



**HAL**  
open science

# Etude de la virulence du virus de la Peste des Petits Ruminants en relation avec la variabilité de la réponse de l'hôte

Roger-Junior Eloiflin

► **To cite this version:**

Roger-Junior Eloiflin. Etude de la virulence du virus de la Peste des Petits Ruminants en relation avec la variabilité de la réponse de l'hôte. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTG087 . tel-03635657

**HAL Id: tel-03635657**

**<https://theses.hal.science/tel-03635657v1>**

Submitted on 8 Apr 2022

**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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Biologie des interactions - Evolution des systèmes infectieux

École doctorale GAIA

Unité de recherche ASTRE - Animal, Santé, Territoires, Risques et Ecosystèmes

## Etude de la virulence du virus de la Peste des Petits Ruminants en relation avec la variabilité de la réponse de l'hôte

Présentée par Roger-Junior ELOIFLIN  
Le 17 Décembre 2021

Sous la direction de Philippe TOTTE  
Et l'encadrement d'Arnaud BATAILLE et d'Artur SUMMERFIELD

Devant le jury composé de

Dr Branka HORVAT, DR CIRI, Université de Lyon 1

Dr David BIRON, CR CNRS, Université Clermont-Auvergne

Pr Stéphane BERTAGNOLI, PU, ENVT Toulouse

Dr Anne-Nathalie VOLKOFF, DR INRAE, Université de Montpellier

Dr Sophie THEVENON, Chercheur IRD, Université de Montpellier

Dr Philippe TOTTE, Chercheur CIRAD, Université de Montpellier

Dr Arnaud BATAILLE, Chercheur CIRAD, Université de Montpellier

Pr Artur SUMMERFIELD, PU, Université de Berne

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Invité/Encadrant

Invité/Encadrant



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



Je dédie cette thèse à ma grand-mère,

Kolmane Kassi Gnima,

décédée pendant la rédaction de cette thèse.

Merci mamie pour ta gentillesse.

Que la terre te soit légère.





## Remerciements

Je tiens à remercier mes encadrants de thèse Arnaud, Artur, Philippe T., Valérie, Philippe H. et Geneviève de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Travailler avec vous a été stimulant, passionnant et agréablement bon. Les milliers d'heures que j'ai passées à travailler sur tous les aspects de cette thèse ont été si douces que même dans mes espoirs les plus fous, je n'aurais pas pu rêver d'un meilleur encadrement. Vous avez su me soutenir tout au long de ce voyage et ma gratitude vous est acquise.

Je remercie sincèrement les Dr Branka Horvat et David Biron d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs et d'être membres du jury.

Je remercie également Pr Stéphane Bertagnoli ainsi que les Dr Anne Nathalie Volkoff et Sophie Thevenon d'accepter d'évaluer ce travail et d'être aussi membres du jury.

### Aux membres de l'UMR ASTRE :

Merci pour votre accueil et votre générosité. Ce fût un réel honneur pour moi de partager votre quotidien au cours des ces 3 années et demi.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'équipe de PPR, Arnaud, Geneviève, Olivier, Renata, Samia et Camille ainsi que Valérie et Philippe T. Merci de m'avoir prêté toute votre expertise, de m'avoir soutenu dans tous les aspects de cette thèse et d'avoir répondu avec calme et patience aux questions quotidiennes dont je vous accablais.

Aux fidèles Dr Moreau Y., Dr Mignotte A., Dr Triay C., "Dr" Lutrat C. Dr Pereira de Oliviera R., Antoni, Celia B. et à vous jeunes padawans du labo, merci pour votre bonne humeur, pour les soirées et les journées passées à discuter des problèmes qui nous lient tous et autour des pressions (IPA, lagger et autres) qui nous unissent.

### A ma famille,

Je tiens à exprimer ma gratitude à ma famille qui a toujours été là pour moi. Merci pour leur soutien indéfectible et pour tous les sacrifices consentis afin que je puisse poursuivre mes études. Je remercie mes très chers parents Banga et Nicole et leurs conjoints respectifs Colette et Dinard ainsi que tous mes frères et sœurs Marie-Danielle, Marjorie-Diane, Michelle-Dominique, Joseph Claude, Maeva et Loïc.

### A mon autre famille,

Tic, Tac, Tibor, Jodie, Crousti, Alex, Belkelor & Bou et charbiloula la magnifique pour n'en citer que quelques-uns, je n'ai pas de mots pour exprimer ce que je ressens pour vous. Merci les amis pour tout !

A vous bernees, Obdulio, Sylvie, Aurelie, Gaël, Thomas, Loïc, Deborah, kemal, Charaf, Adriano et j'en passe, compagnons de haut vol et scientifiques hors pair, merci pour votre accueil chaleureux. Merci filmal ! !!!!!

Je n'oublie pas Emilia et Super Nathan, merci beaucoup de m'avoir intégré si facilement. Sans vous, mittelhausern aurait eu raison de moi à quelques reprises. J'espère vous revoir très bientôt.

A toi Quentin, collègue de qualité supérieure, docteur de l'université de Montpellier (chapeau l'artiste) et compatriote de galère, ces années passées dans notre Pueblo ont été formidables, ton soutien dans toutes ces épreuves me rend si fier de faire partie de tes amis. Ne t'inquiète pas Bea, je ne compte pas t'oublier toi qui as un problème avec la technologie dans ce monde qui bouge si vite. Merci pour tout le soutien et pour m'avoir donné les meilleurs conseils quand j'avais mal, chère grande pharmacienne !

Et à toi, P, qui m'a rejoint dans ce voyage et qui commence à peine le tien. Je tiens à te remercier pour ton soutien indéfectible, ta patience et ta présence même pendant la tempête de ces derniers mois. C'est à ton tour maintenant. Make me proud mon minou !

## ABSTRACT

Peste des petits ruminants (PPR) is a highly pathogenic viral disease caused by peste des petits ruminants virus (PPRV). The virus, which belongs to the genus *Morbillivirus*, infects primarily small domestic ruminants (goats and sheep) but also suids and wild artiodactyls. In nature, the disease occurs in three main forms: superacute, acute and subacute. Acute forms are characterised by the appearance of symptoms (such as coughing, diarrhoea, runny eyes and nose) leading to high morbidity and mortality. Inapparent forms, which are difficult to detect, may contribute to the silent spread of the disease. In this thesis, we sought to determine the viral or host factors that lead to the appearance or non-appearance of disease symptoms. To this end, we applied a multi-omics approach including next generation sequencing methods (DNA, RNA), flow cytometry and mass spectrometry.

Results obtained from comparative genomic analyses show that a small number of mutations can influence the virulence of a PPRV strain. These mutations, distributed throughout the viral genome, can be associated with the attenuation of a virulent strain through notably a reduction in replicative capacity in its natural hosts. As the virulence of a virus strain is also tightly linked with its interaction with the host immune system, we analysed the response of Saanen goats to infection with PPRV strains of different virulence. Vaccination as well as infection with the low virulence PPRV Côte d'Ivoire 1989 strain did not induce any disease symptoms. These strains showed low replication in immune-competent cells (APCs and lymphocytes). This weak replication, in addition to the induction of an effective antiviral response, is partly responsible for the absence of symptoms observed. The highly virulent PPRV Morocco 2008 strain has a high level of replication and induces an activation of antiviral and inflammatory responses that subsides after the synthesis of virus-specific antibodies. The key elements underlying these responses are explained and discussed throughout the different chapter of this thesis.

Keywords: Peste des Petits Ruminants, Immune response, virulence, multi-omics

## TABLE DES MATIERES

<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Liste des tableaux et des figures</b>	<b>6</b>
<b>Abréviations</b>	<b>9</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>14</b>
1. Généralités sur les morbillivirus	14
a. Modes de transmission	16
b. Cycle de réplication virale	18
c. Le virus de la rougeole (MV)	19
d. Le virus de la peste bovine (RPV)	22
e. Le virus de la maladie de carré (CDV)	24
f. Autres morbillivirus	26
2. Le virus de la peste des petits ruminants (PPRV)	30
3. Les morbillivirus (PPRV) et le système immunitaire	37
a. Entrée dans le système immunitaire	38
b. Réponse immunitaire innée	42
c. Réponse immunitaire adaptative	51
4. Objectifs de la thèse	57
<b>II. Travaux de recherche</b>	<b>61</b>
1. Identification des mutations impliquées dans la virulence des souches PPRV	61
a. Etude de l'atténuation de la souche vaccinale Nigéria 75/1	61
i. Article 1: <i>Evolution of Attenuation and Risk of Reversal in Peste des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria 75/1</i>	63
b. Etude comparative des souches virulentes PPRV MA08 et PPRV IC89	81
2. Identification <i>in vitro</i> des facteurs de la réponse immunitaire associés à la sensibilité de l'hôte à l'infection par le PPRV	88
a. Infection des cellules présentatrices d'antigènes par des souches de différentes virulences du PPRV 88	
i. Caractérisations morphologiques des monocytes, MoMs et MoDCs	92
ii. Niveaux d'expression de différents marqueurs cellulaires et caractérisation des schémas d'infection des CPA	93
iii. Discussion des résultats préliminaires de cette étude	96
b. Infection des lymphocytes activés par des souches du PPRV de virulences différentes	101
i. Article 2: <i>Identification of differential responses of goat PBMCs to PPRV virulence using a multi-omics approach</i>	102
3. Identification <i>in vivo</i> des facteurs de la réponse immunitaire associés à la sensibilité de l'hôte à l'infection par le PPRV	117
a. Pathologie induite par les différentes souches	117
i. Article 3: <i>Comparative pathogenesis of peste des petits ruminants virus strains of difference virulence</i>	118
b. Détermination des facteurs du système immunitaire influençant la différence de virulence <i>in vivo</i> en utilisant l'approche multi-omique	165
ii. Evaluation de la dynamique et de l'infection des sous populations de lymphocytes T et des CPA	169
iii. Biologie des systèmes impliqués dans les réponses des cellules immunitaires au cours des infections	170

iv.	Analyse de l'accumulation de protéines cellulaires au cours des infections	180
v.	Discussion des résultats de l'étude multi-omique	183
<b>III.</b>	<b>Discussion générale</b>	<b>191</b>
<b>IV.</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>205</b>
<b>V.</b>	<b>Communications</b>	<b>207</b>
<b>References</b>		<b>210</b>
<b>Résumé</b>		<b>231</b>

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

**Tableau 1.** Représentation des SNP à haute fréquence.

**Tableau 2.** Familles correspondant aux différents BTMs.

**Figure 1.** Représentation schématique du virion et de l'organisation du génome des morbillivirus.

**Figure 2.** Représentation schématique du cycle de réplication des Morbillivirus adaptée de Kumar *et al.* (2014).

**Figure 3.** Arbre phylogénétique représentant les différents morbillivirus.

**Figure 4.** Relation phylogénétique entre les différents morbillivirus basée sur l'hémagglutinine virale.

**Figure 5.** Représentation des moyens possibles de transmissions du PPRV.

**Figure 6.** Symptômes de la PPR.

**Figure 7.** Distribution des foyers de PPR dans le monde.

**Figure 8.** Modulation de la réponse interféron par les protéines virales du PPRV.

**Figure 9.** Représentation schématique du modèle d'infection par le PPRV.

**Figure 10.** Infections des cellules Vero et 10T1/2 par les souches virulentes PPRV IC89 et MA08.

**Figure 11.** Analyse du séquençage des souches virulentes de PPRV IC89 et MA08.

**Figure 12.** Représentation des différents domaines de la protéine de fusion.

**Figure 13.** Schéma récapitulatif de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (MoDCs) et macrophages (MoMs).

**Figure 14.** Schéma récapitulatif du processus de marquage cellulaire des cellules infectées par le PPRV.

**Figure 15.** Aspects morphologiques des cellules présentatrices d'antigènes de chèvres.

**Figure 16.** Marqueurs cellulaires exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes de chèvres.

**Figure 17.** Infection des cellules présentatrices d'antigènes avec différentes souches du PPRV.

**Figure 18.** Mécanisme hypothétique du rôle des macrophages (MoMs) dans les premiers stades de l'infection par le PPRV.

**Figure 19.** Stratégie de sélection et d'évaluation du pourcentage des sous-populations de PBMCs.

**Figure 20.** Dynamique et taux d'infection des sous-populations lymphocytaires et des CPA au cours de l'expérience.

**Figure 21.** Détection du nombre de lectures virales dans les PBMCs collectées pendant l'expérience.

**Figure 22.** Modules liés à l'interféron de type I et à l'inflammation induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.

**Figure 23.** Modules liés aux cellules myéloïdes, aux DC et à la présentation antigénique induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.

**Figure 24.** Modules liés au cycle cellulaire induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.

**Figure 25.** Modules liés aux cellules T, NK et B induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.



**Figure 26.** Modules liés aux différentes familles induites pendant la vaccination par la souche vaccinale PPRV Nigéria75/1.

**Figure 27.** Modules liés aux différentes familles induites après l'inoculation du témoin.

**Figure 28.** Réseaux d'interactions protéines-protéines générés pendant la vaccination des chèvres Saanen.

**Figure 29.** Réseaux d'interactions protéines-protéines générés après l'infection des chèvres Saanen par la souche IC89.

**Figure 30.** Réseaux d'interactions protéines-protéines générés après l'infection des chèvres Saanen par la souche MA08.

**Figure 31.** Réseaux d'interactions protéines-protéines générés après l'inoculation des chèvres Saanen par le témoin.

**Figure 32.** Relations théoriques entre la virulence du PPRV et les quasi-espèces virales au cours des passages en série *in vitro*.

**Figure 33.** Représentation des mécanismes impliqués dans l'immunomodulation *in vitro* lors de l'infection des PBMCs activées par souches de virulences différentes du PPRV.

**Figure 34.** Représentation hypothétique des mécanismes d'immunomodulation induits lors de la vaccination ou de l'infection des chèvres Saanen par la souche faiblement virulente IC89.

**Figure 35.** Représentation hypothétique d'immunomodulation induits lors de l'infection de chèvres Saanen par la souche hautement virulente MA08.

