performance significativement supérieure à celle des autres méthodes de prédiction des épitopes linéaires (<http://www.cbs.dtu.dk/services/bepipred>) (Larsen *et al.*, 2006).

2.2. Epitopes discontinus ou conformationnels :

Le serveur DiscoTope 2.0 hébergé sur la plateforme CBS prediction servers est utilisé pour la prédiction des épitopes conformationnels.

Contrairement à d'autres méthodes de prédiction d'épitopes B basées exclusivement sur l'utilisation des séquences protéiques (input), méthodes plus adaptées à la prédiction d'épitopes composées de portions d'acides aminés contigus (épitopes linéaires), la méthodologie utilisée par le serveur discotope 2.0 repose sur l'utilisation d'informations relatives à la structure 3D des protéines.

Initialement basée sur des données statistiques relatives aux acides aminés, sur de l'information spatiale et sur la surface d'exposition; la méthodologie a été améliorée et utilise aujourd'hui en particulier une redéfinition du "voisinage spatial" utilisé pour sommer les scores de propension des résidus et l'exposition à une demi sphère comme mesure de la surface (Andersen *et al.*, 2006). L'inclusion d'information structurale, permet ainsi, dans une certaine mesure, de dépasser les limites des méthodes basées uniquement sur la séquence, en identifiant par exemple des acides aminés éloignés dans la séquence mais proches dans l'espace. De plus, l'introduction d'information structurale étend le nombre de propriétés physico-chimiques et attributs biologiques qui peuvent être calculés et pris en compte pour la prédiction.

Discotope 2.0 a démontré une meilleure performance dans la prédiction des épitopes conformationnels par rapport aux autres méthodes de prédiction dans des évaluations indépendantes et validations croisées (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope>) (Kringelum *et al.*, 2012).

Le modèle pdb généré sous Phyre2 (Partie III, Chapitre 1) pour la portion de la A27 du LSDV a été utilisé comme input sur le serveur Discotope 2.0.

II. Résultats

1. Analyse expérimentale

1.1. Western Blot

Pour étudier l'antigénicité de la protéine A27, nous avons fait réagir la fraction F1 de la protéine A27 produite en système baculovirus puis purifiée à l'aide d'une colonne anti histidine (Chapitre 3) avec deux types de sérums différents : sérums provenant de 4 caprins naïfs éprouvés et sérums de 2 ovins hyperimmunisés. Un sérum témoin négatif issu de l'espèce ovine est inclus dans le gel et, comme les sérum-test, mis en présence de la fraction purifiée de la protéine A27 produite en baculovirus. Les anticorps fixés sont par la suite révélés par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (anti goatHRP).

Comme le montre la figure 94, des bandes à environ 51 kDa sont observées dans la ligne correspondant à la fraction F1 de la protéine A27 incubée avec les quatre sérums issus des caprins G5 2 d28 17/5/11, G5 17 d28 17/5/11 et G5 18 17/5/11 ainsi que le sérum G5 17 d21 10/5/11. Cette bande à environ 51 kDa représenterait la forme trimérique de la protéine bien que ce western blot ait été conduit en conditions dénaturantes.

Les sérums provenant des caprins 2 et 17 (prélevé à J21 et J28) ont reconnu une deuxième bande moins intense de 100kda qui pourrait représenter la forme hexamérique de la protéine. Cette deuxième bande n'a pas été reconnue par le sérum positif du caprin 18.

Enfin, le sérum caprin G5 1 d21 10/5/11 ainsi que les sérums des ovins hyperimmuns n'ont pas reconnu la protéine A27 comme c'est le cas pour le témoin négatif (sérum ovine) en position 8 dans le gel. Même si l'on sait qu'il existe une réaction croisée chez les deux espèces ovine et caprine, un deuxième western blot est à refaire en ajoutant comme témoin ; un sérum provenant de chèvre séronégative.

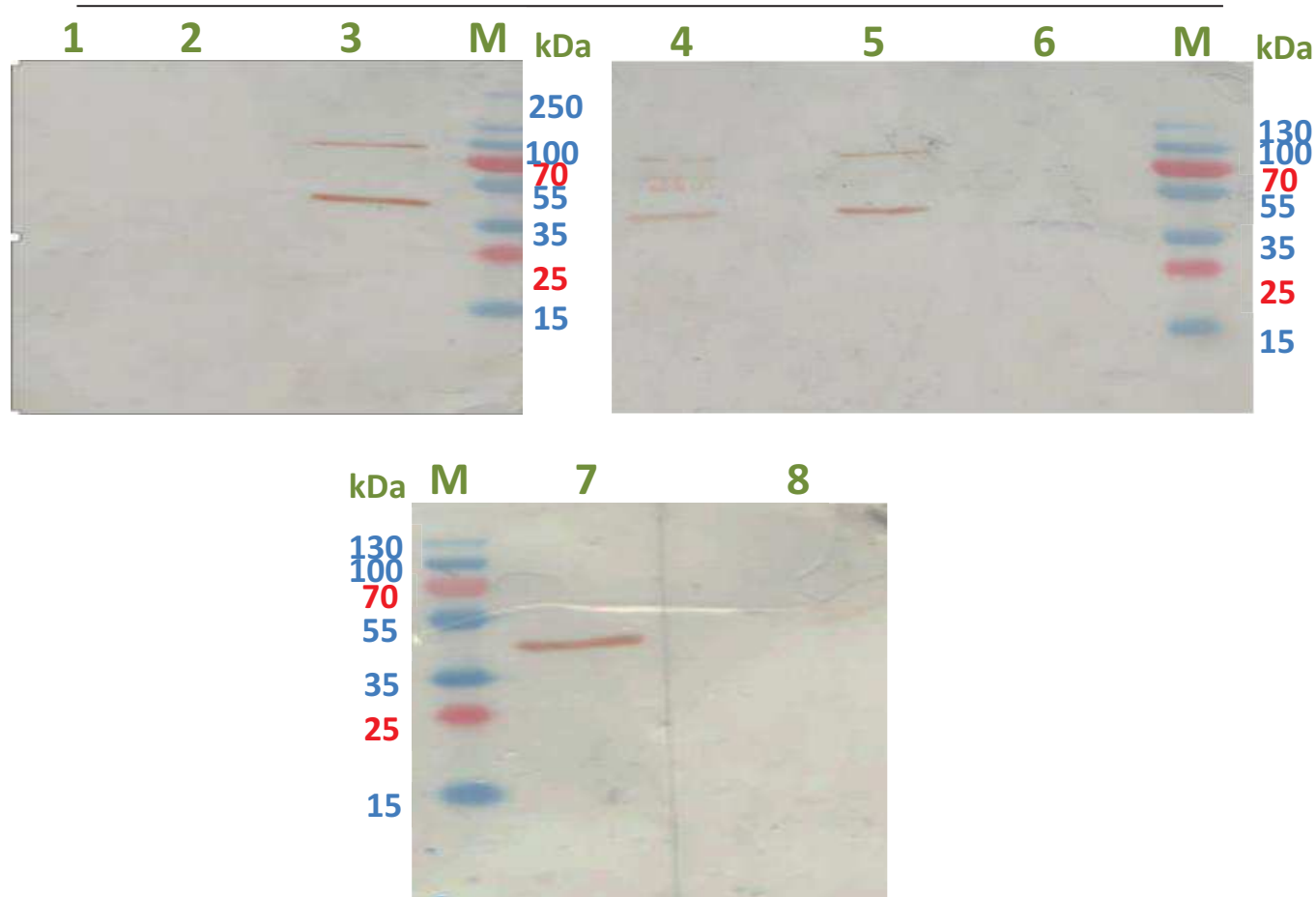


Figure 94. Résultat du western blot en conditions dénaturantes réalisé sur la fraction F1 de la protéine A27 purifiée : M : marqueur moléculaire, 1. SHI souche vaccinale 1983, 2. SHI souche vaccinale 1982, 3. G5 17 d21 10/5/11, 4. G5 2 d28 17/5/11, 5. G5 17 d28 17/5/11, 6. G5 1 d21 10/5/11, 7. G5 18 d28 17/5/11 et 8. Témoin négatif (sérum ovin).

1.2. PepScan

La lecture des résultats du pepscan est réalisée de façon indépendante et à l'aveugle par deux lecteurs (L1 et L2). Chacune des bandelettes incubées avec un sérum-test donné (bandelette-test) est comparée avec la bandelette incubée avec le sérum négatif (sérum caprin) (bandelette témoin). Une lecture comparative, spot à spot, est ainsi réalisée pour chacun des spots de même rang (spot N°i de bandelette-test comparé avec spot N°i de bandelette témoin). Les figures 95 et 96 représentent le résultat du pepscan respectivement pour les jours 1 et 2.

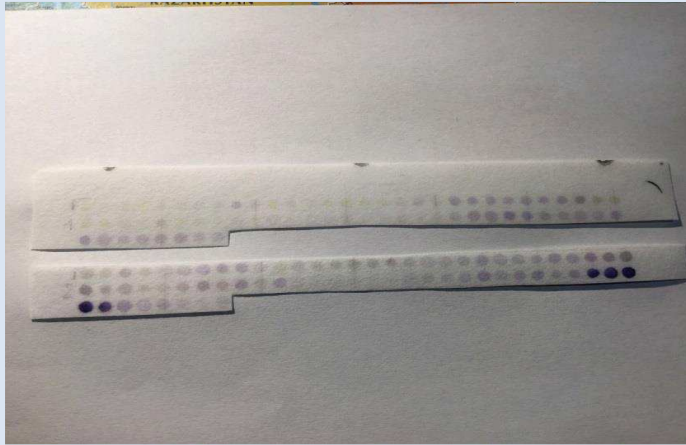
Le différentiel d'intensité entre le même spot des deux bandelettes est noté selon la grille suivante:

Grille lecture comparative		
Score	Lecture Spots	Difference serum test vs. Serum témoin
0	.--	Pas de différence entre le spot avec serum test et spot avec serum témoin neg.
1	.-/+	Différence légère
2	.+	Différence nette
3	.++	Différence nette et intense
4	.+++	Différence très intense

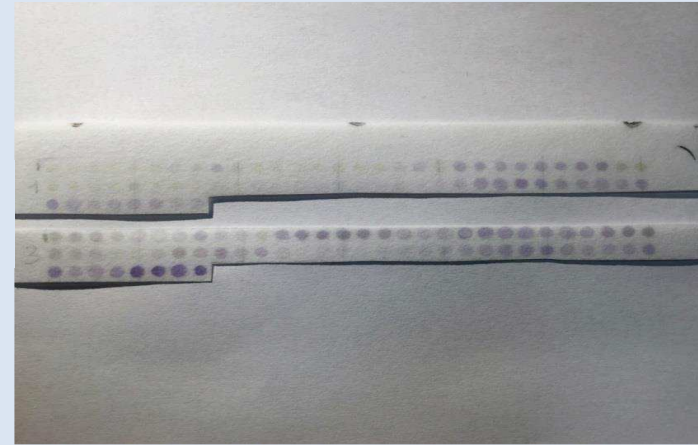
Les sérums des 7 animaux ont ainsi été testés comparativement (par rapport à la bandelette témoin) et donnés les résultats bruts suivants, incluant les résultats de chacun des deux lecteurs (Tableau 37).

PEPSCAN – jour 1

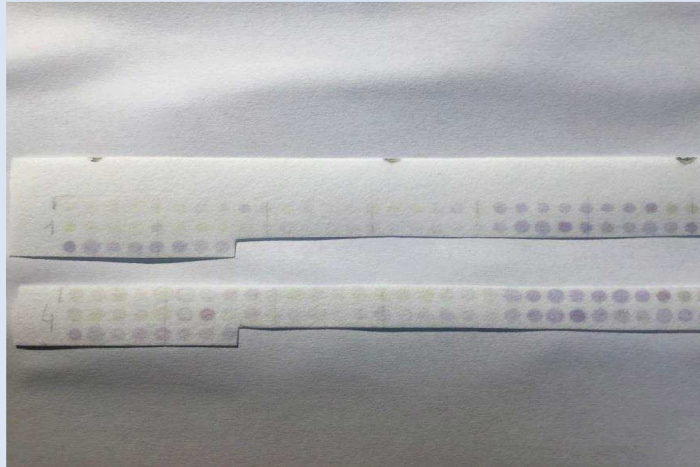
b1
b2



b1
b3



b1
b4



b5
b6

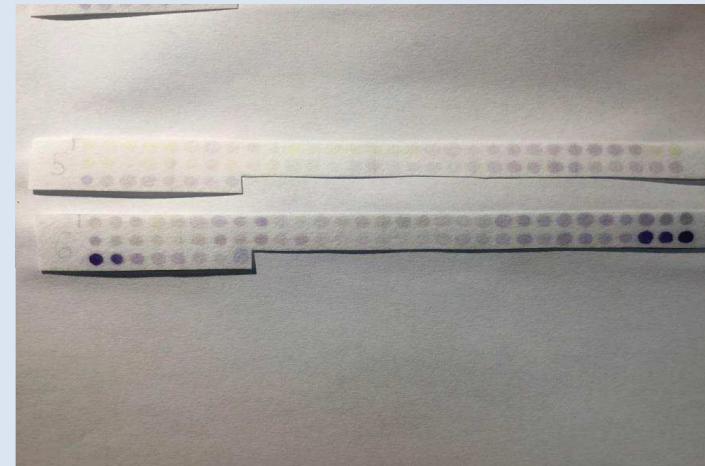
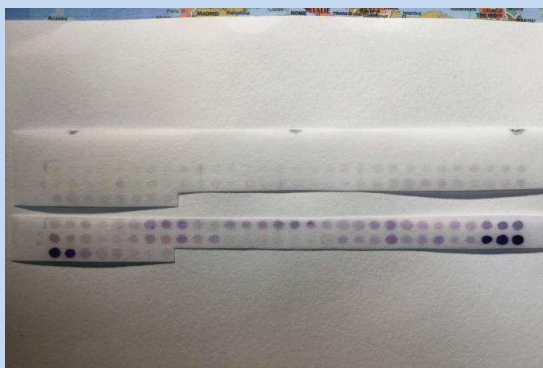


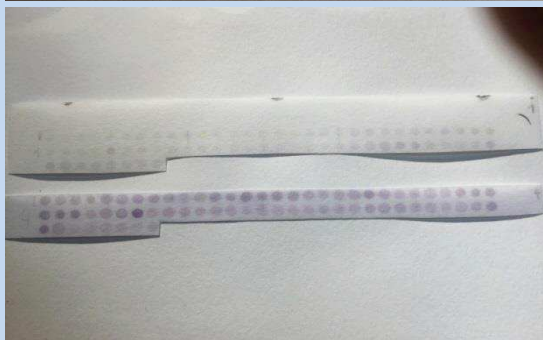
Figure 95. Résultat du Pepsan réalisé au jour 1 (b : bandelettes).

PEPSCAN – jour 2

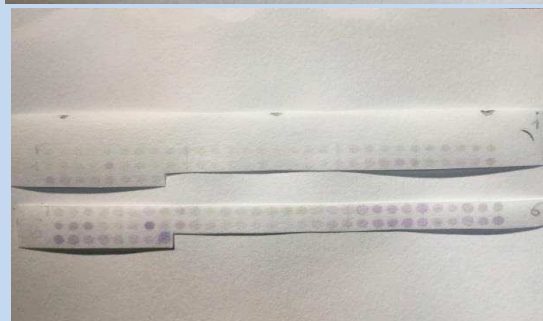
b1
b2



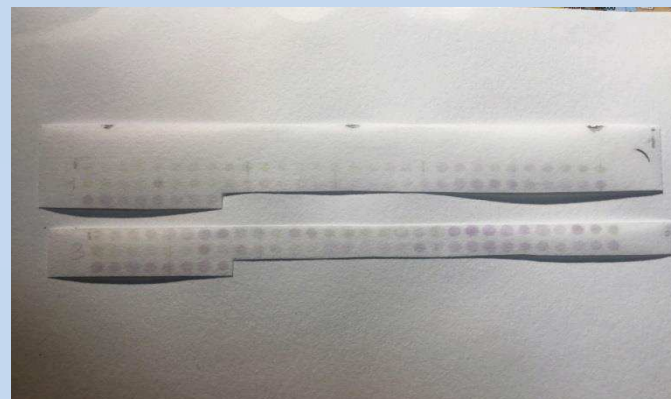
b1
b4



b5
b6



b1
b3



b1
b5

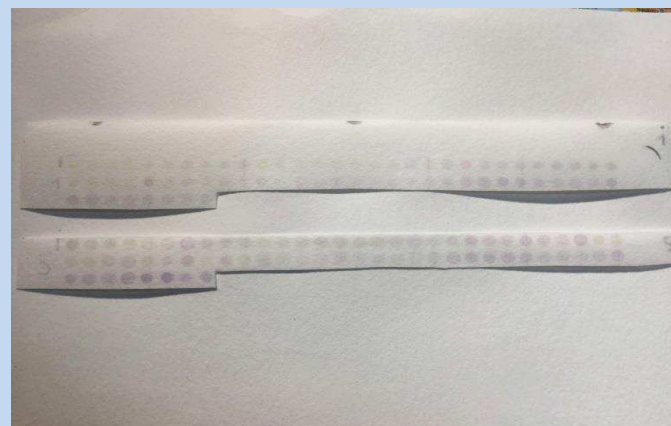


Figure 96. Résultat du Pepsan réalisé au jour 2 (b : bandelettes).

Position				Animal 18				Animal 17		Animal 15		Animal 21		Animal 28		Animal 9		Animal 12		
				Day 1		d1		Day 2		d1		d1		Day 2		Day 2		Day 2		
				L1b1b2 d1	L2b1b2 d1	L1b5b6 d1	L2b5b6 d1	L1-b1b2-d2	L2-b1b2d2	L1b1b3 d1	L2b1b3 d1	L1-b1b4-d1	L2b1b4 d1	L1-b1b3-d2	L2-b1b3 d2	L1-b1b4-d2	L2-b1b4 d2	L1-b1b5-d2	L2-b1b5d2	L1-b1b6-d2
1	1	M-D-R-A-L-S-I-F-P-G-D-D-E-T	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
3	2	R-A-L-S-I-F-P-G-D-D-E-T-N-E	1	1	1	1	1	1	1	2	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1
5	3	L-S-I-F-P-G-D-D-E-T-N-E-R-N	1	2	1	1	2	2	1	2	0	1	0	0	1	1	1	1	1	2
7	4	I-F-P-G-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
9	5	P-G-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
11	6	D-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
13	7	D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S	1	1	1	1	2	2	1	1	0	1	1	1	2	2	1	1	1	1
15	8	T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E	1	2	1	1	2	2	1	2	0	1	1	1	2	2	0	0	0	1
17	9	E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G	0	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	1
19	10	N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
21	11	N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
23	12	R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L	1	1	0	1	2	2	2	2	0	0	1	1	2	2	0	0	0	1
25	13	K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L-L-D	1	1	0	1	1	2	2	3	0	0	1	1	2	2	0	0	0	1
27	14	S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S	1	1	1	1	1	2	2	3	0	0	0	1	2	2	0	1	0	1
29	15	E-H-G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E	1	1	1	1	2	2	2	3	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
31	16	G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E-P	1	1	1	1	2	2	2	3	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1
33	17	Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E-P-N-M	1	2	1	0	1	2	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1
35	18	D-K-L-L-D-L-S-E-E-P-N-M-I-K	1	1	0	0	1	2	1	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
37	19	L-L-D-L-S-E-E-P-N-M-I-K-I-K	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
39	20	D-L-S-E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1
41	21	S-E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K	0	1	1	2	2	1	1	1	0	0	2	1	1	1	0	0	2	1
43	22	E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K-K-I	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2
45	23	P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K-K-I-I-N	1	1	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1	2	1	1	0	2	2
47	24	M-I-K-I-K-N-D-I-K-K-I-I-N-E-R	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
49	25	K-I-K-N-D-I-K-K-I-I-N-E-R-Y-S	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1
51	26	K-N-D-I-K-K-I-I-N-E-R-Y-S-N-Y	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	0	1	1	1	0	1	0	1
53	27	D-I-K-K-I-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2	0	1	1	1	0	0	0	1
55	28	K-K-I-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D	0	0	1	1	2	2	0	1	0	0	1	2	2	2	1	2	1	2
57	29	I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D	2	1	2	2	3	2	2	2	0	0	0	1	2	2	0	0	0	1
59	30	N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I	2	1	2	2	3	2	2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	1
61	31	R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D	1	2	1	2	2	2	1	1	0	1	0	0	2	2	0	0	1	2
63	32	S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L	1	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	0	2	2	0	0	1	2
65	33	Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D	1	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	0	2	2	0	1	1	2
67	34	S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
69	35	D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
supposed HBD																				

supposed HBD

	71	36	D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
	73	37	I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E-M	1	2	1	2	2	1	1	2	2	3	1	1	3	3	1	1	2	3
	75	38	D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E-E-M-Q-I	1	2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
	77	39	L-K-D-S-F-I-S-N-E-E-M-Q-I-K-D	1	2	1	2	3	2	1	2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	2
	79	40	D-S-F-I-S-N-E-E-M-Q-I-K-D-F-V	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
supposed CCD	81	41	F-I-S-N-E-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R	1	1	1	2	2	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
	83	42	S-N-E-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	85	43	E-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	87	44	M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	89	45	I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	91	46	D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	93	47	V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	95	48	R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	97	49	L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cyz(Acm)	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
	99	50	L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cyz(Acm)-h	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
	101	51	K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cyz(Acm)-H-S-I	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	103	52	F-Q-T-S-V-K-E-Cyz(Acm)-N-S-L-K-I	1	0	1	1	2	2	0	0	1	0	1	1	2	0	1	2	2	2
	105	53	T-S-V-K-E-Cyz(Acm)-H-S-L-K-N-I-I	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	2	2
	107	54	V-K-E-Cyz(Acm)-N-S-L-K-N-I-I-K-R	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1
	109	55	E-Cyz(Acm)-N-S-L-K-N-I-I-K-R-L-E	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1
supposed LZD	111	56	N-S-L-K-N-I-I-K-R-L-E-N-H-I-E	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	113	57	L-K-N-I-I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	115	58	N-I-I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K	4	3	4	3	4	3	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1
	117	59	I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M	4	3	4	3	5	3	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
	119	60	R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V	4	3	4	3	5	3	0	1	0	0	0	1	2	2	0	1	2	2
	121	61	E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T	4	3	4	3	5	3	1	1	0	0	0	1	2	2	0	1	1	2
	123	62	H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K	3	3	3	3	4	3	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	2
	125	63	E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	127	64	I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1
	129	65	K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G	0	0	0	0	0	0	3	3	0	1	0	0	0	1	2	3	0	0
	131	66	M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S	0	0	0	0	0	0	3	3	0	1	0	1	0	1	2	3	0	0
	133	67	V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S-T-T	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	135	68	L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S-T-T-L	0	0	0	1	0	0	2	3	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2

Tableau 37. Résultats bruts de l'analyse avec le Pepscan (L1 : Lecteur 1, L2 : Lecteur 2, b1 à b6 : Numéro des bandelettes, d1 : Jour 1, d2 : Jour 2)

A partir de ces résultats bruts, diverses opérations vont être ensuite réalisées. Tout d'abord, une moyenne du résultat des deux lectures est calculée pour chacun des spots. Dans le cas particulier du sérum de l'animal 18 pour lequel trois tests ont été réalisés (deux tests le premier jour et un test le second jour), une moyenne est calculée à partir des 6 lectures réalisées.

Dans l'opération suivante, il s'agissait pour chacun des spots de pouvoir définir un résultat global prenant en compte la réactivité de l'ensemble des 7 sérums testés. Pour y parvenir, deux scores ont été définis de la façon suivante :

- Nombre d'animaux positifs : cela correspond au nombre d'animaux totalisant un score ≥ 1 . En continuité avec la notation adoptée pour évaluer le différentiel d'intensité correspondant à un spot pour un sérum donné (cf grille ci-dessus), on considère ainsi que ce sérum (et par extension, l'animal dont est issu le sérum) est positif si la moyenne des deux lectures correspondant à ce spot est ≥ 1 .
- Score global pour un spot donné : Ce score correspond à la moyenne des moyennes de chaque sérum, dit autrement sommation des différentes moyennes que l'on divise par le nombre total d'animaux ou sérums soit par 7.

A partir de ces deux scores, une grille de lecture est établie arbitrairement pour définir l'intensité de reconnaissance d'un spot et définir trois catégories de spot : (1) spot pour lequel il n'y a aucune reconnaissance, (2) spot pour lequel il y a une reconnaissance légère et (3) spot pour lequel il y a une reconnaissance forte. Visuellement une couleur est associée à chacune de ces trois catégories de reconnaissance.

Grille Code Couleur	couleur remplissage de la cellule	Score	nb an.
aucune reconnaissance		≤ 0.5	≤ 2
reconnaissance légère		$> \text{à } 0.5$	> 2
reconnaissance forte		≥ 1	> 4

Au final, on définit ainsi pour chacun des 68 spots une catégorie d'intensité de reconnaissance, en prenant en compte les réactions observées avec les sérums des 7 animaux. Le long de la séquence protéique, à mesure que défile successivement chacun des peptides spottés, on voit apparaître puis disparaître un signal.

L'interprétation classique du Pepscan consiste à considérer que :

- A l'apparition du signal, l'épitope est présent dans le peptide testé (correspondant au spot) et permet l'accrochage de l'anticorps,
- La persistance du signal signifie que cet épitope est toujours présent dans le peptide testé (ou spot) permettant la fixation de l'anticorps
- La disparition du signal signifie que l'épitope a été altéré dans le peptide testé ne permettant plus l'accrochage de l'anticorps.

Le résultat final des lectures (moyenne), de l'analyse, du calcul des scores et de l'identification des épitopes est représenté par le tableau Excel 38.

Les épitopes identifiés sont représentés en caractères rouge au sein des différents peptides spottés le long de la séquence de la A27.

								An. 18	An. 17	An. 15	An. 21	An. 28	An. 9	An. 12
Start				End										
Position	N' peptide			Position	Snb	Ssc	Ccoul.							
1	1	M-D-R-A-L-S-I-F-P-G-D-D-D-E-T		15	4	0,7		1*	1	0,5	0	1	1	0,5
3	2	R-A-L-S-I-F-P-G-D-D-D-E-T-N-E		17	3	0,8		1,0	1,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5
5	3	L-S-I-F-P-G-D-D-D-E-T-N-E-R-N		19	5	1,0		1,5	1,5	0,5	0	1	1	1,5
7	4	I-F-P-G-D-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N		21	2	0,4		0,0	1,5	0	0	1	0,5	0
9	5	P-G-D-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R		23	2	0,4		0,2	0,5	1	0	1	0	0
11	6	D-D-D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K		25	3	0,6		0,7	0,5	1	0,5	1	0,5	0
13	7	D-E-T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S		27	6	1,1		1,3	1	0,5	1	2	1	1
15	8	T-N-E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E		29	4	1,0		1,5	1,5	0,5	1	2	0	0,5
17	9	E-R-N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G		31	3	0,5		1,2	0	0	0	1,5	0	1
19	10	N-I-N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y		33	0	0,3		0,2	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5
21	11	N-H-R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D		35	0	0,1		0,0	0	0	0	0,5	0	0
23	12	R-E-K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L		37	4	1,0		1,2	2	0	1	2	0	0,5
25	13	K-T-S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L-D		39	4	1,0		1,0	2,5	0	1	2	0	0,5
27	14	S-G-E-H-G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S		41	3	1,0		1,2	2,5	0	0,5	2	0,5	0,5
29	15	E-H-G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E		43	3	0,8		1,3	2,5	0	0	1,5	0	0
31	16	G-H-Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E-E-P		45	3	0,9		1,3	2,5	0	0	2	0	0,5
33	17	Y-E-D-K-L-L-D-L-S-E-E-E-P-N-M		47	3	0,8		1,2	2	0	0	2	0	0,5
35	18	D-K-L-L-D-L-S-E-E-E-P-N-M-I-K		49	3	0,5		0,8	1,5	0	0,5	1	0	0
37	19	L-L-D-L-S-E-E-E-P-N-M-I-K-I-K		51	1	0,3		0,3	0	0	0	1	0	0,5
39	20	D-L-S-E-E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D		53	2	0,5		0,8	0,5	0	0	1,5	0	0,5
41	21	S-E-E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K		55	5	0,9		1,2	1	0	1,5	1	0	1,5
43	22	E-E-P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K-K-I		57	7	1,5		1,2	1	1	2	2	1	2
45	23	P-N-M-I-K-I-K-N-D-I-K-K-I-I-N		59	5	1,1		1,2	0,5	1	1	1,5	0,5	2
47	24	M-I-K-I-K-N-D-I-K-K-I-I-N-E-R		61	4	0,8		0,8	0,5	0,5	1	1	0,5	1
49	25	K-I-K-N-D-I-K-K-I-I-N-E-R-Y-S		63	4	0,7		0,2	0	1	0,5	1	1	1,5
51	26	K-N-D-I-K-K-I-I-N-E-R-Y-S-N-Y		65	2	0,7		0,3	0,5	1,5	0,5	1	0,5	0,5
53	27	D-I-K-K-I-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S		67	2	0,6		0,2	0,5	1,5	0,5	1	0	0,5
55	28	K-K-I-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D		69	5	1,1		1,0	0,5	0	1,5	2	1,5	1,5
57	29	I-I-N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D		71	3	1,0		2,0	2	0	0,5	2	0	0,5
59	30	N-E-R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I		73	3	0,9		2,0	2	0	0	2	0	0,5
61	31	R-Y-S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D		75	4	1,0		1,7	1	0,5	0	2	0	1,5
63	32	S-N-Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L		77	3	0,8		1,2	0,5	0,5	0	2	0	1,5
65	33	Y-I-S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D		79	3	0,9		1,2	0,5	0,5	0	2	0,5	1,5
67	34	S-I-D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F		81	1	0,3		0,3	0	0,5	0	1	0,5	0
69	35	D-D-D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S		83	1	0,1		0,0	0	0	0	1	0	0

supposed HBD

	71	36	D-E-I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E	85	2	0,5		0,7	0,5	1	0	1	0,5	0
	73	37	I-S-D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E-E-M	87	7	1,9		1,5	1,5	2,5	1	3	1	2,5
	75	38	D-I-L-K-D-S-F-I-S-N-E-E-M-Q-I	89	2	0,4		1,0	1	0	0	0,5	0	0,5
	77	39	L-K-D-S-F-I-S-N-E-E-M-Q-I-K-D	91	4	1,0		1,8	1,5	0,5	0,5	1	0,5	1,5
	79	40	D-S-F-I-S-N-E-E-M-Q-I-K-D-F-V	93	0	0,3		0,7	0,5	0	0	0,5	0	0,5
supposed CCD	81	41	F-I-S-N-E-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R	95	2	0,6		1,3	1,5	0	0,5	0,5	0	0,5
	83	42	S-N-E-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L	97	1	0,1		0,0	0	0	0	1	0	0
	85	43	E-E-M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L	99	1	0,1		0,0	0	0	0	1	0	0
	87	44	M-Q-I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K	101	0	0,1		0,0	0	0,5	0	0,5	0	0
	89	45	I-K-D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F	103	1	0,2		0,0	0	0,5	0	1	0	0
	91	46	D-F-V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T	105	0	0,1		0,0	0	0	0	0,5	0	0
	93	47	V-L-R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V	107	0	0,1		0,0	0	0,5	0	0,5	0	0
	95	48	R-L-L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E	109	0	0,3		0,3	0	0,5	0	0,5	0	0,5
	97	49	L-V-L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cyr(Acm)-N	111	2	0,5		0,7	0	0,5	1	0,5	0	1
	99	50	L-E-K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cyr(Acm)-N-S-L	113	1	0,3		0,3	0	0	0	0,5	0	1
	101	51	K-L-F-Q-T-S-V-K-E-Cyr(Acm)-N-S-L-K-N	115	2	0,5		0,2	0	0,5	0	0,5	1	1
	103	52	F-Q-T-S-V-K-E-Cyr(Acm)-N-S-L-K-N-I-I	117	3	0,9		1,2	0	0,5	0,5	1,5	0,5	2
	105	53	T-S-V-K-E-Cyr(Acm)-N-S-L-K-N-I-I-K-R	119	2	0,6		0,2	0	0	0,5	1	0,5	2
	107	54	V-K-E-Cyr(Acm)-N-S-L-K-N-I-I-K-R-L-E	121	2	0,4		0,3	0	0	0	1	0	1,5
	109	55	E-Cyr(Acm)-N-S-L-K-N-I-I-K-R-L-E-N-H	123	2	0,5		0,7	0	0	0	1	0	1,5
	111	56	N-S-L-K-N-I-I-K-R-L-E-N-H-I-E	125	0	0,2		0,2	0	0	0,5	0,5	0	0
	113	57	L-K-N-I-I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I	127	0	0,0		0,3	0	0	0	0	0	0
	115	58	N-I-I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K	129	3	0,9		3,5	0	0,5	0	1	0	1
supposed LZD	117	59	I-K-R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M	131	3	1,0		3,7	0	0,5	0,5	1	0,5	1
	119	60	R-L-E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V	133	3	1,3		3,7	0,5	0	0,5	2	0,5	2
	121	61	E-N-H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T	135	4	1,3		3,7	1	0	0,5	2	0,5	1,5
	123	62	H-I-E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K	137	3	1,0		3,2	0	0	0,5	1	0,5	1,5
	125	63	E-T-I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D	139	1	0,2		0,8	0	0	0	0	0	0,5
	127	64	I-R-K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q	141	2	0,4		0,0	1	0	0	0	1,5	0,5
	129	65	K-N-M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G	143	2	0,9		0,0	3	0,5	0	0,5	2,5	0
	131	66	M-I-V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S	145	2	1,0		0,0	3	0,5	0,5	0,5	2,5	0
	133	67	V-L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S-T-T	147	1	0,5		0,0	2,5	0	0,5	0	0,5	0
	135	68	L-T-K-K-V-D-F-Q-T-G-R-S-T-T-L	148	3	0,7		0,2	2,5	0	0	0,5	1	1

Tableau 38. Interprétation du résultat du Pepscan. Animaux 17 et 18 (An.17, An.18) : animaux naïfs éprouvés, animaux 15, 21, 28, 9 et 12 (An.15, An.21, An.28, An.9, An.12) : animaux immunisés et éprouvés, b1 à b6 : 6 bandelettes identiques contenant 68 spots de 15 peptides chevauchants de 2 acides aminés)

Ce tableau Excel nous a permis de mettre en évidence 6 zones « épitopiques linéaires » dans la séquence de la protéine A27 comme le montre cette séquence de la protéine comme suit :

MDRAL**LSIFPGDDDETNERNINHREK**TSGEHGH**YEDKL**LDLSEEEPNMI**KIKNDIK**K
IINERYSN**YISID**DDE**ISDILKDSFISNEEMQIKD**FVLRLLVLEKLFQTSVKECNSLKN
IIKRLN**HIETIRK**NMIVLTKKVDFQTGRSTTL

LSIFPGDDDETNERNINHREK: **5-25**

YEDKL: **33-37**

KIKNDIK: **49-55**

YISID: **65-69**

ISDILKDSFISNEEMQIKD: **73-91**

HIETIRK: **123-129**

On remarque la présence d'épitopes courts (5 acides aminés seulement) et des épitopes plus longs tout le long de la protéine (une vingtaine de résidus). L'analyse des épitopes linéaires par PepScan a révélé la présence de quatre premiers épitopes à la partie N terminale de la protéine mais aussi un épitope de 19 résidus au niveau du domaine considéré comme étant le domaine CCD et un épitope de 7 résidus au niveau de l'extrémité de la partie C terminale de protéine A27.