ABREVIATIONS

**AA** : Acide aminé

**ADCC** : Cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADN<sub>c</sub>** : ADN complémentaire

**AKAP9** : Protéine d'ancrage A-kinase 9

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARN<sub>db</sub>** : Acide ribonucléique double brin

**ARN<sub>m</sub>** : Acide ribonucléique messenger

**ARN<sub>ss</sub>** : ARN monocaténaire

**AZU1** : Azurocidine

**BCR** : Récepteur des cellules B

**BMDC** : Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse

**BTM** : Modules transcriptionnels du sang

**BME** : *Basal Medium Eagle*

**BWA** : *Burrows-Wheeler Aligner*

**CARD** : Domaines d'activation et de recrutement des caspases

**CARDIF** : CARD induisant l'IFN- $\beta$

**CATH** : Cathelicidin

**cDNA** : ADN complémentaire

**CDS** : régions codantes

**CDV** : Virus de la maladie de carré

**CeMV** : Morbillivirus des cétacés

**CEP290** : Néphrocystine 6

**CHAPS** : 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propanesulfonate

**CHS** : *CV1 cells expressing the goat-sheep Signaling Lymphocyte Activation Molécule SLAM*

**CIRAD** : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**ConA** : Concanavaline A

**CPA** : Cellules présentatrices d'antigènes

**CPE** : effet cytopathogène

**CTL** : Lymphocytes T cytotoxiques

**DC** : Cellules dendritiques

**DC-SIGN** : Lectine de type C spécifique des cellules dendritiques

**DEG** : Gène exprimé de manière différentielle

**DMEM** : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMV**

**DPI** : Days Post Infection

**DrMV** : Morbillivirus de la chauve-souris vampire

**ELISA** : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**EPO** : Érythropoïétine

**ER** : Réticulum endoplasmique

<b>F:</b> Protéine de fusion	<b>IGV:</b> <i>Integrative Genome Viewer</i>
<b>FAO:</b> Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture	<b>IL:</b> Interleukine
<b>FDC:</b> Cellules dendritiques folliculaires	<b>IPA:</b> <i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
<b>FDR:</b> <i>False Discovery Rate</i>	<b>IPS-1:</b> Protéine 1 de stimulation du promoteur de l'IFN- $\beta$
<b>FeMV:</b> Morbillivirus félin	<b>IRF:</b> <i>Interferon Regulatory Factors</i>
<b>FmoPV:</b> Morbillivirus félin	<b>ISG:</b> <i>Interferon Stimulated Genes</i>
<b>FSC:</b> <i>Forward scatter</i>	<b>IVRI:</b> Institut Indien de Recherche Vétérinaire
<b>GADD:</b> Protéine inductible par les dommages causés à l'ADN	<b>JAK:</b> Janus kinase
<b>GliaR:</b> Récepteur des cellules gliales	<b>Kb:</b> Kilobase
<b>GM-CSF:</b> Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages	<b>L:</b> Polymérase virale
<b>GSEA:</b> <i>Gene set enrichment analysis</i>	<b>LC-MS:</b> <i>liquid chromatography – mass spectrometry</i>
<b>H:</b> Hémagglutinine	<b>LFA:</b> Antigène associé à la fonction lymphocytaire
<b>HBD:</b> <i>H binding domain</i>	<b>LFQ:</b> <i>Label-free quantification</i>
<b>HEK:</b> <i>Human embryonic kidney</i>	<b>LGP2:</b> Laboratoire de génétique et de physiologie 2
<b>H&amp;E:</b> <i>Hematoxylin and Eosin</i>	<b>LT:</b> Lymphocyte T
<b>HPI:</b> <i>Hours post infection</i>	Lymphocyte <b>ICM:</b> Lymphocyte spécifique de la mémoire centrale
<b>HRB:</b> <i>Heptad Repeat B</i>	Lymphocyte <b>TEM:</b> Lymphocyte spécifique de la mémoire effectrice
<b>HRC:</b> <i>Heptad Repeat C</i>	<b>M:</b> Protéine de matrice
<b>IC89:</b> PPRV Côte d'Ivoire 1989	<b>MA08:</b> PPRV Maroc 2008
<b>ICAM:</b> Molécule intercellulaire d'adhésion	<b>MAPK:</b> Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>ICTV:</b> <i>International committee on taxonomy viruses</i>	<b>MAVS:</b> Protéine de signalisation antivirale mitochondriale
<b>IFN:</b> <i>Interferon</i>	

**MDA-5:** Antigène 5 de différenciation du mélanome

**MEM:** *Minimum Essential Medium*

**MERS:** Syndrome respiratoire du Moyen-Orient

**miARN:** *Micro-ARN*

**MIBE:** Encéphalite à corps d'inclusion de la rougeole

**mM:** millimolaire

**MoDCs:** *Monocytes derived dendritic cells*

**MOI:** *Multiplicity of infection*

**MoMs:** Monocytes derived macorphages

**MV:** Virus de la rougeole

**MX1/2:** *Dynamain Like GTPase 1/2*

**N:** Nucléoprotéine

**NES:** Normalised enrichment score

**NGS:** Séquençage de nouvelle génération

**NK:** Cellules tueuses naturelles, *Natural killer*

**NKT:** Cellules T tueuses naturelles

**OAT:** *Ornithine aminotransferase*

**OIE:** Organisation internationale de la santé animale

**OMS:** Organisation mondiale de la santé

**P:** Phosphoprotéine

**PAMPs:** Motifs moléculaires associés à des agents pathogènes

**PBMC:** Cellules mononucléaires du sang périphérique

**PBS:** Phosphate Buffer Saline

**PCR:** Réaction de polymérisation en chaîne

**PDA:** Protéines différenciellement accumulées

**PDV:** Virus de la maladie de Carré du phoque

**PERK:** Kinase du réticulum endoplasmique de type PKR

**PFA:** Paraformaldéhyde

**PGLYRP1:** protéine 1 de reconnaissance du peptidoglycane

**PKR:** Protéine kinase R

**PMV :** Morbillivirus des marsouins

**PoMV:** Morbillivirus porcin

**PPR:** Peste des Petits Ruminants

**PPRV:** Virus de la PPR

**PRR:** Récepteurs de reconnaissance des pathogènes

**Q-PCR:** PCR quantitative

**RACE PCR:** Rapid amplification of cDNA-ends by PCR

**RIG-I:** protéine du gène I inductible par l'acide rétinoïque

**RQN:** RNA Quality Number

**RNP:** Ribonucléoprotéine

**RPV:** Virus de la peste bovine

**RT:** Reverse transcriptase

**RT-PCR:** Reverse transcription PCR

**SARS:** Syndrome respiratoire aigu sévère

**SCC:** *Squamous cell carcinoma*

**SDS:** *L-serine dehydratase/L-threonine deaminase*

**siRNA:** Petits ARN interférents

**SIRP $\alpha$ :** *Signal regulatory protein  $\alpha$*

**SLAM:** *Signaling Lymphocytic Activation Molecule*

**SNC:** Système nerveux central

**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphism*

**SNV:** *Single nucleotide variations*

**SP:** Peptide signal

**SRA:** *Sequence read archive*

**SSC:** *Side scatter*

**SSPE:** Panencéphalite sclérosante subaiguë

**STAT:** *Signal transducers and activators of transcription*

**STRING :** *Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis*

**TCR:** Récepteur des cellules T

**TFH:** T folliculaires auxiliaires

**TFR:** T folliculaires régulateur

**TGF:** Facteur de croissance transformant

**Th:** *T helper*

**TLR:** Récepteur de type Toll

**Treg:** T régulateurs

**TYK:** *Tyrosine kinase*

**$\mu$ L:** microlitre

**VCF:** *Variant Call Format*

**VISA:** Adaptateur de signalisation induite par le virus

**VN751:** Vaccin PPRV Nigéria 1975

**VNT:** Test de neutralisation viral

# *Introduction*

# I INTRODUCTION

## 1. Généralités sur les morbillivirus

Les virus du genre *Morbillivirus* sont des pathogènes dominants dans les populations humaines et animales dont les effets sur l'économie, la sécurité alimentaire et la biodiversité sont importants (Delpeut *et al.* 2014; Abdullah *et al.* 2018). Il s'agit d'un genre viral appartenant au *Paramyxoviridae*, une famille de virus enveloppés, non segmentés et à ARN simple brin de polarité négative.

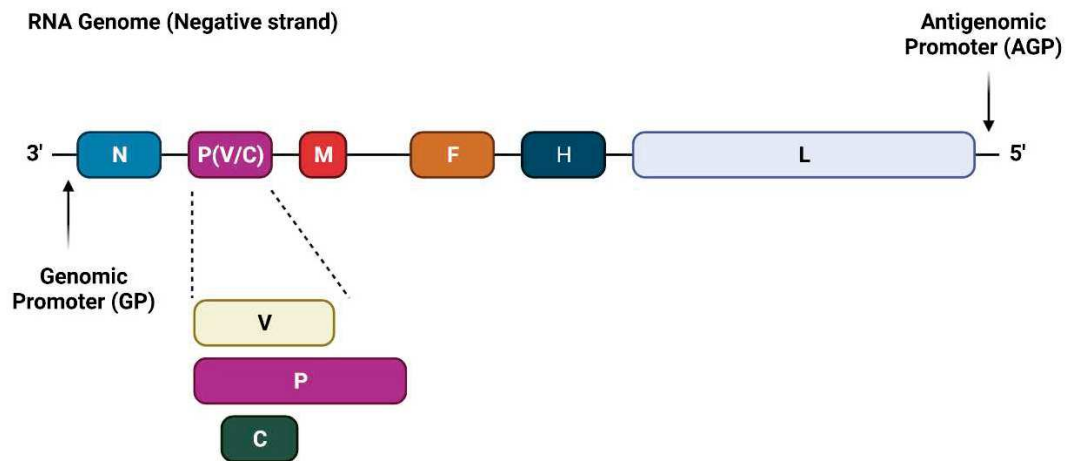
Les virions revêtent plusieurs formes mais sont majoritairement des particules sphériques de 150-300 nm de diamètre, constituées d'une ribonucléoprotéine (RNP) entourée d'une enveloppe de protéines virales. La taille du génome des morbillivirus varie de 15.7 à 16kb et suit la « règle de six » : le nombre de nucléotides dans chaque génome doit être un multiple de 6, car dans la RNP chaque nucléoprotéine (N) couvre 6 nucléotides, ce qui est nécessaire pour assurer une réplication et une transcription efficaces des virus de la famille *Paramyxoviridae* (Calain & Roux 1993).

Ces génomes contiennent 6 gènes qui codent pour six protéines structurales et deux protéines non structurales. Les protéines structurales sont les suivantes : la protéine de nucléocapside N, la phosphoprotéine P, la protéine de matrice M, l'hémagglutinine H, la protéine de fusion F et l'ARN polymérase ARN-dépendante L. Le génome est encapsidé par les protéines N, P et L formant ainsi la ribonucléoprotéine. La transcriptase ARN provoque une insertion d'une pseudo-guanidine au milieu du gène codant pour la protéine P. Cette erreur conduit à la synthèse des deux protéines non structurales V et C (Pfeffermann *et al.* 2018). La [Figure 1](#) montre l'organisation du génome et la structure protéique des morbillivirus.

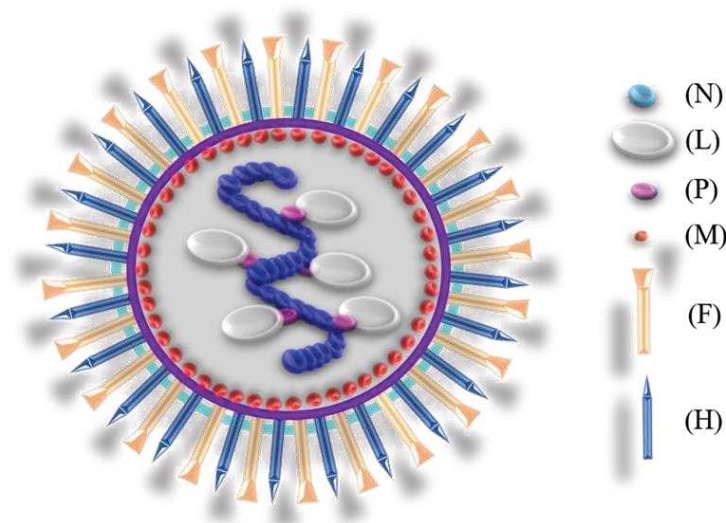
Dans des populations d'hôtes n'ayant jamais été exposées à ces virus, les morbillivirus sont à l'origine d'épidémies dévastatrices associées à de forte morbidité et mortalité.

Les individus qui survivent aux infections développent une immunité à vie (Vries *et al.* 2015; Cosby & Weir 2018).

A



B



**Figure 1. Représentation schématique du virion et de l'organisation du génome des morbillivirus.** (A) Le génome des morbillivirus est une molécule d'ARN à sens négatif monocaténaire non segmentée. Le génome comprend six unités transcriptionnelles (N, P, M, F, H et L), un promoteur génomique à l'extrémité 3' (GP) et un promoteur anti-génome à l'extrémité 5' (AGP). Le gène P code pour deux protéines non structurales supplémentaires, C et V. (B) Les virions des morbillivirus sont formés à partir des protéines structurales. Les glycoprotéines (F et H) sont intégrées dans l'enveloppe virale. Les protéines M tapissent la surface interne de l'enveloppe virale. Le complexe ribonucléoprotéique est composé de protéines N, P et L en association avec le génome ARN. Représentation adaptée de Parida *et al.* (2015).



### a. Modes de transmission

Ces virus sont très contagieux et se propagent par voie respiratoire causant des détresses respiratoires. Les contaminations par morbillivirus se font soit par inhalation de gouttelettes d'aérosol ou de particules virales en suspension dans l'air, soit par contact direct avec des vecteurs passifs ou des fluides biologiques contaminés. En plus des transmissions horizontales, certaines indications révèlent des transmissions verticales de certains morbillivirus tels que le virus de la rougeole et celui de la maladie de Carré (Pfeffermann *et al.* 2018).

La plupart des morbillivirus possèdent des hôtes spécifiques. La spécificité d'espèce implique l'existence d'une barrière d'espèce « hypothétique » qui empêche le passage des virus d'une espèce à une autre. Le virus de la rougeole (MV) infecte les humains et les primates (Rima & Duprex 2006). Le virus de la maladie de carré (CDV) infecte les chiens mais aussi les carnivores sauvages (Martinez-Gutierrez & Ruiz-Saenz 2016). Le virus de la peste bovine (RPV) aujourd'hui éradiqué, infectait principalement les bovins domestiques (Tounkara & Nwankpa 2017). Le virus de la peste des petits ruminants (PPRV) infecte les chèvres, les moutons et un large éventail d'artiodactyles sauvages (Dou *et al.* 2020).

Plusieurs éléments indiquent que les morbillivirus peuvent passer la barrière d'espèce. Cette transmission entre espèces pourrait être liée à l'observation selon laquelle le MV, le CDV et le RPV peuvent se répliquer efficacement dans des cellules exprimant des récepteurs d'entrée d'hôte inhabituels (Rijks *et al.* 2008).

Cependant, les preuves de la transmission entre espèces ne sont pas surprenantes, étant donné l'origine commune de ces virus. En effet, la plupart des morbillivirus ont évolué à partir d'un ancêtre commun, qui s'est adapté à différents hôtes mammifères, indiquant ainsi une forte capacité d'évolution et d'adaptation à de nouveaux hôtes (Vries *et al.* 2015; Cosby & Weir 2018).

Une des plus grandes restrictions aux passages entre espèces est l'entrée des virus. L'identification des récepteurs cellulaires a permis d'établir le chemin d'infection de ces virus (Delpeut *et al.* 2014). Les morbillivirus ciblent dans un premier temps, les cellules immunitaires (lymphotropisme) par le biais du récepteur SLAM (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule*) avant de se propager aux épithéliums respiratoires (épithéliotropisme) par le biais de la protéine de jonction d'adhérence nectin-4 (Sawatsky *et al.* 2018). L'hémagglutinine H permet l'attachement de ces virus à ces récepteurs (Vries *et al.* 2015; Cosby & Weir 2018).

Une stratégie possible pour analyser les capacités d'un morbillivirus à infecter certaines espèces consiste à infecter des cellules exprimant leur récepteur SLAM. Une seule substitution d'acide aminé sur la protéine H a suffi pour permettre à une souche de la maladie de Carré isolée d'un chien à l'aide de cellules exprimant le SLAM canin, d'interagir avec le SLAM du ouistiti (Seki *et al.* 2003). Par ailleurs, la protéine H du virus de la rougeole peut interagir avec les SLAM humains, canins et tamaris, ce qui suggère que cette protéine reconnaît des résidus d'acides aminés qui sont conservés entre ces espèces (Fukuhara *et al.* 2019).

La similarité génétique et de cycle de vie peut suggérer un potentiel zoonotique des morbillivirus infectant des hôtes non humains. Par exemple, le virus de la peste des petits ruminants (PPRV), relativement proche de celui de la rougeole (MV), est incapable d'utiliser les récepteurs des cellules humaines. Néanmoins, un seul changement d'acide aminé est suffisant pour permettre de passer cette restriction, montrant ainsi le potentiel zoonotique de cette maladie (Abdullah *et al.* 2018).

Les récepteurs de la famille SLAM sont un ensemble de neuf glycoprotéines (SLAMF1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9) conservées à la surface des cellules immunitaires (O'Connell *et al.* 2019).

La molécule SLAMF1 (également connue sous le nom de CD150), exprimée à la surface des cellules B et T activées, des cellules dendritiques (DC) et des macrophages, est le principal récepteur d'entrée des morbillivirus dans le système immunitaire (Tatsuo *et al.* 2001).

La glycoprotéine Nectin-4 est une protéine cellulaire exprimée à la surface des cellules épithéliales primaires des voies respiratoires et de nombreuses lignées de cellules d'adénocarcinome d'origine pulmonaire, mammaire et du côlon. Ce récepteur a été identifié comme un récepteur épithélial pour plusieurs morbillivirus et il est impliqué dans la sortie du virus des voies respiratoires et dans la transmission par les aérosols (Noyce & Richardson 2012).

---

### b. Cycle de réplication virale

Le cycle de réplication des morbillivirus débute par l'attachement des virus à la cellule-hôte. Cet attachement est médié par l'interaction entre la protéine Hémagglutinine H virale et les récepteurs cellulaires (SLAM ou Nectin 4). Cette étape d'attachement permet l'activation de la protéine de Fusion virale qui permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et le relargage du matériel génétique viral à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte.

Du fait de la polarité négative de leur ARN, la réplication du génome des morbillivirus démarre dans le cytoplasme par la formation des ARN messagers (ARNm de polarité positive) codant pour les différentes protéines virales. La formation des ARNm s'initie par la fixation de l'ARN polymérase ARN dépendante virale à l'extrémité 3' du génome négatif. La transcription des gènes viraux débute par celle du gène codant pour la nucléoprotéine N. La transcription d'un gène s'achève par l'ajout d'une queue poly (A) et marque le début de la transcription du gène suivant.

L'efficacité de passage de la polymérase au gène suivant n'est pas systématique. La polymérase peut se détacher après la transcription de chaque gène, mais la transcription ne peut s'initier qu'au niveau du promoteur à l'extrémité 3' du génome viral. Ainsi, la quantité relative de chacun des transcrits est fonction de l'ordre des gènes. Les ARNm du gène N situés à l'extrémité 3, sont les plus abondants contrairement à ceux du gène L, situés à l'extrémité 5' du génome.

Les protéines virales sont par la suite synthétisées par les ribosomes cellulaires. Les glycoprotéines de l'enveloppe sont synthétisées à partir des ribosomes puis subissent une maturation dans le réticulum endoplasmique et sont transportées jusqu'à la membrane cellulaire en passant par l'appareil de Golgi. Les autres protéines sont produites dans le cytosol.

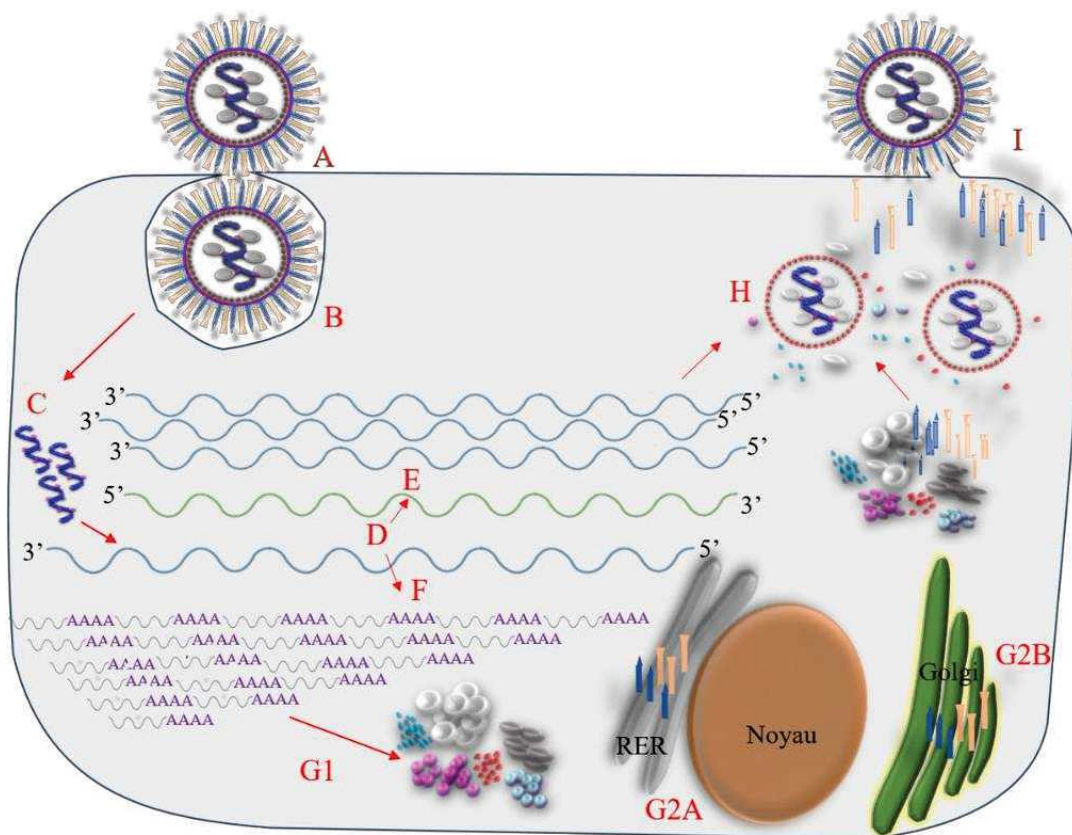
Après la synthèse des ARNm, le génome viral peut ensuite être répliqué en anti-génome positif. C'est cet anti-génome qui sert de matrice pour la synthèse de plusieurs copies du génome viral. Les génomes néosynthétisés s'assemblent avec les protéines N, L et P pour former les nucléocapsides. Celles-ci sont ensuite dirigées vers la membrane cellulaire pour se lier dans le cytosol aux protéines d'enveloppe transmembranaires du virus. La membrane se replie et la particule virale est libérée par bourgeonnement (Parida *et al.* 2015b; Kumar *et al.* 2014). Les différentes étapes du cycle de répllication des morbillivirus sont résumées dans la [Figure 2](#).

---

### c. Le virus de la rougeole (MV)

Le virus de la rougeole est le seul morbillivirus affectant l'homme. Il existe au moins 22 génotypes du virus de la rougeole, répartis en 8 clades (Rima & Duprex 2006). Ce virus est à l'origine de la maladie éponyme, qui est une cause importante de morbidité et de mortalité infantile.

La prédisposition accrue aux infections opportunistes qui en découle peut entraîner des complications telles qu'une pneumonie, des troubles gastro-intestinaux et des éruptions maculo-papuleuses (taches cutanées superficielles). Les éruptions maculo-papuleuses associées au virus de la rougeole sont supposées être dues à la réponse des cellules T à l'infection. Ainsi, les personnes immunodéprimées ne présentent pas ce symptôme (Vries *et al.* 2015).



**Figure 2. Représentation schématique du cycle de réplication des Morbillivirus adaptée de Kumar et al (2014).** (A) Etape d'attachement du virus grâce aux glycoprotéines Hémagglutinine de la surface virale qui interagissent avec les récepteurs cellulaires de type SLAM ou Nectin-4. (B) Etape de fusion des membranes permise par la protéine de fusion virale. (C) Décapsidation cytoplasmique. (D, E) Réplication du génome viral. (F, G1) Transcription et traduction des différentes protéines virales. (G2A, G2B) Modifications post-traductionnelles des protéines virales. (H) Assemblage de la particule virale à la membrane. (I) Bourgeonnement des particules virales.

Des atteintes du système nerveux central (SNC) sont souvent observées chez les individus infectés par ce virus. La rougeole peut par exemple induire la panencéphalite sclérosante subaiguë (SSPE) et l'encéphalite à corps d'inclusion de la rougeole (MIBE) qui surviennent chez les personnes immunodéprimées (Cosby & Weir 2018).

En raison de la forte capacité d'infection de la rougeole, une immunité collective d'au moins 95 % est nécessaire pour prévenir les épidémies sporadiques (Pfeffermann *et al.* 2018). Le  $R_0$ , qui représente le nombre de cas secondaires pouvant être générés à partir d'un cas index dans une population sensible, est estimé à 15 pour le virus de la rougeole. La disponibilité de vaccins sûrs et efficaces à base de virus vivants atténués a permis de réduire considérablement la morbidité et la mortalité liées à la rougeole. La vaccination a réduit de 90% le nombre de cas de rougeole à travers le monde (Rima & Duprex 2006).

Du fait de la disponibilité des moyens de diagnostics et de contrôles efficaces, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avait pour objectif d'éradiquer cette maladie pour 2020 (Cosby & Weir 2018). Cependant, il existe un risque que des morbillivirus émergent de réservoirs zoonotiques pour occuper la niche écologique de la rougeole, comme cela a été observé pour les virus de l'influenza, du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS) et des syndromes respiratoires aigus sévères (SARS). Cette possibilité d'émergence souligne le fait que la vaccination doit être prolongée après l'éradication. Les grands singes sont des hôtes finaux de la rougeole et aucune autre espèce, mis à part l'Homme, ne peut être infectée de manière naturelle par ce virus (Rima & Duprex 2006).

Outre les récepteurs SLAM et Nectin-4, le récepteur CD46 est également impliqué dans la phase de reconnaissance de ce virus. Le CD46 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, identifiée à l'origine comme un inhibiteur du complément. Il s'agit du seul cofacteur membranaire exprimé de manière ubiquitaire

pour le clivage des molécules C3b et C4b. Ce clivage est médié par le CD46 qui joue un rôle clé dans la protection des cellules hôtes contre une activation indésirable du complément (Cardone *et al.* 2011).

Ce cofacteur protéique membranaire fonctionne comme un récepteur d'entrée pour plusieurs pathogènes humains viraux et bactériens importants, tels que le virus de la rougeole. En effet, lorsque des lignées cellulaires murines non perméables au virus de la rougeole sont transfectées avec un ADNc CD46, celui-ci agit comme un récepteur pour la liaison, la fusion, la réplication et la synthèse des protéines du virus de la rougeole (Naniche *et al.* 1993; Dörig *et al.* 1993).

L'infection des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) par la souche vaccinale Edmonston du virus de la rougeole a entraîné une régulation à la baisse de l'expression de CD46 à la surface des cellules, alors que l'infection par une souche de type sauvage ne le permettait pas. Cette régulation négative du CD46 rend les cellules plus sensibles à la dégradation par le complément. Par conséquent, il semble que les souches qui n'induisent pas cette régulation négative ont un avantage répliatif et que cette régulation négative du CD46 par certaines souches virales du virus de la rougeole pourrait être un marqueur d'atténuation (Schnorr *et al.* 1995).

---

### d. Le virus de la peste bovine (RPV)

Dans le genre *Morbillivirus*, le virus de la rougeole est très proche de celui de la peste bovine, qui est une maladie des Artiodactyles. Selon certaines hypothèses, un virus apparenté à la peste bovine aurait franchi la barrière des espèces pour atteindre l'Homme il y a entre 1000 et 5000 ans (Furuse *et al.* 2010; Vries *et al.* 2015). Une étude récente a démontré que le virus de la rougeole a probablement divergé du virus de la peste bovine au sixième siècle avant notre ère, coïncidant vraisemblablement avec l'essor des grandes villes. Cependant, l'origine (humaine ou bovine) de cette divergence n'a pas encore été établie (Düx *et al.* 2020).



La peste bovine est connue depuis l'antiquité (Blancou 1994) pour sa mortalité spectaculaire et sa rapidité de diffusion qui lui donnent un caractère de catastrophe économique et sociale. En Europe et durant des siècles, cette maladie était associée aux guerres et aux mouvements d'armées et de leurs animaux pendant les campagnes militaires et était réputée comme l'une des infections bovines les plus meurtrières, provoquant des destructions massives (Tounkara & Nwankpa 2017; Hamilton *et al.* 2017). L'infection par le virus de la peste bovine provoque des symptômes tels que la fièvre et la diarrhée chez les bovins, qui meurent dans les jours qui suivent l'apparition des symptômes.

Au 18<sup>ème</sup> siècle, Lancisi suggère des méthodes de contrôle de la peste bovine qui permirent à l'Europe de s'en débarrasser avant le 20<sup>ème</sup> siècle. Elles sont encore utilisées aujourd'hui. Dans les années 1920, J. T. Edwards développe un premier vaccin atténué caprinisé contre la peste bovine et démontre que les animaux vaccinés sont protégés à vie. En 1957, W. Plowright et R. D. Ferris développent le premier vaccin peste bovine sur lignée de cellules. Ce vaccin était économique à produire et a largement été utilisé en Afrique et en Asie.

Pour contrôler la maladie dans ces régions, dès les années 1950, une lutte non coordonnée est mise en place en fonction des possibilités financières avec les premiers vaccins caprinisés. Le premier grand programme d'éradication de la peste bovine en Afrique (Programme conjoint PC15) mettant en œuvre une assistance technique et un financement multilatéral débute en 1962. En Afrique et en Asie, plusieurs programmes successifs de vaccination permirent d'aboutir à la déclaration d'éradication mondiale de la maladie en 2011. Le dernier cas de peste bovine a été signalé chez un buffle au Kenya en 2001 (Pfeffermann *et al.* 2018; Hamilton *et al.* 2017).

Après l'éradication mondiale de la variole en 1980, il s'agit de la première maladie animale à être éradiquée dans le monde.



### e. Le virus de la maladie de carré (CDV)

Le virus de la maladie de carré (CDV) provoque une maladie infectieuse chez le chien, mais peut aussi infecter un large éventail de carnivores. Cette capacité à infecter une large gamme d'hôtes constitue un risque pour la conservation de la faune sauvage et captive. En effet, Le CDV infecte de nombreuses espèces domestiques et sauvages de l'ordre des carnivores et d'autres familles comprenant les Felidae, les Procyonidae, les Mustelidae, les Hyaenidae, les Ursidae, et les Viverridae (Martinez-Gutierrez & Ruiz-Saenz 2016). Des familles de mammifères, comme les Cricetidae (rongeurs), les Cercopithecidae (singes de l'Ancien Monde), les Suidae (porcs) et les Elephantidae (éléphants) peuvent aussi être infectées. Des phoques du lac Baïkal ont été reconnus infectés par le CDV, ce qui met en danger les mammifères marins (Mamaev *et al.* 1996; Butina *et al.* 2010).

Chez le chien domestique, la maladie est bien contrôlée par la vaccination (Martella *et al.* 2008). Il existe 17 lignées du CDV qui ont été définies en fonction des divergences d'acides aminés observées dans la protéine H (Diallo 1990; Duque-Valencia *et al.* 2019).

Le CDV diffère des autres morbillivirus par sa capacité à se maintenir dans des populations de faible densité et est connu pour être neurovirulent (Vries *et al.* 2015). Le récepteur nectin-4 est largement exprimé dans le tissu cérébral canin où il pourrait jouer le rôle de récepteur d'entrée, suggérant ainsi un rôle de ce récepteur dans la neurovirulence du CDV (Cosby & Weir 2018). Cependant, l'invasion du système nerveux par le CDV pourrait également impliquer l'existence d'un troisième récepteur potentiel pour ce virus, car la présence du récepteur nectin-4 n'a pas été prouvée dans la substance blanche ou dans les astrocytes en culture. Il s'agirait du récepteur des cellules gliales (Gliar), qui serait impliqué dans la transmission non cytolitique de cellule à cellule dans les astrocytes (Alves *et al.* 2015).

Ce nouveau récepteur doit être entièrement identifié et caractérisé chez les canins car il apparaît jouer un rôle clé pour la neurovirulence du CDV et d'autres morbillivirus.

La surveillance du CDV dans des populations cibles permet d'explorer des scénarios complexes de transmission. Ces scénarios comprennent la possibilité de la circulation de différentes souches dont la virulence peut varier selon les espèces, l'importance épidémiologique des individus asymptomatiques dans la propagation de la maladie et d'hôtes représentant un cul-de-sac épidémiologique (Duque-Valencia *et al.* 2019). Dans les environnements homogènes (par exemple, les chiens domestiques), les scénarios de transmission montrent que des souches spécialisées peuvent émerger dans des populations de taille et de densité suffisantes pour permettre une forte sélection spécifique. Ces souches pourraient se révéler très virulentes mais peu transmissibles à d'autres hôtes. En revanche, les souches généralistes devraient mieux se transmettre et être plus performantes que les souches spécialisées dans les environnements hétérogènes (multi-hôtes) (Nikolin *et al.* 2012).

Après quelques passages en culture cellulaire, le CDV est capable d'infecter des cellules exprimant le SLAM humain. Cette infection semble être due soit à un changement d'un seul acide aminé dans la protéine H, soit à des changements d'acides aminés (AA) dans les protéines P/V, F et H (Bieringer *et al.* 2013; Otsuki *et al.* 2013).

Les anticorps produits après une infection par le CDV ou le MV reconnaissent des épitopes conservés, ce qui permet d'avancer l'hypothèse que l'immunité acquise par la rougeole aurait protégé l'Homme de l'infection par le CDV. Le taux de substitution traduisant la capacité évolutive est estimé entre  $7.41 \times 10^{-4}$  et  $11.5 \times 10^{-4}$  substitution/site/an pour le CDV. Ce taux est légèrement supérieur à celui du MV ( $6.5 \times 10^{-4}$  substitution/site/an), ce qui faciliterait la transmission inter-espèces et l'adaptation du CDV à de nouveaux hôtes (Duque-Valencia *et al.* 2019).