2. Analyse *in silico* : Prédiction des épitopes B

Une fois l'analyse des épitopes par la méthode expérimentale (peptide scanning) effectuée, il importait de comparer le résultat de cette analyse avec le résultat des méthodes de prédiction des épitopes linéaires et conformationnels *in silico* de la protéine.

2.1. Prédiction des épitopes linéaires

2.1.1. Protéine A27 du virus LSD

La séquence protéique entière de la protéine A27 du virus LSD a été étudiée en vue de la prédiction des épitopes linéaires par le logiciel BepiPred. Chaque prédiction est associée à un score ; un score de prédiction élevé augmente la probabilité qu'un résidu donné soit prédit en tant qu'épitope linéaire. Le résultat de cette prédiction est représenté par la figure 97 dans laquelle nous avons fait figurer les épitopes prédits avec un score élevé (>1) en gras.

start	end	score			start	end	score			start	end	score			start	end	score		
1	1	-0.514	.	M .	38	38	-0.089	.	L .	75	75	0.201	.	D .	112	112	-0.257	.	S .
2	2	-0.454	.	D .	39	39	0.078	.	D .	76	76	0.011	.	I .	113	113	-0.570	.	L .
3	3	-0.675	.	R .	40	40	0.234	.	L .	77	77	-0.427	.	L .	114	114	-0.718	.	K .
4	4	-0.768	.	A .	41	41	0.338	.	S .	78	78	-0.536	.	K .	115	115	-0.744	.	N .
5	5	-0.580	.	L .	42	42	0.766	.	E E	79	79	-0.547	.	D .	116	116	-1.037	.	I .
6	6	-0.174	.	S .	43	43	1.044	.	E E	80	80	-0.461	.	S .	117	117	-0.963	.	I .
7	7	0.103	.	I .	44	44	0.668	.	E E	81	81	-0.049	.	F .	118	118	-0.707	.	K .
8	8	0.474	.	F E	45	45	0.878	.	P E	82	82	0.367	.	I E	119	119	-0.711	.	R .
9	9	0.806	.	P E	46	46	0.465	.	N E	83	83	0.175	.	S .	120	120	-0.891	.	L .
10	10	1.372	.	G E	47	47	0.397	.	M E	84	84	0.087	.	N .	121	121	-0.570	.	E .
11	11	1.595	.	D E	48	48	0.140	.	I .	85	85	-0.206	.	E .	122	122	-0.281	.	N .
12	12	2.015	.	D E	49	49	0.008	.	K .	86	86	0.088	.	E .	123	123	-0.407	.	H .
13	13	2.375	.	D E	50	50	-0.307	.	I .	87	87	0.404	.	M E	124	124	-0.341	.	I .
14	14	2.333	.	E E	51	51	-0.434	.	K .	88	88	0.005	.	Q .	125	125	-0.095	.	E .
15	15	2.180	.	T E	52	52	-0.404	.	N .	89	89	-0.380	.	I .	126	126	-0.161	.	T .
16	16	1.509	.	N E	53	53	-0.348	.	D .	90	90	-0.982	.	K .	127	127	-0.427	.	I .
17	17	1.230	.	E E	54	54	-0.538	.	I .	91	91	-1.307	.	D .	128	128	-0.819	.	R .
18	18	0.892	.	R E	55	55	-0.227	.	K .	92	92	-1.605	.	F .	129	129	-0.901	.	K .
19	19	0.715	.	N E	56	56	-0.232	.	K .	93	93	-2.096	.	V .	130	130	-1.302	.	N .
20	20	0.675	.	I E	57	57	-0.215	.	I .	94	94	-2.156	.	L .	131	131	-1.291	.	M .
21	21	0.630	.	N E	58	58	-0.439	.	I .	95	95	-2.546	.	R .	132	132	-1.065	.	I .
22	22	0.617	.	H E	59	59	-0.162	.	N .	96	96	-2.611	.	L .	133	133	-0.989	.	V .
23	23	0.779	.	R E	60	60	-0.129	.	E .	97	97	-2.334	.	L .	134	134	-1.133	.	L .
24	24	0.847	.	E E	61	61	-0.158	.	R .	98	98	-2.394	.	V .	135	135	-1.012	.	T .
25	25	1.322	.	K E	62	62	-0.173	.	Y .	99	99	-2.246	.	L .	136	136	-1.015	.	K .
26	26	1.346	.	T E	63	63	0.111	.	S .	100	100	-2.040	.	E .	137	137	-0.492	.	K .
27	27	1.471	.	S E	64	64	-0.137	.	N .	101	101	-1.540	.	K .	138	138	-0.110	.	V .
28	28	1.430	.	G E	65	65	0.014	.	Y .	102	102	-0.959	.	L .	139	139	0.414	.	D E
29	29	1.278	.	E E	66	66	0.180	.	I .	103	103	-0.738	.	F .	140	140	0.540	.	F E
30	30	1.296	.	H E	67	67	0.465	.	S E	104	104	-0.363	.	Q .	141	141	0.712	.	Q E
31	31	1.279	.	G E	68	68	0.559	.	I E	105	105	-0.302	.	T .	142	142	0.664	.	T E
32	32	1.095	.	H E	69	69	0.363	.	D E	106	106	-0.257	.	S .	143	143	0.879	.	G E
33	33	0.647	.	Y E	70	70	0.528	.	D E	107	107	0.082	.	V .	144	144	0.481	.	R E
34	34	0.045	.	E .	71	71	0.879	.	D E	108	108	0.386	.	K E	145	145	0.797	.	S E
35	35	0.002	.	D .	72	72	0.594	.	E E	109	109	0.123	.	E .	146	146	0.714	.	T E
36	36	-0.369	.	K .	73	73	0.538	.	I E	110	110	0.090	.	C .	147	147	0.676	.	T E
37	37	-0.256	.	L .	74	74	0.327	.	S .	111	111	-0.063	.	N .	148	148	0.476	.	L E

Figure 97. Résultat de prédiction des épitopes linéaires de la protéine A27 du virus LSD par le serveur Bepipred (en jaune : zones définies comme appartenant à un épitope linéaire, en gras : score de prédiction important > 1)

Les peptides prédits comme étant des épitopes linéaires par le logiciel sont représentés en jaune, les résidus ayant un score élevé de prédiction sont représentés en rouge.

MDRALSI**FP****GDDDETNE****RNINHRE****KTSGEHGH****Y**EDKLLDLS**EEEPNM**IKIKNDIKKIINERYSN
YI**SIDDDDEI****SDILKDSFI****SNEE****M**QIKDFVLRLLVLEKLFQTSV**K**ECNSLKNIKRLENHIETIRKNM
IVLTKKV**DFQTGRSTTL**

Plusieurs régions épitopiques ont été prédites au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD, elles englobent les acides aminés de 8 à 33, 42 à 47, 67 à 73, 82, 87, 108 et 139 à 148. On peut remarquer la présence d'épitopes linéaires composés de 10 acides aminés ou de seulement 1 acide aminé. Le résultat de cette prédiction d'épitopes linéaires fait ressortir 4 zones épitopiques essentielles : 3 épitopes se trouvent à la partie N terminale de la protéine, et un dernier au niveau de l'extrémité de la partie C terminale de la protéine. Au sein de ces deux épitopes, les résidus ont été prédits avec des scores différents, deux zones dans la partie N terminale s'étalant des résidus 10 à 17 et 25 à 32 ont été prédits avec un score important (>1) signifiant que ces zones ont beaucoup plus de probabilité d'appartenir à un épitope linéaire.

2.1.2. Protéine A27 du virus de la vaccine

A titre de mise à l'épreuve du serveur Bepipred par confrontation des données prédites avec les données existantes, la même démarche est suivie pour l'étude des épitopes linéaires de la protéine A27 du virus de la vaccine à partir de la séquence protéique entière. Le résultat de cette prédiction des épitopes linéaires est représenté dans la figure 98. Chaque épitope prédit est associé à un score, les épitopes linéaires ayant un score élevé sont les plus probables et sont représentés en gras.

start	end	score		start	end	score		start	end	score	
1	1	0.225	. . M .	37	37	0.697	. . K E	74	74	0.058	. . R .
2	2	-0.068	. . D .	38	38	0.894	. . A E	75	75	-0.224	. . N .
3	3	0.064	. . G .	39	39	1.213	. . D E	76	76	-0.549	. . D .
4	4	0.361	. . T E	40	40	1.701	. . E E	77	77	-0.506	. . E .
5	5	0.766	. . L E	41	41	2.014	. . D E	78	78	-0.765	. . V .
6	6	1.127	. . F E	42	42	2.050	. . D E	79	79	-0.710	. . L .
7	7	1.139	. . P E	43	43	1.794	. . N E	80	80	-0.805	. . F .
8	8	0.813	. . G E	44	44	1.556	. . E E	81	81	-0.933	. . R .
9	9	0.777	. . D E	45	45	1.274	. . E E	82	82	-0.993	. . L .
10	10	0.767	. . D E	46	46	0.987	. . T E	83	83	-0.690	. . E .
11	11	1.056	. . D E	47	47	0.432	. . L E	84	84	-0.271	. . N .
12	12	1.074	. . L E	48	48	0.168	. . K .	85	85	-0.079	. . H .
13	13	1.007	. . A E	49	49	-0.023	. . Q .	86	86	0.043	. . A .
14	14	0.655	. . I E	50	50	-0.395	. . R .	87	87	0.240	. . E .
15	15	0.129	. . P .	51	51	-0.359	. . L .	88	88	0.053	. . T .
16	16	-0.355	. . A .	52	52	-0.126	. . T .	89	89	-0.216	. . L .
17	17	-0.045	. . T .	53	53	-0.090	. . N .	90	90	-0.618	. . R .
18	18	0.016	. . E .	54	54	-0.279	. . L .	91	91	-0.690	. . A .
19	19	0.348	. . F .	55	55	-0.278	. . E .	92	92	-1.093	. . A .
20	20	0.283	. . F .	56	56	0.047	. . K .	93	93	-1.174	. . M .
21	21	0.219	. . S .	57	57	-0.015	. . K .	94	94	-0.931	. . I .
22	22	0.250	. . T .	58	58	0.027	. . I .	95	95	-0.862	. . S .
23	23	0.401	. . K E	59	59	0.285	. . T .	96	96	-0.994	. . L .
24	24	0.832	. . A E	60	60	0.257	. . N .	97	97	-0.756	. . A .
25	25	1.378	. . A E	61	61	0.036	. . V .	98	98	-0.706	. . K .
26	26	1.464	. . K E	62	62	0.024	. . T .	99	99	-0.222	. . K .
27	27	1.521	. . K E	63	63	0.287	. . T .	100	100	-0.087	. . I .
28	28	1.469	. . P E	64	64	0.088	. . K .	101	101	0.354	. . D E
29	29	1.537	. . E E	65	65	0.069	. . F .	102	102	0.574	. . V E
30	30	1.428	. . A E	66	66	0.069	. . E .	103	103	0.739	. . Q E
31	31	0.962	. . K E	67	67	-0.138	. . Q .	104	104	0.753	. . T E
32	32	0.566	. . R E	68	68	-0.315	. . I .	105	105	1.024	. . G E
33	33	0.452	. . E E	69	69	-0.456	. . E .	106	106	1.124	. . R E
34	34	0.200	. . A .	70	70	-0.215	. . K .	107	107	1.394	. . R E
35	35	0.355	. . I E	71	71	-0.102	. . C .	108	108	1.377	. . P E
36	36	0.481	. . V E	72	72	0.039	. . C .	109	109	1.431	. . Y E
				73	73	0.312	. . K .	110	110	1.438	. . E E

Figure 98. Résultat de prédiction des épitopes linéaires de la protéine A27 du virus de la vaccine par le serveur Bepipred (en jaune : zones définies comme appartenant à un épitope linéaire, en gras : score de prédiction important > 1)

Les épitopes linéaires reconnus par le serveur sont représentés en jaune, les régions épitopiques les plus probables c'est-à-dire ayant un score élevé sont représentés en rouge.

MDG**TLFP****GDD****DLA**IPATEFFST**KAAKKPEAKRE****AI****VKA****DEDDNEE****TL**KQRLTNLEKKITNVTT
KFEQIEKCCKRNDEVLFRLNHAETLRAAMISLAKKI**DVQT****GRRPYE**

Quatre zones épitopiques ont été prédites comme faisant partie d'épitopes linéaires : résidus 4 à 14 se trouvant à la partie N terminale de la protéine, résidus 23 à 33 au niveau du domaine HBD, 35 à 47 se trouvant à la jonction entre le domaine HBD et CCD et 102 à 111 se trouvant au niveau du domaine LZD.

2.2. Prédiction des épitopes discontinus (structure 3D)

2.2.1. Protéine A27 du LSD

La structure tridimensionnelle de la protéine A27 des capripoxvirus est utilisée pour la prédiction des épitopes discontinus ou conformationnels. Etant donné que la modélisation de la protéine entière est difficile, nous avons vu dans le Chapitre 1 que nous avons pu obtenir une modélisation en 3D de la protéine sur 31 résidus de la partie incluse dans le domaine CCD ou superenroulé. C'est donc cette partie de la protéine (en jaune) qui a été utilisée pour la prédiction des épitopes discontinus par le logiciel Discotop 2.0 (c3vopC sur Phyre2).

MDRALSIFPGDDDETNERNINHREKTSGEHGHYEDKLLDLSEEEPNNMIKIKNDIKKIINERYSNYISIDDDDEIS
DILKDSFISNEEMQIKD**FVLRLLVLEKLFQTSVKECNSLKNI****KRLEN**HIETIRKNMIVLTKKVDFQTGRSTTL

Le résultat de prédiction des épitopes discontinus par Discotope a révélé que les différents résidus prédits ont un score distinct, les résidus ayant un score de prédiction élevé suggère que la prédiction est plus probable pour ces résidus. Le résultat obtenu est représenté par la figure 99 dans laquelle on a fait figurer les scores de prédiction élevé (>0) en gras.

27	F / PHE 0	-7.978	-7.061	
28	V / VAL 0	-8.805	-7.792	
29	L / LEU 0	-9.119	-8.070	
30	R / ARG 1	-9.135	-8.199	
31	L / LEU 2	-9.675	-8.793	
32	L / LEU 3	-9.661	-8.895	
33	V / VAL 4	-9.592	-8.949	
34	L / LEU 5	-9.594	-9.065	
35	E / GLU 6	-9.009	-8.663	
36	K / LYS 6	-8.243	-7.985	
37	L / LEU 6	-8.187	-7.936	
38	F / PHE 6	-8.494	-8.208	
39	Q / GLN 6	-7.408	-7.246	
40	T / THR 6	-7.164	-7.030	
41	S / SER 5	-7.295	-7.031	
42	V / VAL 6	-6.425	-6.376	
43	K / LYS 1	-1.299	-1.264	<=B
44	E / GLU 0	-1.898	-1.679	<=B
45	C / CYS 0	-1.727	-1.529	<=B
46	N / ASN 1	-0.442	-0.506	<=B
47	S / SER 2	-0.784	-0.924	<=B
48	L / LEU 2	-1.118	-1.220	<=B
49	K / LYS 4	-0.241	-0.673	<=B
50	N / ASN 5	0.543	-0.094	<=B
51	I / ILE 5	0.013	-0.563	<=B
52	I / ILE 6	0.028	-0.665	<=B
53	K / LYS 7	0.831	-0.069	<=B
54	R / ARG 5	0.814	0.145	<=B
55	L / LEU 6	0.205	-0.509	<=B
56	E / GLU 6	0.653	-0.112	<=B
57	N / ASN 0	1.148	1.016	<=B

Figure 99. Résultat de l'analyse de prédiction des épitopes discontinus de la protéine A27 du virus LSD par le serveur DiscoTope (jaune : zones définies comme appartenant à un épitope discontinu, gras : score de prédiction élevé).

Sur les 31 résidus de la séquence protéique de la A27 que nous sommes arrivés à modéliser, seuls 14 résidus représentés à la partie C terminale du domaine CCD (partie en jaune : résidus 108 à 121) ont une prédiction pour être compris dans un épitope discontinu. Ces différents résidus ont été prédits avec des scores différents suggérant que les acides aminés prédits avec un score élevé sont peut-être plus probables, ces derniers sont représentés en rouge au sein de la séquence protéique de la A27 du virus LSD ci-dessous et concernent les résidus allant de la position 115 à 121.

MDRALSIFPGDDDETNERNNINHREKTSGEHGHYEDKLLDLSEEEPNMIKIKNDIKKIINERYSNYISIDDDEIS
DILKDSFISNEEMQIKDFVLRLLVLEKLFQTSV**KECNSLKNIKRLE**NHIETIRKNMIVLTKKVDFQTRSTTL

2.2.2. Protéine A27 du virus de la vaccine

Pour la prédiction des épitopes discontinus au sein de la protéine A27 du virus de la vaccine, un modèle tridimensionnel de la protéine est récupéré sur le site RCSB protein databank avec un modèle de la protéine en 3D déposé par Chang en 2013 (Chang *et al.*, 2013) (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3VOP>), ce qui nous a permis de récupérer un format pdb de la protéine qui sera utilisée comme input par le serveur DiscoTope 2.0. Le résultat de cette prédiction est représenté dans la figure 100 ci-dessous.

GLU	10	0.016	-1.136	<=B
THR	4	0.383	-0.121	<=B
LEU	16	0.085	-1.765	<=B
LYS	3	-0.096	-0.430	<=B
GLN	2	0.341	0.072	<=B
ARG	18	0.581	-1.556	<=B
LEU	18	-0.411	-2.434	<=B
THR	5	0.655	0.004	<=B
ASN	15	1.336	-0.542	<=B
LEU	29	0.863	-2.571	<=B
GLU	14	0.926	-0.791	<=B
LYS	6	1.659	0.778	<=B
LYS	24	1.495	-1.437	<=B
ILE	25	0.821	-2.149	<=B
THR	7	1.023	0.100	<=B
ASN	12	1.738	0.158	<=B
VAL	31	1.025	-2.658	<=B
THR	17	1.366	-0.746	<=B
THR	6	1.760	0.868	<=B
LYS	16	1.641	-0.388	<=B
PHE	26	1.088	-2.027	<=B
GLU	7	1.414	0.446	<=B
GLN	6	1.299	0.460	<=B
ILE	20	-0.189	-2.467	<=B
GLU	13	-0.284	-1.747	<=B
LYS	6	0.248	-0.470	<=B
ALA	9	-1.460	-2.327	<=B
ALA	18	-1.593	-3.480	<=B
LYS	7	-1.506	-2.137	<=B
ARG	5	-1.404	-1.817	<=B
ASN	19	-1.679	-3.671	<=B
ASP	10	-1.430	-2.416	<=B
GLU	6	-1.276	-1.819	<=B
VAL	12	-1.663	-2.851	<=B
LEU	19	-2.203	-4.135	
PHE	7	-1.551	-2.177	<=B
ARG	5	-1.737	-2.112	<=B
LEU	15	-2.612	-4.036	
GLU	12	-1.985	-3.137	<=B
ASN	6	-1.802	-2.284	<=B

Figure 100. Résultat de l'analyse de prédiction des épitopes discontinus de la protéine A27 de la vaccine par le serveur DiscoTope (en jaune : zones définie comme appartenant un épitope discontinu, en gras : score de prédiction élevé).

Selon la figure, les résidus prédits comme faisant partie d'épitopes discontinus sont représentés ici en jaune dans la séquence protéique de la A27 du virus de la vaccine et concernent tout le domaine superenroulé CCD de la protéine. Ces différents résidus ont été prédits avec des scores différents suggérant que les acides aminés prédits avec un score élevé sont peut-être plus probables, ces derniers sont représentés en rouge au sein de cette séquence.

MDGTLFPGDDDLAIPATEFFSTKAAKKPEAKREAIVKADEDDNEETLKQRLTNLEKKITNVTTKFEQIEKCKRNDEVLFRLLENHAETLRAAMISLAKKIDVQTGRRPYE

Les résidus de la portion 45 à 78 de la protéine A27 appartenant au domaine superenroulé ont été prédits comme faisant partie d'un épitope conformationnel qui serait cible des anticorps, au sein de ce domaine plus particulièrement les résidus à la position 52 à 67 appartenant au domaine superenroulé ont été prédits par DiscoTope avec un score élevé (>1) suggérant que ces derniers résidus possèdent une probabilité plus importante que le reste des résidus pour appartenir à un épitope conformationnel.

La compilation de la liste des épitopes définis, résultant de l'analyse Pepscan et de l'analyse *in silico* effectuées sur la protéine A27 du virus LSD, sont résumés dans le tableau 39 en comparaison à ceux de la A27 du virus de la vaccine.

Tableau 39. Tableau récapitulatif des épitopes linéaires et discontinus définis pour la protéine A27 du virus LSD et de la vaccine.

Protéine	Nature de l'analyse	Nature de l'épitope	Positionnement de l'épitope	Localisation de l'épitope	Score de prédiction
A27 LSDV	Expérimentale	Linéaire	5-25	N terminale	-
			33-37		
			49-55		
			65-69		
	In silico	Linéaire	73-91	CCD	Elevé pour les résidus 10-17 et 25-32
			123-129	Extrémité de la partie C terminale	
			8 à 33	N terminale	

			42-47		Faible
			67-73		
			139-148	Extrémité de la partie C terminale	
		Discontinu	108-121	CCD	Important pour les résidus 115-121
A27 Vaccine	In silico	Linéaire	4-14	Partie N terminale	Elevé
			23-33	HBD	
			35-47	HBD/CCD	
			102-111	LZD	
		Discontinu	45-78	CCD	Important pour les résidus 52-67

Conclusion :

L'étude structurale de la protéine A27 du virus LSD que nous avons détaillée dans le chapitre 1 de la partie III ainsi que la prédiction des épitopes majeurs linéaires ou conformationnels que nous venons de voir dans le chapitre IV ont permis d'affirmer que cette protéine possède une propriété antigénique qui a été reconnue par des anticorps d'animaux infectés. Les épitopes majeurs qui sont reconnus par les anticorps neutralisants et qui devraient être protecteurs (par analogie à la protéine de la vaccine) se situeraient à la partie N terminale de la protéine. Cependant, l'étude des épitopes conformationnels est incomplète, et est nécessaire pour l'identification des épitopes majeurs qui seraient cibles des anticorps.

Discussion générale

L'Afrique du Nord est en situation d'enzootie au regard de nombreuses maladies contagieuses d'origine virale particulièrement celles provoquées par des virus appartenant au genre *Capripoxvirus* et affectant principalement les ovins et les caprins tels que le virus de la variole ovine et celui de la variole caprine. Les pays d'Afrique du Nord (Tunisie, Maroc, Algérie et Lybie) sont indemnes de dermatose nodulaire contagieuse, capripoxvirose spécifique des bovins. Le virus de la variole ovine a été isolé pour la première fois en Tunisie en 1974 lors d'une épizootie à Zaghuan malgré le signalement de la maladie depuis la fin des années 1700 (Ramisse *et al.*, 1978; Lefèvre, 1983). Depuis, le virus de la variole ovine circule toujours dans les élevages de petits ruminants en Tunisie malgré la mise en place de moyens de prévention et de contrôle ayant pour but ultime d'éradiquer le virus.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer le statut épidémiologique de la variole ovine en Tunisie au cours de ces 25 dernières années et d'étudier les paramètres clés permettant d'évaluer les stratégies de lutte mises en place pour une meilleure prévention de la maladie. Ce travail a fait l'objet d'un article sous forme de revue intitulé « Sheep pox in Tunisia : current status and perspectives » accepté pour publication dans le journal « Transboundary and Emerging Diseases » présentée en annexe 6 de ce manuscrit.

La maladie est présente tout au long de l'année dans le pays, avec une prévalence maximale en automne et en hiver. Le plus grand nombre de cas est enregistré au centre du pays précisément dans les régions subarides et arides, qui ont une pluviométrie faible et où l'élevage est principalement basé sur la transhumance et la recherche de pâturage, cela en l'absence de contrôle par les autorités vétérinaires. Dans ces régions, la variole est à l'origine de lourdes pertes économiques. Les pertes sont d'abord directes et reviennent aux pertes substantielles en termes de réduction de productivité dues au retard de croissance et à l'atteinte de la valeur économique de l'animal mais aussi à la mauvaise qualité de la laine et du cuir. En Tunisie, l'estimation des pertes indirectes en matière de variole ovine sont nettement plus importantes que les pertes directes. Elles reviennent essentiellement au coût des campagnes vaccinales mises en place par les autorités vétérinaires pour le contrôle de la maladie.

Malheureusement ce constat a été aussi observé dans la majorité des pays d'Afrique du Nord voisins de la Tunisie comme l'Algérie ou le Maroc (Benabdellah *et al.*, 2016; Kardjadj, 2016). Ce sont les éleveurs dont le revenu repose essentiellement sur l'élevage des animaux et la vente de leurs produits qui sont les plus touchés. En Tunisie, ces pertes ont été estimées à environ 1000 Dinars tunisiens/éleveur/an.

En dépit de l'impact économique de la variole ovine en Tunisie, le travail réalisé est le premier à estimer cet impact dans les élevages tunisiens. Dans ce cadre, une étude réalisée au Maroc a également été récemment publiée (Benabdellah *et al.*, 2016).

Cette étude économique a été réalisée dans le but d'alerter les gestionnaires de la santé vétérinaire et les décideurs politiques en proposant la stratégie de contrôle la plus appropriée et la plus efficace en terme de dépenses. Néanmoins, cette analyse préliminaire doit maintenant être confortée par une étude exhaustive incluant d'autres facteurs dépendants de la maladie pouvant influencer l'évaluation de l'impact économique de la maladie.

Il serait intéressant que des études économiques de ce type soient réalisées pour d'autres maladies à déclaration obligatoire contre lesquelles des campagnes de vaccination sont en place, telles que la fièvre catarrhale ovine et la fièvre aphteuse. Ceci permettrait aux autorités vétérinaires d'estimer le montant et la diversité des pertes et dépenses attribuées à chaque maladie et ainsi pouvoir choisir la stratégie de contrôle la meilleure et la mieux adaptée au pays.

En Tunisie, ces stratégies de contrôle reposent essentiellement sur la vaccination, qui est le principal outil permettant de limiter la dissémination du virus. La période de vaccination et le vaccin utilisé sont les facteurs clés de la réussite des campagnes de vaccination. En Tunisie, les campagnes de vaccination étaient menées au départ en automne, cependant un faible taux de couverture vaccinal a été enregistré car cette période coïncidait avec la transhumance des animaux mais aussi à l'agnelage des brebis ce qui a conduit les services vétérinaires à modifier la période de vaccination de l'automne au printemps. Le vaccin utilisé contre la variole ovine depuis les années 1980 est la souche virale atténuée RM65. Malgré les campagnes de vaccination annuelles mises en place par les autorités sanitaires avec un taux de couverture qui n'a pas dépassé les 50%, le virus circule toujours en Tunisie.

Dans ce cadre, une optimisation de la souche vaccinale utilisée serait intéressante à envisager. Cette optimisation consisterait en une vaccination basée sur des composants viraux immunogènes décrits et connus pour induire une immunité protectrice. Le développement de vaccins dits sous-unitaires nécessite une connaissance approfondie de gènes immuno-dominants identifiés comme tels au sein du génome des capripoxvirus qui seraient la cible des anticorps neutralisants permettant ainsi de protéger l'animal immunisé.

Dans ce contexte, le second objectif de ce travail de thèse a été la caractérisation de protéines immuno-dominantes chez les capripoxvirus. Considérant le pourcentage élevé d'identité

nucléotidique (97 %) entre les membres du genre *Capripoxvirus* (Tulman *et al.*, 2002), le virus de la DNC (ou LSD en anglais) a été choisi, le laboratoire disposant de la souche virale KS-1.

Choix des protéines d'étude

Le choix des protéines étudiées repose sur des travaux ayant traité des protéines des Orthopoxvirus et, plus précisément, sur des travaux réalisés sur le virus de la vaccine. Peu de travaux se sont intéressés aux protéines des virus du genre *Capripoxvirus*, ce travail a donc été réalisé par homologie avec les protéines du virus de la vaccine. Le point de départ a été la recherche de gènes codant pour des protéines immuno-dominantes qui seraient la cible de la réponse humorale. L'infection par le virus de la vaccine induit la production d'anticorps dirigés contre les antigènes majeurs incluant des protéines présentes au niveau du virion enveloppé extracellulaire (EV) telles que les protéines A33, B5 ou au niveau du virion mature intracellulaire (MV) telles que les protéines A27, L1, D8 et H3 (Putz *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2007; Lawrence *et al.*, 2007). L'homologue de la protéine D8 du virus de la vaccine étant absent chez les trois virus du genre *Capripoxvirus*, ce gène n'a pas été retenu pour notre étude (Tulman *et al.*, 2001; Tulman *et al.*, 2002). Beaucoup de travaux ont pointé l'importance du gène H3L et notamment de ses orthologues P32 et LSDV074 respectivement chez les GTPV/SPPV et le virus LSD (Carn *et al.*, 1994; Chand *et al.*, 1994; Heine *et al.*, 1999; Bhanot *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2010). Même si la plupart de ces études ont plutôt confirmé une antigénicité de la protéine, ils ont aussi pointé vers une absence de reconnaissance par certains sérums positifs. En outre, ces travaux ont mis en évidence une certaine difficulté de production selon les différents systèmes utilisés ainsi qu'un problème de stabilité de la protéine recombinante produite. Ce gène n'a pas été donc retenu pour notre étude.

Les anticorps dirigés contre les différentes protéines constituant les MV et les EV, sont nécessaires pour induire une protection complète contre les Orthopoxvirus (Wolffe *et al.*, 1993; Ravanello *et al.*, 1994; Roper *et al.*, 1998; Sanderson *et al.*, 2000). Parmi ces anticorps, ceux dirigés contre la protéine B5 vont neutraliser les virions extracellulaires et inhiber leur dissémination à partir de la cellule infectée et sont, de ce fait, un composant important de la réponse anti-EV et de l'immunité protectrice. La réponse anti-B5 est robuste et relativement plus forte que la réponse induite par les anticorps dirigés contre les virions intracellulaires (Bell *et al.*, 2004; Putz *et al.*, 2006). Les anticorps dirigés contre la protéine A33 sont aussi requis pour une protection complète des animaux challengés et vont inhiber la libération des virions extracellulaires à partir des cellules infectées. Cependant, contrairement aux anticorps anti-B5,

les anticorps anti-A33 ne neutralisent pas les EV, la protection induite par cette protéine serait plutôt due à une lyse directe des cellules infectées médiée par le complément (Hooper *et al.*, 2003; Lustig *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été démontré que l'homologue de la protéine A33 chez le sheep pox virus (SPPV122) pouvait contrairement à la protéine A33 du virus de la vaccine induire la production d'anticorps neutralisants chez les animaux immunisés (Chervyakova *et al.*, 2016).

D'autre part, la protéine immunogénique L1 et les anticorps dirigés contre cette dernière neutralisent les virions intracellulaires (Chung *et al.*, 2006). La protéine A27 est la protéine la plus abondamment retrouvée à la surface des virions matures intracellulaires, elle est fortement antigénique et immunogénique, induisant la production d'un fort taux d'anticorps neutralisants (Chung *et al.*, 2006; Perino *et al.*, 2013).

L'ensemble des travaux pointe l'importance et le rôle privilégié de ces quatre protéines dans l'induction d'une réponse immune protectrice. Les anticorps anti-MV (anti-A27 et anti-L1) vont neutraliser l'inoculum initial de l'infection alors que les anticorps anti-EV (anti-B5 et anti-A33) vont limiter la dissémination de la progénie virale au sein des cellules infectées (Xiao *et al.*, 2007).

Notre choix s'est donc orienté vers les homologues de ces quatre protéines L1, A27, A33 et B5 chez les virus du genre *Capripoxvirus* et plus particulièrement le virus LSD. Ces protéines sont respectivement identifiées, comme suit : LSDV60, LSDV117, LSDV122 et LSDV141. Pour mieux caractériser ces protéines du genre *Capripoxvirus*, le choix a été fait de les produire dans deux systèmes d'expression différents : le système eucaryote et le système baculovirus (BEVS). Au préalable, une analyse structurale *in silico* de ces quatre protéines a été nécessaire.