### f. Autres morbillivirus

Le monde marin n'est pas épargné par les conséquences de ces virus. En effet, deux morbillivirus de mammifères marins ont été isolés au cours des années 1980 et 1990 à partir de phoques ou de cétacés morts et ont été nommés virus de la maladie de Carré du phoque (PDV) et Morbillivirus des cétacés (CeMV). Un morbillivirus des cétacés a été décrit dans un premier temps chez des marsouins communs des côtes irlandaises en 1988 et a été nommé Morbillivirus des marsouins (PMV). Quelques années plus tard, un virus inconnu a provoqué une mortalité massive de dauphins rayés dans la méditerranée. Ce virus a été nommé Morbillivirus des dauphins (DMV). En se basant sur des similarités de séquences, les PMV et DMV ont été regroupés en CeMV (Ohishi *et al.* 2019).

Le nombre de cas de PDV et de CeMV chez diverses espèces marines ne cesse d'augmenter dans le monde. L'infection expérimentale de phoques par le PDV a montré que la pathologie provoquée est similaire à celle du CDV : une pneumonie sévère, une déplétion lymphocytaire et une méningo-encéphalite sont généralement observées (Kennedy 1998). Une forme cérébrale du CeMV a été détectée uniquement chez les dauphins rayés, ce qui suggère que ces animaux développent une encéphalite chronique après s'être remis d'une infection systémique. Les lésions cérébrales de ces animaux sont très similaires à celles observées dans l'encéphalite sclérosante induite par le virus de la rougeole (Di Guardo & Mazzariol 2013).

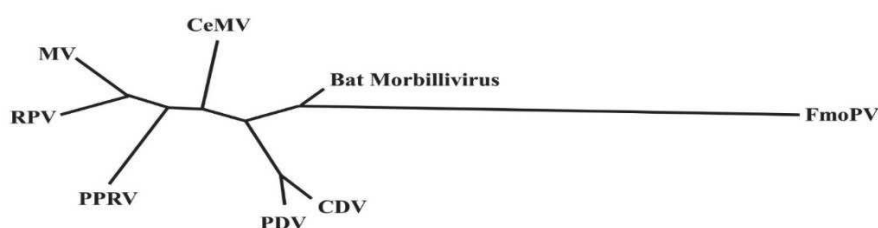
Des infections subcliniques peuvent se produire chez les cétacés. Ces infections induisant une absence de signes cliniques mais une détection d'ARN viral et d'anticorps peuvent conduire à une sous-estimation de l'incidence et de la prévalence de ces virus, induisant une propagation silencieuse de la maladie (Ohishi *et al.* 2019).

Les morbillivirus des mammifères marins sont certainement transmis par contact car ces virus ont une durée de vie très courte en dehors de leur hôte.

Lors de leur passage terrestre, les pinnipèdes vivent en colonies très denses, ce qui implique que le PDV peut être transmis comme les autres morbillivirus terrestres. La transmission verticale des CeMV est également envisagée (Di Guardo & Mazzariol 2016).

Le PDV et le CDV sont des virus étroitement apparentés et les séquences SLAM des caniformes sont similaires. Par conséquent, la transmission des morbillivirus entre caniformes est possible, si ces animaux entrent en contact dans la nature (Ohishi *et al.* 2019). Par exemple, le CDV a été isolé chez des phoques de la mer Caspienne lors d'épidémies avec des taux de mortalité élevés en 1997, 2000 et 2001 (Mamaev *et al.* 1996; Beineke *et al.* 2015).

Les chauves-souris et les rongeurs sont considérés comme les mammifères qui abritent en permanence l'une des plus grandes diversités génétiques des virus existants. Une phylogénie basée sur une partie de la polymérase virale L a été révélée pour la première fois, un nouveau membre du genre *Morbillivirus* chez les chauves-souris (chauves-souris vampires néo tropicales) (Drexler *et al.* 2012). Il a été nommé Morbillivirus de la chauve-souris vampire (DrMV) et n'a pas encore été isolé en tant que virus qui se réplique (Nambulli *et al.* 2016). La présence d'un virus apparenté au morbillivirus appartenant aux paramyxovirus a également été détecté chez les rongeurs (Drexler *et al.* 2012)

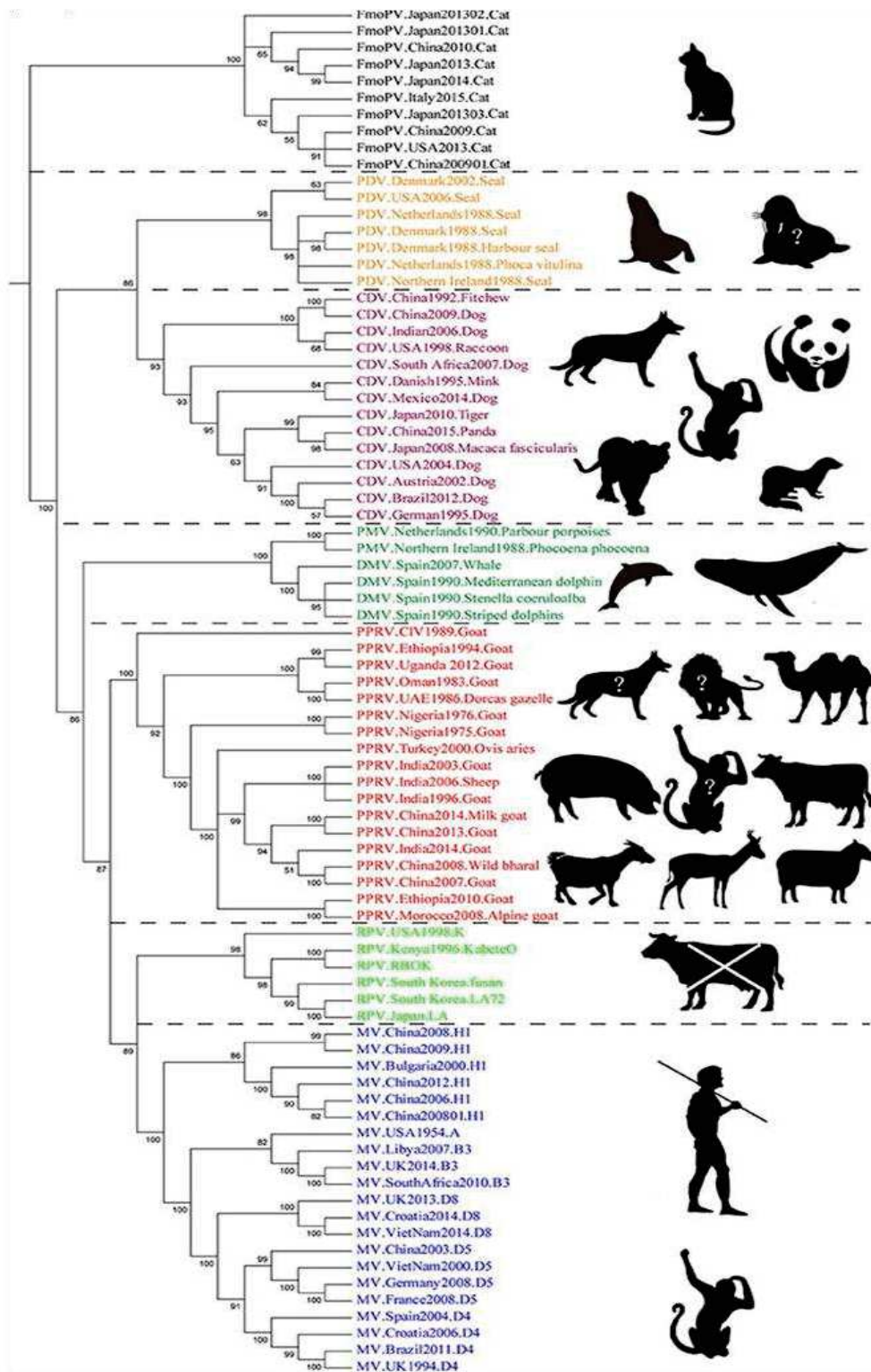


**Figure 3. Arbre phylogénétique représentant les différents morbillivirus.** Cette représentation contient les morbillivirus des cétacés (CeMV), le virus de la rougeole (MV), le virus de la peste bovine (RPV), le virus de la peste des petits ruminants (PPRV), le virus de la maladie de Carré du phoque (PDV), le virus de la maladie de Carré (CDV), le morbillivirus de la chauve-souris (Bat Morbillivirus) et le morbillivirus félin (FmoPV) (Vries *et al.* 2015).

Les chats et les chiens sont les animaux domestiques et de compagnie les plus répandus dans le monde. L'existence d'un morbillivirus canin (CDV) a conduit à émettre l'hypothèse de la présence de morbillivirus non reconnus chez les chats. Une étude d'épidémiologie moléculaire chez des chats errants de Hong Kong et des chats malades de Chine continentale a permis de caractériser un morbillivirus de chat appelé Morbillivirus félin (FeMV). Ce virus a la particularité de s'attaquer aux reins, induisant des symptômes comparables à ceux de la néphrite tubulo-interstitielle chez le chat (Woo *et al.* 2012).

Depuis lors, le Japon, les États-Unis, la Turquie, le Brésil, la Thaïlande, l'Italie et l'Allemagne ont signalé la présence de ce virus. Un nouveau génotype FeMV-GT2 a récemment été isolé en Allemagne et a démontré un tropisme *in vitro* pour les cellules primaires félines des reins, des poumons et du système immunitaire, ainsi que pour des cultures organotypiques du cerveau et du cervelet félin (Sieg *et al.* 2019). Les **Figures 3 et 4** montrent les relations phylogénétiques entre les différents morbillivirus.

Cette année, un nouveau virus du genre *Morbillivirus* a été détecté chez le porc : le Morbillivirus porcin (PoMV). Ce virus a montré le même tropisme que les autres morbillivirus et a comme spécificité l'induction d'une encéphalite et d'une inflammation placentaire chez le porc (Arruda *et al.* 2021).



**Figure 4. Relation phylogénétique entre les différents morbillivirus basée sur l'hémagglutinine virale.** Le PPRV et le MV sont les morbillivirus les plus étroitement apparentés. Le CDV et le PDV se situent dans la même branche évolutive. La partie droite de l'image montre les hôtes et les hôtes potentiels (marqués d'un "?") des virus apparentés. La croix sur la vache signifie l'éradication de la peste bovine. (Dou *et al.* 2020)

---

## 2. Le virus de la peste des petits ruminants (PPRV)

Le virus de la peste des petits ruminants (PPRV) est un morbillivirus à l'origine d'une maladie infectieuse le plus souvent aiguë des petits ruminants domestiques (principalement des moutons et des chèvres) et sauvages. Cette maladie épidémique transfrontalière, hautement contagieuse menace les moyens de subsistance et la sécurité alimentaire des éleveurs à faibles revenus. Plus d'un milliard de moutons et de chèvres, soit approximativement 80% des petits ruminants, sont à risque d'infection par le PPRV. La maladie est aujourd'hui répartie de l'Afrique de l'Ouest à l'Asie de l'Est et menace l'Europe avec des épidémies récentes en Géorgie (Rajko-Nenow *et al.* 2017; Donduashvili *et al.* 2018) et en Bulgarie (OIE 2018a; Kamel & El-Sayed 2019). Les pertes économiques sont estimées de 1.45 à 2.1 milliard de dollar par an (OIE & FAO 2015).

La classification génotypique du PPRV a permis d'identifier 4 lignées virales. Ainsi, les lignées I et II sont limitées à l'Afrique occidentale et centrale, la lignée III est commune à l'Afrique orientale et à la partie sud du Moyen-Orient et la lignée IV est historiquement rattachée à l'Asie. Néanmoins, la lignée IV est maintenant également prédominante au Moyen-Orient et se propage dans toute l'Afrique (Kwiatek *et al.* 2011; Dundon *et al.* 2020; Touunkara *et al.* 2021). Les raisons de sa dominance sont encore mal connues.

Les petits ruminants domestiques, mais aussi certains artiodactyles sauvages et captifs sont touchés par la maladie, avec un taux de mortalité de 50 à 100 % dans les populations sensibles (Kwiatek *et al.* 2011; Li *et al.* 2017; Marashi *et al.* 2017; Jaisree *et al.* 2018; Rahman *et al.* 2020). Les bovidés peuvent être infectés par le PPRV sans développer de symptômes (Couacy-Hymann *et al.* 2019).



Notamment, une séroprévalence de 17,5 % chez les bovins et de 22,5 % chez les buffles a été constatée lors d'une enquête sérologique réalisée dans la province du Punjab au Pakistan (Abubakar *et al.* 2017). En 2013, un foyer de PPR a été détecté chez des chameaux en Iran (Zakian *et al.* 2016), bien que les infections expérimentales ont démontré que ces animaux ne développent aucun signe de la maladie (Fakri *et al.* 2019).

Ainsi, les bovins et les camélidés sont considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques pour le PPRV (Schulz *et al.* 2019).

Notre connaissance sur la susceptibilité de différentes espèces à être infectées par le PPRV est en constante évolution. Les porcs et les sangliers peuvent également être infectés par le virus de la PPR (PPRV) et représentent peut-être des hôtes négligés et un réservoir potentiel de la maladie. En effet, une infection expérimentale a montré que le virus peut être transmis de manière bidirectionnelle entre les porcs et les chèvres, ce qui indique que ces animaux peuvent être une source possible d'infection par le PPRV (Schulz *et al.* 2018). Le manque de séquences virales provenant d'hôtes de type sauvage et atypiques pour la PPR ainsi que la méconnaissance des facteurs liés à la sensibilité des nouveaux hôtes constituent un obstacle à la compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette adaptation à de nouveaux hôtes (Dou *et al.* 2020).

L'observation clinique de la maladie sur le terrain a révélé que plusieurs espèces de petits ruminants sont touchées à des degrés divers. Les chèvres sont généralement plus sévèrement touchées que les moutons et, en cas de contact avec des animaux infectés, la maladie se déclare souvent chez les chèvres sans affecter les moutons (Lefèvre & Diallo 1990). Les infections expérimentales permettent difficilement de reproduire le pouvoir pathogène initialement observé sur le terrain. La sensibilité des hôtes varie considérablement selon l'espèce, la race, le statut immunitaire et certainement des facteurs environnementaux, même s'ils sont infectés par le même virus (Fakri *et al.* 2017).

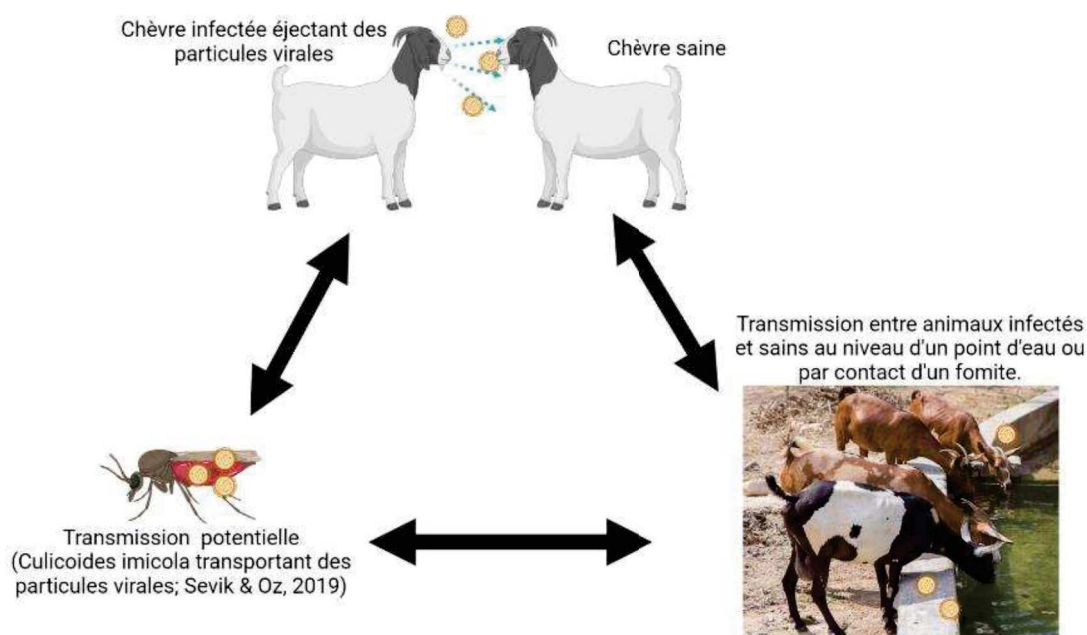


Dans la relation hôte-virus, la différence de gravité de la maladie dépend de la sensibilité de l'hôte et de la virulence du virus. Par exemple, lorsqu'elles sont infectées par les mêmes souches de PPRV, les chèvres naines des régions tropicales sont plus sensibles que les chèvres à longues pattes des régions sahariennes (Lefèvre 1991; Couacy-Hymann *et al.* 2007).

Cependant, la virulence des isolats du PPRV peut être affectée par d'autres facteurs tels que les conditions de stockage (Couacy-Hymann *et al.* 2007), le type de cellule et le nombre de passages effectués pour l'isolement de la souche (Baron *et al.* 2014). Les techniques d'isolement et de maintien des souches de PPRV utilisées dans les études expérimentales influencent donc grandement notre capacité à mieux comprendre les raisons de cette variabilité de la susceptibilité des hôtes et de la virulence des souches circulantes.

Comme les autres morbillivirus, le PPRV est lymphotropique, épithéliotropique (Pope *et al.* 2013; Birch *et al.* 2013) et se transmet soit par contact entre des animaux infectés et des animaux sains, soit par inhalation d'aérosols ou de particules virales en suspension. Il n'y a pas de preuve de transmission verticale de la PPR à travers le placenta. Des preuves récentes de la présence de l'ARN du PPRV dans *Culicoides imicola* soulèvent la question de la transmission entre hôtes à l'aide de vecteurs (Şevik & Oz 2019). La **Figure 5** résume les modes de transmission possibles du PPRV.

Le virus pénètre dans l'organisme en passant par l'épithélium nasopharyngé. Une fois reconnu, il est pris en charge par les macrophages et les cellules dendritiques et transporté vers les ganglions lymphatiques. A ce niveau se déroule une réplication virale extensive due à l'infection des lymphocytes activés exprimant le récepteur SLAM. Ces lymphocytes vont ainsi participer à la propagation systémique du virus (Kumar *et al.* 2014).



**Figure 5. Représentation des modes possibles de transmissions du PPRV.**

Le virus peut être transmis soit par contact entre des animaux sains et infectés, soit par contact avec un fomite, soit potentiellement par l'implication de vecteurs.

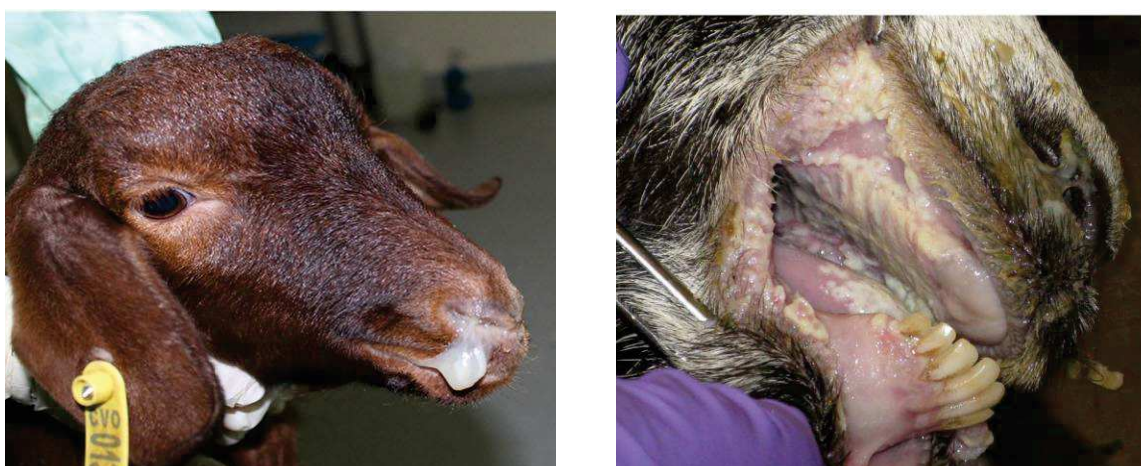
Dans les premiers stades de l'infection marqués par une hyperthermie, toutes les sécrétions corporelles sont fortement chargées en particules virales. Le fait de tousser et d'éternuer projette des aérosols virulents dans l'air. L'excrétion virale commence au stade de l'incubation, avant l'apparition des premiers signes cliniques, et certains auteurs rapportent qu'elle peut durer jusqu'à plus de 2 mois après la guérison, comme cela a été observé dans les fèces de chèvres (Wasee Ullah *et al.* 2016).

La période d'incubation de la maladie est généralement de 4-6 jours, bien qu'elle puisse varier entre 3 et 14 jours. Durant cette période, la présence silencieuse du virus, sans signes cliniques visibles, augmente le risque de propagation de la maladie à d'autres petits ruminants. Au cours de la phase aiguë de la maladie, les animaux expriment un état fébrile et une fièvre pouvant atteindre 41°C qui peut durer 3-5 jours, s'accompagnant de dépression et d'anorexie (Balamurugan *et al.* 2014).

Le museau devient très sec. Il y a aussi une salivation excessive et la formation de lésions érosives pouvant devenir nécrotiques dans la cavité buccale. Dans les cas sévères de la maladie, ces lésions nécrotiques progressent avec l'apparition d'un dépôt de fibrine (dépôt caséux) sur la langue. Dans les derniers stades de la maladie, les animaux développent de la diarrhée et de la toux induisant une respiration abdominale laborieuse. Enfin, l'animal peut devenir dyspnéique et la perte de poids progressive conduit finalement à la mort. Certains symptômes de la maladie sont présentés dans la **Figure 6**.

Le taux de morbidité (nombre d'individus atteints par unité de population) peut atteindre 100% avec un taux élevé de létalité des formes aiguës de la maladie. La mortalité peut varier considérablement en fonction de la virulence de la souche virale et de l'état immunologique de l'animal atteint (Parida et al. 2015).

La PPR est une maladie en constante progression, avec des occurrences dans des pays d'Afrique du Nord, Centrale et Australe tels que l'Algérie et le Burundi (Niyokwishimira *et al.* 2019; Britton *et al.* 2019; OIE 2018b), ou encore en Bulgarie (OIE 2018a) et en Mongolie (Shatar *et al.* 2017; Pruvot *et al.* 2020).



**Figure 6. Symptômes de la PPR :** (A) Écoulement nasal observé chez une chèvre (Bamouh *et al.* 2019). (B) Erosions de la muqueuse buccale (Truong *et al.* 2014).

Certains pays présentent un risque d'incursion du PPRV en raison de la porosité de leurs frontières et de leur proximité avec un pays où le PPRV est endémique. C'est le cas de plusieurs d'entre eux, pour leur proximité avec la Chine (Burns *et al.* 2019). Selon l'organisation internationale de la santé animale (OIE), des cas de PPR ont été rapportés dans 39 pays en 2007, 43 en 2013 et la maladie est aujourd'hui présente dans plus de 70 pays à travers l'Afrique, l'Asie et l'Europe (Dou *et al.* 2020).

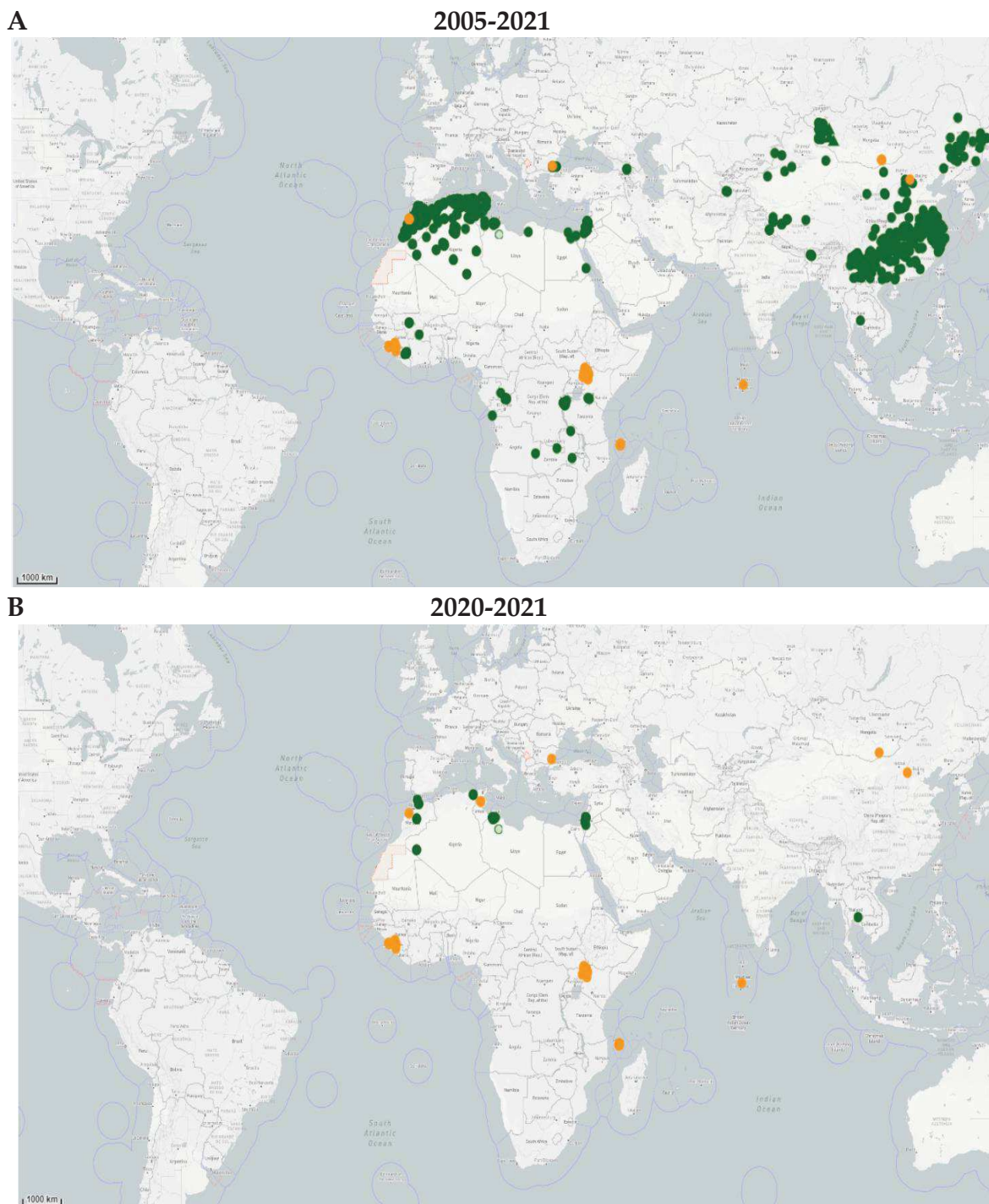
Depuis 2019, le nombre de foyers de PPR dans le monde a considérablement diminué. Cette diminution peut être attribuée aux effets des campagnes de vaccination implémentées dans plus de 50 pays (Figure 7).

La mobilité des animaux, associée au commerce ou au pastoralisme, est un facteur important dans la transmission et la circulation transfrontalière de la PPR (Bataille *et al.* 2021). Par exemple, un échantillonnage environnemental dans un marché de chèvres à Katmandou, au Népal, a montré que 60 % des échantillons étaient positifs pour la PPR (Colenutt *et al.* 2021).

Les leçons acquises de l'éradication mondiale de la peste bovine en 2011, ainsi que l'impact considérable de la PPR sur la production des petits ruminants ont conduit la FAO et l'OIE à élaborer et à approuver la stratégie mondiale pour le contrôle et l'éradication de la PPR (GCES PPR) afin d'éradiquer la PPR d'ici 2030 (FAO & OIE 2015; FAO & OIE 2016).

La mise en place d'un tel programme d'éradication nécessite la disponibilité de moyens de diagnostics et de vaccins efficaces. Les moyens de diagnostics de la PPR reposent principalement sur la détection du matériel génétique ou antigénique viral (par exemple par RT-PCR, RT-PCR en temps réel ou ELISA immunocapture), la détection d'anticorps dirigés contre PPRV (ELISA de compétition, tests de neutralisation virale (VNT)) ou encore l'isolation du virus par culture cellulaire (Kamel & El-Sayed 2019). Le séquençage complet du génome de la PPRV devient aussi un moyen de plus en plus utilisé pour étudier l'épidémiologie évolutive de la maladie.





**Figure 7. Distribution des foyers de PPR dans le monde.** (A) Foyers de PPR notifiés au cours de la période 2005-2021. (B) Foyers de PPR notifiés au cours de la période 2020-2021. Les cercles représentent les foyers chez les animaux domestiques. La couleur des cercles détermine si le foyer est en cours (orange) ou a été résolu (vert). Ces données sont disponibles sur le portail <https://wahis.oie.int/#/home>.

Les vaccins les plus utilisés contre la PPR sont des vaccins vivants atténués à partir de souches sauvages. Le premier et le plus utilisé de ces vaccins à travers le monde est le vaccin PPR Nigéria 75/1. La souche sauvage à l'origine de ce vaccin a été isolée par Taylor et Abegunde en 1975 au Nigéria à partir d'une chèvre morte de PPR (Taylor & Abegunde 1979). La souche vaccinale a ensuite été obtenue en effectuant 75 passages cellulaires sur des cellules Vero (Diallo *et al.* 1989). Un deuxième vaccin vivant atténué, le vaccin Sungri 96 principalement utilisé en Inde, a été développé par l'institut indien de recherche vétérinaire (IVRI) à partir d'un isolat indigène du virus de la PPR (Sarkar *et al.* 2003).

L'immunogénicité et l'efficacité protectrice des vaccins PPR après administration nasale ou sous-cutanée ont été prouvées chez les chèvres et moutons. Les animaux vaccinés ont été protégés contre les infections par des souches virulentes et n'ont présenté aucune excrétion virale dans les fluides biologiques.

Ainsi, ces vaccins sont efficaces pour conférer une immunité stérilisante contre l'infection par toutes les lignées virales du PPRV et peuvent être utilisés pour contrôler la maladie au niveau mondial (Hodgson *et al.* 2018; Mahapatra *et al.* 2020). Une couverture vaccinale de 70 % est nécessaire pour assurer le contrôle de la propagation de la PPR (Kamel & El-Sayed 2019).

---

### 3. Les morbillivirus (PPRV) et le système immunitaire

Le système immunitaire est un système complexe d'éléments de reconnaissance et de défense qui distinguent le soi du non-soi. Lors d'une primo-infection, une immunité innée se met en place pour lutter de manière non spécifique contre l'agent agresseur. Cette immunité innée permet l'induction d'une réponse adaptative qui vient répondre de manière spécifique. Les chapitres suivants détaillent les différentes composantes du système immunitaire qui sont impliquées lors d'une infection par des morbillivirus et principalement par le virus de la peste des petits ruminants (PPRV).

### a. Entrée dans le système immunitaire

Les récepteurs cellulaires sont l'un des principaux facteurs déterminant la diversité des hôtes et les tropismes cellulaires et tissulaires d'un virus. Les morbillivirus pénètrent dans le système immunitaire par le biais du récepteur SLAMF1 (CD150). Cette entrée nécessite l'interaction entre l'hémagglutinine virale H et le récepteur SLAMF1. La spécificité de l'interaction H-SLAM peut être liée soit à une barrière d'espèces, soit à l'expansion potentielle des hôtes chez les morbillivirus (Fukuhara *et al.* 2019; Prajapati *et al.* 2019). Le système d'affichage de surface des baculovirus est une technologie qui permet d'étudier de manière plus spécifique l'interaction entre les protéines H des morbillivirus et le récepteur SLAM de l'hôte (Zhao *et al.* 2020).

La distribution du récepteur SLAM chez la chèvre est similaire au tropisme tissulaire du PPRV. En effet, les tissus lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques, ganglions mésentériques, hilaires, mandibulaires, inguinaux et cervicaux superficiels) ainsi que la muqueuse nasale, le duodénum, le cœur, la vésicule biliaire et le thymus présentent la plus forte expression du SLAM. Néanmoins, une faible expression de SLAM a été observée dans les poumons, le côlon, le rectum, le larynx, la langue et l'œsophage qui, avec les organes lymphoïdes, sont des sites majeurs de réplication du PPRV. Ces résultats indiquent la présence de récepteurs encore inconnus pour le PPRV qui pourrait expliquer son tropisme dans certains organes (Meng *et al.* 2011). L'expression du SLAM, en corrélation avec l'expression du virus dans les tissus lymphoïdes, peut être utilisée pour mettre au point des méthodes de diagnostic pour la détection du PPRV (Prajapati *et al.* 2020).