L'analyse structurale *in silico* concernant les trois protéines L1, A33 et B5 a été menée en vue de délimiter des domaines d'intérêt à exprimer dans le système BEVS. En ce qui concerne la protéine A27, une analyse *in silico* plus approfondie a été réalisée avec l'étude de la structure primaire, secondaire et tertiaire de la protéine. L'étude structurale de protéines des virus du genre *Capripoxvirus* n'a fait pour l'instant l'objet d'aucune étude.

Analyse *in silico* de la protéine A27

L'étude de la structure primaire de la protéine LSDV117 repose sur l'alignement présenté dans les travaux de Chang et al (2013) élargissant l'étude de la protéine A27 aux homologues de

virus appartenant aux différents genres de la famille Poxviridae. Sur la base des calculs de distance réalisés à partir de cet alignement, il apparaît que la partie C terminale de la protéine (domaines CCD et LZD) est notablement mieux conservée que la partie N terminale (domaine HBD). La différence de taille de la protéine est principalement due à des délétions ou des insertions localisées en partie N terminale alors que la longueur des domaines CCD et LZD est relativement conservée (Chang *et al.*, 2013).

Selon les régions étudiées, l'alignement permet d'étudier, entre genres viraux, le niveau de conservation de résidus importants dans la fonction de la protéine A27. Il n'était pas possible de vérifier la conservation des résidus en partie N terminale de la protéine au vu de la divergence très importante qu'il existe. Au niveau du domaine CCD, en revanche, cette étude était possible et concernait neuf résidus impliqués dans l'oligomérisation de la protéine ; 6 résidus Leu47, Leu51, Leu54, Ile58, Val61, Phe65 retrouvés à l'interface de la partie N terminale (NTR), de la protéine responsables de la formation de trimères et les 3 résidus Ile68, Asn75 et Leu82 se trouvant à l'interface de la partie C terminale (CTR) sont responsables de la formation d'hexamères (Chang *et al.*, 2013). Seuls deux résidus sur les neuf sont conservés entre le virus de la vaccine et les Capripoxvirus, suggérant que, s'il y a oligomérisation de la protéine A27 des Capripoxvirus, les modalités d'assemblage ne suivent pas les mêmes règles. Dans le domaine CCD de la protéine A27 du virus de la vaccine, deux cystéines contiguës à la position 71 et 72 responsables d'interactions intermoléculaires avec la protéine A26 chez le virus de la vaccine sont retrouvées. Seule une cystéine est conservée chez les virus du genre Capripoxvirus, suggérant que la formation du complexe A27-A26 ne serait pas conservée chez ces derniers, ceci est appuyé par l'absence d'un homologue de la protéine A26 chez le virus LSD (Tulman *et al.*, 2001).

Enfin, le domaine leucine zipper de la protéine A27 sert de domaine d'ancrage pour la protéine A17 à travers des liaisons non covalentes au niveau de deux sites inter-peptidiques F80-E87 et R90-R101. La conservation de ces résidus a été vérifiée sur un alignement regroupant différents virus. Seul le résidu F80 n'est pas conservé, alors que les trois autres résidus en position 87, 90 et 101 sont conservés parmi les 5 genres de poxvirus étudiés (*Orthopoxvirus*, *capripoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Leporipoxvirus* et *Suipoxvirus*) suggérant une relative conservation de l'interaction de la protéine A27 chez ces virus avec la protéine A17. Cette interaction apparaît d'autant plus vitale pour la protéine A27 qu'elle ne semble pas être une protéine transmembranaire comme suggéré par l'étude faite sur le serveur THMMH. Chez le virus de la

vaccine, plusieurs travaux ont montré que la liaison des protéines A27-A17 était nécessaire à l'ancrage de la protéine A27 à la membrane (Howard *et al.*, 2008; Kochan *et al.*, 2008). L'interaction de ces deux protéines chez le LSDV est aussi appuyée par le fait que l'homologue de la protéine A17 chez le virus LSDV est représenté par la protéine LSDV109, protéine transmembranaire associée aux deux membranes des MV comme la protéine A17 (Tulman *et al.*, 2001; Wallengren *et al.*, 2001).

Suite à la vérification de la conservation des résidus importants dans l'oligomérisation et l'interaction de la protéine A27 avec ses partenaires moléculaires, l'exposition de ces mêmes résidus a été étudiée. Pour ce faire, la méthodologie développée sur un serveur prédisant la surface relative d'accessibilité d'un acide aminé a été utilisée. Le calcul prévisionnel de cette accessibilité permet de classer grossièrement les résidus en deux grandes classes, les épitopes enfouis et les épitopes exposés. Généralement, les résidus biologiquement les plus intéressants sont le plus souvent exposés, car ils peuvent interagir avec l'environnement. Il est cependant important d'avoir une bonne estimation de la fiabilité du résultat d'exposition particulièrement pour chaque prévision du degré d'exposition proposé. La qualité de la prévision qui permet d'approcher le z-score de la méthodologie utilisée sur le serveur NetSurfP est primordiale (Petersen *et al.*, 2009).

Au niveau du domaine CCD de la protéine de la vaccine, les 9 résidus hydrophobes Leu47, Leu51, Leu54, Ile58, Val61, Phe65, Ile68, Asn75 et Leu82 identifiés comme étant responsables de l'assemblage et de l'oligomérisation de la protéine de la vaccine, sont évalués comme étant des résidus enfouis par le serveur. Les résidus situés aux positions homologues chez les virus du genre *Capripoxvirus* (les résidus E85, I89, F92, L96, L99, F103, S106, L113 et L120 selon l'alignement de Chang *et al.* 2013), ont été prédits comme étant des résidus enfouis avec une probabilité assez élevée (z score important) pour la plupart des résidus (sauf pour le résidu E85 qui a été prédit comme étant un résidu exposé avec une faible probabilité).

Ceci pourrait être expliqué par le fait que ces résidus sont responsables de l'assemblage de la protéine en formant des liaisons hydrophobes intramoléculaires entre eux puisqu'ils sont dans une proximité spatiale et n'ont donc pas besoin d'être exposés à la surface de la protéine pour accomplir leur fonction.

Enfin, au niveau du domaine leucine zipper de la protéine A27 du virus de la vaccine, les quatre résidus F80, E87, R90 et R101 sont responsables de son interaction avec la protéine A17,

l'analyse par Netsurf a montré avec un score de prédiction élevé que trois résidus sur les 4 sont exposés, seul le résidu R90 est enfoui. En effet, la formation du complexe A27-A17 a lieu par la formation de ponts intermoléculaires entre les deux protéines nécessitant l'exposition des résidus impliqués dans cette relation. Chez le virus LSDV, l'analyse par Netsurf des homologues de ces résidus (selon l'alignement de Chang et al : les résidus K118, E125, R128 et R139) a montré avec une probabilité importante, que trois résidus sur les quatre sont aussi exposés et que le même résidu, le résidu R128 homologue au résidu R90 est enfoui, suggérant une conservation de la fonction d'interaction de la protéine A27 avec la protéine A17 chez les deux virus.

Analyse de la structure secondaire et tertiaire de la protéine A27

Une analyse sous Phyre2 de la structure secondaire de la protéine A27 du virus de la vaccine a été réalisée. Les résultats des prévisions établies avec ce serveur convergent avec ceux des travaux expérimentaux déjà publiés (Lin *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2013), ce qui a permis ainsi de valider la méthodologie de prédiction développée sous Phyre2.

La structure tridimensionnelle est très importante puisqu'elle détermine les propriétés biologiques, incluant les propriétés immunologiques des protéines. L'abord de la structure 3D par cristallographie et par résonance magnétique nucléaire n'étant pas à notre portée, notre contribution à cette étude s'est appuyée sur différents outils bioinformatiques.

La modélisation tridimensionnelle de la totalité de la protéine A27 réalisée par le serveur Phyre 2 est difficile, seulement une partie de la protéine A27 a pu être modélisée, en rapport avec l'absence au sein des banques de données de protéines présentant une structure/organisation similaire à la protéine A27 des Capripoxvirus. En effet, l'inconvénient majeur de la méthodologie utilisée sous Phyre 2, réside dans le fait que, si l'homologie entre la protéine d'intérêt et la protéine dont la structure est connue n'a pas pu être détectée, la modélisation ultérieure de la protéine est impossible sera rendue peu fiable (Kelley *et al.*, 2015). Jusqu'à ce jour, les méthodes de modélisation existantes permettant de prédire la structure d'une protéine donnée à partir de sa seule séquence (méthode *ab initio*) aboutissent à des résultats de fiabilité faible à médiocre.

L'algorithme utilisé sous Phyre2 suggère, avec un fort indice de fiabilité (97.7%), que la région étudiée de la protéine A27 du LSDV (31 résidus : résidus 92 à 122) adopterait une organisation

en région super-enroulée, à l'image de la région homologue de la protéine A27 de la vaccine (domaine CCD).

Notre analyse rejoint celle précédemment publiée (Chang *et al.*, 2013), qui soulignait plus largement une conservation évolutive de l'organisation structurale de cette région entre différents genres viraux (orthopoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, parapoxvirus) au sein de la famille Poxviridae.

Cette conservation structurale chez les orthologues de la protéine A27 suggère que l'évolution de cette protéine a été contrainte par la nécessité du maintien d'importantes fonctions biologiques.

Suite à l'analyse structurale des protéines *in silico*, nous avons étudié l'antigénicité des quatre protéines d'intérêt choisies par leur expression dans deux systèmes différents : le système eucaryote et le système baculovirus-cellules d'insectes (BEVS).

Expression des protéines dans le système eucaryote

L'expression des quatre protéines d'intérêt dans le système eucaryote est réalisée dans le but de vérifier leur antigénicité et de confirmer qu'elles sont bien reconnues par des anticorps spécifiques anti-capripoxvirus provenant de sérums infectés par des CaPVs. Ce système d'expression eucaryote qui est à différencier des autres systèmes de production (*E. Coli*, baculovirus, levures...) a l'avantage de pouvoir reproduire l'expression des protéines sous leur forme native (Demain *et al.*, 2009). L'expression des quatre protéines d'intérêt (L1, A27, A33 et B5) dans le système eucaryote a nécessité un clonage des quatre gènes codant pour ces protéines réalisé avec succès dans le vecteur d'expression eucaryote pCI-neo.

La validation *in vitro* de l'expression de chacun des gènes s'est faite d'abord par la technique d'immunofluorescence indirecte. Aucune de nos constructions plasmidiques contenant les protéines d'intérêt n'a réagi avec les anticorps polyclonaux utilisés (sérum d'ovin hyper immunisé avec une souche vaccinale et sérum de chèvre naïve challengé avec une souche de goat pox virus). Afin de vérifier que la transcription de l'ADNc en ARN avait bien eu lieu, la présence d'ARNm a été testée. En effet, suite à une extraction des ARN totaux, une réaction de RT-PCR utilisant des amorces spécifiques de chaque gène a été effectuée et a révélé que les gènes étaient transcrits correctement.

Le fait que la construction utilisée comme témoin contrôle positif, le gène N PPR, exprimé en pCI-neo a pu être reconnu par des sérums monoclonaux et polyclonaux anti-PPR valide qu'une construction pCI-neo possède la capacité d'exprimer correctement une protéine donnée. En outre, l'équipe de Kochan (2008) qui a cloné la protéine A27 du virus de la vaccine dans le vecteur pCIneo et l'a exprimé en cellules humaines a pu prouver que la protéine a été produite avec succès avec une fonctionnalité correcte (Kochan *et al.*, 2008), ceci confirme que le type de construction choisi est bien adapté à l'expression des protéines choisies.

Devant la difficulté de pouvoir conclure sur la réalité de la traduction protéique à partir des constructions réalisées en pCI-neo, une alternative a été envisagée avec l'utilisation de la technique de Western Blot consistant au transfert des extraits protéiques des lysats cellulaires (cellules Vero transfectées avec les constructions pCIneo) révélés par des anticorps anti-capripoxvirus contenus dans des sérums expérimentaux provenant soit d'animaux ayant subi un challenge infectieux par un goat pox virus soit d'animaux vaccinés. Cette seconde technique n'a pas non plus permis de générer de signal décelable.

Des travaux supplémentaires doivent être entrepris pour tenter de déterminer l'origine de cet échec. L'équipe de Zheng est, quant à elle parvenue à exprimer les quatre protéines A27, L1, A33 et B5 du goat pox virus dans un vecteur viral d'expression eucaryote, le Semliki Forest Virus (SVF), et a évalué l'expression de ces quatre constructions en Western blot révélé avec un sérum contenant des anticorps anti-GTPV. Chacune des quatre protéines est reconnue à la taille attendue démontrant que ces dernières sont correctement exprimées (Zheng *et al.*, 2009).

Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer le résultat obtenu. Un facteur qui pourrait affecter le résultat des expériences est le choix du vecteur d'expression ainsi que la lignée cellulaire utilisée (Parham *et al.*, 2001). Le fait que les protéines exprimées dans le système d'expression eucaryote ne soient pas dans une conformation idéale pour que les épitopes ne soient reconnus par les anticorps polyclonaux n'est pas une hypothèse à retenir étant donné que le système choisi permet d'exprimer des protéines dans un environnement identique à celui où sont exprimées les protéines virales. En outre, nous venons de valider plus haut que le système d'expression utilisé est adapté à l'expression de protéines. Ceci est appuyé par les travaux de Parham (2001) visant à exprimer avec succès deux protéines dans le vecteur d'expression pCI-neo au sein de six lignées cellulaires différentes d'origine humaine et simienne notamment les cellules Vero utilisées lors de la transfection de nos constructions, confirmant que ce vecteur

est adapté à l'expression transitoire des protéines mais semble moins adapté pour l'expression stable des protéines (Parham *et al.*, 2001).

Une deuxième hypothèse, qui serait plus probable, consisterait à considérer que les titres sériques en anticorps spécifiques contenus dans les sérums testés soient insuffisants, pour chacune des protéines testées. Cependant, cette hypothèse n'est pas la plus probable. En effet, des travaux ultérieurs ont démontré par Western Blot la présence d'anticorps à des titres détectables pour la protéine A27.

Malgré les résultats négatifs générés par les constructions en pCI-neo, il a été considéré que les résultats de Zheng *et al.* étaient suffisamment robustes pour valider que les protéines identifiées étaient antigéniques et représentaient des bons candidats pour des travaux ultérieurs de caractérisation (étude approfondie de l'antigénicité, et de l'immunogénicité). Les travaux sur ces mêmes protéines ont alors été poursuivis avec une orientation vers le système de production baculovirus pour les protéines sélectionnées.

Cette décision de poursuivre ce travail a ensuite été confortée par les résultats de Chervyakova *et al.*, 2016 qui confirment l'antigénicité des 4 protéines choisies initialement démontrée par Zheng *et al.* (Chervyakova *et al.*, 2016).

Expression des protéines dans le système baculovirus-cellules d'insectes (BEVS)

Production de la protéine A27 dans le système BEVS

La production de la protéine A27 dans le système BEVS a consisté en une infection des cellules d'insectes avec le passage 3 de notre stock de baculovirus recombinant avec un MOI de 10. Les cellules ont été, récoltées 72 heures post-infection en système en suspension.

La protéine d'intérêt a été ensuite purifiée à partir du surnageant de cellules d'insectes Sf9 infectées, la protéine étant sécrétée dans la fraction extracellulaire suite à l'ajout de la séquence du peptide signal de la mellitine dans la construction. La présence de la protéine dans la fraction intracellulaire a été vérifiée par Western blot et s'est avérée négligeable par rapport à la fraction extracellulaire, ce qui était attendu. D'autres auteurs, qui ont exprimé la protéine A27 du virus de la vaccine dans le système BEVS ont choisi également de purifier la protéine d'intérêt à partir du surnageant de cellules infectées (Xiao *et al.*, 2007; Kochan *et al.*, 2008). Hughes a aussi exprimé la protéine A27 du virus de la vaccine dans le système BEVS avec succès (Hughes *et al.*, 2014).

La procédure de purification est une étape importante pour le rendement protéique ultérieur. La purification des protéines s'est faite à l'aide de tags d'affinité, outils efficaces et très utilisés pour la purification des protéines recombinantes. La pureté et la taille de la protéine ont été ensuite analysées par Western Blot dans des conditions réduites avec un anticorps anti-histidine. Une forme monomérique (17kDa) associée à une forme trimérique (50kDa, moins intense) ont été observées. Cependant, un profil de dégradation au niveau de la forme monomérique de la protéine (présence de bandes de taille inférieure à 17kDa) a été observé. Deux hypothèses peuvent alors se poser, il s'agirait soit d'un clivage protéique réalisé par des enzymes spécifiques de façon intracellulaire, soit à une activité protéolytique due à des protéases virales libérées suite au processus d'infection lytique qui vont dégrader les protéines produites dans le surnageant de façon non spécifique en impactant leur qualité.

Cette deuxième hypothèse serait dans notre cas peut être la plus probable étant donné le taux de mortalité cellulaire avoisinant les 70% a été observé lors de la récolte du surnageant de culture supposé contenir la protéine d'intérêt. Cependant, plusieurs auteurs ayant travaillé sur la protéine A27 du virus de la vaccine ont démontré que ce profil de dégradation semble être plus fréquemment lié à un clivage protéolytique qu'à une libération de protéases suite à un processus lytique.

Dans ce contexte, Vazquez a observé en Immunoblot une bande à 14kDa représentant la forme monomérique de la protéine, mais aussi une bande de 12kDa. Cet auteur souligne la sensibilité de la protéine à la dégradation, en particulier lors d'un temps d'incubation long à température ambiante (Vazquez *et al.*, 1998). Lai qui a observé le même constat a voulu analyser la séquence en acides aminés de la partie N terminale des 2 protéines, il a trouvé que les deux premiers résidus de la protéine de 12kDa étaient délétés et a expliqué que ceci serait probablement dû à un clivage par les protéases cellulaires, l'auteur a aussi précisé que la quantité de la forme de 12kDa augmente avec le temps d'induction confirmant donc le constat de Vazquez (Lai *et al.*, 1991).

Chervyakova (2016) et collaborateurs, qui ont produit l'homologue de la protéine A27 chez le sheep pox virus (SPPV117) en *E. coli* ; ont identifié une dégradation de la forme monomérique de la protéine (17kDa) avec une bande à une taille inférieure (environ 12 à 13 kDa) (Chervyakova *et al.*, 2016).

Enfin, Kochan qui a exprimé la protéine A27 dans le système baculovirus a vérifié le poids moléculaire de la protéine produite par Western Blot avec un anticorps monoclonal spécifique. La protéine exprimée est présente sous 2 formes de poids moléculaire ; 14 et 12 kDa, suggérant que la protéine procède de la même façon dans les cellules d'insectes que dans le système d'expression bactérien confirmant que ceci est dû à un clivage protéolytique (Kochan *et al.*, 2008).

Le constat de clivage protéolytique observé dans plusieurs systèmes d'expression (bactéries, BEVS) de la protéine A27, nous mène à penser que cette hypothèse de dégradation observée serait la plus probable. En outre, la dégradation observée dans notre cas n'a pas concerné la forme trimérique de la protéine mais plutôt la forme monomérique comme l'ont constaté ces auteurs confortant donc la seconde hypothèse émise.

Pour parer à cette éventuelle dégradation protéique, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases dans le milieu de culture a été envisagée.

Le moment où les anti-protéases sont ajoutées est crucial et doit être bien choisi pour ne pas interférer avec la production de la protéine d'intérêt. L'option d'introduire les anti-protéases lors de la récolte des cellules infectées a été prise.

Une deuxième production dans un système de culture statique a eu donc lieu en ajoutant des anti-protéases, après purification avec la colonne His trap (obtention de plusieurs fractions), un western blot en utilisant un anticorps anti-histidine a été réalisé. Une forme soluble monomérique de 17kDa non dégradée de la protéine a pu être obtenue avec disparition de la bande à la taille inférieure. La première fraction purifiée (F1) qui est la plus concentrée de cette deuxième production a permis l'étude de l'antigénicité de la protéine A27.

Etude de l'antigénicité de la protéine A27

L'étude de l'antigénicité de la protéine A27 du virus LSD a été étudiée par deux approches complémentaires : une approche expérimentale et une analyse *in silico*. Une première phase de l'étude expérimentale visait à déterminer si la protéine A27 produite en système baculovirus était reconnue par des anticorps issus de différents immun-sérums positifs spécifiques des Capripoxvirus.

Dans un second temps, l'étude expérimentale visait à identifier la présence d'épitopes linéaires au sein de la protéine A27. Pour finir, une analyse *in silico* a été conduite sur la protéine et les résultats générés, ont été comparés à ceux obtenus expérimentalement.

Analyse expérimentale

L'analyse expérimentale a consisté en la réalisation d'un immuno-blot et d'un peptide scanning (pepscan). Pour vérifier l'antigénicité de la protéine A27 produite dans le système baculovirus, une analyse par immuno-blot de la fraction F1 purifiée a été conduite dans des conditions réduites avec des anticorps polyclonaux provenant de chèvres naïves challengées avec la souche Yemen goat pox virus ou provenant de moutons immunisés de façon répétée avec une souche vaccinale.

Alors que des sérums ovins témoin négatifs vis-à-vis du capripox étaient disponibles, il n'a pas été possible de disposer de sérum caprin anti-CaPV négatif. L'absence de sérum caprin séronégatif sur les immuno-blots réalisés nous a conduits à adopter une réserve, quant aux conclusions, que nous sommes aujourd'hui en mesure d'apporter. Ce sérum négatif ayant été tardivement disponible, des travaux sont actuellement en cours afin de répéter les Western Blot dans le but de confirmer la positivité et la spécificité des bandes initialement observées.

Dans l'optique où les bandes observées avec les immun-sérums anti-CaPV d'origine caprine sur les Western Blot en conditions réduites sont effectivement spécifiques, alors nos résultats mettraient en évidence deux bandes, l'une de 51 kDa majoritaire et l'autre de 100kDa minoritaire, qui suggéreraient respectivement la présence de la forme trimérique et à moindre degré la forme hexamérique de la protéine.

Il faut noter que la forme trimérique a été reconnue par les sérums provenant de 3 caprins sur les 4 éprouvés et la forme hexamérique a été retrouvée sur 2 animaux sur les 4 animaux éprouvés.

Ceci pourrait être expliqué par une variabilité individuelle dans la reconnaissance des épitopes pour les animaux choisis. On ne peut, en effet, pas exclure que les individus puissent être différents vis-à-vis de la présence dans le sérum de "populations" distinctes d'anticorps, certains anticorps reconnaissant des épitopes présents à la surface de trimères et d'autres reconnaissant d'autres épitopes à la surface d'hexamères.

Les formes oligomériques de la protéine dues à son assemblage ont été observées dans plusieurs travaux ayant intéressé la protéine A27 du virus de la vaccine, et ayant exprimé la protéine A27 en système bactérien (Lai *et al.*, 1990; Vazquez *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2013; Perino *et al.*, 2013) mais aussi la protéine A27 du buffalo pox virus, variant indien de la protéine A27 de la vaccine (Kumar *et al.*, 2015). Notons que toutes les formes oligomériques obtenues dans ces travaux ont été réalisées en conditions natives.

La formation d'une structure oligomérique stable est essentielle pour la fonction biologique de la protéine A27. Plusieurs résidus hydrophobes du domaine CCD sont critiques pour la formation d'oligomères (Ho *et al.*, 2005). Les deux cystéines contiguës C71-C72 du domaine CCD sont aussi impliquées dans l'oligomérisation de la protéine A27, puisqu'il a été démontré qu'en présence d'agents réducteurs, la forme trimérique se dissocie en forme monomérique (Lai *et al.*, 1990).

L'assemblage de la protéine est donc à la base des principales fonctions biologiques de la protéine A27. La forme oligomérique de la protéine est essentielle pour son attachement aux GAGs de la cellule hôte et la modulation de la fusion membranaire ; permettant ainsi la pénétration du virus. En effet, la dissociation de l'assemblage de la protéine peut causer l'échec de l'entrée du virus (Rodriguez *et al.*, 1987; Lin *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2009). L'oligomérisation est également critique pour la sortie des virions matures (Chang *et al.*, 2013).

Les formes trimériques et hexamériques identifiées par les différents auteurs sont observées lors d'immuno-blots réalisés, en conditions natives non dénaturantes, permettant de conserver les ponts disulfures stabilisant la forme trimérique de la protéine. En conditions réduites dénaturantes, l'ensemble des auteurs cités plus haut ont obtenu la forme monomérique de la protéine A27. Dans notre cas, nous avons réalisé des immunoblots en conditions dénaturantes avec 5,6% de β -mercaptoéthanol. Malgré ces conditions réduites, l'oligomérisation de la protéine est restée prédominante.

Chang (2013) a utilisé pour une dénaturation complète de la protéine A27, du β -mercaptoéthanol à une concentration de 5% et a pu observer la forme monomérique de la protéine (Chang *et al.*, 2013). Cheryakova (2016) qui va voulu vérifier l'antigénicité de la protéine SPPV117 homologue de la protéine A27 chez le sheep poxvirus, a travaillé en conditions réduites avec une concentration de 2,5% de β -mercaptoéthanol et a démontré que la

forme monomérique (17kDa) a été reconnue par un sérum provenant d'ovin infectés (Chervyakova *et al.*, 2016).

Malgré l'utilisation d'une concentration plus élevée du même agent dénaturant, la différence dans l'efficacité de la dénaturation peut être fonction de la protéine d'étude sachant que Chang *et al.* travaillent sur la protéine A27 de la vaccine, Chervyakova *et al.* sur la protéine A27 du sheep pox et notre équipe sur la protéine du LSDV. Dans notre cas, l'utilisation d'une concentration plus élevée de l'agent dénaturant ou sa substitution par un autre plus puissant comme le DTT par exemple serait, peut être la solution. Lin lors de son étude sur la structure de la protéine A27 de la vaccine a dénaturé la protéine avec une concentration d'urée à 2,5M en indiquant que le processus de dénaturation avait plusieurs étapes impliquant la formation de formes intermédiaires de dissociation. L'auteur a affirmé que le degré de dissociation est dépendant de la concentration de l'agent dénaturant mais aussi de la concentration de la protéine dans l'échantillon (Lin *et al.*, 2002).

Après avoir vérifié que la protéine A27 produite dans le système baculovirus était correctement reconnue par des sérums de caprins éprouvés, l'identification d'épitopes reconnus a été l'étape suivante.

Les épitopes sont des domaines/régions se trouvant à la surface des protéines. On en distingue deux types : les épitopes de type B qui sont reconnus par les anticorps et les épitopes de type T qui font réagir les lymphocytes T. Nous nous sommes intéressés à la prédiction des épitopes de type B de la protéine A27 du virus LSD qui peuvent être linéaires ou conformationnels.

L'étude des épitopes linéaires a été réalisée par deux techniques complémentaires : une première technique expérimentale de « peptide scanning », communément appelée « pepscan » associée à une analyse *in silico* de prédiction des épitopes.

L'approche de peptide scanning, tend à indiquer l'existence de six zones épitopiques linéaires dans la séquence protéique de la protéine A27 du LSD, avec quatre épitopes de longueur variable en partie N terminale de la protéine (régions 5 -25, 33-37, 49- 55, 65-69), un épitope long d'une vingtaine de résidus (résidu 73 à résidu 91) dans la région que notre analyse indique comme étant organisée en domaine super-enroulé (CCD) et enfin un dernier épitope de 7 résidus situé à l'extrémité de la région C terminale.

En parallèle de cette analyse expérimentale de «PepScan », la prédiction de la présence d'épitopes continus ou linéaires a été réalisée par une analyse *in silico* grâce au logiciel Bepipred. Le résultat de cette prédiction d'épitopes linéaires fait ressortir 4 zones épitopiques essentielles dont trois se trouvent à la partie N terminale de la protéine (8 à 33, 42 à 47, 67 à 73), et un dernier au niveau de l'extrémité de la partie C terminale de la protéine (139 à 148) . Cependant, deux zones seulement ont été prédites avec un score important et couvrent la partie N terminale de la protéine (résidus 10 à 17 et résidus 25 à 32).

Une première approche de comparaison entre les résultats d'analyse expérimentale et ceux de l'analyse *in silico* a été menée. Deux domaines se trouvant en partie N terminale de la protéine ont été prédits comme appartenant à des épitopes linéaires à la fois par le Pepscan et par l'analyse *in silico* et englobent les régions communes allant des résidus 8 à 25 se trouvant en partie N terminale et les résidus 67 à 69. Une des zones épitopiques se trouvant dans le domaine CCD (résidus 73 à 91) qui a été reconnue par le sérum de caprins éprouvés par le Pepscan n'a pas été prédite par le logiciel Bepipred.

Afin d'évaluer les performances de la méthodologie utilisée sous Bepipred, il nous est paru intéressant de confronter les performances du serveur aux données expérimentales extraites de la littérature relative aux travaux sur la protéine A27 de la vaccine.

L'analyse par le serveur Bepipred aboutit à l'identification de quatre zones épitopiques linéaires : résidus 4- 14 se trouvant en partie N terminale, résidus 23- 33 se trouvant au niveau du domaine HBD, résidus 35- 47 se trouvant à la jonction entre le domaine HBD et CCD et résidus 102- 111 dans le domaine LZD. Notons que la majorité des résidus des trois dernières zones épitopiques ont été prédites avec un score élevé signifiant qu'elles ont plus de probabilité d'appartenir à une épitope linéaire.

La confrontation de ces données avec la littérature est plutôt en faveur d'une validation des résultats apportés par Bepipred. En effet, les régions épitopiques prédites par Bepipred rejoignent, au moins partiellement, celles identifiées dans le cadre des travaux réalisés sur la protéine A27 de la vaccine par Berhanu et al (2008) (aa 1-50, aa 51-90 et aa 81-110) (Berhanu *et al.*, 2008) et Kaeffer et al (2016) (aa 31-40, 31-50 et 101-110) (Kaeffer *et al.*, 2016).

Par ailleurs, à côté des épitopes linéaires, l'étude des épitopes discontinus a été réalisée sur le serveur Discotope 2.0.

Ce serveur fait appel à des algorithmes basés sur des données compilées à partir de l'analyse cristallographique par rayons X de complexes anticorps-antigènes. Les limites des performances de ce serveur résident déjà dans la rareté des données disponibles sur les épitopes conformationnels, en comparaison avec les données disponibles sur les épitopes linéaires (Andersen *et al.*, 2006). Ceci est illustré en particulier par l'absence de données sur les épitopes conformationnels de la protéine A27 de la vaccine, ne nous permettant pas, par exemple, de confronter ces données expérimentales aux prédictions réalisées sur Discotope 2.0 sur cette même protéine.

L'étude la protéine A27 du LSDV sur le serveur discotope 2.0 s'est basée sur l'utilisation du modèle tridimensionnel pdb (c3vopC) produit dans le cadre de notre analyse sur le serveur Phyre2. Ce modèle pdb était bâti sur 31 résidus localisés en région C terminale, à cheval sur les domaines supposés CCD et LZD (résidus 92-122). L'analyse par Discotope 2.0 aboutit à l'identification de 14 amino-acides désignés comme participant à la constitution d'un épitope conformationnel.

L'existence de cet épitope conformationnel doit être considérée en prenant en compte l'organisation oligomérique de la protéine A27 du LSDV. C'est effectivement sous cet environnement oligomérique qu'intervient l'interaction de l'anticorps avec son épitope conformationnel. En attendant à ce que des travaux futurs portent directement sur l'analyse cristallographique des complexes A27 LSDV-anticorps, les études cristallographiques d'autres complexes viendront enrichir les bases de données utilisées sur discotope permettant par ce biais d'améliorer les performances des prédictions réalisées.

Conclusion générale et perspectives

La variole ovine est toujours considérée aujourd'hui comme une maladie virale endémique touchant les petits ruminants en Tunisie. La maladie est présente tout au long de l'année dans le pays, avec une prévalence maximale en automne et en hiver. Malgré la mise en place, par les autorités vétérinaires, de campagnes de vaccinations annuelles permettant de contrôler la dissémination du virus, le taux de couverture vaccinal reste faible (<50%). Plusieurs hypothèses sont avancées et pourraient en être la cause: (i) l'absence d'une stratégie de contrôle globale commune aux quatre pays d'Afrique du Nord (Tunisie, Maroc, Algérie, Libye) en lien avec la perméabilité des frontières et les mouvements d'animaux illégaux (ii) la baisse d'intérêt national pour la variole ovine en raison de l'émergence de nouvelles maladies infectieuses d'origine virale et contagieuses telles que la fièvre catarrhale ovine, la peste des petits ruminants, la fièvre aphteuse (iii) le choix de vacciner seulement l'espèce ovine malgré la circulation avérée du virus de la variole chez d'autres espèces au sein des troupeaux tunisiens.

L'identification des points clés, qui font actuellement partie de la stratégie de lutte contre la maladie est cruciale avec (i) la nécessité d'élaborer une stratégie permettant de réguler la transhumance et le mouvement incontrôlé d'animaux d'élevage (iii) l'ajout des caprins comme espèce cible dans les programmes de vaccination (iv) l'optimisation de la souche vaccinale utilisée (actuellement, la souche vivante atténuée RM65).

Cette optimisation consisterait par exemple à éviter de vacciner les populations animales avec une souche virale atténuée induisant une immunité durable mais avec un fort potentiel de réversion de virulence et préférer l'utilisation de vaccins composés d'antigènes immuno-dominants tels que les vaccins sous-unitaires. Ceci nécessite une meilleure connaissance des protéines spécifiques des capripoxvirus, cibles des anticorps. Quatre protéines potentiellement immuno-dominantes spécifiques du virus LSDV appartenant au genre *Capripoxvirus*, les protéines L1, A27, A33 et B5 ont été, en partie, caractérisées au cours de ce travail de thèse.

Dans un premier temps, une analyse *in silico* a permis de caractériser une partie de la structure de ces protéines d'intérêt et de vérifier leur taux de conservation parmi différents virus appartenant à la famille des poxvirus. Une caractérisation structurale approfondie a concerné la protéine A27 avec la mise en évidence de sa structure primaire, secondaire et tertiaire. Cette analyse structurale a, dans un deuxième temps, permis de produire les quatre protéines d'intérêt dans deux systèmes d'expression différents : le système eucaryote (pCIneo et cellules Vero) qui n'a pas permis d'aboutir aux résultats attendus et le système baculovirus-cellules d'insectes (BEVS) qui, lui, a permis de générer des résultats intéressants.

L'antigénicité de la protéine A27 produite en système baculovirus a été démontrée au travers de sa reconnaissance par des sérums hyper immuns anti-capripoxvirus provenant d'infections expérimentales. La mise en évidence de formes trimériques et hexamériques a mis en évidence l'oligomérisation de la protéine A27 spécifique du LSDV, à l'image de ce qui a été observé pour son homologue spécifique du virus de la vaccine.

L'immuno-détection des peptides synthétisés sur membranes (PepScan) correspondant à la protéine A27 combinée à une analyse *in silico* ont permis d'identifier des zones susceptibles de constituer des régions épitopiques reconnues. Un épitope linéaire majeur se situerait en partie N terminale de la protéine A27 et serait, par homologie au virus de la vaccine, impliqué dans la liaison de la protéine à l'héparan sulfate de la cellule hôte. La fixation d'un anticorps protecteur à cette région inhiberait la fixation de la protéine empêchant ainsi la pénétration du virus au sein de la cellule hôte neutralisant donc l'infection. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés par d'autres travaux. Plusieurs points doivent être repris et réalisés en continuité avec les travaux déjà initiés : (i) devant les travaux sur l'antigénicité des protéines homologues chez le GTPV (Zheng *et al.*, 2009) et le SPPV (Chervyakova *et al.*, 2016), l'expression des quatre protéines du LSDV en système eucaryote doit être retentée tout en s'assurant de la production d'ARN messagers (ii) la production des protéines d'intérêt L1, A33 et B5 dans le système baculovirus avec la production des baculovirus recombinants pour A33 (iii) l'approfondissement des analyses d'antigénicité par immunoblot de la protéine A27 et des autres protéines sur les sérums contrôles tels que des sérums négatifs d'ovins (iv) l'approfondissement de l'analyse structurale de la protéine A27 (surtout structure tertiaire) en utilisant différents serveurs de prédiction structurale (Raptor-X, I-Tasser) (v) cette analyse structurale tri-dimensionnelle permettra de prédire plus précisément les épitopes discontinus de la protéine A27.

La réalisation de ces premières analyses permettra alors d'envisager l'analyse structurale *in silico* pour les trois autres protéines L1, A33 et B5 tout en vérifiant leur antigénicité par Western Blot et la prédiction d'épitopes majeurs immuno-dominants par Pepscan en utilisant un panel plus large de sérums provenant de différentes espèces animales (BV, CP, OV) avec des statuts d'infection différents (vaccination, infection naturelle).

En continuité des travaux portant sur l'antigénicité de la protéine A27, l'étude de son pouvoir immunogène par la mise en place d'expérimentations animales sur petits ruminants

consistant en l'immunisation d'animaux par la protéine produite et purifiée serait intéressante à envisager.

La connaissance de nouveaux éléments sur cette protéine A27 spécifique du capripoxvirus particulièrement sur son antigénicité avec la mise en évidence d'épitopes cibles des anticorps pourrait permettre d'améliorer les techniques de détection des capripoxvirus. Les techniques de diagnostic virologique ou sérologique utilisées à ce jour nécessitent, entre autres, l'utilisation, en laboratoire de biosécurité de niveau 3, d'une souche virale atténuée pouvant présenter un risque. L'usage de techniques de diagnostic basées sur des antigènes recombinants plutôt que sur des souches virales répliquatives est une alternative à soutenir. Dans ce cadre, le développement d'un test sérologique de type ELISA indirect basé sur la protéine A27 recombinante produite en système baculovirus est à promouvoir. Enfin, des informations sur la structure de la protéine A27 ainsi que la connaissance des épitopes majeurs linéaires ou conformationnels pourra aider au développement d'inhibiteurs bloquant l'assemblage de la protéine ou la formation de complexes avec d'autres protéines pouvant inhiber l'infection par le virus.

Références bibliographiques

1. Abdo-Salem S, Waret-Szkuta A, Roger F, Olive MM, Saeed K, and Chevalier V. Risk assessment of the introduction of Rift Valley fever from the Horn of Africa to Yemen via legal trade of small ruminants. *Trop Anim Hlth Prod.* 2011;43:471-80.
2. Abera Z, Degefu H, Gari G, Kidane M. Sero-prevalence of lumpy skin disease in selected districts of West Wollega zone, Ethiopia. *BMC veterinary research.* 2015;11:135.
3. Abu-El-Saad AA, Abdel-Moneim AS. Modulation of macrophage functions by sheeppox virus provides clues to understand interaction of the virus with host immune system. *Virology journal.* 2005;2:22.
4. Abutarbush SM, Ababneh MM, Al Zoubi IG, Al Sheyab OM, Al Zoubi MG, Alekish MO, et al. Lumpy Skin Disease in Jordan: Disease Emergence, Clinical Signs, Complications and Preliminary-associated Economic Losses. *Transboundary and emerging diseases.* 2015;62(5):549-54.
5. Abutarbush SM, Hananeh WM, Ramadan W, Al Sheyab OM, Alnajjar AR, Al Zoubi IG, et al. Adverse Reactions to Field Vaccination Against Lumpy Skin Disease in Jordan. *Transboundary and emerging diseases.* 2014.
6. Achour HA, Bouguedour R. Epidemiology of sheep pox in Algeria. *Revue Scientifique et Technique OIE.* 1999;18:606-17.
7. Achour HA, Bouguedour R, Bouhbal A, Guechtouli A, Aouissat M. Comparative study of the immunizing ability of some attenuated strains of sheep pox virus and of a sensitizing vaccine. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics).* 2000;19(3):773-83.
8. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Osorio FA, Balinsky C, et al. The genome of swinepox virus. *Journal of virology.* 2002;76(2):783-90.
9. AHA AHA. Disease Strategy Sheep pox and goat pox. Available at: www.animalhealthaustraliacom.au/programs/emergency-animal-diseasepreparedness/ausvetplan/. 2011.
10. Al-Salihi KA, Hassan IQ. Lumpy Skin Disease in Iraq: Study of the Disease Emergence. *Transboundary and emerging diseases.* 2015;62(5):457-62.
11. Alcamí A, Symons JA, Smith GL. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *Journal of virology.* 2000;74(23):11230-9.
12. Aldaz-Carroll L, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Hirao L, Isaacs SN, et al. Epitope-mapping studies define two major neutralization sites on the vaccinia virus extracellular enveloped virus glycoprotein B5R. *Journal of virology.* 2005;79(10):6260-71.
13. Aldaz-Carroll L, Whitbeck JC, Ponce de Leon M, Lou H, Pannell LK, Lebowitz J, et al. Physical and immunological characterization of a recombinant secreted form of the membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R gene. *Virology.* 2005;341(1):59-71.
14. Aldaz-Carroll L, Xiao Y, Whitbeck JC, de Leon MP, Lou H, Kim M, et al. Major neutralizing sites on vaccinia virus glycoprotein B5 are exposed differently on variola virus ortholog B6. *Journal of virology.* 2007;81(15):8131-9.
15. Aldrige. S. Downstream processing needs a boost. *Gen Eng News.* 2006;26(1):1-51.
16. Alkhamis MA, VanderWaal K. Spatial and Temporal Epidemiology of Lumpy Skin Disease in the Middle East, 2012-2015. *Front Vet Sci.* 2016;3:19.
17. Alva V, Nam SZ, Soding J, Lupas AN. The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic acids research.* 2016;44(W1):W410-5.
18. Anandan R, Sundararajan, S., Kannamani, G. and Jayaraman, M.S. . Studies on live and inactivated sheep pox vaccines. *Cheiron.* 1972: 1,42.
19. Andersen PH, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Science.* 2006;15:2558-67.
20. Andreeva A, Howorth D, Chothia C, Kulesha E, Murzin AG. SCOP2 prototype: a new approach to protein structure mining. *Nucleic acids research.* 2014;42(Database issue):D310-4.

21. Andrell J, Tate CG. Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Molecular membrane biology*. 2013;30(1):52-63.
22. Annandale CH, Holm DE, Ebersohn K, Venter EH. Seminal transmission of lumpy skin disease virus in heifers. *Transboundary and emerging diseases*. 2014;61(5):443-8.
23. Anses. Risque d'introduction de la dermatose nodulaire contagieuse en France. Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective, Juin 2017. 2017.
24. Appaiahgari MB, Vrati S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. *Expert opinion on biological therapy*. 2015;15(3):337-51.
25. Arlen PA, Singleton M, Adamovicz JJ, Ding Y, Davoodi-Semiromi A, Daniell H. Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infection and immunity*. 2008;76(8):3640-50.
26. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2006;22(2):195-201.
27. Arnold K, Kiefer F, Kopp J, Battey JN, Podvinec M, Westbrook JD, et al. The Protein Model Portal. *Journal of structural and functional genomics*. 2009;10(1):1-8.
28. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*. 2012;40(Web Server issue):W597-603.
29. Asagba MO, Nawathe DR. Evidence of sheep pox in Nigeria. *Tropical animal health and production*. 1981;13(1):61.
30. Assarsson E, Greenbaum JA, Sundstrom M, Schaffer L, Hammond JA, Pasquetto V, et al. Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(6):2140-5.
31. Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current opinion in structural biology*. 2013;23(3):393-402.
32. Aucoin MG, Mena JA, Kamen AA. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Current gene therapy*. 2010;10(3):174-86.
33. Ayari-Fakhfakh E, do Valle TZ, Guillemot L, Panthier JJ, Bouloy M, Ghram A, et al. MBT/Pas mouse: a relevant model for the evaluation of Rift Valley fever vaccines. *The Journal of general virology*. 2012;93(Pt 7):1456-64.
34. Ayelet G, Abate Y, Sisay T, Nigussie H, Gelaye E, Jemberie S, et al. Lumpy skin disease: preliminary vaccine efficacy assessment and overview on outbreak impact in dairy cattle at Debre Zeit, central Ethiopia. *Antiviral research*. 2013;98(2):261-5.
35. Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1994;202(2):586-605.
36. Babiuk S, Bowden TR, Boyle DB, Wallace DB, Kitching RP. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transboundary and emerging diseases*. 2008;55(7):263-72.
37. Babiuk S, Parkyn G, Copps J, Larence JE, Sabara MI, Bowden TR, et al. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2007;19(5):486-91.
38. Babiuk S, Wallace DB, Smith SJ, Bowden TR, Dalman B, Parkyn G, et al. Detection of antibodies against capripoxviruses using an inactivated sheeppox virus ELISA. *Transboundary and emerging diseases*. 2009;56(4):132-41.
39. Babkin IV, Babkina IN. The origin of the variola virus. *Viruses*. 2015;7(3):1100-12.
40. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, et al. Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories*. 2014;13:141.
41. Baker D, Sali A. Protein structure prediction and structural genomics. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5540):93-6.

42. Balamurugan V, Jayappa KD, Hosamani M, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Singh RK. Comparative efficacy of conventional and taqman polymerase chain reaction assays in the detection of capripoxviruses from clinical samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2009;21(2):225-31.
43. Balinsky CA, Delhon G, Smoliga G, Prarat M, French RA, Geary SJ, et al. Rapid preclinical detection of sheeppox virus by a real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology.* 2008;46(2):438-42.
44. Balozet L. Expériences sur la clavelée. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis.* 1931;3:245-53.
45. Barford D, Takagi Y, Schultz P, Berger I. Baculovirus expression: tackling the complexity challenge. *Current opinion in structural biology.* 2013;23(3):357-64.
46. Barnard GC, Henderson GE, Srinivasan S, Gerngross TU. High level recombinant protein expression in *Ralstonia eutropha* using T7 RNA polymerase based amplification. *Protein expression and purification.* 2004;38(2):264-71.
47. Baroudy BM, Moss B. Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over. *Nucleic acids research.* 1982a;10(18):5673-9.
48. Baroudy BM, Venkatesan S, Moss B. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell.* 1982;28(2):315-24.
49. Bashton M, Chothia C. The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure (London, England : 1993).* 2007;15(1):85-99.
50. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports.* 2017;27(1):4-25.
51. Bell E, Shamim M, Whitbeck JC, Sfyroera G, Lambris JD, Isaacs SN. Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology.* 2004;325(2):425-31.
52. Ben-Gera J, Klement E, Khinich E, Stram Y, Shpigel NY. Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease - The results of a randomized controlled field study. *Vaccine.* 2015;33(38):4837-42.
53. Ben Chehida F, Fakhfakh A, Caufour P, Amdouni J, Nasr J, Messaoudi L, et al. Sheep pox in Tunisia: Current status and perspectives. *Transboundary and emerging diseases.* 2017;1-14.
54. Ben Dhia M. L'élevage ovin en Tunisie. Situation actuelle et perspective d'avenir. In Caja G, Djemali M, Gabiña D et Nefzaoui A. (eds), *L'élevage ovin en zones arides et semi arides Options Méditerranéennes CIHEAM-IAMZ, Zaragoza.* 1995:9-20.
55. Benabdellah M, El Yajouri O. Cost Benefit Analysis of Control Programs against Sheep pox in Morocco in a deterministic Environment. *Journal of Inspiration Economy.* 2016;1:27-39.
56. Benhnia MR, McCausland MM, Moyron J, Laudenslager J, Granger S, Rickert S, et al. Vaccinia virus extracellular enveloped virion neutralization in vitro and protection in vivo depend on complement. *Journal of virology.* 2009;83(3):1201-15.
57. Berezovsky IN. Discrete structure of van der Waals domains in globular proteins. *Protein engineering.* 2003;16(3):161-7.
58. Berezovsky IN, Guarnera E, Zheng Z. Basic units of protein structure, folding, and function. *Progress in biophysics and molecular biology.* 2016.
59. Berezovsky IN, Zheng Z, Kurotani A, Tokmakov AA, Kurochkin IV. Organization of the multiaminoacyl-tRNA synthetase complex and the cotranslational protein folding. *Protein science : a publication of the Protein Society.* 2015;24(9):1475-85.
60. Berhanu A, Wilson RL, Kirkwood-Watts DL, King DS, Warren TK, Lund SA, et al. Vaccination of BALB/c mice with *Escherichia coli*-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge. *Journal of virology.* 2008;82(7):3517-29.

61. Berhe G, Minet C, Le Goff C, Barrett T, Ngangnou A, Grillet C, et al. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *Journal of virology*. 2003;77(2):1571-7.
62. Bertagnoli S. Poxvirus In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes. Eds Tec & doc Tome 1. 2003:pp. 407-14.
63. Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR, Martins LT, Tavares KC, Bertolini M, et al. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. *Transgenic research*. 2016;25(3):329-43.
64. Bhanot V, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Sen A, Yadav V, et al. Expression of P32 protein of goatpox virus in *Pichia pastoris* and its potential use as a diagnostic antigen in ELISA. *Journal of virological methods*. 2009;162(1-2):251-7.
65. Bhanuprakash V, Hosamani M, Singh RK. Prospects of control and eradication of capripox from the Indian subcontinent: a perspective. *Antiviral research*. 2011;91(3):225-32.
66. Bhanuprakash V, Indrani BK, Hegde R, Kumar MM, Moorthy AR. A classical live attenuated vaccine for sheep pox. *Tropical animal health and production*. 2004;36(4):307-20.
67. Bhanuprakash V, Indrani BK, Hosamani M, Singh RK. The current status of sheep pox disease. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2006;29(1):27-60.
68. Binopal YS, Ongadi FA, Chepkwony JC. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. *The Onderstepoort journal of veterinary research*. 2001;68(2):151-3.
69. Bisbee C. . Current perspectives on manufacturing and scaleup of biopharmaceuticals. *Gen Eng News*. 1993;13:8-10.
70. Bisht H, Weisberg AS, Moss B. Vaccinia virus l1 protein is required for cell entry and membrane fusion. *Journal of virology*. 2008;82(17):8687-94.
71. Blancou J, Kieny MP, Lathe R, Lecocq JP, Pastoret PP, Soulebot JP, et al. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*. 1986;322(6077):373-5.
72. Blasco R, Sisler JR, Moss B. Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *Journal of virology*. 1993;67(6):3319-25.
73. Blouch RE, Byrd CM, Hruby DE. Importance of disulphide bonds for vaccinia virus L1R protein function. *Virology journal*. 2005;2:91.
74. Borrel A. Etude expérimentale de la clavelée. Filtration du virus; sero-clavelisation; serothérapie *Annls, Inst Pasteur*. 1903:17-24.
75. Boshra H, Truong T, Nfon C, Bowden TR, Gerdts V, Tikoo S, et al. A lumpy skin disease virus deficient of an IL-10 gene homologue provides protective immunity against virulent capripoxvirus challenge in sheep and goats. *Antiviral research*. 2015;123:39-49.
76. Boshra H, Truong T, Nfon C, Gerdts V, Tikoo S, Babiuk LA, et al. Capripoxvirus-vectored vaccines against livestock diseases in Africa. *Antiviral research*. 2013;98(2):217-27.
77. Boumart Z, Daouam S, Belkourati I, Rafi L, Tuppurainen E, Tadlaoui KO, et al. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines. *BMC veterinary research*. 2016;12(1):133.
78. Bowden TR, Babiuk SL, Parkyn GR, Copps JS, Boyle DB. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*. 2008;371(2):380-93.
79. Bowden TR, Coupar BE, Babiuk SL, White JR, Boyd V, Duch CJ, et al. Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of virological methods*. 2009;161(1):19-29.
80. Brahmi A, . L'élevage ovin laitier en Tunisie : Analyse de la situation actuelle, contraintes, moyens et perspectives de développement. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, Sciences de la production animale, Institut National Agronomique de Tunisie, Tunisie. 2008.

81. Bratke KA, McLysaght A, Rothenburg S. A survey of host range genes in poxvirus genomes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;14:406-25.
82. Breiman A, Carpentier DC, Ewles HA, Smith GL. Transport and stability of the vaccinia virus A34 protein is affected by the A33 protein. *The Journal of general virology*. 2013;94(Pt 4):720-5.
83. Brem G, Besenfelder U, Hartl P. Production of foreign proteins in the mammary gland of transgenic mammals. *Chim Oggi* 1993;11(21):25.
84. Brenner J, Bellaiche M, Gross E, Elad D, Oved Z, Haimovitz M, et al. Appearance of skin lesions in cattle populations vaccinated against lumpy skin disease: statutory challenge. *Vaccine*. 2009;27(10):1500-3.
85. Buller RM, Arif BM, Black DN, Dumbell KR, Esposito JJ, Lefkowitz EJ, et al. Family Poxviridae. In: Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (eds), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier Academic Press, San Diego. 2005:117– 33.
86. Cameron C, Hota-Mitchell S, Chen L, Barrett J, Cao JX, Macaulay C, et al. The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*. 1999;264(2):298-318.
87. Cao JX, Gershon PD, Black DN. Sequence analysis of HindIII Q2 fragment of capripoxvirus reveals a putative gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homologue. *Virology*. 1995;209(1):207-12.
88. Carn VM. An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples. *Journal of virological methods*. 1995;51(1):95-102.
89. Carn VM. Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*. 1993;11(13):1275-9.
90. Carn VM, Kitching RP. An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). *Epidemiology and infection*. 1995;114(1):219-26.
91. Carn VM, Kitching RP, Hammond JM, Chand P. Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus. *Journal of virological methods*. 1994;49(3):285-94.
92. Carter GC, Law M, Hollinshead M, Smith GL. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *The Journal of general virology*. 2005;86(Pt 5):1279-90.
93. Caufour P, Rufael T, Lamien CE, Lancelot R, Kidane M, Awel D, et al. Protective efficacy of a single immunization with capripoxvirus-vectored recombinant peste des petits ruminants vaccines in presence of pre-existing immunity. *Vaccine*. 2014;32(30):3772-9.
94. Chakroun G. Prédiction de la structure d'une protéine. *Soluscience*. 2009.
95. Chan KW, Lee ML, Yang WC, Wong ML, Hsu WL, Ho CF, et al. Differential diagnosis of Goatpox virus in Taiwan by multiplex polymerase chain reaction assay and high-resolution melt analysis. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2014;26(2):195-202.
96. Chan WM, Kalkanoglu AE, Ward BM. The inability of vaccinia virus A33R protein to form intermolecular disulfide-bonded homodimers does not affect the production of infectious extracellular virus. *Virology*. 2010;408(1):109-18.
97. Chan WM, Ward BM. There is an A33-dependent mechanism for the incorporation of B5-GFP into vaccinia virus extracellular enveloped virions. *Virology*. 2010;402(1):83-93.
98. Chand P, Kitching RP, Black DN. Western blot analysis of virus-specific antibody responses for capripox and contagious pustular dermatitis viral infections in sheep. *Epidemiology and infection*. 1994;113(2):377-85.
99. Chang TH, Chang SJ, Hsieh FL, Ko TP, Lin CT, Ho MR, et al. Crystal structure of vaccinia viral A27 protein reveals a novel structure critical for its function and complex formation with A26 protein. *PLoS pathogens*. 2013;9(8):e1003563.
100. Chen N, Buller RM, Wall EM, Upton C. Analysis of host response modifier ORFs of ectromelia virus, the causative agent of mousepox. *Virus research*. 2000;66(2):155-73.

101. Chen Z, Earl P, Americo J, Damon I, Smith SK, Yu F, et al. Characterization of chimpanzee/human monoclonal antibodies to vaccinia virus A33 glycoprotein and its variola virus homolog in vitro and in a vaccinia virus mouse protection model. *Journal of virology*. 2007;81(17):8989-95.
102. Chen Z, Earl P, Americo J, Damon I, Smith SK, Zhou YH, et al. Chimpanzee/human mAbs to vaccinia virus B5 protein neutralize vaccinia and smallpox viruses and protect mice against vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(6):1882-7.
103. Chervyakova OV, Zaitsev VL, Iskakov BK, Tailakova ET, Stochkov VM, Sultankulova KT, et al. Recombinant Sheep Pox Virus Proteins Elicit Neutralizing Antibodies. *Viruses*. 2016;8(6).
104. Chihota CM, Rennie LF, Kitching RP, Mellor PS. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiology and infection*. 2001;126(2):317-21.
105. Ching YC, Chung CS, Huang CY, Hsia Y, Tang YL, Chang W. Disulfide bond formation at the C termini of vaccinia virus A26 and A27 proteins does not require viral redox enzymes and suppresses glycosaminoglycan-mediated cell fusion. *Journal of virology*. 2009;83(13):6464-76.
106. Chu FI, Ho Y, Tzou DL. NMR assignment of the vaccinia virus envelope protein A27L. *Journal of biomolecular NMR*. 2005;32(2):178.
107. Chu G, Hayakawa H, Berg P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic acids research*. 1987;15(3):1311-26.
108. Chu Y, Yan X, Gao P, Zhao P, He Y, Liu J, et al. Molecular detection of a mixed infection of Goatpox virus, Orf virus, and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* in goats. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2011;23(4):786-9.
109. Chung CS, Chen CH, Ho MY, Huang CY, Liao CL, Chang W. Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *Journal of virology*. 2006;80(5):2127-40.
110. Chung CS, Hsiao JC, Chang YS, Chang W. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *Journal of virology*. 1998;72(2):1577-85.
111. Coetzer JAW. Lumpy skin disease. *Infectious diseases of livestock*. 2004;2:1268-1276.
112. Cohen ME, Xiao Y, Eisenberg RJ, Cohen GH, Isaacs SN. Antibody against extracellular vaccinia virus (EV) protects mice through complement and Fc receptors. *PloS one*. 2011;6(6):e20597.
113. Contreras-Gomez A, Sanchez-Miron A, Garcia-Camacho F, Molina-Grima E, Chisti Y. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology progress*. 2014;30(1):1-18.
114. Dadousis C. Sheep pox in Evros. A 7-year (1994-2000) retrospective study. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2003;54:172-80.
115. Dales S. Effects of streptovitamin A on the initial events in the replication of vaccinia and reovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1965;54(2):462-8.
116. Dales S, Mosbach EH. Vaccinia as a model for membrane biogenesis. *Virology*. 1968;35(4):564-83.
117. Dales S, Siminovitch L. The development of vaccinia virus in Earle's L strain cells as examined by electron microscopy. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1961;10:475-503.
118. Damon IK. Poxviruses. In: Knipe, D. M., P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (eds),. *Fields Virology*. 2007: pp. 2947–75.
119. Das A, Babiuk S, McIntosh MT. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(5):1613-20.
120. Das R, Baker D. Macromolecular modeling with rosetta. *Annual review of biochemistry*. 2008;77:363-82.
121. Dashprakash M, Venkatesan G, Ramakrishnan MA, Muthuchelvan D, Sankar M, Pandey AB, et al. Genetic diversity of fusion gene (ORF 117), an analogue of vaccinia virus A27L gene of capripox virus isolates. *Virus genes*. 2015;50(2):325-8.

122. Davies DH, Molina DM, Wrammert J, Miller J, Hirst S, Mu Y, et al. Proteome-wide analysis of the serological response to vaccinia and smallpox. *Proteomics*. 2007;7(10):1678-86.
123. Davies FG. Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goats in Kenya, with observation on the epidemiology and control. *The Journal of hygiene*. 1976;76(2):163-71.
124. Davies FG. Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle. *The British veterinary journal*. 1991;147(6):489-503.
125. Davies FG, Otema C. Relationships of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses. *Research in veterinary science*. 1981;31(2):253-5.
126. de Castilho Fernandes A, Fontes A, Gonsales N, Swiech K, Picanco-Castro V, Faca S, et al. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2011;58(4):243-9.
127. de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*. 2009;8:26.
128. de Virgilio M, De Marchis F, Bellucci M, Mainieri D, Rossi M, Benvenuto E, et al. The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. *Journal of experimental botany*. 2008;59(10):2815-29.
129. DeLange AM, McFadden G. The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Current topics in microbiology and immunology*. 1990;163:71-92.
130. Delhay S, Paul S, Sommereyns C, Van Pesch V, Michiels T. Les interférons de type I. *Virologie*. 2006;10:167-78.
131. Delhon G, Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, de la Concha-Bermejillo A, Lehmkuhl HD, et al. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *Journal of virology*. 2004;78(1):168-77.
132. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*. 2009;27(3):297-306.
133. Demkowicz WE, Maa JS, Esteban M. Identification and characterization of vaccinia virus genes encoding proteins that are highly antigenic in animals and are immunodominant in vaccinated humans. *Journal of virology*. 1992;66(1):386-98.
134. DGSV. Direction Générale des Services Vétérinaires Tunisiens. Ministère de l'Agriculture. Annual reports 2009-2015 Annexe 1. 2015.
135. DGSV. Direction Générale des Services Vétérinaires Tunisiens. Ministère de l'Agriculture. Annual report Rapport variole ovine Situation sanitaire. 2010;207:1-21.
136. Diallo A, and G. J. Viljoen. Genus Capripoxvirus. In: Mercer, A A, A Schmidt, and O Weber (eds), *Poxviruses*,. 2007:pp. 167–81.
137. Diallo A, Minet C, Berhe G, Le Goff C, Black DN, Fleming M, et al. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;969:88-91.
138. Doceul V, Hollinshead M, van der Linden L, Smith GL. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5967):873-6.
139. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*. 2015;23(3):223-9.
140. Domenech J, Lubroth J, Eddi C, Martin V, Roger F. Regional and international approaches on prevention and control of animal transboundary and emerging diseases. *AnnNY Acad Sci*. 2006;1081:90-107.
141. Dor O, Zhou Y. Real-SPINE: an integrated system of neural networks for real-value prediction of protein structural properties. *Proteins*. 2007;68(1):76-81.
142. Dove A. Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nature biotechnology*. 2002;20(8):777-9.
143. Dubey SCaS, A.M. . Live and inactivated tissue culture vaccines against goat-pox. *Indian Vet J*. 1978;65:925.
144. Duraffour S, Andrei G, Snoeck R. Nouvelles armes thérapeutiques contre les poxvirus. *Virologie*. 2008; 12 (5) 323-38.

145. Earley AK, Chan WM, Ward BM. The vaccinia virus B5 protein requires A34 for efficient intracellular trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of wrapping and incorporation into progeny virions. *Journal of virology*. 2008;82(5):2161-9.
146. EFSA AP. EFSA Panel on Animal Health and Welfare. Scientific Opinion on sheep and goat pox. *EFSA Journal*, 12, 3885, doi:102903/jefsa20143885. 2014.
147. Egli A, Levin A, Santer DM, Joyce M, O'Shea D, Thomas BS, et al. Immunomodulatory Function of Interleukin 28B during primary infection with cytomegalovirus. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(5):717-27.
148. Embury-Hyatt C, Babiuk S, Manning L, Ganske S, Bowden TR, Boyle DB, et al. Pathology and viral antigen distribution following experimental infection of sheep and goats with capripoxvirus. *Journal of comparative pathology*. 2012;146(2-3):106-15.
149. EMPRES. *Transboundary Animal Diseases Bulletin*. Division: Animal Production and Health Division. 1999(Issue No. 11 – 1999.).
150. Engelstad M, Howard ST, Smith GL. A constitutively expressed vaccinia gene encodes a 42-kDa glycoprotein related to complement control factors that forms part of the extracellular virus envelope. *Virology*. 1992;188(2):801-10.
151. Engelstad M, Smith GL. The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. *Virology*. 1993;194(2):627-37.
152. Esposito JJ, Sammons SA, Frace AM, Osborne JD, Olsen-Rasmussen M, Zhang M, et al. Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5788):807-12.
153. Essani K, Dugre R, Dales S. Biogenesis of vaccinia: involvement of spicules of the envelope during virion assembly examined by means of conditional lethal mutants and serology. *Virology*. 1982;118(2):279-92.
154. Fagbo S, Coetzer JA, Venter EH. Seroprevalence of Rift Valley fever and lumpy skin disease in African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park and Hluhluwe-iMfolozi Park, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*. 2014;85(1):1075.
155. Fakhfakh E, Le Goff C, Albina E, Zekri S, Sghaier C, Odissev C, et al. Isolement et étude moléculaire de souches des virus de la clavelée et de l'ecthyma contagieux en Tunisie. *Revue Élev Méd Vét Pays trop*. 2005;58:7-14.
156. Falkner FG, Holzer GW. Vaccinia viral/retroviral chimeric vectors. *Current gene therapy*. 2004;4(4):417-26.
157. Fang M, Cheng H, Dai Z, Bu Z, Sigal LJ. Immunization with a single extracellular enveloped virus protein produced in bacteria provides partial protection from a lethal orthopoxvirus infection in a natural host. *Virology*. 2006;345(1):231-43.
158. FAO-OIE-WHO. The FAO-OIE-WHO collaboration. Sharing responsibilities and coordinating global activities to address health risks at the animal-human-ecosystems interfaces: A tripartite concept note. 2010.
159. Feiten MC, Di Luccio M, Santos KF, de Oliveira D, Oliveira JV. X-Ray Crystallography as a Tool to Determine Three-Dimensional Structures of Commercial Enzymes Subjected to Treatment in Pressurized Fluids. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2016.
160. Ferris RD, Plowright W. Simplified methods for the production of monolayers of testis cells from domestic animals, and for the serial examination of monolayer cultures. *The Journal of pathology and bacteriology*. 1958;75(2):313-8.
161. Fèvre E, Bronsvoort B, Hamilton K, Cleaveland S. Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends in microbiology*. 2006;14:125-31.
162. Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and bioengineering*. 1993;41(1):3-13.
163. Fisher J. http://www.bioinformatics.wsu.edu/bioinfo_course/notes.html. 2010.
164. Fitzgerald D. Revving up the green express. *Scientist*. 2003;17(14):45-7.

165. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses (ASM Press, Washington DC), 2nd Ed. 2003.
166. Fogg C, Lustig S, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH, Moss B. Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *Journal of virology*. 2004;78(19):10230-7.
167. Fogg CN, Americo JL, Lustig S, Huggins JW, Smith SK, Damon I, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses to recombinant proteins correlates with protection of mice and monkeys to orthopoxvirus challenges. *Vaccine*. 2007;25(15):2787-99.
168. Foo CH, Lou H, Whitbeck JC, Ponce-de-Leon M, Atanasiu D, Eisenberg RJ, et al. Vaccinia virus L1 binds to cell surfaces and blocks virus entry independently of glycosaminoglycans. *Virology*. 2009;385(2):368-82.
169. Foo CH, Whitbeck JC, Ponce-de-Leon M, Saw WT, Cohen GH, Eisenberg RJ. The myristate moiety and amino terminus of vaccinia virus l1 constitute a bipartite functional region needed for entry. *Journal of virology*. 2012;86(10):5437-51.
170. Franke CA, Reynolds PL, Hruby DE. Fatty acid acylation of vaccinia virus proteins. *Journal of virology*. 1989;63(10):4285-91.
171. Fulzele S, Singh, R.K., Hosamani, M., Mondal, B., Yadav, M.P. . Evaluation of duplex PCR and PCR-RFLP for diagnosis of sheep pox and goat pox. *Int J TropMed* 2006;1((2)):66-70.
172. Galea P, Kellya L, Snarya EL. Qualitative assessment of the entry of capripoxviruses into Great Britain from the European Union through importation of ruminant hides,skins and wool. *Microbial Risk analysis*. 2016;1:13-8.
173. Galmiche MC, Goenaga J, Wittek R, Rindisbacher L. Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens. *Virology*. 1999;254(1):71-80.
174. Gari G, Abie G, Gizaw D, Wubete A, Kidane M, Asgedom H, et al. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine*. 2015;33(28):3256-61.
175. Gari G, Biteau-Coroller F, LeGoff C, Caufour P, Roger F. Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. *Veterinary microbiology*. 2008;129(3-4):269-80.
176. Gari G, Grosbois V, Waret-Szkuta A, Babiuk S, Jacquet P, Roger F. Lumpy skin disease in Ethiopia: seroprevalence study across different agro-climate zones. *Acta tropica*. 2012;123(2):101-6.
177. Gavinelli A, Dilaveris D. European Union Lumpy Skin Disease and other exotic diseases antigen/vaccine banks. Current status, policy and future considerations: Stakeholder focus group meeting on availability of Lumpy Skin Disease (LSD) vaccines authorised to EU standards European Medicines Agency (31 January 2017, London, UK). Personal communication. 2017.
178. Geisse S. Insect Cell Cultivation and Generation of Recombinant Baculovirus Particles for Recombinant Protein Production. In *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*. 2007;24:489-507.
179. Gelaye E, Belay A, Ayelet G, Jenberie S, Yami M, Loitsch A, et al. Capripox disease in Ethiopia: Genetic differences between field isolates and vaccine strain, and implications for vaccination failure. *Antiviral research*. 2015;119:28-35.
180. Gershon PD, Ansell DM, Black DN. A comparison of the genome organization of capripoxvirus with that of the orthopoxviruses. *Journal of virology*. 1989;63(11):4703-8.
181. Ghanadan A, Saghadzadeh A, Jahanzad I, Rezaei N. Clinical aspects of indirect immunofluorescence for autoimmune diseases. *Expert review of clinical immunology*. 2015;11(5):597-616.
182. Gheraibia Y. Méthode hybride pour la prédiction des structures secondaires des protéines. *Mémoire de Magistère* 2012.
183. Ghram A. Rapport annuel d'activités du Laboratoire de Pathologie Animale. In: *Rapport annuel d'activités de l'Institut Pasteur de Tunis* 2010:199-201.