L'épithélium trachéal regorge de cellules dendritiques (DC) et constitue le site par lequel les morbillivirus pénètrent dans l'organisme.

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles qui ont une fonction de sentinelle dans le système immunitaire. Elles capturent les antigènes à la périphérie et, après activation, migrent vers les tissus lymphoïdes pour présenter les antigènes aux lymphocytes T (LT), ce qui entraîne une réponse immunitaire spécifique à l'agent pathogène (Martin-Gayo & Yu 2019). Les DC jouent un rôle central dans l'amorçage d'une réponse immunitaire adaptative et antivirale. Ce rôle requiert trois types de signaux : la présentation de l'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII), la co-stimulation avec les molécules CD80/86 et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines 12 et 18 (IL12 et IL18). L'IL12 produite par les DCs pendant une infection virale est essentielle pour l'amorçage de la différenciation des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> productrices d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) (pour une revue cf. Ayassoufi & Pfaller 2020).

Ainsi, les DC peuvent être responsables du transport des particules virales vers les organes lymphoïdes et de leur transmission aux cellules T. L'infection de macaques avec une souche fluorescente du virus de la rougeole a permis de déterminer que la réplication virale initiale se déroule dans les amygdales. Dans ce modèle, le virus cible les lymphocytes CD150<sup>+</sup> (ou SLAMF1<sup>+</sup>) et les cellules myéloïdes CD11c<sup>+</sup> et, très faiblement, les cellules épithéliales (Swart *et al.* 2007). Les cellules CD11c<sup>+</sup> sont la principale population de cellules cibles dans les poumons entre 4 et 5 jours après l'infection, ce qui indique un rôle important des macrophages alvéolaires et/ou des DC dans les premiers stades de l'infection (Lemon *et al.* 2011).

Plusieurs agents pathogènes ciblent la lectine de type C spécifique des DC (DC-SIGN) pour leur dissémination ou pour moduler les fonctions des DC afin de faciliter leur survie (Geijtenbeek *et al.* 2004). Cette lectine est abondamment présente dans les tissus sous-épithéliaux buccaux, pharyngés, amygdaliens, trachéaux, bronchiques et dans les poumons. La capture du virus de la rougeole (MV) par les DC conduit non seulement à la présentation de l'antigène mais aussi à une transmission efficace aux lymphocytes T (Witte *et al.* 2006).



La distribution tissulaire et les études fonctionnelles démontrent que le CD150 et le DC-SIGN ont des fonctions distinctes dans la transmission du MV par les DC. En effet, le DC-SIGN est essentiel pour la liaison du MV aux DC immatures qui n'expriment pas le CD150. Bien qu'il ne soit pas fonctionnel en tant que récepteur d'entrée, ce récepteur augmente l'infection des DC immatures lorsqu'il est fortement exprimé. Le DC-SIGN fonctionne comme un récepteur d'attachement pour le MV jouant un rôle crucial dans l'infection des DC matures. L'absorption du virus par le DC-SIGN et, dans une moindre mesure, par le CD150, entraîne la dégradation du virus et la présentation des antigènes dérivés du MV aux cellules T dans les tissus lymphoïdes pendant la phase systémique de l'infection (Witte *et al.* 2008).

Le virus de la rougeole (MV) altère les fonctions des DC via différents mécanismes. Les protéines N virales se lient aux récepteurs FC gamma pour bloquer la production d'IL12 par les DC réduisant l'activation des cellules T. La protéine H, interagissant avec le CD46, joue aussi un rôle dans l'inhibition de la production d'IL12. Les patients atteints de la rougeole ont un niveau très bas d'IL12 dans le sérum. Ce faible niveau d'IL12 induit une inhibition de l'activation et de la différenciation des cellules T qui contribue à la baisse de la réponse immunitaire (Ayasoufi & Pfaller 2020).

La mise en évidence de syncytia composés de cellules exprimant le marqueur CD68+ (spécifique des monocytes et des macrophages) dans les poumons d'animaux infectés par le PPRV suggère que, comme le MV, le PPRV peut également cibler ces cellules présentatrices d'antigènes (CPA) non professionnelles (Truong *et al.* 2014). La stimulation des DC dérivées de la moelle osseuse (BMDC) par le PPRV pourrait induire la répression de la maturation et de la différenciation des BMDC par le biais d'une série de gènes liés à l'immunité (Li *et al.* 2019b). Le profil protéomique des BMDC stimulées par le PPRV montre que les protéines synthétisées après la stimulation sont principalement impliquées dans la croissance, la prolifération, l'adhésion, la signalisation et la régulation du cycle cellulaire, ainsi qu'à d'autres fonctions telles que l'apoptose et l'immunité innée (Li *et al.* 2019a).

Certains mécanismes impliquant les récepteurs cellulaires peuvent être mis en place pour prévenir ou promouvoir l'infection par les *Morbillivirus*. Par exemple, l'inhibition de l'expression du SLAM par le biais de petits ARN interférents (*small interfering RNA* : siRNA) entraîne le blocage de certaines fonctions cellulaires impliquées dans la réplication et la production du PPRV (Pawar *et al.* 2008a). Certains siRNA ciblant l'ARNm M du PPRV affectent la transcription et suppriment l'expression de la protéine M, inhibant ainsi la réplication virale *in vitro* (Liu *et al.* 2015).

L'infection des PBMCs par le PPRV a permis d'identifier et d'évaluer le profil d'expression de plusieurs micro-ARN (miARN) impliqués dans la réplication et la pathogenèse du PPRV (Qi *et al.* 2018).

L'infection des PBMCs par le PPRV a également induit une augmentation rapide de l'expression de SLAM qui est suivie d'une diminution progressive de cette expression. L'expression du micro-ARN miR-218 interagissant avec la région 3' UTR du SLAM, est inversement corrélée à celle du SLAM. Ainsi, le miR-218 a un effet négatif sur l'expression du SLAM et la réplication virale. Dans les premiers stades de l'infection, la réplication virale est essentielle à l'inhibition de l'expression du miR-218 (Qi *et al.* 2019).

Mis à part l'interaction H-SLAM, le PPRV peut utiliser d'autres moyens pour infecter les cellules. Le PPRV peut pénétrer dans les cellules épithéliales de l'endomètre caprin par endocytose. Ce mécanisme d'absorption dépend du cholestérol et est médié par les cavéoles, qui dépendent du pH et nécessitent la présence de la dynamine et de la kinase PI3K. L'infection de ce type de cellules pourrait expliquer en partie l'apparition clinique de l'avortement chez les chèvres infectées par le PPRV (Yang *et al.* 2018).

### b. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée à une infection virale débute par la détection de motifs moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMPs) viraux. Les PAMPs viraux sont généralement des acides nucléiques dont la structure n'est pas présente dans les cellules non infectées. Il s'agit des ARN double brins (ARNdb), des ARN monocaténares (ARNss) non coiffés avec un 5' triphosphate ou des ADN non méthylés.

Cette détection est effectuée par des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) situés sur la membrane plasmique, dans le compartiment endosomal ou dans le cytoplasme des cellules infectées. Il s'agit par exemple des récepteurs de type Toll (TLR) 2, 3, 7 et 9, des hélicases ARN RIG-I (protéine du gène I inductible par l'acide rétinoïque) MDA5 (antigène 5 de différenciation du mélanome) et LGP2 (laboratoire de génétique et de physiologie 2) et de la protéine kinase R (PKR).

Les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent deux domaines d'activation et de recrutement des caspases (CARD) qui permettent le recrutement des adaptateurs CARDIF (CARD induisant l'IFN- $\beta$ ), VISA (adaptateur de signalisation induite par le virus), MAVS (protéine de signalisation antivirale mitochondriale) et IPS-1 (protéine 1 de stimulation du promoteur de l'IFN- $\beta$ ) (Randall & Goodbourn 2008).

Ces adaptateurs entraînent l'activation d'un réseau complexe de voies de signalisation intracellulaires, qui aboutit à la transcription de gènes de défense de l'hôte, en particulier de cytokines pro-inflammatoires dont les interférons (IFN) (Goodbourn & Randall 2009; Kawai & Akira 2010). Le récepteur LGP2, dénué de domaines CARD, permet de faciliter la détection des PAMPs viraux par RIG-I et MDA5 (Sato *et al.* 2010).

La réponse interféron (IFN) est la première ligne de défense contre les infections virales. Les IFNs sont des cytokines à large spectre, antitumorales et antivirales, qui peuvent moduler le système immunitaire et être utilisées comme adjuvants. Ils sont classés en trois groupes différents : type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\delta$  et IFN- $\kappa$ ), type II (IFN- $\gamma$ ) et type III (IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 et IFN- $\lambda$ 3) (Zhou *et al.* 2018).

Les IFNs de type I sont produits par de nombreux types cellulaires et leur synthèse débute par la phosphorylation du facteur de transcription IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) et sa translocation dans le noyau ce qui déclenche la transcription de l'IFN- $\beta$ . Une fois synthétisé, l'IFN- $\beta$  se lie aux récepteurs IFNAR1/2 (exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme) ce qui déclenche la voie de signalisation JAK (*Janus Kinase*) /STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) via l'activation des tyrosines kinases JAK1 et TYK2 (*Tyrosine Kinase 2*).

L'activation de la voie JAK/STAT induit la formation du complexe ISGF3, composé des molécules STAT1, STAT2 et IRF9, qui dirige la transcription des gènes stimulés par l'IFN (ISG). Ce complexe pénètre dans le noyau de la cellule et permet l'expression du facteur de transcription IRF7 (qui peut être synthétisé par une boucle autocrine ou paracrine de l'IFN- $\beta$ ) qui induit la synthèse de l'IFN- $\alpha$ .

En réponse à l'infection par le virus de la rougeole, les IFN- $\alpha$ /  $\beta$  sont produits par des cellules immunitaires tels que les DC conventionnels (cDC) et plasmacytoïdes (pDCs) et non immunitaires (cellules épithéliales, endothéliales et gliales). Les pDC, connues sous le nom de cellules productrices d'IFN (IPC), constituent un type unique de cellules sentinelles capables de produire de grandes quantités d'IFN- $\alpha$ /  $\beta$  en réponse à une infection virale (Duhon *et al.* 2010; Reizis 2019).

La présence des TLR7 et 9 exprimés sélectivement par les pDC est principalement responsable de la production d'IFN- $\alpha$  par ces cellules. Ces TLR sont situés dans les endosomes où ils reconnaissent le matériel génétique viral (ssRNA ou DNA).

Cette reconnaissance permet l'activation de la transcription de l'IFN par la phosphorylation et la translocation de l'IRF7 exprimé de manière constitutive par les pDCs. Ainsi, la synthèse des IFN par les pDC ne nécessite pas la présence d'une répllication virale active, mais seulement la détection du matériel génétique viral (Duhon *et al.* 2010).

Les IFN de type I sécrétés par les pDC sont fortement impliqués dans la maturation des DC myéloïdes, la présentation des antigènes, l'activation des NK et stimulent la production d'anticorps par les cellules B, ce qui favorise l'établissement d'une mémoire durable des cellules B. Ainsi, les pDC jouent un rôle crucial dans l'immunité innée et sont importantes pour le développement d'une réponse immunitaire adaptative efficace (García-León *et al.* 2015).

Les interférons stimulent l'expression de centaines d'ISGs dans les cellules infectées et les cellules environnantes, ce qui permet l'établissement d'un état antiviral (Blaszczyk *et al.* 2016; Maarifi *et al.* 2020). L'activité direct ou autocrine des ISGs sur la répllication du virus de la rougeole est très mal connue ce qui suggère que ces gènes ont une activité paracrine c'est-à-dire, permettent d'arrêter la propagation du virus en protégeant les cellules non infectées (Ayasoufi & Pfaller 2020).

Les autres sous types d'IFNs de type I (IFN- $\omega$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN-d et IFN- $\kappa$ ) jouent des rôles moins bien définis. Ils sont par exemple impliqués dans la régulation de la reconnaissance maternelle pendant la grossesse (Randall & Goodbourn 2008).

Les IFNs de type II (IFN- $\gamma$ ) ont une voie de synthèse et d'activation similaire à celle des IFN de type I. La différence majeure entre ces deux types d'interférons est que l'IFN- $\gamma$  est produit principalement par les cellules *natural killer* (NK) et les cellules tueuses naturelles (NKT) dans le cadre de la réponse immunitaire innée, et par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) et les Th1 CD4 et CD8 une fois que l'immunité spécifique à l'antigène apparaît. Cette cytokine est donc essentielle à l'immunité antivirale innée et adaptative (Schoenborn & Wilson 2007).

Les IFN de type III, appelés IFN- $\lambda$  ou IFNL, jouent également un rôle important dans les activités immunitaires antivirales. Ils ont été découverts sous le nom d'interleukine (IL)-29 (IFN- $\lambda$ 1), 28a (IFN- $\lambda$ 2) et 28b (IFN- $\lambda$ 3).

Une fois synthétisés, ces interférons se lient aux récepteurs IL-28R $\alpha$  et IL-10R2. Cette liaison active les tyrosines kinases (TYK2 et JAK1) associées aux récepteurs pour contrôler la phosphorylation des protéines STAT et la formation du complexe ISGF3.

Contrairement aux récepteurs IFNAR1/2, le récepteur IL-28R $\alpha$  est exprimé uniquement dans quelques types de cellules comprenant certaines classes de leucocytes comme les macrophages, les lymphocytes du sang périphérique, les DC conventionnelles, les cellules épithéliales et les DC plasmacytoïdes. Ainsi, la réponse cellulaire à l'IFN- $\lambda$  est limitée à un spectre étroit de cellules, joue un rôle central dans les réponses immunitaires antivirales à la surface des épithéliums et optimise la réponse immunitaire adaptative antivirale (Zhou *et al.* 2018).

L'infection des cellules HEK293T par le PPRV entraîne une augmentation de l'expression des gènes liés à l'IFN mais sans détection d'IFN (Chang *et al.* 2019). Cette absence de détection a également été observée lors de l'infection de fibroblastes de chèvre et de cellules Vero exprimant le récepteur SLAM et transfectées avec un plasmide exprimant la luciférase sous l'expression du promoteur de l'IFN- $\beta$ .

Les cellules Vero ne produisent pas naturellement d'IFN mais réagissent à leur présence, car elles possèdent toujours les récepteurs des interférons alpha et bêta (Sanz Bernardo *et al.* 2017). L'addition exogène d'IFN (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  et IFN- $\lambda$ 3) a permis d'inhiber efficacement la réplication du PPRV dans les cellules HEK293T. En outre, cette étude a démontré que la voie JAK/STAT est impliquée dans les effets anti-PPRV des interférons (Chang *et al.* 2019).

Les protéines V et C des paramyxovirus ont démontré des activités antagonistes à l'IFN (Yanagi *et al.* 2006). Différents morbillivirus (RPV, MeV, PPRV et CDV) ont montré une efficacité de 100 % dans le blocage de l'activation (phosphorylation et accumulation nucléaire) de STAT2 induite par l'IFN- $\alpha$ . Ces virus ont fait preuve d'une efficacité élevée à intermédiaire pour bloquer la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN- $\alpha$  et cette efficacité est beaucoup plus variable pour bloquer la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN- $\gamma$ .

La protéine V de ces morbillivirus a été capable d'induire par elle-même ces effets différentiels sur la phosphorylation des protéines STAT1 et STAT2 induite par les IFN. Cette protéine a une interaction directe avec STAT1, STAT2 et les kinases JAK1 et TYK2, ce qui suggère que ces virus peuvent bloquer directement ou indirectement les étapes initiales de la voie de réponse des IFN de type I et bloquer partiellement celles de l'IFN de type II (Chinnakannan *et al.* 2013). Une étude par mutagenèse a déterminé que le motif Trp et le groupe Cys dans la structure en doigt de zinc de la protéine V du PPRV sont essentiels pour l'interaction avec la protéine STAT2 et le blocage de la signalisation de l'IFN (Ma *et al.* 2015).