184. Giacomotto J, Segalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *British journal of pharmacology*. 2010;160(2):204-16.
185. Gitao C, Mbindyo C, Omani R, Chemweno V. Review of Sheep Pox Disease in Sheep. *J Vet Med Res*. 2017;4(1):1068.
186. Golden JW, Josleyn MD, Hooper JW. Targeting the vaccinia virus L1 protein to the cell surface enhances production of neutralizing antibodies. *Vaccine*. 2008;26(27-28):3507-15.
187. Gomez-Sebastian S, Lopez-Vidal J, Escribano JM. Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette. *PloS one*. 2014;9(5):e96562.
188. Gong SC, Lai CF, Esteban M. Vaccinia virus induces cell fusion at acid pH and this activity is mediated by the N-terminus of the 14-kDa virus envelope protein. *Virology*. 1990;178(1):81-91.
189. Gorman CM. Mammalian cell expression. *Current opinion in biotechnology*. 1990;1(1):36-47.
190. Graentzdoerffer A, Nemetz C. Titration of Non-Occluded Baculovirus Using a Cell Viability Assay. *BioTechniques*. 2003;34:260-4.
191. Graham BS, Belshe RB, Clements ML, Dolin R, Corey L, Wright PF, et al. Vaccination of vaccinia-naïve adults with human immunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial. The AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *The Journal of infectious diseases*. 1992;166(2):244-52.
192. Grosenbach DW, Hansen SG, Hruby DE. Identification and analysis of vaccinia virus palmitoylproteins. *Virology*. 2000;275(1):193-206.
193. Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 1):105-17.
194. Gulbahar MY, Davis WC, Yuksel H, Cabalar M. Immunohistochemical evaluation of inflammatory infiltrate in the skin and lung of lambs naturally infected with sheeppox virus. *Veterinary pathology*. 2006;43(1):67-75.
195. Haegeman A, Zro K, Sammin D, Vandenbussche F, Ennaji MM, De Clercq K. Investigation of a Possible Link between Vaccination and the 2010. Sheep Pox Epizootic in Morocco Transbound Emerg Diseases. 2015;doi: 10.1111/tbed.12342.
196. Haig DA. Lumpy skin disease. *Bull EpizootDisAfr*. 1957;5:421-30.
197. Haj Ammar H, Kilani H, Ben Hamouda W, Lazghab A, Jemli B, Khaled N. Bulletin des Services Vétérinaires - Numéro spécial - Dermatose nodulaire Contagieuse. 2016.
198. Hakola K, Van der Boogaart P, Mulders J, de Leeuw R, Schoonen W, Van Heyst J, et al. Recombinant rat follicle-stimulating hormone; production by Chinese hamster ovary cells, purification and functional characterization. *Molecular and cellular endocrinology*. 1997;127(1):59-69.
199. Han JH, Batey S, Nickson AA, Teichmann SA, Clarke J. The folding and evolution of multidomain proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(4):319-30.
200. Handistatus. <http://web.oie.int/hs2/report.asp>. 2016.
201. Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, Bartlett NW, et al. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(3):343-51.
202. He Y, Wang Y, Struble EB, Zhang P, Chowdhury S, Reed JL, et al. Epitope mapping by random peptide phage display reveals essential residues for vaccinia extracellular enveloped virion spread. *Virology journal*. 2012;9:217.
203. Hefferon KL, Oomens AG, Monsma SA, Finnerty CM, Blissard GW. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*. 1999;258(2):455-68.
204. Heine HG, Stevens MP, Foord AJ, Boyle DB. A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *Journal of immunological methods*. 1999;227(1-2):187-96.
205. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.

206. Hennig J, Wang I, Sonntag M, Gabel F, Sattler M. Combining NMR and small angle X-ray and neutron scattering in the structural analysis of a ternary protein-RNA complex. *Journal of biomolecular NMR*. 2013;56(1):17-30.
207. Hentzen A. Bovine semen risk analysis. Report to South African Veterinary Semen and Embryo Group of the South African Veterinary Association. 2000.
208. Heraud JM, Edghill-Smith Y, Ayala V, Kalisz I, Parrino J, Kalyanaraman VS, et al. Subunit recombinant vaccine protects against monkeypox. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(4):2552-64.
209. Herrera E, Lorenzo MM, Blasco R, Isaacs SN. Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: essential role in virus envelopment is independent of a large portion of the extracellular domain. *Journal of virology*. 1998;72(1):294-302.
210. Hildebrand A, Remmert M, Biegert A, Soding J. Fast and accurate automatic structure prediction with HHpred. *Proteins*. 2009;77 Suppl 9:128-32.
211. Hitchman RB, Locanto E, Possee RD, King LA. Optimizing the baculovirus expression vector system. *Methods (San Diego, Calif)*. 2011;55(1):52-7.
212. Ho Y, Hsiao JC, Yang MH, Chung CS, Peng YC, Lin TH, et al. The oligomeric structure of vaccinia viral envelope protein A27L is essential for binding to heparin and heparan sulfates on cell surfaces: a structural and functional approach using site-specific mutagenesis. *Journal of molecular biology*. 2005;349(5):1060-71.
213. Hogsette JA, Ruff JP, Jones CJ. Stable fly biology and control in Northwest Florida. *J Agric Entomol*. 1987;4 (1):1-11.
214. Hollinshead M, Rodger G, Van Eijl H, Law M, Hollinshead R, Vaux DJ, et al. Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. *The Journal of cell biology*. 2001;154(2):389-402.
215. Holowczak JA. Uncoating of poxviruses. I. Detection and characterization of subviral particles in the uncoating process. *Virology*. 1972;50(1):216-32.
216. Hood. E. From green plants to industrial enzymes. *Enzyme Microb Technol*. 2002;30:279-83.
217. Hooper JW, Custer DM, Thompson E. Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. *Virology*. 2003;306(1):181-95.
218. Hooper JW, Thompson E, Wilhelmsen C, Zimmerman M, Ichou MA, Steffen SE, et al. Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *Journal of virology*. 2004;78(9):4433-43.
219. Hosamani M, Mondal B, Tembhurne PA, Bandyopadhyay SK, Singh RK, Rasool TJ. Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. *Virus genes*. 2004a;29(1):73-80.
220. Howard AR, Senkevich TG, Moss B. Vaccinia virus A26 and A27 proteins form a stable complex tethered to mature virions by association with the A17 transmembrane protein. *Journal of virology*. 2008;82(24):12384-91.
221. Hsiao JC, Chung CS, Chang W. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of virology*. 1999;73(10):8750-61.
222. Hu FQ, Pickup DJ. Transcription of the terminal loop region of vaccinia virus DNA is initiated from the telomere sequences directing DNA resolution. *Virology*. 1991;181(2):716-20.
223. Hu FQ, Smith CA, Pickup DJ. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology*. 1994;204(1):343-56.
224. Hu K. Vectorology and factor delivery in induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem cells and development*. 2014;23(12):1301-15.
225. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2005;40(4):430-43.
226. Huang GM, Wei CK. Reports on misbirth of pregnant goats after live attenuated goatpox vaccinations. *Guangxi Journal of Husbandry and Veterinary Medicine*. 2004;20:214-5.

227. Hughes LJ, Goldstein J, Pohl J, Hooper JW, Lee Pitts R, Townsend MB, et al. A highly specific monoclonal antibody against monkeypox virus detects the heparin binding domain of A27. *Virology*. 2014;464-465:264-73.
228. Ichihashi Y, Matsumoto S, Dales S. Biogenesis of poxviruses: role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination. *Virology*. 1971;46(3):507-32.
229. Ichihashi Y, Oie M. Neutralizing epitope on penetration protein of vaccinia virus. *Virology*. 1996;220(2):491-4.
230. Ichihashi Y, Takahashi T, Oie M. Identification of a vaccinia virus penetration protein. *Virology*. 1994;202(2):834-43.
231. IJkel W, Lebbink RJ, Op den Brouw ML, Goldbach RW, Vlak JM, Zuidema D. Identification of a novel occlusion derived virus-specific protein in *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 2001;284(2):170-81.
232. Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied microbiology and biotechnology*. 2003;62(1):1-20.
233. Inceoglu AB, Kamita SG, Hammock BD. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in virus research*. 2006;68:323-60.
234. Ireland DC, Binopal YS. Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *Journal of virological methods*. 1998;74(1):1-7.
235. Irons PC, Tuppurainen ES, Venter EH. Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*. 2005;63(5):1290-7.
236. Isaacs SN, Wolffe EJ, Payne LG, Moss B. Characterization of a vaccinia virus-encoded 42-kilodalton class I membrane glycoprotein component of the extracellular virus envelope. *Journal of virology*. 1992;66(12):7217-24.
237. Jensen EC. The basics of western blotting. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)*. 2012;295(3):369-71.
238. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*. 2016;6(8).
239. Johnston JB, Barrett JW, Nazarian SH, Goodwin M, Ricciuto D, Wang G, et al. A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity*. 2005;23(6):587-98.
240. Johnston JB, McFadden G. Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. *Cellular microbiology*. 2004;6(8):695-705.
241. Jonic S. Cryo-electron Microscopy Analysis of Structurally Heterogeneous Macromolecular Complexes. *Computational and structural biotechnology journal*. 2016;14:385-90.
242. Joseph B, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S, Murthy M, Selvakumar K, Ganesan M, et al. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Cell Sci Ther*. 2015;6, 5.
243. Kaba SA, Salcedo AM, Wafula PO, Vlak JM, van Oers MM. Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. *Journal of virological methods*. 2004;122(1):113-8.
244. Kaever T, Matho MH, Meng X, Crickard L, Schlossman A, Xiang Y, et al. Linear Epitopes in Vaccinia Virus A27 Are Targets of Protective Antibodies Induced by Vaccination against Smallpox. *Journal of virology*. 2016;90(9):4334-45.
245. Kaever T, Meng X, Matho MH, Schlossman A, Li S, Sela-Culang I, et al. Potent neutralization of vaccinia virus by divergent murine antibodies targeting a common site of vulnerability in L1 protein. *Journal of virology*. 2014;88(19):11339-55.
246. Kahana-Sutin E, Klement E, Lensky I, Gottlieb Y. High relative abundance of the stable fly *Stomoxys calcitrans* is associated with lumpy skin disease outbreaks in Israeli dairy farms. *Medical and veterinary entomology*. 2017;31(2):150-60.
247. Kalinin S, Peulen T, Sindbert S, Rothwell PJ, Berger S, Restle T, et al. A toolkit and benchmark study for FRET-restrained high-precision structural modeling. *Nature methods*. 2012;9(12):1218-25.

248. Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server. *Nucleic acids research*. 2007;35(Web Server issue):W429-32.
249. Kara PD, Afonso CL, Wallace DB, Kutish GF, Abolnik C, Lu Z, et al. Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus. *Archives of virology*. 2003;148(7):1335-56.
250. Kardjadj M. Capripoxviruses: Transboundary Animal Diseases of Domestic Ruminants. *Ann Virol Res* 2016;2(3):1024.
251. Katsafanas GC, Moss B. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell host & microbe*. 2007;2(4):221-8.
252. Katz E, Ward BM, Weisberg AS, Moss B. Mutations in the vaccinia virus A33R and B5R envelope proteins that enhance release of extracellular virions and eliminate formation of actin-containing microvilli without preventing tyrosine phosphorylation of the A36R protein. *Journal of virology*. 2003;77(22):12266-75.
253. Kears M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2012;28(12):1647-9.
254. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*. 2015;10(6):845-58.
255. Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, et al. Safety and immunogenicity of LC16m8, an attenuated smallpox vaccine in vaccinia-naïve adults. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(9):1395-402.
256. Khan KH. Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2013;3(2):257-63.
257. Kidokoro M, Tashiro M, Shida H. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(11):4152-7.
258. Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic acids research*. 2009;37(Database issue):D387-92.
259. Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*. 1990;91(2):217-23.
260. Kitchen M, Müller H, Zobl A, Windisch A, Romani N, Huemer HP. Orf virus infection in a hunter presumably transmitted by game in Western Austria. *Acta Derm Venereol*. 2014;94:212-4.
261. Kitching P. Progress towards sheep and goat pox vaccines. *Vaccine*. 1983;1(1):4-9.
262. Kitching RP. The control of sheep and goat pox. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*. 1986;5:503-11.
263. Kitching RP. Passive protection of sheep against capripoxvirus. *Research in veterinary science*. 1986d;41(2):247-50.
264. Kitching RP. Sheep pox and goat pox. In: *Infectious Diseases of Livestock*, (CoetzerJAW, 2nd12 Edn). Capetown: Oxford University Press Southern Africa. 2004:1277-81.
265. Kitching RP, and V. M. Carn . Sheep pox and goat pox. *Office International des Epizooties Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees) OIE, Paris*. 2008:1058-68.
266. Kitching RP, Hammond JM, Black DN. Studies on the major common precipitating antigen of capripoxvirus. *The Journal of general virology*. 1986a;67 (Pt 1):139-48.
267. Kitching RP, Hammond JM, Taylor WP. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Research in veterinary science*. 1987;42(1):53-60.
268. Kitching RP, Mellor PS. Insect transmission of capripoxvirus. *Research in veterinary science*. 1986c;40(2):255-8.
269. Kitching RP, Smale C. Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Research in veterinary science*. 1986b;41(3):425-7.

270. Kitching RP, Taylor WP. Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Tropical animal health and production*. 1985;17(2):64-74.
271. Kitching RP, Taylor WP. Transmission of capripoxvirus. *Research in veterinary science*. 1985;39(2):196-9.
272. Klausner Z, Fattal E, Klement E. Using Synoptic Systems' Typical Wind Trajectories for the Analysis of Potential Atmospheric Long-Distance Dispersal of Lumpy Skin Disease Virus. *Transboundary and emerging diseases*. 2015.
273. Kochan G, Escors D, Gonzalez JM, Casasnovas JM, Esteban M. Membrane cell fusion activity of the vaccinia virus A17-A27 protein complex. *Cellular microbiology*. 2008;10(1):149-64.
274. Kost TA, Kemp CW. Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;896:187-97.
275. Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infection and immunity*. 2005;73(12):8266-74.
276. Krause CD, Pestka S. Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacology & therapeutics*. 2005;106(3):299-346.
277. Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS computational biology*. 2012;8(12):e1002829.
278. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*. 2001;305(3):567-80.
279. Krupovic M, Cvirkaitė-Krupovic V, Bamford DH. Protein A33 responsible for antibody-resistant spread of Vaccinia virus is homologous to C-type lectin-like proteins. *Virus research*. 2010;151(1):97-101.
280. Kumar A, Yogisharadhya R, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Shivachandra SB. Structural analysis and immunogenicity of recombinant major envelope protein (rA27L) of buffalopox virus, a zoonotic Indian vaccinia-like virus. *Vaccine*. 2015;33(41):5396-405.
281. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1312:17-30.
282. Lai CF, Gong SC, Esteban M. The purified 14-kilodalton envelope protein of vaccinia virus produced in *Escherichia coli* induces virus immunity in animals. *Journal of virology*. 1991;65(10):5631-5.
283. Lai CF, Gong SC, Esteban M. Structural and functional properties of the 14-kDa envelope protein of vaccinia virus synthesized in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(36):22174-80.
284. Lamien CE, Le Goff C, Silber R, Wallace DB, Gulyaz V, Tuppurainen E, et al. Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. *Veterinary microbiology*. 2011a;149(1-2):30-9.
285. Lamien CE, Lelenta M, Goger W, Silber R, Tuppurainen E, Matijevic M, et al. Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of virological methods*. 2011b;171(1):134-40.
286. Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*. 2006;2:2.
287. Larsson P, Skwark MJ, Wallner B, Elofsson A. Improved predictions by Pcons.net using multiple templates. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2011;27(3):426-7.
288. Law M, Hollinshead R, Smith GL. Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 1):209-22.

289. Law M, Smith GL. Antibody neutralization of the extracellular enveloped form of vaccinia virus. *Virology*. 2001;280(1):132-42.
290. Lawrence SJ, Lottenbach KR, Newman FK, Buller RM, Bellone CJ, Chen JJ, et al. Antibody responses to vaccinia membrane proteins after smallpox vaccination. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196(2):220-9.
291. Le Goff C, Fakhfakh A, Chadeyras E, Aba-Adulugba E, Libeau G, Hammami S, et al. Host range phylogenetic grouping of capripoxviruses: Genetic typing of CaPVs. In *Applications of Gene based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries* Edited by HPS Makkar and GJ Viljoen BerlinSpringer. 2005:727-33.
292. Le Goff C, Lamien CE, Fakhfakh E, Chadeyras A, Aba-Adulugba E, Libeau G, et al. Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 8):1967-77.
293. Lees JG, Lee D, Studer RA, Dawson NL, Sillitoe I, Das S, et al. Gene3D: Multi-domain annotations for protein sequence and comparative genome analysis. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D240-5.
294. Lefèvre PC. La variole ovine (clavelée) et la variole caprine. . *Etudes et synthèses de l'IEMVT Maisons Alfort (France)*. 1983:171.
295. Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. Poxviruses: past, present and future. *Virus research*. 2006;117(1):105-18.
296. Li SF, Wang HL, Hu ZH, Deng F. Genetic modification of baculovirus expression vectors. *Virologica Sinica*. 2012;27(2):71-82.
297. Liljestrom P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*. 1991;9(12):1356-61.
298. Lin CL, Chung CS, Heine HG, Chang W. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *Journal of virology*. 2000;74(7):3353-65.
299. Lin TH, Chia CM, Hsiao JC, Chang W, Ku CC, Hung SC, et al. Structural analysis of the extracellular domain of vaccinia virus envelope protein, A27L, by NMR and CD spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(23):20949-59.
300. Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges. *Protein expression and purification*. 2013;90(2):104-16.
301. Lobb B, Doxey AC. Novel function discovery through sequence and structural data mining. *Current opinion in structural biology*. 2016;38:53-61.
302. Lorenzo MM, Sanchez-Puig JM, Blasco R. Mutagenesis of the palmitoylation site in vaccinia virus envelope glycoprotein B5. *The Journal of general virology*. 2012;93(Pt 4):733-43.
303. Lubinga JC, Tuppurainen ES, Coetzer JA, Stoltz WH, Venter EH. Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. *Experimental & applied acarology*. 2014;62(1):67-75.
304. Lubinga JC, Tuppurainen ES, Stoltz WH, Ebersohn K, Coetzer JA, Venter EH. Detection of lumpy skin disease virus in saliva of ticks fed on lumpy skin disease virus-infected cattle. *Experimental & applied acarology*. 2013;61(1):129-38.
305. Lundstrom K. Alphaviruses in gene therapy. *Viruses*. 2015;7(5):2321-33.
306. Lustig S, Fogg C, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH, Moss B. Combinations of polyclonal or monoclonal antibodies to proteins of the outer membranes of the two infectious forms of vaccinia virus protect mice against a lethal respiratory challenge. *Journal of virology*. 2005;79(21):13454-62.
307. Lustig S, Fogg C, Whitbeck JC, Moss B. Synergistic neutralizing activities of antibodies to outer membrane proteins of the two infectious forms of vaccinia virus in the presence of complement. *Virology*. 2004;328(1):30-5.
308. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast (Chichester, England)*. 2005;22(4):249-70.

309. Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(23):7415-9.
310. Mahmood MA, Hesni Z, Afzal S. Preparation of live sheep pox tissue culture vaccine. *Pakistan Vet J*. 1988;8:56-63.
311. Mangana-Vougiouka O, Markoulatos P, Koptopoulos G, Nomikou K, Bakandritsos N, Papadopoulos O. Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *Journal of virological methods*. 1999;77(1):75-9.
312. Mangana O, Kottaridi C, Nomikou K. The epidemiology of sheep pox in Greece from 1987 to 2007. *Rev Sci Tech*. 2008;27:899-905.
313. Manz A, Pamme N, Iossifidis D. *Bioanalytical Chemistry* 2004.
314. Marek M, van Oers MM, Devaraj FF, Vlask JM, Merten OW. Engineering of baculovirus vectors for the manufacture of virion-free biopharmaceuticals. *Biotechnology and bioengineering*. 2011;108(5):1056-67.
315. Margittai M, Widengren J, Schweinberger E, Schroder GF, Felekyan S, Haustein E, et al. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(26):15516-21.
316. Markoulatos P, Mangana-Vougiouka O, Koptopoulos G, Nomikou K, Papadopoulos O. Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*. 2000;84(2):161-7.
317. Mateva V, Stoichev S. Adaptation and cultivation of sheep pox virus (strain Perego) in tissue cultures and evaluation of its immunogenic properties. *Vet Med Nauki*. 1975;12:18-23.
318. Maupetit J. Prédiction de la structure des protéines. Thèse de Doctorat. 2007.
319. Maurer-Stroh S, Eisenhaber F. Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends in microbiology*. 2004;12(4):178-85.
320. McCarroll L, King LA. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. *Current opinion in biotechnology*. 1997;8(5):590-4.
321. McFadden G. Poxvirus tropism. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(3):201-13.
322. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2000;16(4):404-5.
323. McKown RL, Teutonico, R.A. Transgenic animals for production of proteins. *Gen Eng News* 1999;19(9):1,14,29,46,55,60.
324. Mellor PS, Kitching RP, Wilkinson PJ. Mechanical transmission of capripoxvirus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Res Vet Sci*. 1987;43:109-12.
325. Mergulhao FJ, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology advances*. 2005;23(3):177-202.
326. Meseda CA, Campbell J, Kumar A, Garcia AD, Merchlinsky M, Weir JP. Effect of the deletion of genes encoding proteins of the extracellular virion form of vaccinia virus on vaccine immunogenicity and protective effectiveness in the mouse model. *PloS one*. 2013;8(6):e67984.
327. Messud-Petit F, Gelfi J, Delverdier M, Amardeilh MF, Py R, Sutter G, et al. Serp2, an inhibitor of the interleukin-1 β -converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus. *Journal of virology*. 1998;72(10):7830-9.
328. Michie AD, Orengo CA, Thornton JM. Analysis of domain structural class using an automated class assignment protocol. *Journal of molecular biology*. 1996;262(2):168-85.
329. Mirzaie K, Barani SM, Bokaie S. A review of sheep pox and goat pox: perspective of their control and eradication in Iran. *J Adv Vet Anim Res*. 2015;2:373-81.
330. Mitra S, Tinku A. *Data Mining Multimedia, soft computing and bioinformatique*. 2003.
331. Mondal B, Hosamani M, Dutta TK, Senthilkumar SV, Rathoreand R, Singh RK. An outbreak of sheep pox on a sheep breeding farm in Jammu, India. *Rev Sci Tech, OIE*. 2004;23:943-9.
332. Morrow. K. Improving protein production processes. *Gen Eng News* 2007;27(5):50-41.

333. Moss B. Poxviridae: the viruses and their replication. In *Virology* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001;p. 2849-83.
334. Moss B. Poxvirus DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(9).
335. Moss B. Poxvirus membrane biogenesis. *Virology*. 2015;479-480:619-26.
336. Moss B. Regulation of orthopoxvirus gene expression. *Current topics in microbiology and immunology*. 1990;163:41-70.
337. Moss B, Rosenblum EN. Letter: Protein cleavage and poxvirus morphogenesis: tryptic peptide analysis of core precursors accumulated by blocking assembly with rifampicin. *Journal of molecular biology*. 1973;81(2):267-9.
338. Mossman K, Upton C, Buller RM, McFadden G. Species specificity of ectromelia virus and vaccinia virus interferon-gamma binding proteins. *Virology*. 1995;208(2):762-9.
339. Murata T, Shinozuka Y, Obata Y, Yokoyama KK. Phosphorylation of two eukaryotic transcription factors, Jun dimerization protein 2 and activation transcription factor 2, in *Escherichia coli* by Jun N-terminal kinase 1. *Analytical biochemistry*. 2008;376(1):115-21.
340. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. *Poxviridae*. *Veterinary Virology Academic Press*, San Diego. 1999:277-91.
341. Murray L, Edwards L, Tuppurainen ES, Bachanek-Bankowska K, Oura CA, Mioulet V, et al. Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC veterinary research*. 2013;9:90.
342. Murray M, Martin WB, Koylu A. Experimental sheep pox. A histological and ultrastructural study. *Research in veterinary science*. 1973;15(2):201-8.
343. Ngichabe CK, Binpal YS, Njiru JW, Carn VM. Evaluation of an immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of capripoxviruses. *The Veterinary record*. 1999;145(8):231-2.
344. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering*. 1997;10(1):1-6.
345. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. 2000;28(12):E63.
346. Nuttall J, Vitale A, Frigerio L. C-terminal extension of phaseolin with a short methionine-rich sequence can inhibit trimerisation and result in high instability. *Plant molecular biology*. 2003;51(6):885-94.
347. O'Connell CJ, Karzon DT, Barron AL, Plaut ME, Ali VM. Progressive vaccinia with normal antibodies. A case possibly due to deficient cellular immunity. *Annals of internal medicine*. 1964;60:282-9.
348. Odissev C, Sghaier CH, S. H, Bejaoui L. La Clavelée : Synthèse Bibliographique et Situation Actuelle en Tunisie. *Bull Epid Inf Vet*. 1995;8:1-4.
349. OIE.
http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI/index/newlang/fr.OIE-WAHID.SPV/GPV Greece. 2016.
350. OIE. Lumpy skin disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. . Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health Paris. 2010;pp.1–13.
351. OIE. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. OIE Part 2,. 2004: 1–17.
352. Okamoto T, Campbell S, Mehta N, Thibault J, Colman PM, Barry M, et al. Sheeppox virus SPPV14 encodes a Bcl-2-like cell death inhibitor that counters a distinct set of mammalian proapoptotic proteins. *Journal of virology*. 2012;86(21):11501-11.
353. Oomens AG, Blissard GW. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 1999;254(2):297-314.
354. Orengo CA, Pearl FM, Bray JE, Todd AE, Martin AC, Lo Conte L, et al. The CATH Database provides insights into protein structure/function relationships. *Nucleic acids research*. 1999b;27(1):275-9.
355. Orlova ES, Shcherbakova AV, Diev VI, Zakharov VM. Differentiation of capripoxvirus species and strains by polymerase chain reaction. *Molekuliarnaia biologii*. 2006;40(1):158-64.

356. Osz-Papai J, Radu L, Abdulrahman W, Kolb-Cheynel I, Troffer-Charlier N, Birck C, et al. Insect cells-baculovirus system for the production of difficult to express proteins. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1258:181-205.
357. Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almazrazi HG, et al. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W163-9.
358. Paborsky LR, Fendly BM, Fisher KL, Lawn RM, Marks BJ, McCray G, et al. Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen. *Protein engineering*. 1990;3(6):547-53.
359. Pacha-Bey A. Décret du 1er Mai 1931. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*. 1931;3:243-4.
360. Pang B, Zhu Y, Lu L, Gu F, Chen H. The Applications and Features of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Traditional Chinese Medicine. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2016;2016:3837270.
361. Paran N, Lustig S, Zvi A, Erez N, Israely T, Melamed S, et al. Active vaccination with vaccinia virus A33 protects mice against lethal vaccinia and ectromelia viruses but not against cowpoxvirus; elucidation of the specific adaptive immune response. *Virology journal*. 2013;10:229.
362. Parham JH, Kost T, Hutchins JT. Effects of pCneo and pCEP4 expression vectors on transient and stable protein production in human and simian cell lines. *Cytotechnology*. 2001;35(3):181-7.
363. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 1986;25(19):5425-32.
364. Parsons BL, Pickup DJ. Transcription of orthopoxvirus telomeres at late times during infection. *Virology*. 1990;175(1):69-80.
365. Pastoret PP. Emerging diseases, zoonoses and vaccines to control them. *Vaccine*. 2009;27:6435-8.
366. Payne LG. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. *The Journal of general virology*. 1980;50(1):89-100.
367. Penkova VM, Jassim, F.A, Thompson, J.R. and Al-Doori, T.M. . The propagation of an attenuated sheep pox virus and its use as a vaccine *Bull. Off Int Epizoot*. 1974;81(329).
368. Perdiguero B, Blasco R. Interaction between vaccinia virus extracellular virus envelope A33 and B5 glycoproteins. *Journal of virology*. 2006;80(17):8763-77.
369. Perino J, Thielens NM, Crouch E, Spehner D, Crance JM, Favier AL. Protective effect of surfactant protein d in pulmonary vaccinia virus infection: implication of A27 viral protein. *Viruses*. 2013;5(3):928-53.
370. Perrin A, Albina E, Breard E, Sailleau C, Prome S, Grillet C, et al. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*. 2007;25(37-38):6774-83.
371. Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC structural biology*. 2009;9:51.
372. Pickup DJ, Bastia D, Stone HO, Joklik WK. Sequence of terminal regions of cowpox virus DNA: arrangement of repeated and unique sequence elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(23):7112-6.
373. Pieper U, Webb BM, Barkan DT, Schneidman-Duhovny D, Schlessinger A, Braberg H, et al. ModBase, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic acids research*. 2011;39(Database issue):D465-74.
374. Plowright W, Ferris RD. The growth and cytopathogenicity of sheep-pox virus in tissue cultures. *British journal of experimental pathology*. 1958;39(4):424-35.
375. Possee RD, King LA. Baculovirus Transfer Vectors. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2016;1350:51-71.

376. Precausta P, Kato, F. and Vellut, G. . A new freeze-dried living virus vaccine against sheep-pox. *Comp Immun Microbio/Infect Dis*. 1979;1:305.
377. Promed. <http://promedmail.org/post/20120728.1218484.Israel> 98935511. 2012.
378. Promed. Lumpy skin disease. Europe (09): Romania, preparedness, prevention. <http://promedmail.org/post/201606234305647>. 2016.
379. Prozesky L, Barnard BJ. A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *The Onderstepoort journal of veterinary research*. 1982;49(3):167-75.
380. Pulford DJ, Gates A, Bridge SH, Robinson JH, Ulaeto D. Differential efficacy of vaccinia virus envelope proteins administered by DNA immunisation in protection of BALB/c mice from a lethal intranasal poxvirus challenge. *Vaccine*. 2004;22(25-26):3358-66.
381. Putz MM, Midgley CM, Law M, Smith GL. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nature medicine*. 2006;12(11):1310-5.
382. Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, Pei J, et al. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins*. 2009;77 Suppl 9:89-99.
383. Ramisse J, Asso J, Hassani A, Anane O, Jemli J. Culture du virus claveloux sur cellules : Application à la vaccination et au contrôle de l'immunité. . *Rev Elev Méd Vét PaysTrop*. 1978;31:11-9.
384. Ramyar HaH. Development of an attenuated live virus vaccine against sheep pox. *M Arch Inst RazL* 1968:20-77.
385. Rao BT, Das HJ, Sharma RD, Singh S. Some observations on an outbreak of sheep pox in sheep in East Godavari District, Andhra Pradesh. *Livest Advisor* 1994;XIX((X)):3-6.
386. Rao TV, Bandyopadhyay SK. A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnosis. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 2000;1(2):127-36.
387. Rao TV, Negi BS, Dhar P, Asgola D. Evaluation of latex agglutination test for rapid detection of goat poxvirus antigen and antibodies. *Acta virologica*. 1996;40(2):95-7.
388. Ravanello MP, Franke CA, Hruby DE. An NH2-terminal peptide from the vaccinia virus L1R protein directs the myristylation and virion envelope localization of a heterologous fusion protein. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(10):7585-93.
389. Ravanello MP, Hruby DE. Characterization of the vaccinia virus L1R myristylprotein as a component of the intracellular virion envelope. *The Journal of general virology*. 1994;75 (Pt 6):1479-83.
390. Ravanello MP, Hruby DE. Conditional lethal expression of the vaccinia virus L1R myristylated protein reveals a role in virion assembly. *Journal of virology*. 1994;68(10):6401-10.
391. Reeves GA, Dallman TJ, Redfern OC, Akpor A, Orengo CA. Structural diversity of domain superfamilies in the CATH database. *Journal of molecular biology*. 2006;360(3):725-41.
392. REMESA. <http://www.fao.org/remesanetwork/remesa>. 2012.
393. Rigano MM, Manna C, Giulini A, Pedrazzini E, Capobianchi M, Castilletti C, et al. Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cellsdagger. *Plant biotechnology journal*. 2009;7(6):577-91.
394. Robert D, Vian B. *Elément de biologie cellulaire*. 2008.
395. Roberts KL, Breiman A, Carter GC, Ewles HA, Hollinshead M, Law M, et al. Acidic residues in the membrane-proximal stalk region of vaccinia virus protein B5 are required for glycosaminoglycan-mediated disruption of the extracellular enveloped virus outer membrane. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 7):1582-91.
396. Roche DB, Buenavista MT, Tetchner SJ, McGuffin LJ. The IntFOLD server: an integrated web resource for protein fold recognition, 3D model quality assessment, intrinsic disorder prediction, domain prediction and ligand binding site prediction. *Nucleic acids research*. 2011;39(Web Server issue):W171-6.
397. Rodriguez JF, Esteban M. Mapping and nucleotide sequence of the vaccinia virus gene that encodes a 14-kilodalton fusion protein. *Journal of virology*. 1987;61(11):3550-4.