L'absence de production d'IFN lors de l'infection par le PPRV de fibroblastes de chèvre et de cellules Vero (exprimant le récepteur SLAM et transfectées avec un plasmide exprimant la luciférase sous l'expression du promoteur de l'IFN- $\beta$ ) peut être partiellement ou totalement due à la liaison de la protéine V aux récepteurs RIG-I et MDA5 qui supprime la cascade d'activation conduisant à la production d'IFN- $\beta$  (Sanz Bernardo *et al.* 2017). Néanmoins, cette protéine n'est pas la seule protéine virale à bloquer activement l'activation du promoteur de l'IFN- $\beta$ .

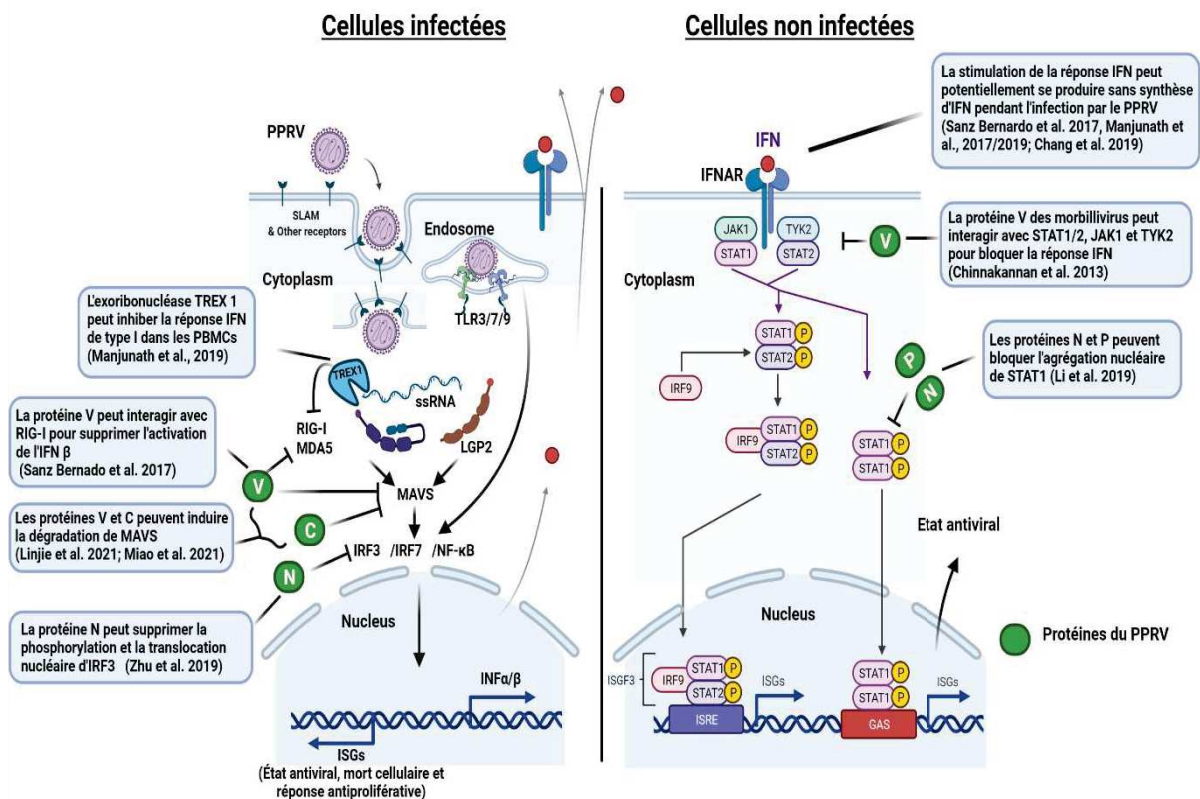
Les protéines V et C du PPRV peuvent interagir avec la protéine mitochondriale de signalisation antivirale (MAVS). Cette interaction permet d'inhiber de manière significative la phosphorylation de STAT1 interférant ainsi avec la voie de signalisation JAK-STAT et induisant une régulation à la baisse de la synthèse *in vitro*

d'INF- $\beta$ . L'infection par le PPRV, et en particulier la présence de la protéine V, induit la dégradation de MAVS, qui est essentielle pour l'activation du promoteur de l'IFN- $\beta$ . Ainsi les protéines V et C du PPRV jouent un rôle essentiel dans l'évasion immunitaire innée et la progression de la maladie (Linjie *et al.* 2021; Miao *et al.* 2021).

Les protéines N et P du PPRV fonctionnent aussi comme des facteurs antagonistes de l'IFN en bloquant l'agrégation nucléaire de STAT1 ce qui supprime la signalisation de la voie JAK/STAT (Li *et al.* 2019c). La protéine N joue un rôle extrêmement important dans la suppression de la phosphorylation et de la translocation nucléaire du facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF3) et de la production d'interféron de type I (IFN) en interférant avec la formation du complexe TBK1/IRF3. Cette protéine virale particulièrement abondante, semble jouer un rôle précoce dans l'évasion immunitaire innée du PPRV (Zhu *et al.* 2019). Les différents mécanismes de modulation de la réponse interféron par les protéines virales sont présentés dans la **Figure 8**.

Malgré ces preuves *in vitro* solides de la régulation de la réponse interféron antivirale par les protéines du PPRV, cette réponse est néanmoins engagée lorsque les animaux sont infectés *in vivo*. Par exemple, la virémie chez les chèvres, et non chez les moutons, induit une augmentation de la synthèse d'IFN- $\gamma$  (Truong *et al.* 2014). La transcription des ARN messagers de l'IFN $\beta$  et de l'IFN- $\gamma$  semble être induite de manière indépendante de la pathogenèse par différentes souches de PPRV (Baron *et al.* 2014).





**Figure 8. Modulation de la réponse interféron par les protéines virales du PPRV.** La réponse antivirale IFN commence par la détection des particules virales soit présentes dans les endosomes par les TLR3,7 et 9, soit par la détection dans le cytoplasme des ARN viraux par les TLR intracellulaires RIG-I, MDA5 et LGP2. Cette détection déclenche la cascade d'activation des facteurs de transcription IRF3/7 et NFκB qui entrent dans le noyau pour induire la synthèse de l'IFN. Une fois synthétisé, l'IFN peut avoir une action autocrine (sur la cellule productrice elle-même) ou paracrine (sur les cellules voisines). L'IFN est détecté par les récepteurs IFNAR qui induisent la formation d'ISGF3 (STAT1/2 et IIRF9) ou la dimérisation de STAT1. Ces facteurs se transloquent dans le noyau de la cellule pour permettre la synthèse de gènes de réponse (ISGs) qui vont induire un état antiviral. Plusieurs mécanismes sont utilisés par le PPRV pour inhiber la réponse antivirale à l'interféron. L'exoribonucléase TREX1 peut jouer un rôle dans l'inhibition de la réponse IFN de type I au début de l'infection par le PPRV en dégradant l'ARN viral. Les protéines virales N, P, V et C peuvent également interagir avec différents composants de cette réponse pour l'inhiber. Ces différentes interactions sont présentées dans la figure.

En plus de la réponse interféron antivirale, d'autres mécanismes innés tels que l'autophagie peuvent être impliqués dans les premières étapes de la lutte contre l'infection virale. Par exemple, il a été observé qu'une fois à l'intérieur de la cellule, la souche vaccinale PPRV Nigeria 75/1 induit une activation successive de plusieurs voies métaboliques qui contribuent à l'induction de l'autophagie par vagues. Dans un premier temps, la protéine H interagit avec le récepteur Nectin-4 pour inactiver la voie AKT-MTOR ce qui déclenche une première vague de l'autophagie. Les vagues tardives semblent être le résultat d'une interaction directe entre les protéines virales et les protéines IRGM et HSPA1A. Cette interaction est maintenue pendant la réplication virale et est exploitée par le virus pour promouvoir la production de particules virales infectieuses (Yang *et al.* 2020).

Les morbillivirus peuvent aussi interagir avec les récepteurs de type Toll (TLR) pour contribuer à l'activation de la réponse immunitaire ou à l'immunosuppression.

La protéine H des souches sauvages du virus de la rougeole (MV) peut activer le TLR2 exprimé à la surface des DC et des macrophages et conduire à la synthèse du NF $\kappa$ B qui augmente l'expression des marqueurs de surface tels que le CD150 (SLAMF1), CD80 et CD86 et la synthèse des cytokines pro-inflammatoires IL1B,6,8,12,18 et TNF $\alpha$ . Ainsi, les souches sauvages du MV, via l'activation du TLR2, activent le système immunitaire en régulant à la hausse le CD150, ce qui stimule la propagation et la pathogénicité du virus. L'interaction entre la protéine H du vaccin contre le MV et le TLR2 est abolie par la présence d'une mutation dans la souche atténuée. Cette interaction abortive pourrait contribuer à la réponse immunitaire faible observée après une vaccination (Bieback *et al.* 2002).

Mis à part l'augmentation de la permissivité au virus, l'interaction H-TLR2 peut de manière indirecte inhiber la réponse immunitaire. En effet, l'interaction H-TLR2 induit l'augmentation de l'expression du CD150 qui interagit aussi avec la protéine H.

Le contact entre le CD150 exprimé à la surface des DC humains et la protéine H du MV module l'activité de deux voies métaboliques impliqués dans la différenciation des DC. Cette interaction induit aussi une baisse de l'expression des marqueurs d'activation (CD80, CD83, CD86 et MHCII) et de la synthèse d'IL12, sans affecter la synthèse d'IL10 (Marie *et al.* 2001; Romanets-Korbut *et al.* 2016).

Une étude récente réalisée avec la protéine H d'une souche sauvage du PPRV montre que tout comme le MV, elle induit l'activation du TLR2 et la sécrétion d'IL1b, IL6, IL8 déclenchant ainsi l'immunité innée et participant à la pathogénèse du virus. Contrairement au virus de la rougeole, la protéine H du PPRV induit la synthèse de l'IL12 par les DC (Rojas *et al.* 2021a).

Les protéines du PPRV peuvent également être impliquées dans des mécanismes cellulaires induisant une atténuation de la réponse immunitaire et favorisant la réplication virale.

L'infection par le PPRV, et plus particulièrement la présence de la protéine P, permet de réduire la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  par la kinase du réticulum endoplasmique de type protéine kinase R (PERK). Cette réduction, passant par l'induction de la protéine inductible par les dommages causés à l'ADN (GADD34) impliquée dans la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , constitue un mécanisme de régulation de la survie des cellules hôtes, bénéfique à la réplication virale (Alfred *et al.* 2021).

---

c. Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative met en œuvre des cellules effectrices (lymphocytes B et T) capables de produire une réponse spécifiquement dirigée contre l'agresseur. Cette spécificité est médiée par l'expression de gènes ayant subi des réarrangements et des mutations somatiques et permettant la production d'une large gamme de protéines reconnaissant les épitopes du non soi (Georgel & Bahram 2006).

Cette réponse est initiée essentiellement dans les tissus lymphoïdes secondaires, les ganglions lymphatiques et la rate par la présentation des antigènes aux lymphocytes T et B. Bien que les lymphocytes B soient capables de présenter des antigènes, ce sont principalement les cellules dendritiques (DC) migrantes, provenant des sites infectés, qui assurent l'activation des lymphocytes T naïfs. Les interférons de type I ( $IFN\alpha/\beta$ ) stimulent les DC, servant ainsi de lien entre les réponses immunitaires innées et adaptatives (Tough 2004).

L'interaction entre les DC et les cellules T naïves forme la synapse immunologique qui fonctionne par l'induction de certains signaux. Un premier signal est généré par l'interaction entre les molécules d'adhésion exprimées par les deux types cellulaires. Il s'agit généralement des DC-SIGN et de la molécule intercellulaire d'adhésion 1 (ICAM-1) pour les DC, et de ICAM-3 et de l'antigène 1 associé à la fonction lymphocytaire (LFA-1) pour les lymphocytes.

Un deuxième signal est généré par l'interaction entre les molécules du CMH (exprimées par les DC), le peptide antigénique et le récepteur des cellules T ou B (TCR ou BCR). Un troisième signal est généré par l'interaction entre les molécules CD80/86 et le CD28 exprimé par le lymphocyte. Les deux derniers types de signaux induisent l'expression de molécules telles que le CD40 (DC) et CD40L (lymphocytes) qui permettent la synthèse de cytokines impliquées dans l'orientation fonctionnelle du lymphocyte.

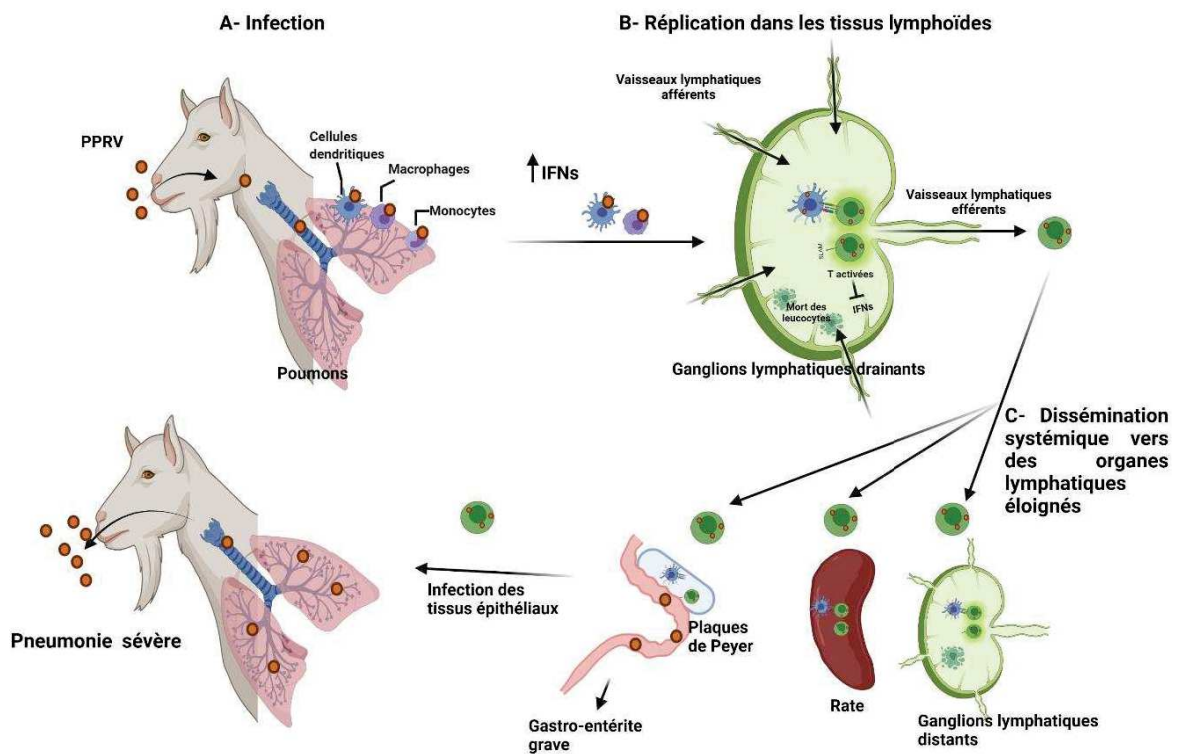
Lors de cette orientation, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> acquièrent leurs fonctions d'auxiliaires (*T helper* : Th) adaptées à la nature du danger.

La présence d'IL-12 induit l'orientation Th1 qui privilégie une immunité cellulaire ; l'IL-4 induit l'orientation Th2 favorisant la réponse humorale ; l'action de l'IL6 et du facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) induit l'orientation Th17 qui entretient la réponse inflammatoire. En absence de signaux de danger et en présence d'acide rétinoïque et de TGF- $\beta$ , il y a induction de lymphocytes T régulateurs (Treg) qui inhibent l'action des lymphocytes effecteurs.

Les différentes populations de lymphocytes auxiliaires interviennent dans des processus d'activation et de différenciation d'autres types cellulaires tels que les cellules *natural killer* (NK), les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, les lymphocytes B, les polynucléaires et les monocytes. Par exemple, sous l'action des médiateurs Th, les cellules B subissent une commutation isotypique qui permet la production de différents isotypes d'anticorps.