398. Rodriguez JF, Janeczko R, Esteban M. Isolation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies to vaccinia virus. *Journal of virology*. 1985;56(2):482-8.
399. Rodriguez JF, Smith GL. IPTG-dependent vaccinia virus: identification of a virus protein enabling virion envelopment by Golgi membrane and egress. *Nucleic acids research*. 1990;18(18):5347-51.
400. Roldao A, Oliveira R, Carrondo MJ, Alves PM. Error assessment in recombinant baculovirus titration: evaluation of different methods. *Journal of virological methods*. 2009;159(1):69-80.
401. Romero CH, Barrett T, Chamberlain RW, Kitching RP, Fleming M, Black DN. Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology*. 1994;204(1):425-9.
402. Romero CH, Barrett T, Evans SA, Kitching RP, Gershon PD, Bostock C, et al. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*. 1993;11(7):737-42.
403. Romero CH, Barrett T, Kitching RP, Carn VM, Black DN. Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease with a recombinant capripoxvirus expressing the fusion protein gene of rinderpest virus. *The Veterinary record*. 1994;135(7):152-4.
404. Rondia P. Aperçu de l'élevage ovin en Afrique du Nord. *Filière Ovine et Caprine*. 2006;18:11-4.
405. Roper RL, Payne LG, Moss B. Extracellular vaccinia virus envelope glycoprotein encoded by the A33R gene. *Journal of virology*. 1996;70(6):3753-62.
406. Roper RL, Wolffe EJ, Weisberg A, Moss B. The envelope protein encoded by the A33R gene is required for formation of actin-containing microvilli and efficient cell-to-cell spread of vaccinia virus. *Journal of virology*. 1998;72(5):4192-204.
407. Rosales R, Sutter G, Moss B. A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(9):3794-8.
408. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annual review of microbiology*. 1999;53:577-628.
409. Roychoudhury PK, Khaparde SS, Mattiasson B, Kumar A. Synthesis, regulation and production of urokinase using mammalian cell culture: a comprehensive review. *Biotechnology advances*. 2006;24(5):514-28.
410. Ruczinski I. Protein Structure Prediction : Secondary Structure. Department of Biostatistics, Johns Hopkins University. 2008.
411. Rudraraju R, Ramsay AJ. Single-shot immunization with recombinant adenovirus encoding vaccinia virus glycoprotein A27L is protective against a virulent respiratory poxvirus infection. *Vaccine*. 2010;28(31):4997-5004.
412. Rusche B. The 3Rs and animal welfare - conflict or the way forward? *Altex*. 2003;20(Suppl 1):63-76.
413. Russel D, Lasker K, Webb B, Velazquez-Muriel J, Tjioe E, Schneidman-Duhovny D, et al. Putting the pieces together: integrative modeling platform software for structure determination of macromolecular assemblies. *PLoS biology*. 2012;10(1):e1001244.
414. Rziha H, Henkel M, Cottone R, Bauer B, Auge U, Gotz F, et al. Generation of recombinant parapoxviruses: non-essential genes suitable for insertion and expression of foreign genes. *Journal of biotechnology*. 2000;83(1-2):137-45.
415. Saijo M, Ami Y, Suzuki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, et al. LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *Journal of virology*. 2006;80(11):5179-88.
416. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)*. 1988;239(4839):487-91.
417. Salem A, Bouhsira E, Liénard E, Bousquet Melou A, Jacquiet P, Franc M. Susceptibility of Two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, cyhalothrin, Permethrin and Phoxim. *Intern J Appl Res Vet Med*. 2012;10 (3):249-57.

418. Samanta U, Bahadur RP, Chakrabarti P. Quantifying the accessible surface area of protein residues in their local environment. *Protein engineering*. 2002;15(8):659-67.
419. Sanderson CM, Hollinshead M, Smith GL. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *The Journal of general virology*. 2000;81(Pt 1):47-58.
420. Santhamani R, Venkatesan G, Minhas SK, Shivachandra SB, Muthuchelvan D, Pandey AB, et al. Detection and characterization of atypical capripoxviruses among small ruminants in India. *Virus genes*. 2015;51:33-8.
421. Schlesinger S. Alphavirus vectors: development and potential therapeutic applications. *Expert opinion on biological therapy*. 2001;1(2):177-91.
422. Schmelz M, Sodeik B, Ericsson M, Wolffe EJ, Shida H, Hiller G, et al. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *Journal of virology*. 1994;68(1):130-47.
423. Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology*. 2004;65(4):363-72.
424. Schwede T. Protein modeling: what happened to the "protein structure gap"? *Structure (London, England : 1993)*. 2013;21(9):1531-40.
425. Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C, et al. Poxviruses and immune evasion. *Annual review of immunology*. 2003;21:377-423.
426. Senkevich TG, Ward BM, Moss B. Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *Journal of virology*. 2004;78(5):2357-66.
427. Sharma B, Negi BS, Pandey AB, Bandyopadhyay SK, Shankar H, Yadav MP. Detection of goat pox antigen and antibody by the counter immunoelectrophoresis test. *Tropical animal health and production*. 1988;20(2):109-13.
428. Shchelkunov SN, Totmenin AV, Babkin IV, Safronov PF, Ryazankina OI, Petrov NA, et al. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS letters*. 2001;509(1):66-70.
429. Shen Y, Vernon R, Baker D, Bax A. De novo protein structure generation from incomplete chemical shift assignments. *Journal of biomolecular NMR*. 2009;43(2):63-78.
430. Shih PC, Yang MS, Lin SC, Ho Y, Hsiao JC, Wang DR, et al. A turn-like structure "KKPE" segment mediates the specific binding of viral protein A27 to heparin and heparan sulfate on cell surfaces. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(52):36535-46.
431. Shinoda K, Wyatt LS, Irvine KR, Moss B. Engineering the vaccinia virus L1 protein for increased neutralizing antibody response after DNA immunization. *Virology journal*. 2009;6:28.
432. Singh IP PR, Srivastava RN. . Sheep pox: a review. *Vet Bull*. 1979;49((3)):145-54.
433. Singh RK, Balamurugan V, Hosamani M, De UK, Chandra BM, Krishnappa MPG. B5r gene based sequence analysis of Indian buffalopox virus isolates in relation to other orthopoxviruses. *Acta virologica*. 2007;51(1):47-50.
434. Skovgard H, Nachman G. Biological control of house flies *Musca domestica* and stable flies *Stomoxys calcitrans*(Diptera: Muscidae) by means of inundative releases of *Spalangia cameroni*(Hymenoptera: Pteromalidae). *Bulletin of entomological research*. 2004;94(6):555-67.
435. Small JC, Ertl HC. Viruses - from pathogens to vaccine carriers. *Current opinion in virology*. 2011;1(4):241-5.
436. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and cellular biology*. 1983;3(12):2156-65.
437. Smith GL, Law M. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus research*. 2004;106(2):189-97.
438. Smith GL, Vanderplasschen A, Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 12):2915-31.
439. Smyth MS, Martin JH. x ray crystallography. *Molecular pathology : MP*. 2000;53(1):8-14.
440. Sodeik B, Krijnse-Locker J. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends in microbiology*. 2002;10(1):15-24.

441. Soi RK, Rurangirwa FR, McGuire TC, Rwambo PM, DeMartini JC, Crawford TB. Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(12):1842-9.
442. Sorensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*. 2005;4(1):1.
443. Sroller V, Ludvikova V, Maresova L, Hainz P, Nemeckova S. Effect of IFN-gamma receptor gene deletion on vaccinia virus virulence. *Archives of virology*. 2001;146(2):239-49.
444. Stack J, Haga IR, Schroder M, Bartlett NW, Maloney G, Reading PC, et al. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(6):1007-18.
445. Stern RJ, Thompson JP, Moyer RW. Attenuation of B5R mutants of rabbitpox virus in vivo is related to impaired growth and not an enhanced host inflammatory response. *Virology*. 1997;233(1):118-29.
446. Stoger E, Sack M, Fischer R, Christou P. Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current opinion in biotechnology*. 2002;13(2):161-6.
447. Stubbs S, Oura CA, Henstock M, Bowden TR, King DP, Tuppurainen ES. Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. *Journal of virological methods*. 2012;179(2):419-22.
448. Su HP, Garman SC, Allison TJ, Fogg C, Moss B, Garboczi DN. The 1.51-Angstrom structure of the poxvirus L1 protein, a target of potent neutralizing antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(12):4240-5.
449. Su HP, Golden JW, Gittis AG, Hooper JW, Garboczi DN. Structural basis for the binding of the neutralizing antibody, 7D11, to the poxvirus L1 protein. *Virology*. 2007;368(2):331-41.
450. Su HP, Singh K, Gittis AG, Garboczi DN. The structure of the poxvirus A33 protein reveals a dimer of unique C-type lectin-like domains. *Journal of virology*. 2010;84(5):2502-10.
451. Takahashi T, Oie M, Ichihashi Y. N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins. *Virology*. 1994;202(2):844-52.
452. Tang J, Murtadha M, Schnell M, Eisenlohr LC, Hooper J, Flomenberg P. Human T-cell responses to vaccinia virus envelope proteins. *Journal of virology*. 2006;80(20):10010-20.
453. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2001;356(1411):983-9.
454. Teichmann SA, Murzin AG, Chothia C. Determination of protein function, evolution and interactions by structural genomics. *Current opinion in structural biology*. 2001;11(3):354-63.
455. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*. 2006;72(2):211-22.
456. Tessier DC, Thomas DY, Khouri HE, Laliberte F, Vernet T. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*. 1991;98(2):177-83.
457. Thomas AD, Mare CVE. Knopvelsiekte. *J S Afr Vet Assoc*. 1945;16:36-43.
458. Thornton JM, Orengo CA, Todd AE, Pearl FM. Protein folds, functions and evolution. *Journal of molecular biology*. 1999;293(2):333-42.
459. Tian H, Chen Y, Wu J, Shang Y, Liu X. Serodiagnosis of sheeppox and goatpox using an indirect ELISA based on synthetic peptide targeting for the major antigen P32. *Virology journal*. 2010;7:245.
460. Todd AE, Orengo CA, Thornton JM. Evolution of protein function, from a structural perspective. *Current opinion in chemical biology*. 1999;3(5):548-56.
461. Torgeir R. In Silico protein structure and function prediction. <http://www.trhvidsten.com/Teachinghtml>. 2008.
462. Townsley AC, Weisberg AS, Wagenaar TR, Moss B. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *Journal of virology*. 2006;80(18):8899-908.

463. Trewthella J, Hendrickson WA, Kleywegt GJ, Sali A, Sato M, Schwede T, et al. Report of the wwPDB Small-Angle Scattering Task Force: data requirements for biomolecular modeling and the PDB. *Structure* (London, England : 1993). 2013;21(6):875-81.
464. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of virology*. 2001;75(15):7122-30.
465. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sur JH, Sandybaev NT, et al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *Journal of virology*. 2002;76(12):6054-61.
466. Tuppurainen E, Galon N. Lumpy Skin Disease: Current situation in Europe and neighbouring regions and necessary control measures to halt the spread in South-East Europe. Europe – OIE Regional Commission. 2016.
467. Tuppurainen ES, Lubinga JC, Stoltz WH, Troskie M, Carpenter ST, Coetzer JA, et al. Evidence of vertical transmission of lumpy skin disease virus in *Rhipicephalus decoloratus* ticks. *Ticks and tick-borne diseases*. 2013b;4(4):329-33.
468. Tuppurainen ES, Lubinga JC, Stoltz WH, Troskie M, Carpenter ST, Coetzer JA, et al. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks. *Epidemiology and infection*. 2013a;141(2):425-30.
469. Tuppurainen ES, Oura CA. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and emerging diseases*. 2012;59(1):40-8.
470. Tuppurainen ES, Pearson CR, Bachanek-Bankowska K, Knowles NJ, Amareen S, Frost L, et al. Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. *Antiviral research*. 2014;109:1-6.
471. Tuppurainen ES, Venter EH, Coetzer JA. The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *The Onderstepoort journal of veterinary research*. 2005;72(2):153-64.
472. Tuppurainen ES, Venter EH, Shisler JL, Gari G, Mekonnen GA, Juleff N, et al. Review: Capripoxvirus Diseases: Current Status and Opportunities for Control. *Transboundary and emerging diseases*. 2015.
473. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*. 2012;40(15):e115.
474. Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL. Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *Journal of virology*. 2003;77(13):7590-600.
475. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human gene therapy*. 2002;13(16):1935-43.
476. van Eijl H, Hollinshead M, Rodger G, Zhang WH, Smith GL. The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 1):195-207.
477. Van Regenmortel MH. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2001;29(3-4):209-13.
478. Vanderplasschen A, Hollinshead M, Smith GL. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *The Journal of general virology*. 1998;79 (Pt 4):877-87.
479. Vazquez MI, Esteban M. Identification of functional domains in the 14-kilodalton envelope protein (A27L) of vaccinia virus. *Journal of virology*. 1999;73(11):9098-109.
480. Vazquez MI, Rivas G, Cregut D, Serrano L, Esteban M. The vaccinia virus 14-kilodalton (A27L) fusion protein forms a triple coiled-coil structure and interacts with the 21-kilodalton (A17L) virus membrane protein through a C-terminal alpha-helix. *Journal of virology*. 1998;72(12):10126-37.
481. Venkatesan G, Balamurugan V, Bhanuprakash V. Multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of sheeppox, goatpox and orf viruses from clinical samples of sheep and goats. *Journal of virological methods*. 2014a;195:1-8.
482. Venkatesan G, Balamurugan V, Bhanuprakash V. TaqMan based real-time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of capripox and orf virus genomes in clinical samples. *Journal of virological methods*. 2014b;201:44-50.

483. Venkatesan G, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Singh RK, Pandey AB. Loop mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of sheep pox and goat pox viruses in clinical samples. *Mol Cell Probes*. 2016;16:30014-7.
484. Verardi PH, Jones LA, Aziz FH, Ahmad S, Yilma TD. Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated In vivo without a concomitant reduction in immunogenicity. *Journal of virology*. 2001;75(1):11-8.
485. Vetrini F, Ng P. Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current advances and future perspectives. *Viruses*. 2010;2(9):1886-917.
486. Vinayagamurthy B, Kallesh DJ, Madhusudhan H, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Kumar RS. Comparative efficacy of conventional and TaqMan polymerase chain reaction assays in the detection of capripoxviruses from clinical samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2009;21:225-31.
487. Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5599):1790-3.
488. Wade-Evans AM, Romero CH, Mellor P, Takamatsu H, Anderson J, Thevasagayam J, et al. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology*. 1996;220(1):227-31.
489. Wahid. World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) – Version 1. http://www.woeint/wahis_2/public/wahidphp/Diseaseinformation/statusdetail. 2013.
490. Wall EM, Cao J, Chen N, Buller RM, Upton C. A novel poxvirus gene and its human homolog are similar to an *E. coli* lysophospholipase. *Virus research*. 1997;52(2):157-67.
491. Wallace DB, Ellis CE, Espach A, Smith SJ, Greyling RR, Viljoen GJ. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine*. 2006;24(49-50):7181-9.
492. Wallace DB, Viljoen GJ. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*. 2005;23(23):3061-7.
493. Wallengren K, Risco C, Krijnse-Locker J, Esteban M, Rodriguez D. The A17L gene product of vaccinia virus is exposed on the surface of IMV. *Virology*. 2001;290(1):143-52.
494. Walmsley AM, Arntzen CJ. Plant cell factories and mucosal vaccines. *Current opinion in biotechnology*. 2003;14(2):145-50.
495. Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*. 2000;60(2):249-71.
496. Walzthoeni T, Leitner A, Stengel F, Aebersold R. Mass spectrometry supported determination of protein complex structure. *Current opinion in structural biology*. 2013;23(2):252-60.
497. Wang DR, Hsiao JC, Wong CH, Li GC, Lin SC, Yu SS, et al. Vaccinia viral protein A27 is anchored to the viral membrane via a cooperative interaction with viral membrane protein A17. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(10):6639-55.
498. Wang HW, Wang JW. How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2017;26(1):32-9.
499. Ward BM. Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. *Journal of virology*. 2005;79(8):4755-63.
500. Ward BM, Weisberg AS, Moss B. Mapping and functional analysis of interaction sites within the cytoplasmic domains of the vaccinia virus A33R and A36R envelope proteins. *Journal of virology*. 2003;77(7):4113-26.
501. Weidhaas DE, Haile DG. A theoretical model to determine the degree of trapping required for insect population control. *Entomol Soc Am Bull*. 1987;24:18-20.
502. Weiss KE. Lumpy skin disease virus. *Virol Monogr*. 1968;3:111-31.

503. Wilkinson BE, Cox M. Baculovirus expression system: the production of proteins for diagnostic, human therapeutic or vaccine use. *Gen Eng News*. 1998;18:35
504. Willer DO, McFadden G, Evans DH. The complete genome sequence of Shope (rabbit) fibroma virus. *Virology*. 1999;264(2):319-43.
505. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(6):3071-6.
506. Wolffe EJ, Isaacs SN, Moss B. Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination. *Journal of virology*. 1993;67(8):4732-41.
507. Wolffe EJ, Vijaya S, Moss B. A myristylated membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R open reading frame is the target of potent neutralizing monoclonal antibodies. *Virology*. 1995;211(1):53-63.
508. Wolffe EJ, Weisberg AS, Moss B. The vaccinia virus A33R protein provides a chaperone function for viral membrane localization and tyrosine phosphorylation of the A36R protein. *Journal of virology*. 2001;75(1):303-10.
509. Woods JA. Lumpy skin disease-a review. *Tropical animal health and production*. 1988;20(1):11-7.
510. Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology*. 1999;293(2):321-31.
511. Wu H, Guo J, Chen S, Liu X, Zhou Y, Zhang X, et al. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013;72:267-91.
512. Wurm F, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current opinion in biotechnology*. 1999;10(2):156-9.
513. Xiao Y, Aldaz-Carroll L, Ortiz AM, Whitbeck JC, Alexander E, Lou H, et al. A protein-based smallpox vaccine protects mice from vaccinia and ectromelia virus challenges when given as a prime and single boost. *Vaccine*. 2007;25(7):1214-24.
514. Xiao Y, Zeng Y, Alexander E, Mehta S, Joshi SB, Buchman GW, et al. Adsorption of recombinant poxvirus L1-protein to aluminum hydroxide/CpG vaccine adjuvants enhances immune responses and protection of mice from vaccinia virus challenge. *Vaccine*. 2013;31(2):319-26.
515. Yamaji H. Suitability and perspectives on using recombinant insect cells for the production of virus-like particles. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(5):1963-70.
516. Yan XM, Chu YF, Wu GH, Zhao ZX, Li J, Zhu HX, et al. An outbreak of sheep pox associated with goat poxvirus in Gansu province of China. *Veterinary microbiology*. 2012;156(3-4):425-8.
517. Yang ZR, Thomson R, McNeil P, Esnouf RM. RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21(16):3369-76.
518. Yeruham I, Nir O, Braverman Y, Davidson M, Grinstein H, Haymovitch M, et al. Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds. *The Veterinary record*. 1995;137(4):91-3.
519. Yeruham I, Yadin H, Van Ham M, Bumbarov V, Soham A, Perl S. Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *The Veterinary record*. 2007;160(7):236-7.
520. Yokote H, Shinmura Y, Kanehara T, Maruno S, Kuranaga M, Matsui H, et al. Vaccinia virus strain LC16m8 defective in the B5R gene keeps strong protection comparable to its parental strain Lister in immunodeficient mice. *Vaccine*. 2015;33(45):6112-9.
521. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47-59.
522. Yu H, Chen J, Liu S, Zhang A, Xu X, Wang X, et al. Large-Scale Production of Functional Human Lysozyme in Transgenic Cloned Goats. *Journal of biotechnology*. 2013.

523. Zangana IK, M.A. A. Epidemiological, clinical and histopathological studies of lamb and kid pox in Duhok. Iraq. *Bulgarian J Vet Med.* 2013;16:133-8.
524. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* 2005;272:6179-217.
525. Zeynalova S, Asadov K, Guliyev F, Vatani M, Aliyev V. Epizootology and Molecular Diagnosis of Lumpy Skin Disease among Livestock in Azerbaijan. *Frontiers in microbiology.* 2016;7:1022.
526. Zhang Y. Interplay of I-TASSER and QUARK for template-based and ab initio protein structure prediction in CASP10. *Proteins.* 2014;82 Suppl 2:175-87.
527. Zhao Z, Fan B, Wu G, Yan X, Li Y, Zhou X, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat pox virus and sheep pox virus. *BMC microbiology.* 2014;14:10.
528. Zheng M, Jin N, Liu Q, Huo X, Li Y, Hu B, et al. Immunogenicity and protective efficacy of Semliki forest virus replicon-based DNA vaccines encoding goatpox virus structural proteins. *Virology.* 2009;391(1):33-43.
529. Zheng M, Liu Q, Jin N, Guo J, Huang X, Li H, et al. A duplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Capripoxvirus and Orf virus. *Molecular and cellular probes.* 2007;21(4):276-81.
530. Zro K, Azelmat S, Bendouro Y, Kuhn JH, El Fahime E, Ennaji MM. PCR-based assay to detect sheeppox virus in ocular, nasal, and rectal swabs from infected Moroccan sheep. *Journal of virological methods.* 2014;204:38-43.

Annexes

Annexe 1 : Composition des tampons, des solutions et des milieux de culture

1. Electrophorèse, transfert et révélation des protéines

➔ Tampon d'électrophorèse des protéines

- Tris HCl (pH 8,3) : 25 mM
- Glycine : 192 mM
- SDS : 0.1 %

➔ Tampon de transfert des protéines

- Tris HCl (pH 8,3) : 25 mM
- Méthanol : 20%
- Glycine : 192 mM

➔ Tampon de Laemmli

- SDS : 2%
- Glycérol : 10%
- Tris-HCl (pH 6,8) : 62,5mM
- Bleu de bromophénol 0.01%
- B-Mercaptoéthanol 5%

➔ Gels de séparation et de concentration

	Gel de séparation (15%)	Gel de concentration (6%)
Tris HCl	2 ml (1,5 M ; pH 8,8)	625 ul (1M, pH 6,8)
Eau	1.62 ml	1.5 ml
Mélange Bis/Acrylamide 30%	3.75 ml	325 ul
SDS 10% (10g/100ml)	75 ul	50 ul
APS 10% (100mg/ml)	75 ul	35 ul
Temed	7.5 ul	3.5 ul

Composition Tris HCl 1,5 M pH 8,8 : 100ml

- 18,7 g Tris Base
- Compléter avec de l'eau à 60 ml
- Ajuster le pH à 8,8 avec une solution HCl 5N
- Ajuster le volume à 100ml (conserver à +4°C)

Composition TrisHCl 1M pH 6,8 : 100ml

- Trizma Base : 12,14 g
- Ajuster le pH à 6,8
- Conserver à +4°C

Composition solution acrylamide/Bis acrylamide à 30% : 100 ml

- Acrylamide : 29,2 g
- NN'-bis-méthylène-acrylamide : 0,8 g
- Ajuster le volume à 100ml avec de l'eau
- Conserver à +4°C à l'abri de la lumière

2. Solutions pour le PepScan**➔ Tampon CBS**

NaCl, 137 mM

KCl 3mM

Acide citrique monohydrate 10mM

➔ Tampon TBS

NaCl, 137 mM

KCl, 2.68mM

Tris base pH 7 50mM

➔ Regen A

Urée 8M

Sodium dodecyl sulfate SDS (solution à 20 %) 1%

Regen B

Ethanol 50%

Acide acétique 10%

3. Milieu de culture LB (Luria-burti)

➔ Préparation LB Agar

- Dans une bouteille de 1 litre : 500 ml d'eau stérile, ajouter 10 g de LB en poudre (LB broth, L3522, Sigma-Aldrich) et 8 g d'agar (16 g/l) (Sigma-Aldrich).
- Mettre le mélange sous une plaque chauffante avec un aimant jusqu'à dissolution complète de la poudre.
- Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes
- Mettre la bouteille dans un bain marie préchauffé à 55°C
- Si préparation de milieu LB avec ampicilline : ajouter l'ampicilline à ce stade (le milieu ne doit pas être très chaud pour ne pas dégrader l'antibiotique : milieu à environ 50°C) puis bien mélanger
- Faire couler le milieu dans les boîtes de pétri (environ 20ml/boîte)

➔ Préparation milieu LB liquide

- Dans un volume de 1 litre d'eau, ajouter 20 g de LB en poudre,
- Bien mélanger avec un aimant sous une plaque chauffante
- Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes

Annexe 2 : Précipitation de l'ADN par l'éthanol**Réactifs :**

- 3M acétate de sodium pH 5,2 ou 5M d'acétate d'ammonium
- ADN
- Ethanol absolu (100%)

Protocole :

- Estimer le volume de l'échantillon d'ADN à traiter
- Ajouter 1/10 du volume d'acétate de sodium, pH 5,2 (concentration finale 0,3 M)
- Mélanger
- Ajouter 2 à 2.5 volumes d'éthanol absolu refroidi
- Mélanger
- Placer le mélange 20 minutes à -80°C
- Centrifugation à une vitesse maximale pendant 15 minutes
- Enlever délicatement le surnageant
- Ajouter 1 ml d'éthanol à 70%, vortexer brièvement
- Centrifugation à la même vitesse
- Enlever le surnageant
- Séchage du culot quelques minutes sous une hotte
- Resuspendre le culot dans un volume approprié (environ 20 ul) d'eau ou de tampon TE

Annexe 3 : Composition milieu RF1/RF2 pour la compétence des bactéries DH5 α **1. Milieu RF1 (pour 1 litre)**

- RbCl (Rubidium Chloride) : 12g
- MnCl₂ (Manganèse Chloride) : 9,9 g
- C₂H₃O₂K 1M (Acétate de potassium) : 30 ml
- CaCl₂ : 1,5g
- Glycérol : 150g (120ml pour un litre)
- H₂O : qsp 1L

Ajuster le pH à 5,8 avec une solution de HCl 5N

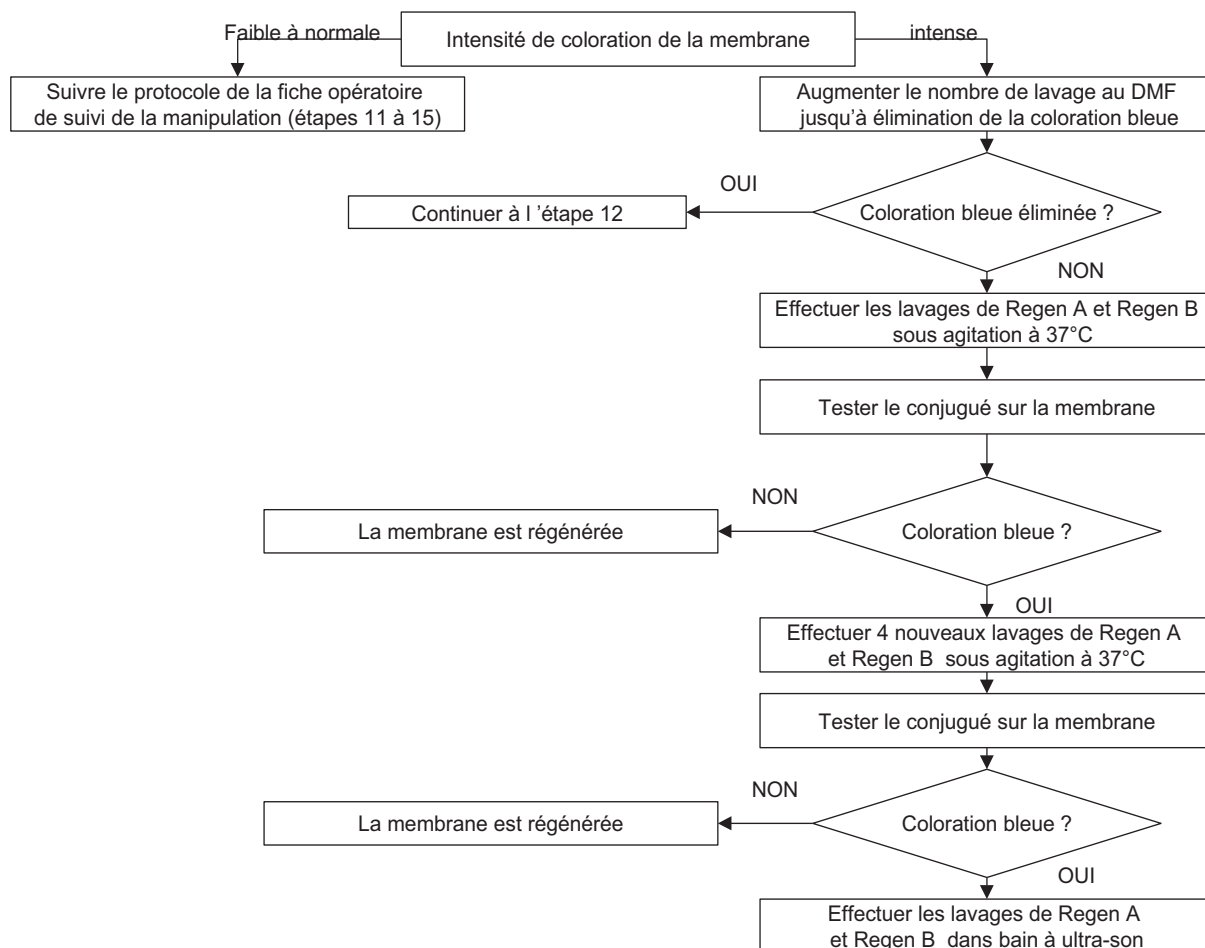
Filtrer le mélange à 0,2 μ M

2. Milieu RF2 (pour 1 litre)

- MOPS 0,5M pH 6,8 : 20 ml (ajuster le pH avec une solution de NaOH 5N)
- RbCl : 1,2g
- CaCl₂ : 11g
- Glycérol : 150 g (120ml pour un litre)
- H₂O : qsp 1L

Annexe 4 : Purification de l'ARN total à partir des cellules animales par la « Spin » technologie (RNeasy MiniKit, Qiagen)

1. Lyse des cellules en ajoutant un volume approprié de tampon RLT (350 à 600ul) . Vortexer.
2. Homogénéiser le lysat en le plaçant dans une colonne « QIAshredder spin column » placée dans un collection tube de 2 ml, puis centrifugation à vitesse maximale (13000 rpm) pendant 2 minutes.
3. Ajouter un volume d'éthanol à 70% au lysat homogénéisé, bien mélanger par pipetage/refoulement.
4. Transférer jusqu'à 700 ul de l'échantillon à la colonne « RNeasy spin column » placé dans un collection tube de 2 ml. Centrifuger pendant 15 secondes à > 10000 rpm. Se débarrasser du flow-through.
5. Ajouter 700 ul de tampon RLT à la colonne RNeasy. Centrifuger pendant 15 secondes à 10000 rpm pour laver la membrane de la colonne. Se débarrasser du flow-through.
6. Ajouter 500ul de tampon RPE à la colonne RNeasy et centrifuger pendant 2 minutes à 10000 rpm. Cette longue centrifugation va faire sécher la membrane de la colonne pour s'assurer de l'absence de l'éthanol lors de l'élution de l'ARN.
7. Elution de l'ARN : Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml. Ajouter 30 à 50 ul d'eau RNase free directement au centre de la colonne. Centrifuger pendant 1 minute à 10000 rpm.

Annexe 5 : Régénération de la membrane pour le pepScan

Après régénération, si la membrane n'est pas réutilisée, la sécher à froid sous la hotte pour éviter les vapeurs d'éthanol. Puis placer la membrane entre deux papier Whatman dans un sachet plastique fermé pour une conservation à -20°C .

Received: 22 March 2017

DOI: 10.1111/tbed.12656

REVIEW ARTICLE

WILEY Transboundary and Emerging Diseases

Sheep pox in Tunisia: Current status and perspectives

F. Ben Chehida^{1,2,3,4,5,6,7,8,9} | E. Ayari-Fakhfakh^{1,2,7} | P. Caufour^{5,6} | J. Amdouni^{1,2} |
 J. Nasr¹⁰ | L. Messaoudi¹¹ | H. Haj Ammar¹² | S. Sghaier^{1,2,7} | C. Bernard^{6,13} |
 1 A. Ghram⁷ | C. Cêtre-Sossah^{6,13} 

¹Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie (IRVT), Tunis, Tunisia²Université Tunis El Manar, Tunis, Tunisia³Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet, Sidi Thabet, Tunisia⁴Université de Manouba, Manouba, Tunisia⁵UMR CMAEE, CIRAD, Montpellier, France⁶INRA UMR1309 CMAEE, Montpellier, France⁷Institut Pasteur de Tunis, Tunis Belvédère, Tunisia⁸Faculté des Sciences de Bizerte, Jazourma, Bizerte, Tunisia⁹Université de Carthage, Carthage, Tunisia¹⁰Institut National Agronomique de Tunis, Tunis Belvédère, Tunisia¹¹CTV Jelma, Sidi Bouzid, Tunisia¹²Ministère de l'Agriculture, Direction Générale des Services Vétérinaires, Tunis, Tunisia¹³UMR CMAEE, CIRAD, Sainte Clotilde, La Réunion, France

Correspondence

E. Ayari-Fakhfakh, Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie (IRVT), Tunis, Tunisia.
 Email: cherifim2001@yahoo.fr

Summary

Sheep pox, a well-known endemic capripox infection, has significant impacts on small ruminant populations in Tunisia. It is responsible for high economic losses throughout North Africa due to its enzootic nature and to the active animal transhumance existing in some governorates in Tunisia. The aim of this review was to analyse data gathered on annual vaccination campaigns designed to control its spread by reducing the level of endemicity and to describe diagnostic and management tools adapted to the Tunisian situation. Seasonal, temporal and spatial distributions of sheep pox outbreaks, as well as related clinical features, were found. It was concluded from this review that establishing strong herd immunization through individual animal immunization, creating adequate infrastructure, increasing awareness among breeders, setting up a field-based surveillance network and improving routine diagnostic methods need to be the major components of a programme to eradicate the disease. It was also felt that cost-benefit analyses of the surveillance and control strategies used would help in controlling its persistence.

KEYWORDS

control, epidemiology, sheep pox, transboundary disease, Tunisia

1 | INTRODUCTION

Sheep pox (SPP), goat pox (GTP) and lumpy skin disease (LSD) are important viral diseases that significantly impact the livestock industry and hence the entire economy of affected countries (Damon, 2007; Murphy, Gibbs, Horzinek, & Studdert, 1999).

Sheep pox virus (SPPV), goat pox virus (GTPV) and lumpy skin disease virus (LSDV) are classified as Capripoxvirus (CaPV), a genus belonging to the Poxviridae family (Buller et al., 2005). Their double-stranded DNA, approximately 150 kb long, encodes at least 147 genes (Tulman et al., 2001). A comparative analysis of the complete genome of SPPV and GTPV isolates, including pathogenic field isolates and attenuated vaccine viruses, highlighted the high degree of sequence homology, up to 96% of identity between SPPV and GTPV

and 97% between LSDV and both GTPV and SPPV genomes, suggesting a common SPPV ancestor for GTPV and LSDV (Lamien, Le Goff et al., 2011; Le Goff et al., 2009). The classification of different SPPV and GTPV strains was based on the host species from which they are isolated (sheep, goat or both), although some strains are not host specific (Lamien, Le Goff et al., 2011; Lamien, Lelenta et al., 2011; Le Goff et al., 2009).

Capripox diseases are endemic in several regions of the world. LSD is commonly encountered throughout the continent of Africa except for Libya, Algeria, Morocco and Tunisia, which are still considered to be unaffected. LSD is also widespread in the Middle East (Israel, Lebanon, Palestine, Jordan, Iran, Iraq, Cyprus, Turkey) and in Egypt (Alkhamis & VanderWaal, 2016; Kitching, McGrane, & Taylor, 1986; Mirzaie, Barani, & Bokaie, 2015; Promed, 2012; Yeruham

Dispatch: 9.4.17	CE: Raja S	PE: Sujitha G
No. of pages: 14		
WILEY		
12656	Manuscript No.	
T B E D	Journal Code	
		

et al., 1995, 2007) as well as in the Balkans (Bulgaria, Greece, Macedonia, Serbia) (OIE, 2016; Promed 2016; Tuppurainen et al., 2015), but is absent in East Asia (Tuppurainen & Oura, 2012).

SPP and GTP are widespread in Central and North Africa (Algeria, Morocco, Libya and Tunisia) (Haegeman et al., 2015), the Middle East, Central Asia, the Indian subcontinent (Bhanuprakash, Indrani, Hosamani, & Singh, 2006; Mondal et al., 2004) and China. More recently, they spread to southern European countries (Bulgaria, Greece, Turkey) located closer to Middle Eastern countries (Babiuk, Bowden, Boyle, Wallace, & Kitching, 2008; Cam, 1993; Dadousis, 2003; Kitching, 2004; Mangana, Kottaridi, & Nomikou, 2008; Zangana & Abdullah, 2013) (Figure 1).

These viral infections occur predominantly in countries with extensive, nomadic or transhumance breeding of sheep and goats, and mainly in regions where uncontrolled movements of live animal are prevalent. International trade of animals and their derived products (e.g., wool and leather) is an additional major risk factor in the entry of such viruses in SPPV-free countries (Galea, Kelly, & Snarya, 2016; Tuppurainen et al., 2015).

Dedicated tools should be harmonized between neighbouring countries in North Africa in a joint effort to control these infections in each affected country (Domenech, Lubroth, Eddi, Martin, & Roger, 2006).

In Tunisia, isolation and characterization of the virus were reported for the first time in 1974 (Ramisse, Asso, Hassani, Anane, & Jemli, 1978) even though the disease had been recognized from a clinical point of view more than two centuries ago (Balozet, 1931). Ever since, numerous outbreaks have been reported across the

country, causing substantial economic losses due to their enzootic nature, despite decades of vaccination to reduce disease transmission (Odissev, Sghaier, Hammami, & Bejaoui, 1995). So far, surveillance and annual vaccination are the only practical counter measures against CapV infections in Tunisia (DGSV, 2015; REMESA 2012).

The aim of this article was to highlight the epidemiological status of sheep pox in Tunisia over the past 25 years and to investigate key parameters to reassess control strategies for better prevention and control of future disease emergence.

2 | GENERAL OVERVIEW OF THE SPP STATUS IN NORTHERN AFRICA

The disease is known to be endemic in the region of North Africa (Morocco, Algeria, Tunisia and Libya) with specific features in each country. The epidemiological situation of sheep pox in one country may be affected by the health status in the neighbouring countries, which is why it is worth considering the region as a whole. The risk for neighbouring countries to be re-infected or for the virus to be reintroduced is mainly linked to legal and illegal trade in animals across uncontrolled borders (Achour & Bouguedour, 1999). Most of the data gathered are of a quantitative nature (number of reported cases, number of outbreaks) and originated from passive surveillance of the disease. A disease outbreak is defined as the occurrence of cases of disease in excess of what would normally be expected in a given community, geographical area or season. A number of notifications and outbreaks reported are often underestimated and thus

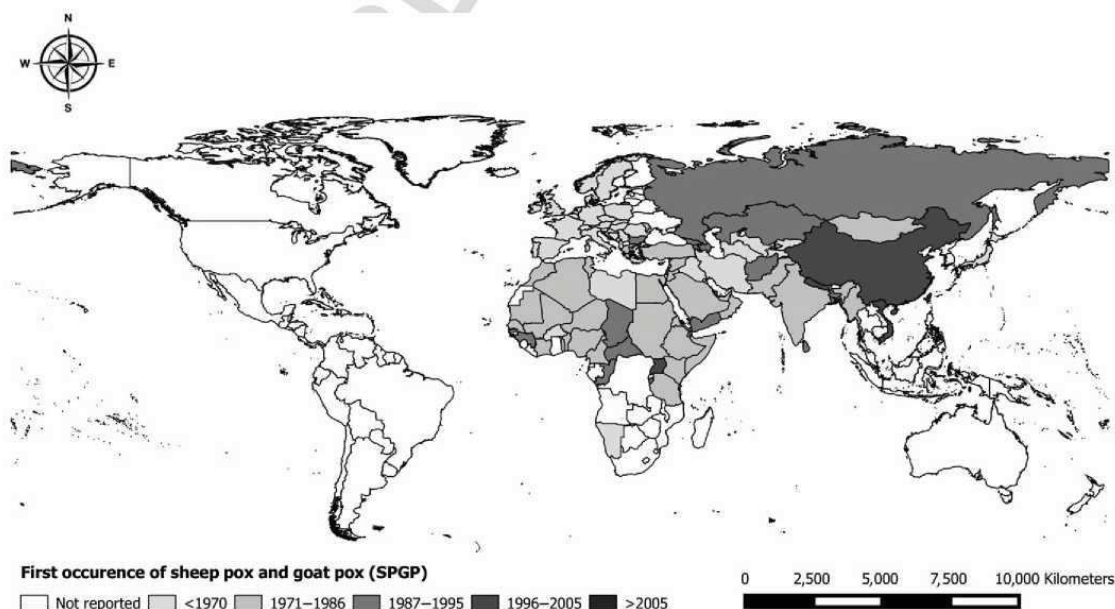


FIGURE 1 Worldwide distribution of sheep pox and goat pox, 1970–2015

often underestimate the real prevalence of the disease in the different countries in the region. Nevertheless, country-specific reported sheep pox outbreaks for the past 20 years have been gathered and reveal variations among North African countries (Handistatus, 2016; WAHID, 2013) (Figure 2). In Morocco, even though it was not possible to gather all the data from the past 20 years, the number of outbreaks declined during the 1996–2006 decade, as there were no reported outbreaks during the period 1998–2000. This could be explained by the high level of vaccination coverage, reaching 80% (Empres, 1999). A series of outbreaks of Peste des Petits Ruminants (PPR) occurred in Morocco between 2007 and 2011, hindering the national vaccination campaigns, favouring the occurrence of sheep pox outbreaks and leading to a peak of 1,890 reported cases during the period concerned (Handistatus, 2016; WAHID, 2013).

In Tunisia, the number of outbreaks reported over the past 20 years (Figure 2) included peaks in the periods 1992–1994, in the year 2001, 2007–2009 and finally 2014–2015, with the highest peaks in 2008 and 2015.

In Algeria, despite a national control programme that continued for several decades, sheep pox is still considered as a major animal health problem. Vaccination coverage increased considerably in the past decade 2005–2016 reaching 78% compared to 40% for the previous decade 1995–2005 (Achour & Bouguedour, 1999). A total of 46 outbreaks were recorded over the past 20 years (Handistatus, 2016; WAHID, 2013). The recurrence of SPPV is likely due to either internal spread within the country or to legal and illegal animal movements across uncontrolled borders (as SPPV is endemic in the three neighbouring countries) or to a combination of both (Achour & Bouguedour, 1999).

As far as Libya is concerned, only sparse data are available for the past 20 years, with gaps for the years 2005–2006 and 2010–2016 due to internal political issues (Handistatus, 2016; WAHID, 2013). Sheep pox is not considered as a priority disease affecting the health status of small ruminants.

3 | SHEEP POX IN TUNISIA

SPP was reported as a contagious disease by Bourgelat in 1763 and clinically described by Gilbert in 1798 (Lefèvre, 1983). It is now

considered as a notifiable contagious disease by the Office International des Epizooties (OIE). With the creation of the Arloing Institute and the Tunis Pasteur Institute (Pacha-Bey, 1931), diagnostic capacity of animal diseases increased allowing the development of a sheep pox vaccine in 1950 by Dr E. Ducloux to limit the spread of SPP in Tunisia (Odissev et al., 1995). Despite the long presence of SPPV in Tunisia, the first published report mentioning the isolation and characterization of a field strain of sheep pox, originating from an outbreak in Zaghouan in 1974, was made by Ramisse et al., 1978, through a collaboration between Tunisian and French scientists.

3.1 | Temporal and spatial distribution of sheep pox in Tunisia

Small ruminant farms may be affected by different cutaneous infectious diseases (Orf, SPP, bluetongue, PPR) (DGSV, 2010; Fakhfakh et al., 2005). Sheep pox is one of major ovine viral pathologies reported by the veterinary services (Fakhfakh et al., 2005). High levels of contacts between animals when they gather around water points and during transhumance, combined with low vaccination coverage, are key factors in SPP viral transmission in herds across Tunisia. Detailed information on the spatial and the temporal distribution of these outbreaks can help to understand better the spatial and temporal evolution of the disease and lead to the design of adequate disease control.

3.1.1 | Temporal and seasonal distribution

The temporal distribution of sheep pox outbreaks during the past 25 years in Tunisia can be divided into three periods based on variations in the number of declared disease outbreaks, their origins, and some of the control measures applied in each period (i) the first period between 1989 and 1995, (ii) the main period between 1996 and 2001 when RADISCON (Regional Animal Disease Surveillance and Control Network) was implemented and (iii) the third period from 2001 to the present (Figure 3).

Over the first period (1989–1995), the average number of outbreaks reported was 175; with a peak of 302 outbreaks in 1993, the average of the vaccination coverage reported was 33%, with a peak reaching 42% (Handistatus, 2016; WAHID, 2013). The foot-and-

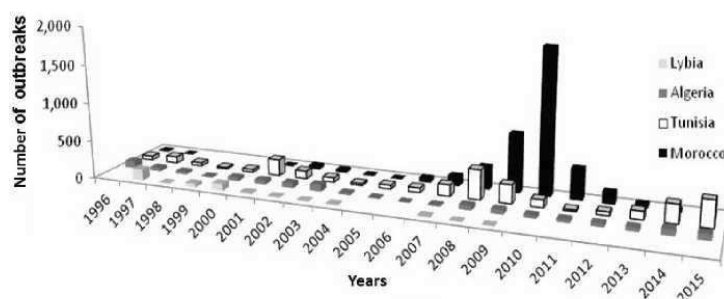


FIGURE 2 Sheep pox outbreaks reported in North African countries, 1996–2015 (WAHID, 2013; Handistatus, 2016)

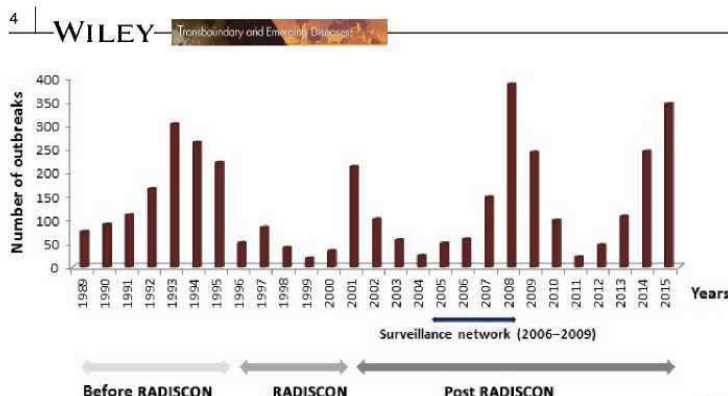


FIGURE 3 Sheep pox outbreaks reported in Tunisia, 1989–2015 (WAHID, 2013; DGSV, 2015; Handistatus, 2016)

mouth disease (FMD) epizootic in 1990 had a real impact on sheep pox vaccination campaigns and may explain the notable increase in outbreaks of sheep pox in 1993 and 1994. Indeed, the emergence of FMD virus in 1989, following importations of small ruminants from the Middle East, largely hampered efforts by the veterinary services to continue the sheep pox vaccination as all means (financial and personal) were directed towards controlling FMD. This deprived regular disease control programmes for small ruminants, specifically sheep pox, of both financial and human resources (Kitching, 1998). What is more, as the vaccination campaign against SPPV between 1989 and 1995 took place in autumn (September to November), full access to all the herds that needed to be vaccinated was very difficult, as this is the lambing season for most of the ewes. The level of vaccination coverage dropped as low as 20.1% in 1994. The latter is likely the explanation for the increase in the number of SPPV cases.

During the second period, 1996–2001, the implementation of the 5-year RADISCON network helped reduce the number of sheep pox outbreaks. In fact, through the RADISCON programme, coordinated efforts were made to ensure good distribution of SPP vaccines in all four North African countries, particularly in Tunisia, and to identify the main target endemic areas to ensure high vaccination coverage of 75%. During that period, the average number of outbreaks decreased dramatically to reach a low of 84 outbreaks in 1997. The peak number of outbreaks was reported in autumn, when sheep are exposed to various geo-climatic conditions. By the end of the RADISCON project, vaccination campaigns were being implemented throughout Tunisia, with vaccination coverage starting at 21% in 1999 and reaching 59% in 2000 (Figure 4). It is worth noting that seasonal vaccination campaigns were changed from autumn to winter and were mainly conducted in January, avoiding thus the lambing period and enhancing vaccination coverage.

The third period, 2001–2016, witnessed three major peaks 7 years apart: there were 212 outbreaks in 2001, 386 in 2008 and 344 in 2015. Each observed peak was correlated with either the introduction of an emerging disease/re-emergence of a notifiable disease in the country, such as bluetongue (BT) in 2001, PPR/BT in 2007–2008 and FMD in 2014 or the increased prevention measures taken against threatening diseases such as Rift valley fever (RVF). It is important to mention here that the renewal cycle of the small

ruminant's herds in Tunisia is about 6–7 years corresponding to the years 2001, 2008 and 2015 where the three major peaks of SPP outbreaks occurred for the period 2001–2016. The introduction of young naive animals that are not vaccinated against SPP in farms without no period of quarantine is a notable factor that may influence the cyclic peak of SPP outbreaks despite the high level of vaccination coverage maintained.

Similar to the first period, the depletion of resources (financial and human) due to the (re-) emergence of disease as BT, PPR and FMD leads to a reduced capacity to vaccinate against SPP. For example, after the BTV enzootic of 2000, 212 outbreaks of SPPV were reported in 2001. Six to seven years later (2007 and 2008), the emergence of bluetongue and Peste des petits ruminants in Morocco led to several control measures (such as improved control of herd movements at the Tunisian border, active animal surveillance using sentinel herds) with the aim to prevent the introduction of BTV and PPR in Tunisia. These extra activities were not foreseen and had a major impact on routine SPP vaccination campaigns. The activities of monitoring and screening of sentinel herds conducted to an increased number of reported/declared cases compared to previous decades. Most of these cases were declared based only on clinical skin lesions without any laboratory diagnostic confirmation and could be considered as false-positive SPP reported cases as other pathogens could have been the sources of the observed skin lesions (Ghram, 2010).

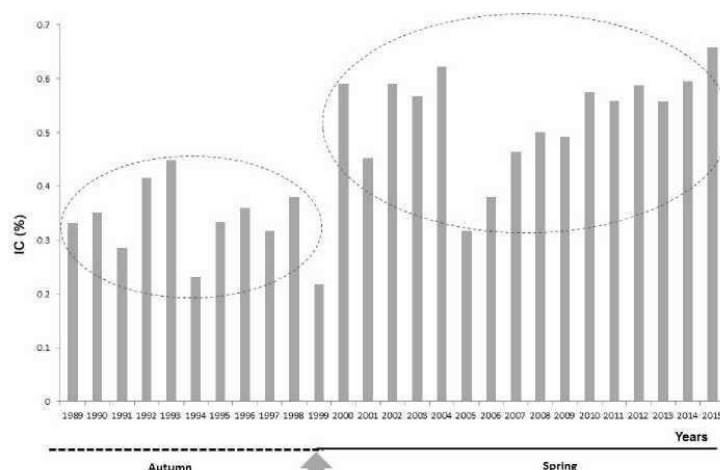
In terms of a pattern of seasonal distribution, analysis of the periods 2005–2008 and 2013–2015 showed autumn and winter to be the two main seasons for sheep pox outbreaks, even though it is well known that outbreaks can occur all year round (Figure 5). It should be noted that between 2008 and 2013, no data were available and thus could not be included in this analysis.

3.1.2 | Spatial distribution

In Tunisia, the spatial distribution of sheep pox corresponds to the country's climatic zones, the distribution of herd density and agro-pastoral practices (Figure 6). There is a positive correlation between bio-geo-climatic zones and the number of outbreaks, as small ruminants are distributed according to these bio-geo-climatic strata: 37%

LOW RESOLUTION FIG

FIGURE 4 Evolution of the immunization coverage (IC), 1989–2015 (WAHID, 2013; DGSV, 2015; Handistatus, 2016) and impact of the season of the vaccination campaign on the IC. IC is the ratio of the total number of vaccinated animals relative to the total number of susceptible animals (not including goats)



LOW RESOLUTION FIG

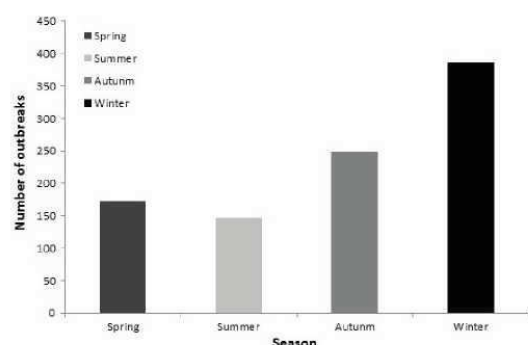


FIGURE 5 Seasonal variations in sheep pox outbreaks, 2005–2015 (WAHID, 2013; Handistatus, 2016). No data were available for the period 2008–2013 and are consequently not included

in the North, 39% in the Center and 24% in the South with a farming system adapted to each region (Brahmi, 2008;). Bio-ecological and climatic zones can be classified in five distinct zones: humid, subhumid, subarid, arid and desert zones (Ben Dhia, 1995).

The humid zone is located in the northernmost part of the country and includes the governorates of Jendouba, Bizerte and Béja, where rainfall ranges from 800 to 1,000 mm a year (and can reach 1,200 mm a year). The subhumid zone is located between Zaghouan and Le Kef with rainfall ranging from 400 to 600 mm per year. Abundant water resources enable pastures for livestock, along with forage crops and other resources derived from farmland. The result is a greater capacity to cope with change, and breeders do not need to drive their herds long distances to access land with wild vegetation. Such conditions limit the emergence of sheep pox outbreaks. Only seven outbreaks of sheep pox have been reported in the northern coastal areas of Tunisia in the last 20 years.

In the Central Region, the subarid (from Kasserine to Sousse, including Mahdia) and arid zones (Gafsa, Sfax, Sidi BouZid, Gabès and Médenine) have much lower rainfall and livestock production is primarily based on transhumance and the search for migratory pasture, in the absence of any regulations or control by veterinary authorities. More than 600 cumulative cases of SPP were reported between 1996 and 2015 in the governorate of Sidi Bouzid, which hosts the largest number of small ruminants in the country, 590,700 head (8.15%) after the governorate of Kasserine, 671,000 head (9.26%). Sidi Bouzid is also the site of a weekly livestock market, known to be one of the main hubs for animal movements with animals coming from several governorates in Tunisia thus favouring the transmission of contagious diseases. In the two neighbouring governorates of Kasserine and Kairouan, more than 300 cases of SPP have been notified including the town of Kasserine located at the Tunisian-Algerian border, where uncontrolled movements of animals are very common (Figure 6).

The coastal areas in the Central Region, Sousse, Monastir and Mahdia, receive a reasonable amount of rainfall. Small ruminants are produced following an agro-pastoral mode with no need for transhumance, thus avoiding the risk of animals catching infectious diseases.

Finally, the southern part of Tunisia, the desert zone (Gabès, Médenine, Tozeur, Kébili and Tataouine) receives less than 100 mm of rainfall per year. Grazing and rangelands with wild vegetation are rare. The livestock system is mainly family size and of oasis type (three to 12 animals). The animals are kept permanently in stalls in breeder houses with very limited contact with other animals likely to be sources of transmissible infectious diseases. These livestock production conditions may explain the low number of sheep pox outbreaks (156) in the past 20 years (Rondia, 2006).

Parameters, such as vaccination coverage, differ a lot from one governorate to another and have a major impact on the spatial distribution of SPP outbreaks in Tunisia. Other parameters such as the absence of officially declared outbreaks or under reporting due to

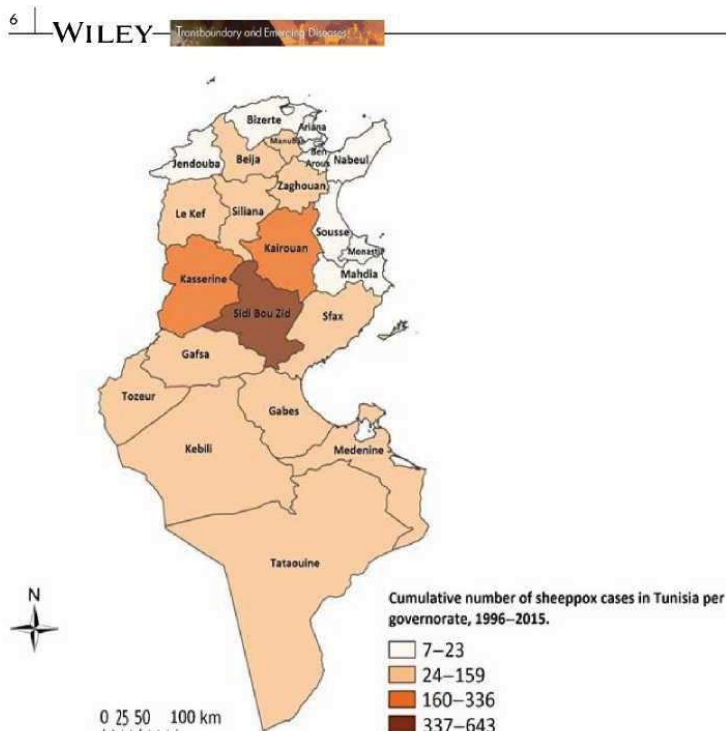


FIGURE 6 Spatial distribution of sheep pox outbreaks in Tunisia, 1995–2015 (WAHID, 2013; Handistatus, 2016)

difficult access to remote areas and the absence of laboratory confirmation may influence estimation of the spatial distribution of SPP outbreaks in the country.

In fact, some mountainous areas, in the north-western part of the country, are difficult for veterinary services to access and consequently lack appropriate animal health monitoring including animal vaccination programmes, thus contributing to the spread of diseases.

3.2 | Transmission and host range in Tunisia

SPPV is known to be spread either by direct contact between infected and naive animals, through aerosols or abraded skin/mucosal lesions or by virus excreted in nasal secretions, milk and possibly urine (Bhanuprakash et al., 2006).

In Tunisia, sheep pox outbreaks appeared mainly after close and sustained contact between animals and several factors enable transmission of the virus. Thus, places where animals may assemble and come into close contact with one another, such as markets, are the main sources of contagion especially during certain periods of the year like the religious festival Aïd El Idha (Abdo-Salem et al., 2011; Fèvre, Bronsvoort, Hamilton, & Cleaveland, 2006). Another factor that may influence SPP transmission is the introduction of naive animals onto the farm with no period of quarantine. In about one-third of small ruminant farms, owners purchase breeding rams for the renewal of their herds without implementing quarantine. Mixed herds (38%) composed of sheep, goats (about 25% of the mixed herd) and cattle are important factors contributing to the persistence of the virus on farms (DGSV, 2010). There is also no continuous

follow-up of either SPP and GTP in caprine species, which represents a significant risk for the virus spread/transmission and its maintenance in some herds. In addition, animal health inspection by private or public veterinarians may be hindered by their availability and the accessibility of the farms.

Finally, movement of infected animals is the main cause of the spread of capripox viruses (Kitching, 2004; Animal Health Australia (AHA), 2011). In Tunisia, transhumance is mainly practiced in subarid and arid areas and is considered to represent a high risk of SPP transmission in the absence of regulations and sanitary control measures to monitor animal movements.

The stability of SPPV in the environment as well as its presence in scabs for long periods of time may also be a source of infection for naive animals, particularly in arid and subarid geo-climatic areas. Indirect transmission may also occur through fomites such as human movements, vehicles, wildlife and trade of inadequately treated hides (EFSA AHAW Panel, 2014) or through mechanical transmission by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) although the latter route may be rare (Kitching & Mellor, 1986; Mellor, Kitching, & Wilkinson, 1987; OIE, 2004; Rao & Bandyopadhyay, 2000). CaPV follow the rules of poxviruses and are described as having a ruminant host range capable of supporting their survival in the wild, although they may occasionally infect and cause the disease in other animal species (McFadden, 2005). They are generally considered to be host specific, leading to outbreaks in a preferred host. SPPV and GTPV cause clinical diseases in sheep and goats, respectively. Only three reports cite simultaneous infection of sheep and goats in Kenya (Davies, 1976), in the Middle East (Kitching et al., 1986) and in India (Santhamani et al., 2015).

So far, only one study based on a national epidemiological survey has been conducted on the diversity of Tunisian SPPV isolates. Typical SPP skin lesions of 63 sheep were sampled. Molecular characterization of the isolates, based on thymidine kinase (TK) and G-protein-coupled chemokine receptor (GPCR) genes, revealed a genetic profile of field strains identical to that of the SPP vaccine strain type Romania 65, administered routinely during Tunisian SPP vaccination campaigns (Le Goff et al., 2009); the Tunisian field isolates and the vaccine strain Romania 65 form a homogeneous group despite the diversity of their geographical origin.

3.3 | Clinical features

SPP disease has an incubation period varying from 4 days to 2 weeks. In Tunisia, the disease has been monitored and studied mainly in sheep despite the fact 38% of the herds are mixed and contain 25% of goats. SPP disease can occur at any age but young animals, under 3 months of age, are the most affected. Symptoms in Tunisian herds often start with nasal and ocular discharges, pyrexia (40–42°C) (Figure 7, panel B), dyspnoea, depression and loss of appetite with enlargement of all superficial lymph nodes, in particular the pre-scapular lymph nodes. Common skin nodular lesions and papules are predominant and are usually first observed on the face, around the lips and the nares and on the eyelids, starting their development at the onset of fever reaction (Figure 7, panels a and c). Generally, skin lesions progress through macular, papular and vesicular forms, until a scab forms. They may cover the entire body but are more easily detected on the hairless parts of the skin and the mammary glands. Some clinical observations of the disease revealed the presence of papules at the base of the tail and in the labial mucosal (Figure 7, panels a and d). Animals may also develop respiratory problems including

bronchial pneumonia with nasal mucopurulent discharge and digestive complications. Other ocular signs were also observed like blepharitis and kerato-conjunctivitis but were less frequent.

In Tunisia, the morbidity and the mortality rates are 4.98% and 0.55%, respectively. The observed average case fatality rate (CFR) corresponding to the ratio of the number of deaths to the number of cases observed per year for SPP is estimated at 11.09% for any age (Table 1). However, CFR is usually high in lambs and could have reached the value of 15.89% in 2010 with bacterial surinfections being the main sources of mortality (DGSV, 2010) (Figure 8). A three-year study, from 2006 to 2009, showed that sheep aged over 2 years old exhibited the highest morbidity rate (5.97%) as most were unvaccinated animals (Table 1). Morbidity and mortality rates can vary among sheep breeds. This has not yet been studied in Tunisia despite the diversity of ovine breeds. Sick but cured animals exhibited strong sustained humoral and cellular immunity throughout their life.

3.4 | Tools for sheep pox management

Successful SPP control and eradication programmes rely mainly on early detection of the index case, rapid stamping out of all infected and in-contact animals, strict control of movement, appropriate quarantine and good disinfection. Skin and visceral pox lesions caused by SPPV are strongly indicative of the disease. The clinical diagnosis by trained veterinary staff is the first step in the diagnosis process, but a definitive diagnosis requires laboratory confirmation. Vaccination campaigns need to be implemented in affected countries using proven efficacy vaccines that will be properly administered (i.e., cold-chain compliance).

In Tunisia, all recorded sheep pox outbreaks are based on pathognomonic clinical skin lesions (papules, nodules and vesicles),

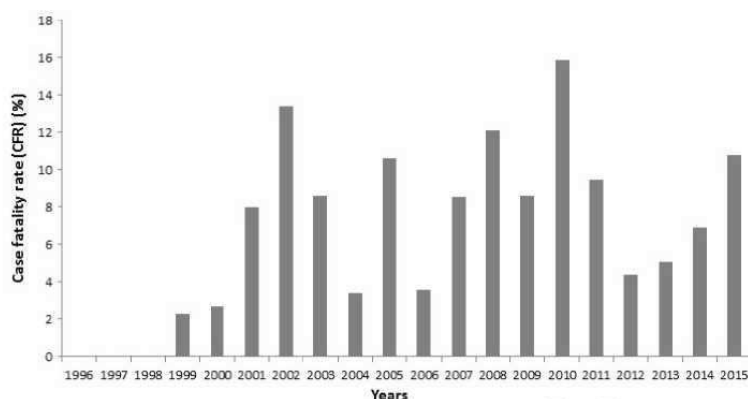
LOW RESOLUTION FIG
Colour online, B&W in print

FIGURE 7 a. Multiple papules on the ventral tail, b. Mucopurulent discharges from eyes and nose, c. Papules on the face, around nostrils and eyes, d. Labial mucosal nodules



TABLE 1 Description of the main sheep pox epidemiological indicators, Tunisia, 2006–2009

Age category of animals	All ages categories	<3 months	3 months to 1 year	1–2 years old	>2 years old
Morbidity rate (%)	4.98	4.93	3.96	4.16	5.97
Mortality rate (%)	0.55	2.39	0.22	0.66	0.46
Case fatality rate (%)	11.09	48.39	5.47	15.95	7.74

**FIGURE 8** Case fatality rates (CFR) of sheep pox, Tunisia, 1996–2015 (WAHID, 2013; Handistatus, 2016). CFR is the number of deaths divided by the number of cases reported per year

easily detected on the hairless parts of the body and the mammary glands. In the case of mortality, a post-mortem diagnosis is established based on the lung lesions. Two official veterinary laboratories (the Tunisian veterinary research institute (IRVT) with a functional sheep pox research platform and the veterinary microbiology laboratory at the Tunis Pasteur Institute are able to diagnose and confirm SPP cases. Currently, conventional viral isolation techniques and molecular tests are used. Seroneutralization tests (SNT) or immunofluorescence assays (IFAT) are suitable for retrospective serological surveys at the herd level, but these assays are not sufficiently rapid or reliable at the individual level to be used as primary tests.

3.4.1 | Diagnostic tools

As far as the SPP diagnosis is concerned, the first technique implemented was isolation of the virus collected from skin lesions using different types of primary cells (lamb testis, lungs) as well as cell lines (ETM, Vero), building up a Tunisian field strain bio-bank which was the starting material for molecular techniques (Binopal, Ongadi, & Chepkwony, 2001; Mangana-Vougiouka et al., 1999; Tuppurainen, Venter, & Coetzer, 2005). Electron microscopy was also used to identify SPP virions from sampled papules and inoculated cell cultures (Fakhfakh et al., 2005) in collaboration with the Tunis Faculty of Medicine.

Molecular diagnostic tests play an important role in monitoring the spread of SPP in susceptible livestock. Polymerase chain reaction (PCR) and alternative amplification techniques provide rapid and sensitive diagnostic tests for detection of the SPPV genome. Two conventional agarose gel-based polymerase chain reaction (PCR) assays were optimized using skin lesions, nodules and crusts. The target

genes were the thymidine kinase gene (Gershon & Black, 1989) and a putative gene encoding the homolog G-protein-coupled chemokine receptor (Q2/3L) named the GPCR and the homolog interleukin gene receptor (IL8) (Cao, Gershon, & Black, 1995; Le Goff et al., 2009; Le Goff et al., 2005). However, the results obtained could not differentiate between SPPV, GTPV and LSDV (Ireland & Binopal, 1998; Kitching & Smale, 1986) and this was considered as a major constraint to the interpretation of the data. In the meantime, PCR has been optimized and allows antigen detection in eyes and nasal swabs and blood samples (Zro et al., 2014) as does the newly described loop-mediated isothermal amplification assay (Venkatesan, Balamurugan, Bhanuprakash, Singh, & Pandey, 2016; Zhao et al., 2014).

Finally, it is important to note that no PCR is currently performed for the detection of SPPV versus GTPV as GTPV has not been reported in Tunisia to date. Nevertheless, it would be wise to reinforce Tunisian diagnostic capacities to develop gel-based PCR for the differentiation of such viruses as described for mature virion envelope protein of vaccinia virus H3L analog, named P32 (Chan et al., 2014; Heine, Stevens, Foord, & Boyle, 1999; Hosamani et al., 2004), capripox virus homolog of vaccinia virus 30-kDa RNA polymerase subunit (RPO30) and vaccinia virus analogous I3L gene and DNA binding phosphoprotein (Lamien, Le Goff et al., 2011; Venkatesan, Balamurugan, & Bhanuprakash, 2014a; Venkatesan, Balamurugan, & Bhanuprakash, 2014b). The development of routine DIVA molecular techniques, using a single PCR-based assay capable of identifying all capripox virus isolates, specifically vaccine isolates or sheep, goat and cattle field isolates is necessary (Orlova, Shcherbakova, Diev, & Zakharov, 2006).

In addition, clinically SPPV and GTPV may be confused with other viral infections including contagious ecthyma, bluetongue and

PPR. Unfortunately, despite the control measures deployed since their original introduction, all these infections affect Tunisian herds. Therefore, it is urgent to make available multiplex PCR-based methods able to differentiate between these epidemic-prone viral diseases.

Few ELISA techniques have been described for the detection of CAPV antibodies (Babiuk et al., 2008; Bhanot et al., 2009; Bowden et al., 2009; Ngichabe, Binopal, Njiru, & Carn, 1999; Tian, Chen, Wu, Shang, & Liu, 2010). For SPPV antibody detection, IFAT and SNT were defined as specific tests able to differentiate between capripoxviruses and parapoxviruses and sufficiently sensitive and reliable to be used for seroprevalence studies (Abera, Degefu, Gari, & Kidane, 2015; Fagbo, Coetzer, & Venter, 2014; Gari, Biteau-Coroller, Le Goff, Caufour, & Roger, 2008; Kitchen et al., 2014) but are obviously not the best tests for high-throughput surveillance.

3.4.2 | Vaccination

The main sustainable and reliable tool to fight SPP infected countries is medical prophylaxis through annual vaccination campaigns which started in the 1980s in Tunisia. Data on the follow-up of the yearly Tunisian SPP vaccination programmes were gathered for the period 1989–2015 (Figure 4).

Two factors were identified as keys to the success of any SPP vaccination campaign: (i) the period chosen for vaccine administration and (ii) the type of vaccines administered.

Period of vaccination

In Tunisia, between 1989 and 1998, SPP vaccination campaigns were conducted in the autumn (September–November) because the vaccination campaign against SPP was combined with that against FMD to spare resources. In fact, each vaccination campaign requires a huge logistic investment in human resources, transport, communication, grouping animals for vaccination and making sure adequate doses of vaccine are available and are delivered respecting cold-chain conditions. The farmers, however, did not consider autumn as the best season and consequently did not cooperate sufficiently because the vaccination period coincided with the lambing period. In addition, the vaccination period corresponded to the period of transhumance during which the majority of animals in arid and subarid regions escaped mass immunization. This likely explains the low level of vaccination coverage that reached a maximum of 40% (Figure 4) and contributed to the persistence and spread of SPP in Tunisia (Figure 3).

The failure during the first 10 years of vaccination (period 1989–1999) illustrated by the low vaccination coverage led the veterinary services to shift the vaccination period from autumn (September–November) to spring (February–May) (Figure 4). This period was much more acceptable to farmers as it does not coincide with either the lambing or the transhumance period. A vaccination coverage rate of 59% was achieved in 2000, and the lowest rate of 32% was recorded in 2005 (Figure 4). The significant difference in the timing of the vaccination campaigns in autumn and in spring proved that

the timing of a vaccination campaign is crucial for the success of disease control. Despite critical periods related to the emergence of new infections, the overall rate of vaccinated animals has been increasing over the years, favouring better control of the disease.

Type of vaccines administered

The type of vaccines and the method of vaccination are key components of a successful vaccination programme (Gelaye et al., 2015). In Tunisia, before 1989, one of the vaccines used was made of crude viruses extracted from desiccated lesions of sick animals and co-administered with a hyperimmune serum (Odissev et al., 1995). Starting in 1989, a live attenuated viral strain was used, which was delivered under cold-chain conditions in Tunisia as well as in Morocco and Algeria, enabling strong lasting immunity. One type of vaccine used was the strain RM/65 produced by Tunis Pasteur Institute (Achour, Bouguedour, Bouhbal, Guechtouli, & Aouissat, 2000). The strain RM/65, of Yugoslav origin, was attenuated through 31 passages in kidney sheep primary cells at the Razi Institute in Iran (Mahmood, Hesni, & Afzal, 1988; Ramyar & Hessami, 1968). As neighbouring countries, Morocco and Algeria appear to have used the same type of vaccine strain. In addition, during SPP epizootics, Algeria used the Prerego strain of Algerian origin adapted after five passages in testicular lamb cells at the Sofia Veterinary Institute (Mateva & Stoichev, 1975). The vaccination schedule depends on the age of the animals and vaccination of animals under the age of 2 months requires two injections followed by an annual booster injection.

Finally, to obtain an overall field vaccination coverage rate, it was important to design a sampling protocol including the number of herds vaccinated each year and their distribution in the different Tunisian governorates. So far, none of these experimental studies have been conducted. Although the type of vaccine used so far in Tunisia is known to produce a solid humoral and cellular immune response for up to 24 months (Ramyar & Hessami, 1968), these data need to be validated for the main local Tunisian sheep breeds, West thin tail, Barbarine, Black of Thibar and Sicilo Sarde breeds.

4 | STRATEGIES TO CONTROL AND ERADICATE SPP FROM NORTH AFRICAN COUNTRIES

4.1 | North African countries

SPP is a notifiable contagious disease and, as such, has to be declared to the OIE. Control strategies consequently have to be well designed and shared with neighbouring countries, in which the disease may occur. The RADISCON (Regional Animal Disease Surveillance and Control Network) programme which was created in 1996 for a period of 5 years, implemented health measures to control infectious diseases that had a serious economic impact on the affected country. The network grouped 29 countries located on two continents (North Africa, the Horn of Africa, the Middle East, the Arabian Peninsula and the Persian Gulf) that share several endemic

and epidemic-prone diseases, one of which was SPP, whose eradication process ended in 2005. The main objectives were (i) to increase training in the analysis of animal health data, (ii) to promote active and passive surveillance of transboundary diseases, (iii) to promote high quality surveys of outbreaks to enable risk analysis and (iv) to eradicate the diseases of interest, in this case SPP, which affected the countries belonging to the network.

Even if it was not possible to eradicate SPP in the North African countries during the course of RADISCON programme, the mere existence of the network greatly improved the animal health status in Morocco, Algeria, Tunisia and Libya, witnessed by a major decrease in outbreaks of SPP (Figure 2). For example, in 1997, an SPP vaccination coverage rate of 80% was achieved in Morocco, while the coverage rate was 40% in Algeria and 50% in Tunisia. In addition, it has to be noticed that gathering all the data of the outbreaks and the vaccination campaigns in a country is very important and will greatly help in the improvement of the control strategy.

Means of control (SPP reported outbreaks database shared between partners, choice of a type of surveillance, a type of vaccines to be administered, a schedule of vaccination) need to be harmonized and monitored in the North African region. This would require major efforts by each country. Even though RADISCON was an excellent example of a joint effort by Algeria, Morocco and Tunisia, continuous funding is required for efficient control of the disease with a final objective of eradication.

4.2 | Tunisia

In Tunisia, since 2006, SPP control has mainly been based on a yearly vaccination programme and a surveillance network led by the Tunisian veterinary services, in collaboration with private veterinarians in the field. The aim of the surveillance network is to collect detailed epidemiological data on animal diseases and to study the characteristics of annually reported cases to produce field-based control plans. In this context, the RADISCON network was able to monitor SPP outbreaks in time (seasonality) and space, which enabled the characterization of the main clinical signs observed in affected herds.

The organization of the vaccination programme is linked to several administrative bodies, each of which has its own main goal: (i) the head of the veterinary services (Chief Veterinary Officer [CVO]) decides on whether vaccination campaigns should be conducted, and the type of vaccines to be administered, (ii) the 24 different Regional Commissaries for Agricultural Development (RCAD) with the help of the regional bureau of animal production, in charge of the planning details related to the field actions for vaccine administration, (iii) the Office of Breeding and Pasture (OEP), which helps with the organization of the vaccination campaigns in the field. Coordination between these three administrative bodies needs to be strengthened to optimize the results of the vaccination campaigns.

So far, there are no national regulations in place to oversee the regulations and plans to fight against SPP in Tunisia. All existing

texts concern diseases that should be declared, but with no specific mention of SPP.

5 | ECONOMIC IMPACT OF SPP: A CASE STUDY IN TUNISIA

SPP causes high economic losses in all North African countries due to chronic debility in affected sheep with reduced production, poor growth, infertility, abortion and sometimes death. The main impact of the disease is the worldwide ban on the trade of animals and animal products). In addition, the economic consequences of capripox infections are linked to the huge costs of the annual vaccination programmes to the Tunisian government as well as the high morbidity rate as compared to the mortality rate, especially in animals over 3 months of age. In general, morbidity in endemic areas is around 10% while mortality ranges between 1% and 3% (Babiuk et al., 2008; Davies, 1991; Yeruham et al., 2007). In Tunisia, the SPP morbidity rate is higher, ranging from 3.96% to 5.97% (Table 1).

The exploratory study we describe below is, to our knowledge, the first to address the financial impact of SPP infection at the farm level. The study was conducted in the Imada of Jelma (governorate of Sidi Bouzid), in Tunisia (Figure 6), where transhumance and movement of animals across the borders of neighbouring Algeria and Libya predominate. A survey was conducted of 90 small ruminant farms comprising an average of 300,000 head of sheep, mainly raised for fattening. A limited number of veterinary officers take care of the surrounding animals. Due to the high mobility of the animals in this area, there is no annual vaccination programme. Vaccination is only done when outbreaks of SPP occur, usually resulting in a 100% morbidity rate and representing the main cause of economic loss for the farmers. The aim of this preliminary study was to roughly estimate the economic performances of the herds in relation with the occurrence of SPP outbreaks at the farm level. The estimation was based on the calculated gross margin with or without SPP infection (profit minus variable costs) which was the only indicator of economic performance in the herds that were investigated. Analysis of the collected data showed that:

1. The overall economic performance of sheep breeding is low in this region. The average annual gross margin of sheep breeders is around 14,000 Tunisian dinars (TD), equivalent to US\$6,350 per year, or a monthly gross income of 1,170 TD, equivalent to US\$531 (Table 2). Gross income includes fixed charges (livestock amortization, depreciation of equipment, etc.) and any additional costs, that is family labour and land ownership hardly guarantees the sustainability of this type of breeding.
2. The farmers' income is further reduced when losses due to sheep pox outbreaks are taken into account. These losses are of three types: the first is related to the loss of the commercial value of sick lambs. The farmer has to sell sick animals at low prices. The second type represents losses due to increased veterinary costs. The third type is due to the time allotted by the farmer to

TABLE 2 Estimated annual of sheep pox (SPP) in investigated herds ($n = 90$ farms), Jelma, governorate of Sidi-Bouzyd, Tunisia, August–September 2016

Variables for financial costs per investigated farm (means)	Minimum	Maximum	Average	SD
Annual expenses (TD)	400	19200	7045.78	3832.294
Financial profit from sales (TD)	3500	168000	61650.56	33532.569
Estimated losses due to the reduced commercial value of SPP infected lambs (TD)	150	1650	705.00	316.765
Estimated losses due to increased veterinary costs (TD)	55	605	258.50	116.147
Estimated losses due the additional time allotted by the farmer to care for sick SPP infected animals as well as for access to veterinary services (TD)	1	11	4.70	2.112
Total losses (TD)	206	2266	968.20	435.024
Number of vaccinated animals on the farm investigated	9	471	171.44	94.600
Cost of Vaccination (TD)	4.1	212.0	77.150	42.5699
Number of animals per investigated farm	10	480	176.14	95.807
Number of sick animals per investigated farm	1	11	4.70	2.112
Gross margins without SPP infection (benefits -variable costs due to SPP infection in the herd) (TD)	800	38400	14091.56	7664.587
Gross margins with SPP infection (benefits -variable breeding costs) (TD)	590	35922	13046	7187

TD, Tunisian dinars.

take care of sick animals in addition to access to veterinary services.

3. In general, the percentage of sick animals detected does not exceed 3% of the farm livestock, but the resulting damage is nevertheless significant. Indeed, gross profit losses can reach 2,478 TD, equivalent to US\$1,125 per breeder (Table 2).

In conclusion, the results of this small-scale study conducted in a region with a high risk of SPP infection associated with active transhumance and a low level of vaccination coverage, underlined the negative impact of SPP on farmers' incomes. These preliminary findings now need to be validated in a more exhaustive study that includes additional disease-dependent factors that may influence the evaluation of the economic impact of the disease.

The following steps would logically be evaluating the costs/benefits of different possible control strategies and surveillance means used to minimize the damage caused by this infection. To our knowledge, this preliminary study is the first of its kind. Further investigations are needed and could provide guidance for producers as well as for policymakers to adjust their decisions for the control of SPP in high risk areas.

6 | CONCLUSION AND PERSPECTIVES

At present, sheep pox is still considered as an endemic viral disease of small ruminants in Tunisia. The disease is present throughout the

year with peak prevalence in autumn and winter. Vaccination is the only strategy currently used to control the disease with a weak coverage rate of 50% due to several constraints. These constraints are related to the absence of a global control strategy between the four North African countries; the borders are permeable and illegal movements of animals have been persisting for decades. A second constraint is the lack of national interest: SPP has lost its former importance due to the emergence of new dangerous viral diseases such as bluetongue and PPR. As a result, the farmers have lost interest in SPP, which is no longer considered as a real threat, which, in turn, leads to a lack of interest in the annual vaccination campaigns planned by the veterinary services.

Although the health status of sheep herds with respect to SPP infections is of great concern to Tunisian authorities, any potential solutions must first consist in identifying the key points that are currently part of the strategy for disease control, such as (i) the implementation of a mass vaccination programme in the absence of animal identification, (ii) the need for a strategy to regulate transhumance and uncontrolled movements of animals, the need for a strategy to provide control schemes adapted to low or high risk areas such as prioritization of vaccination in high risk areas including well-defined buffer zones, and (iii) the addition of goats as a target species in the SPP vaccination programmes, as goats play a significant role in spreading the virus all over the country. A second option is to analyse the cost/benefit of different control strategies: slaughtering animals in the case of an outbreak of SPP with compensation paid to farmers versus vaccination combined with

suitable surveillance that would minimize the damage caused by this viral infection.

In this context, it is important to note that an enormous amount of TD is spent by the veterinary authorities on annual vaccination campaigns against SPP, ignoring the logistical problem of only vaccinating sheep against pox despite its ongoing circulation among other Tunisian livestock.

Finally, the eradication of sheep pox in Tunisia primarily depends on the priority given to the disease by the national veterinary services. The veterinary services in all North African countries need to work together to control the disease. Getting the breeders themselves involved is obviously a key to the success of any programme for the control of SPP that aims to eradicate this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank all the Tunisian farmers for their participation in the fieldwork. We thank Pr M. Zrelli for sharing data, and Dr R. Metras and Dr L. Biscornet for their critical review.

REFERENCES

- Abdo-Salem, S., Waret-Szkuta, A., Roger, F., Olive, M. M., Saeed, K., & Chevalier, V. (2011). Risk assessment of the introduction of Rift Valley fever from the Horn of Africa to Yemen via legal trade of small ruminants. *Tropical Animal Health and Production*, 2011(43), 471–480.
- Abera, Z., Degefu, H., Gari, G., & Kidane, M. (2015). Sero-prevalence of lumpy skin disease in selected districts of West Wollega zone, Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 11, 135. doi:10.1186/s12917-015-0432-7
- Achour, H. A., & Bouguedour, R. (1999). Epidemiology of sheep pox in Algeria. *Revue Scientifique et Technique OIE*, 18, 606–617.
- Achour, H. A., Bouguedour, R., Bouhbal, A., Guechtouli, A., & Aouissat, M. (2000). Comparative study of the immunizing ability of some attenuated strains of sheep pox virus and of a sensitizing vaccine. *Revue Scientifique et Technique*, 19, 773–783.
- Alkhamis, M. A., & VanderWaal, K. (2016). Spatial and temporal epidemiology of lumpy skin disease in the middle East, 2012–2015. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 19.
- Animal Health Australia (AHA) (2011). Disease Strategy Sheep pox and goat pox. Retrieved from www.animalhealthaustralia.com.au/programs/emergency-animal-disease-preparedness/ausvetplan/
- Babiuk, S., Bowden, T. R., Boyle, D. B., Wallace, D. B., & Kitching, R. P. (2008). Capripoxviruses: An emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 55, 263–272.
- Balozet, L. (1931). Expériences sur la clavelée. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, XX-3, 245–253.
- Ben Dhia, M. (1995). L'élevage ovin en Tunisie. Situation actuelle et perspective d'avenir. In G. Caja, M. Djemali, D. Gabina, & A. et Nefzaoui (Eds.), *L'élevage ovin en zones arides et semi-arides: Options Méditerranéennes* (pp. 9–20). Zaragoza: CIHEAM-IAMZ.
- Bhanot, V., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Venkatesan, G., Sen, A., Yadav, V., ... Singh, R. K. (2009). Expression of P32 protein of goatpox virus in *Pichia pastoris* and its potential use as a diagnostic antigen in ELISA. *Journal of Virological Methods*, 162, 251–257.
- Bhanuprakash, V., Indrani, B. K., Hosamani, M., & Singh, R. K. (2006). The current status of sheep pox disease. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 27–60.
- Binepal, Y. S., Ongadi, F. A., & Chepkwony, J. C. (2001). Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68, 151–153.
- Bowden, T. R., Coupar, B. E., Babiuk, S. L., White, J. R., Boyd, V., Duch, C. J., ... Boyle, D. B. (2009). Detection of antibodies specific for sheep pox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*, 161, 19–29.
- Brahmi, A. (2008). *L'élevage ovin laitier en Tunisie: Analyse de la situation actuelle, contraintes, moyens et perspectives de développement*. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, Sciences de la production animale, Institut National Agronomique de Tunisie, Tunisie.
- Buller, R. M., Arif, B. M., Black, D. N., Dumbell, K. R., Esposito, J. J., Lefkowitz, E. J., ... Tripathy, D. N. (2005). Family poxviridae. In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, & L. A. Ball (Eds.), *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 117–133). San Diego: Elsevier Academic Press.
- Cao, J. X., Gershon, P. D., & Black, D. N. (1995). Sequence analysis of HINDIII Q2 fragment of capripoxvirus reveals a putative gene encoding a G-protein-coupled chemokine receptor homolog. *Virology*, 209, 207–212.
- Carn, V. M. (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, 11, 1275–1279.
- Chan, K. W., Lee, M. L., Yang, W. C., Wong, M. L., Hsu, W. L., Ho, C. F., ... Wang, C. Y. (2014). Differential diagnosis of Goatpox virus in Taiwan by multiplex polymerase chain reaction assay and high-resolution melt analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26, 195–202.
- Dadousis, C. (2003). Sheep pox in Evros. A 7-year (1994–2000) retrospective study. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 54, 172–180.
- Damon, I. K. (2007). Poxviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, & S. E. Straus (Eds.), *Fields virology* (pp. 2947–2975). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Davies, F. G. (1976). Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goats in Kenya, with observation on the epidemiology and control. *Journal of Hygiene London*, 76, 163–171.
- Davies, F. G. (1991). Lumpy skin disease, an African capripox virus disease of cattle. *British Veterinary Journal*, 147, 489–503.
- DGSV (2010). *Direction Générale des Services Vétérinaires Tunisiens*. Ministère de l'Agriculture. Annual report. Rapport variole ovine. Situation sanitaire. DGSV-207, 1–21.
- DGSV (2015). *Direction Générale des Services Vétérinaires Tunisiens*. Ministère de l'Agriculture. Annual reports 2009–2015. Annex 1.
- Domenech, J., Lubroth, J., Eddi, C., Martin, V., & Roger, F. (2006). Regional and international approaches on prevention and control of animal transboundary and emerging diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 90–107.
- EFSA AHAW Panel (2014). EFSA Panel on Animal Health and Welfare. Scientific opinion on sheep and goat pox. *EFSA Journal*, 12, 3885. doi:10.2903/j.efsa.2014.3885
- EMPRES (1999). *Transboundary animal diseases bulletin: Issue No. 11–1999*. Division: Animal Production and Health Division.
- Fagbo, S., Coetzer, J. A., & Venter, E. H. (2014). Seroprevalence of Rift Valley fever and lumpy skin disease in African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park and Hluhluwe-impfuzi Park, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85, 1075.
- Fakhfakh, E., Le Goff, C., Albina, E., Zekri, S., Sghaier, C., Odisse, C., ... Hammami, S. (2005). Isolement et étude moléculaire de souches de virus de la clavelée et de l'ecthyma contagieux en Tunisie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 58, 7–14.
- Fèvre, E., Bronsvoort, B., Hamilton, K., & Cleaveland, S. (2006). Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends in Microbiology*, 14, 125–131.

- Galea, P., Kelly, L., & Snary, E. L. (2016). Qualitative assessment of the entry of capripox viruses into Great Britain from the European Union through importation of ruminant hides, skins and wool. *Microbial Risk Analysis*, 1, 13–18.
- Gari, G., Biteau-Coroller, F., Le Goff, C., Caufour, P., & Roger, F. (2008). Evaluation of indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the diagnosis and screening of lumpy skin disease using Bayesian method. *Veterinary Microbiology*, 129, 269–280.
- Gelaye, E., Belay, A., Ayelet, G., Jenberie, S., Yami, M., Loitsch, A., ... Lamien, C. E. (2015). Capripox disease in Ethiopia: Genetic differences between field isolates and vaccine strain, and implications for vaccination failure. *Antiviral Research*, 119, 28–35.
- Gershon, P. D., & Black, D. N. (1989). A capripoxvirus pseudogene whose only intact homologs are in other poxvirus genomes. *Virology*, 172, 350–354.
- Ghrum, A. (2010). Rapport annuel d'activités du Laboratoire de Pathologie Animale. *Rapport annuel d'activités de l'Institut Pasteur de Tunis*, 199–201.
- Haegeman, A., Zro, K., Sammin, D., Vandenbussche, F., Ennaji, M. M., & De Clercq, K. (2015). Investigation of a possible link between vaccination and the 2010. Sheep Pox Epizootic in Morocco. *Transboundary and Emerging Diseases*, ???, ???–???. doi:10.1111/tbed.12342
- Handistatus (2016). Retrieved from <http://web.oie.int/hs2/report.asp>
- Heine, H. G., Stevens, M. P., Foord, A. J., & Boyle, D. B. (1999). A capripox virus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32 the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *Journal of Immunological Methods*, 227, 187–196.
- Hosamani, M., Mondal, B., Tembhurne, P. A., Bandyopadhyay, S. K., Singh, R. K., & Rasool, T. J. (2004). Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. *Virus Genes*, 29, 73–80.
- Ireland, D. C., & Binopal, Y. C. (1998). Improved detection of capripox-virus in biopsy samples by PCR. *Journal of Virological Methods*, 74, 1–7.
- Kitchen, M., Müller, H., Zobl, A., Windisch, A., Romani, N., & Huemer, H. P. (2014). Orf virus infection in a hunter presumably transmitted by game in Western Austria. *Acta Dermato Venereologica*, 94, 212–214.
- Kitching, R. P. (1998). A recent history of foot-and-mouth disease. *Journal of Comparative Pathology*, 118, 89–108.
- Kitching, R. P. (2004). Sheep pox and goat pox. *Infectious diseases of livestock* (Coetzer JAW), 2nd edn. (pp. 1277–1281). Capetown: Oxford University Press Southern Africa.
- Kitching, R. P., McGrane, J. J., & Taylor, W. P. (1986). Capripox in the yemen arab republic and the sultanate of Oman. *Tropical Animal Health and Production*, 18, 115–122.
- Kitching, R. P., & Mellor, P. S. (1986). Insect transmission of capripox-virus. *Research in Veterinary Science*, 40, 255–258.
- Kitching, R. P., & Smale, C. (1986). Comparison of external dimensions of capripoxvirus isolates. *Research in Veterinary Science*, 41, 425–427.
- Lamien, C. E., Le Goff, C., Silber, R., Wallace, D. B., Gulyaz, V., Tuppurainen, E., ... Diallo, A. (2011). Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: Development of a classical PCR method to differentiate goat poxvirus from sheep poxvirus. *Veterinary Microbiology*, 149, 30–39.
- Lamien, C. E., Lelenta, M., Goger, W., Silber, R., Tuppurainen, E., Matijević, M., ... Diallo, A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of Virological Methods*, 171, 134–140.
- Le Goff, C., Lamien, C. E., Fakhfakh, E., Chadeyras, A., Aba-Adulugba, E., Libeau, G., ... Albina, E. (2009). Capripoxvirus G-protein protein coupled chemokine receptor: A host-range gene suitable for virus animal origin discrimination. *Journal of General Virology*, 90, 1967–1977.
- Lefèvre, P. C. (1983). *La variole ovine (clavelée) et la variole caprine. Etudes et synthèses de l'EMVT*. Maisons Alfort (France), 171.
- Le-Goff, C., Fakhfakh, E., Chadeyras, A., Aba-Adulugba, E., Libeau, G., Hammami, S., ... Albina, E. (2005). Host range phylogenetic grouping of capripoxviruses: Genetic typing of CaPVs. In H. P. S. Makkar, & G. J. Viljoen (Eds.), *Applications of gene based technologies for improving animal production and health in developing countries* (pp. 727–733). Berlin: Springer.
- Mahmood, M. A., Hesni, Z., & Afzal, S. (1988). Preparation of live sheep pox tissue culture vaccine. *Pakistan Veterinary Journal*, 8, 56–63.
- Mangana, O., Kottaridi, C., & Nomikou, K. (2008). The epidemiology of sheep pox in Greece from 1987 to 2007. *Revue Scientifique et Technique*, 27, 899–905.
- Mangana-Vougiouka, O., Markoulatos, P., Koptopoulos, G., Nomikou, K., Bakandritsos, N., & Papadopoulos, O. (1999). Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *Journal of Virological Methods*, 77, 75–79.
- Mateva, V., & Stoichev, S. (1975). Adaptation and cultivation of sheep-pox virus (strain Perego) in tissue cultures and evaluation of its immunogenic properties. *Veterinarno Meditsinsk Nauki*, 12, 18–23.
- McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 201–213.
- Mellor, P. S., Kitching, R. P., & Wilkinson, P. J. (1987). Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Research in Veterinary Science*, 43, 109–112.
- Mirzaie, K., Barani, S. M., & Bokaie, S. (2015). A review of sheep pox and goat pox: Perspective of their control and eradication in Iran. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2, 373–381.
- Mondal, B., Hosamani, M., Dutta, T. K., Senthilkumar, S. V., Rathoreand, R., & Singh, R. K. (2004). An outbreak of sheep pox on a sheep breeding farm in Jammu, India. *Revue Scientifique et Technique OIE*, 23, 943–949.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C., & Studdert, M. J. (1999). *Poxviridae* (pp. 277–291). San Diego: Veterinary Virology. Academic Press.
- Ngichabe, C. K., Binopal, Y. S., Njiru, J. W., & Carn, V. M. (1999). Evaluation of an immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of capripoxviruses. *Veterinary Record*, 145, 231–232.
- Odisse, C., Sghaier, C. H., Hammami, S., & Bejaoui, L. (1995). La Clavelée: Synthèse Bibliographique et Situation Actuelle en Tunisie. *Bull. Epid. Inf. Vet.*, 8, 1–4.
- OIE (2004). Sheep pox and goat pox, Chapter 2.1.10. In X. Xxxxx (Ed.), *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*, 5th ed. (pp. 211–220). Xxxxx: Xxxxx.
- OIE (2016). Retrieved from http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI/index/newlang/fr.OIE-WAHID.SPV/GPV/Greece.
- Orlova, E. S., Shcherbakova, A. V., Diev, V. I., & Zakharov, V. M. (2006). Differentiation of capripoxvirus species and strain by polymerase chain reaction. *Molecular Biology*, 40, 58–64.
- Pacha-Bey, A. (1931). Décret du 1er Mai 1931. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, XX-3, 243–244.
- Promed (2012). Retrieved from <http://promedmail.org/post/20120728.1218484.Israel98935511>
- Promed (2016). *Lumpy skin disease. Europe (09): Romania, preparedness, prevention*. Retrieved from <http://promedmail.org/post/20160623.4305647>
- Ramisse, J., Asso, J., Hassani, A., Anane, O., & Jemli, J. (1978). Culture du virus claveléux sur cellules: Application à la vaccination et au contrôle de l'immunité. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 31, 11–19.
- Ramyar, H., & Hessami, M. (1968). Development of an attenuated live vaccine against sheep pox. *Archives of Razi Institute*, 20, 77–80.
- Rao, T. V., & Bandyopadhyay, S. K. (2000). A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnosis. *Animal Health Research Reviews*, 1, 127–136.
- REMESA (2012). Retrieved from <http://www.fao.org/remesaneetwork/re-mesa>

- Rondia, P. (2006). Aperçu de l'élevage ovin en Afrique du Nord. *Filière Ovine et Caprine*, 18, 11–14.
- Santhamani, R., Venkatesan, G., Minhas, S. K., Shivachandra, S. B., Muthuchelvan, D., Pandey, A. B., & Ramakrishnan, M. A. (2015). Detection and characterization of atypical capripoxviruses among small ruminants in India. *Virus Genes*, 51, 33–38.
- Tian, H., Chen, Y., Wu, J., Shang, Y., & Liu, X. (2010). Serodiagnosis of sheep pox and goat pox using an indirect ELISA based on synthetic peptide targeting for the major antigen P32. *Virology Journal*, 7, 245. doi:10.1186/1743-422X-7-245
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2001). Genome of lumpy skin disease virus. *Journal of Virology*, 75, 7122–7130.
- Tuppurainen, E. S., & Oura, C. A. (2012). Review: Lumpy skin disease: An emerging threat to Europe, the Middle East and Asia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, 40–48.
- Tuppurainen, E. S. M., Venter, E. H., & Coetzer, J. A. W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 72, 153–164.
- Tuppurainen, E. S., Venter, E. H., Shisler, J. L., Gari, G., Mekonnen, G. A., Juleff, N., ... Babiuk, L. A. (2015). Review: Capripoxvirus diseases: Current status and opportunities for control. *Transboundary and Emerging Diseases*, ????, ???–???. doi:10.1111/tbed.12444
- Venkatesan, G., Balamurugan, V., & Bhanuprakash, V. (2014a). Multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of sheep pox, goatpox and orf viruses from clinical samples of sheep and goats. *Journal of Virological Methods*, 195, 1–8.
- Venkatesan, G., Balamurugan, V., & Bhanuprakash, V. (2014b). TaqMan based real-time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of capripox and orf virus genomes in clinical samples. *Journal of Virological Methods*, 201, 44–50.
- Venkatesan, G., Balamurugan, V., Bhanuprakash, V., Singh, R. K., & Pandey, A. B. (2016). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of sheep pox and goat pox viruses in clinical samples. *Molecular and Cellular Probes*, S0890–8508(16), 30014–30017.
- WAHID (2013). *World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) – Version 1*. Release date: 30 December 2013 August 2012. Retrieved from http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail.
- Yeruham, I., Nir, O., Braverman, Y., Davidson, M., Grinstein, H., Haymovitch, M., & Zamir, O. (1995). Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds. *Veterinary Record*, 137, 91–93.
- Yeruham, I., Yadin, H., Van Ham, M., Bumbarov, V., Soham, A., & Perl, S. (2007). Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheep pox in a dairy sheep flock. *Veterinary Record*, 160, 236–237.
- Zangana, I. K., & Abdullah, M. A. (2013). Epidemiological, clinical and histopathological studies of lamb and kid pox in Duhok, Iraq. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 16, 133–138.
- Zhao, Z., Fan, B., Wu, G., Yan, X., Li, Y., Zhou, X., ... Zhang, Q. (2014). Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat pox virus and sheep pox virus. *BMC Microbiology*, 14, 10.
- Zro, K., Azelmat, S., Bendouro, Y., Kuhn, J. H., El Fahime, E., & Ennaji, M. (2014). PCR-based assay to detect sheep pox virus in ocular, nasal, and rectal swabs from infected Moroccan sheep. *Journal of Virological Methods*, 204, 38–43.

How to cite this article: Ben Chehida F, Ayari-Fakhfakh E, Caufour P, et al. Sheep pox in Tunisia: Current status and perspectives. *Transbound Emerg Dis*. 2017;00:1–14. <https://doi.org/10.1111/tbed.12656>