A l'issue des interactions entre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes, les cellules se séparent et sous l'action de l'IL2, les lymphocytes spécifiques à l'antigène commencent à se multiplier. Cette multiplication est connue sous le nom de prolifération clonale.

Au cours de la réponse adaptative, certains lymphocytes activés se différencient en cellules mémoires à longue durée de vie. Parmi les cellules mémoires, il existe des lymphocytes TEM (spécifiques de la mémoire effectrice), les lymphocytes TCM (spécifique de la mémoire centrale) et les lymphocytes B mémoires assurant la réponse immunitaire lors d'une infection ultérieure (Aymeric & Lefranc G 2009).



**Figure 9. Représentation schématique du modèle d'infection par le PPRV.**

(A) Le virus pénètre dans l'organisme par les voies respiratoires et est capté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (cellules dendritiques, macrophages et monocytes). Cette infection entraîne une augmentation de la synthèse d'interféron (IFN) qui induit la migration des CPA vers les ganglions lymphatiques drainant le site de l'infection. (B) Dans ces ganglions lymphatiques, la réplication virale a lieu, provoquant la mort des leucocytes et bloquant la réponse IFN, ce qui permet au virus de provoquer une immunosuppression et de se propager dans tout l'organisme. (C) Probablement par l'intermédiaire des lymphocytes infectés, le virus se propage dans le système et atteint les tissus lymphoïdes distants où il peut à nouveau se répliquer. (D) L'étape finale de ce site est l'infection des épithéliums, qui entraîne des signes cliniques tels que la pneumonie ou la gastro-entérite. Cependant, l'excrétion virale commence avant l'apparition des symptômes (Rojas *et al.* 2016).



L'infection par les morbillivirus induit une immunosuppression accompagnée par une réponse immunitaire spécifique aux virus. Les DC semblent jouer un rôle pivot dans les premières phases de l'immunosuppression induite par les morbillivirus. En effet, une mauvaise interaction entre DC et cellules T ou une altération de la synthèse des cytokines pendant le recrutement et la génération des cellules T, peut générer des cellules activées et inadaptées qui sur-expriment le SLAM et permettent la propagation du virus. Néanmoins, une expression de l'IL-12 par les granulocytes peut induire une bonne activation des cellules T mais ne peut procurer une interaction stable du CMH ou de la costimulation par les DC (Laksono *et al.* 2018). En plus d'induire une baisse de l'expression des molécules CD80/83/86 et MHCII, l'interaction entre la protéine H du MV et le CD150 exprimé à la surface des DC supprime l'alloprolifération des cellules T médiée par les DC (Romanets-Korbut *et al.* 2016).

La lymphopénie induite par le MV s'arrête peu après l'infection et l'immunité anti-rougeole se met en route de manière fonctionnelle. Ce qui indique que les fonctions des DC sont bloquées uniquement de manière transitoire, ce qui permet de créer un environnement propice à l'entrée, à la réplication et à la propagation du virus dans les cellules de l'immunité adaptative (Ayasoufi & Pfaller 2020).

L'immunité acquise pour d'autres pathogènes, particulièrement la mémoire immunitaire humorale, peut être affectée de manière négative par le virus de la rougeole (Mina *et al.* 2019). Ce phénomène est appelé l'amnésie immunitaire et est caractérisé par la déplétion des cellules B naïves et mémoires et d'une reconstitution incomplète de leur stock (Petrova *et al.* 2019). Les éléments précoces conduisant à cette amnésie pourraient impliquer l'interaction entre les DC et les cellules T dans les ganglions lymphatiques. En effet, les DC folliculaires (FDC) guident la différenciation des lymphocytes T CD4 en T folliculaires auxiliaires (TFH) ou en T folliculaires régulateurs (TFR). Les FDC interagissent ensuite avec les TFH pour permettre la sélection et la différenciation des cellules B en plasmocytes, tandis que les TFR suppriment la fonction des FDC (Ayasoufi & Pfaller 2020).

L'infection par le PPRV entraîne une diminution du nombre de lymphocytes circulants et nuit également à l'activation de ces cellules, ce qui se caractérise par la réduction de leur capacité de réponse après une stimulation par un mitogène (Rojas *et al.* 2014). Le tropisme lymphocytaire et la capacité immunosuppressive du PPRV peut induire un retard dans la réponse des cellules T, ce qui offre au virus une fenêtre d'opportunité où il peut se répliquer et se propager (Rojas *et al.* 2016).

Le rôle des cellules B dans l'immunosuppression induite par le PPRV est encore mal compris mais ces cellules demeurent indispensables dans le processus d'établissement de la réponse humorale anti-PPRV.

Les réponses immunitaires protectrices à médiation cellulaire et humorale contre les morbillivirus sont principalement dirigées contre les glycoprotéines membranaires H, F et la protéine de nucléocapside N. Les glycoprotéines membranaires H et F induisent une réponse anticorps neutralisante robuste et protectrice. Bien que plus présente lors de la réplication virale, la protéine N des morbillivirus n'induit pas de réponse humorale neutralisante mais induit une forte réponse à médiation cellulaire (Kumar *et al.* 2014). La déplétion des cellules CD8<sup>+</sup> a démontré que les anticorps et/ou les cellules CD4<sup>+</sup> spécifiques semblent être les principaux médiateurs responsables de la protection induite par la vaccination contre le PPRV (Baron *et al.* 2020).

La réponse humorale anti-PPRV est basée sur la synthèse d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines les plus abondantes notamment contre les protéines N, H et F du virus. Les anticorps dirigés contre les protéines H et F du virus provoquent une réponse neutralisante, tandis que ceux dirigés contre la protéine N ne provoquent pas de réponse neutralisante (Rojas *et al.* 2021b).

Les anticorps non neutralisants peuvent avoir une fonction d'opsonisation, en reconnaissant les antigènes viraux exprimés à la surface de la cellule infectée et en provoquant leur lyse, soit par activation du complément, soit par induction de mécanismes tels que la cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC).



Ce mécanisme, qui implique l'action des macrophages, des cellules NK, des neutrophiles et éosinophiles, contribue à la clearance virale au cours de l'infection par le PPRV (Rojas *et al.* 2018). Les anticorps neutralisants ont pour fonction d'inhiber les premières étapes de la réplication virale. Il en existe plusieurs types détectables par des tests d'inhibition de la microfusion (Thakur *et al.* 2021).

Les cellules T gamma delta ( $\gamma\delta$ ) sont des cellules qui présentent des caractéristiques à la fois du système immunitaire inné et du système immunitaire adaptatif et qui sont parfois appelées cellules du système immunitaire relais. Elles sont capables de produire des cytokines ( $\text{IFN}\gamma$ , IL17,  $\text{TNF}\alpha$ ), des chimiokines, ont des activités cytotoxiques et régulatrices et ainsi participent à l'immunité protectrice contre les infections (Yirsaw & Baldwin 2021).

Le rôle des cellules T  $\gamma\delta$  dans l'infection par le PPRV est encore mal compris mais il a été montré que, quelle que soit la souche PPRV utilisée, le pourcentage de lymphocytes T  $\gamma\delta$  diminuait fortement au cours de l'infection (Baron *et al.* 2020).

---

## 4. Objectifs de la thèse

La susceptibilité de l'hôte à l'infection au PPRV peut varier considérablement et cette variabilité dépend de l'hôte et de la souche virale comme observé lors de l'infection des chèvres naines d'Afrique de l'Ouest et à longue pattes du Sahel (Lefèvre 1991; Couacy-Hymann *et al.* 2007). Dans le cadre d'une étude visant à établir un modèle d'infection robuste pour évaluer l'efficacité des souches vaccinales de la PPR, la dynamique de l'infection, la virulence des différentes souches et la sensibilité des espèces/races, des chèvres Saanen ont été infectées par différents souches du virus de la PPR.

L'étude a démontré que ces animaux sont très sensibles à la souche PPRV Maroc 2008 (lignée virale IV), tandis que la souche PPRV Côte d'Ivoire 1989 (lignée virale I) n'a provoqué aucun signe de la maladie. La méthode d'inoculation (sous cutanée ou intranasale) joue aussi un rôle important dans l'apparition des signes cliniques. La souche vaccinale (lignée virale II) a confirmé sa capacité à protéger les animaux d'une épreuve virulente, ce qui renforce le paradigme selon lequel une souche d'une lignée pourrait protéger contre des souches d'autres lignées (Enchery *et al.* 2019).

Les travaux qui ont été réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans la compréhension des interactions hôtes pathogènes et plus précisément de la modulation du système immunitaire de l'hôte au cours de l'infection par des souches de virulences différentes du virus de la peste des petits ruminants (PPRV). En somme, il s'agira de déterminer comment ces interactions peuvent expliquer la variabilité de la virulence des souches et la sensibilité de l'hôte.

Plus précisément, les objectifs de ce projet sont d'utiliser des infections expérimentales *in vitro* et *in vivo* et des approches multi-omiques pour :

- **Identifier les mutations des gènes viraux modifiant la virulence des souches PPRV**

La détermination des mutations qui ont conduit à l'atténuation de la souche vaccinale Nigeria 75/1 pourrait nous permettre de localiser les positions clés associées à l'atténuation d'une souche de PPRV. La disponibilité des différents passages cellulaires ayant conduit à l'obtention de cette souche vaccinale offre une opportunité unique de découvrir comment ces mutations apparaissent au cours du processus d'atténuation en utilisant les techniques de séquençage de nouvelle génération.

L'impact de ces mutations sur la virulence a également été évalué par immunofluorescence dans un modèle cellulaire présentant différentes sensibilités à l'infection par des souches vaccinales ou virulentes de PPRV.

Les résultats obtenus lors de l'infection expérimentale de chèvres Saanen montrent également que la souche Côte d'Ivoire 89 (IC89) a potentiellement été atténuée lors des passages effectués au CIRAD (Montpellier, France).

Une étude génomique comparative entre la souche peu virulente IC89 du CIRAD et la souche IC89 montrant une forte virulence dans d'autres infections (Baron *et al.* 2014), pourra également permettre d'identifier des positions importantes pour l'atténuation virale.

- **Identifier les facteurs de l'hôte impliqués dans la réponse immunitaire et associés à la sensibilité de l'hôte à l'infection par le PPRV.**

Les principales cellules cibles du virus sont les cellules immunitaires exprimant le récepteur SLAM, si bien qu'il semble essentiel de mieux comprendre comment l'infection module l'activité de ces cellules.

Pour ce faire, des expériences *in vitro* et *in vivo* ont été entreprises dans le but de déterminer les gènes et protéines engagés dans la réponse de l'hôte à l'infection par des souches de différentes virulences (Enchery *et al.* 2019) :

PPRV Maroc 2008 (MA08, hautement virulente), PPRV Côte d'Ivoire 1989 (IC89, faiblement virulente) et la souche vaccinale PPR Nigeria 1975/1 (VN75/1).

Les expériences *in vitro* ont consisté à infecter dans un premier temps les cellules présentatrices d'antigènes (responsable du transport initial des particules virales vers les ganglions lymphatiques proximaux) et ensuite les lymphocytes (principaux médiateurs de l'immunité adaptative) par les souches de différentes virulences.

Au cours des expériences *in vivo*, le modèle de challenge précédemment établi (Enchery *et al.* 2019) a été utilisé. Plusieurs paramètres tels que l'apparition des signes cliniques, la modification de certains paramètres biologiques et la modulation de la réponse immunitaire par les différentes souches ont été évalués. Les techniques de biologie moléculaire et de sérologie (RT-PCR en temps réel, ELISA, test de séroneutralisation), la cytométrie en flux, le séquençage des ARN messagers ainsi que l'analyse de l'expression des protéines par spectrométrie de masse ont permis d'analyser les données obtenues des expériences *in vitro* et *in vivo*.

# *Travaux de Recherche*

## II TRAVAUX DE RECHERCHE

### 1. Identification des mutations impliquées dans la virulence des souches PPRV

#### a. Etude de l'atténuation de la souche vaccinale Nigeria 75/1

Isolée d'une chèvre morte de la PPR au Nigéria en 1975, la souche Nigeria 75/1, peu virulente et induisant que très peu de symptômes de la maladie, a été utilisée pour obtenir une souche vaccinale. Cette souche vaccinale a été produite en effectuant 75 passages dans des cellules Vero, ce qui fait d'elle un vaccin vivant atténué. Au cours de la production du vaccin, différents passages cellulaires ont été testés pour leur innocuité chez l'animal. L'inoculation du passage 55 n'a provoqué aucun signe de la maladie et a été capable d'induire une protection après un challenge. Le passage 63 quant à lui, a entraîné une bonne immunité et l'apparition d'anticorps neutralisants dès 7 jours après inoculation. Ainsi, les passages successifs sur cellules Vero ont été accompagnés d'une perte progressive du pouvoir pathogène de la souche initiale (Diallo *et al.* 1989).

Les souches virales évoluent, acquièrent ou perdent des caractéristiques en subissant des mutations. Ces mutations, résultat de la pression de sélection, permettent d'améliorer la fitness du virus en fonction de l'hôte qu'il infecte. Ici, les passages successifs dans des cellules Vero (cellules de rein de singe) ont permis l'adaptation de la souche Nigeria 75/1 à ce type de cellules, perdant ainsi une partie de sa capacité à infecter ses hôtes primaires. Certains des passages historiques (entre les passages 47 et 75) qui ont conduit à l'atténuation de la souche vaccinale ont été conservés au CIRAD, ce qui nous donne une occasion unique d'étudier l'évolution de cette souche.

Ainsi, le premier objectif de cette étude a été de déterminer l'emplacement des mutations associées à l'atténuation de la souche vaccinale et dans quel ordre elles sont apparues. Pour ce faire, les souches sauvages, intermédiaires disponibles et vaccinales ont été séquencées puis comparées. La comparaison entre la souche sauvage et la souche vaccinale a démontrée la présence de 18 mutations fixes et discriminantes.

Ces mutations, 9 synonymes et 9 non synonymes, sont distribuées à travers le génome viral et ne sont pas localisées spécifiquement dans une protéine virale. Au début de cette étude, nous disposions de certains passages cellulaires ayant conduit à cette atténuation. Les résultats indiquent que 12 des 18 mutations sont déjà présentes dans le génome dès le passage 47 sur cellules Vero. Les mutations restantes apparaissent et se fixent successivement. La dernière mutation apparaît dans la zone leader contenant le promoteur du génome viral au passage 67.

Dans un second temps, le risque de réversion de ces mutations a été évalué par des passages cellulaires supplémentaires du vaccin effectués au moment de son développement, et par des cultures supplémentaires réalisées pour cette étude. Nous avons constaté que toutes les mutations associées à l'atténuation de la souche vaccinale ne présentent aucun risque de réversion jusqu'au passage 149 sur cellules Vero. Néanmoins, d'autres mutations apparaissent au cours du temps et plus particulièrement lorsqu'un autre type cellulaire est utilisé. La notion de quasi-espèce virale selon laquelle une souche virale ne doit pas être uniquement considérée comme un seul génome mais une composition de plusieurs génomes, a été prise en compte dans l'analyse de ces différentes souches. Ces analyses nous ont permis de constater que la taille des populations virales était plus ou moins similaire au cours des passages.

Enfin, le phénotype d'infection sur les cellules 10T1/2 de ces différents passages cellulaires a été observé par immunofluorescence. Ces cellules de fibroblastes murins sont permissibles à la réplication des souches sauvages mais pas à celle des souches vaccinales du PPRV (Comerlato *et al.* 2020). L'infection de ces cellules par les différents

passages cellulaires a permis de déterminer que l'apparition d'une mutation en particulier est essentielle pour permettre la réplication et le changement phénotypique du virus dans ce type cellulaire.

En résumé, cette étude a démontré qu'un faible nombre de mutations est associé à l'atténuation de la souche vaccinale. Certaines de ces mutations devraient être étudiées plus spécifiquement pour mieux comprendre leur rôle dans l'atténuation virale. Les résultats suggèrent également que le risque de réversion est faible, confirmant que ce vaccin reste sûr si celui-ci est produit selon les normes recommandées.

- i. *Article 1: Evolution of Attenuation and Risk of Reversal in Peste des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria 75/1*
-



Article

# Evolution of Attenuation and Risk of Reversal in Peste des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria 75/1

Roger-junior Eloiflin <sup>1,2</sup>, Marie Boyer <sup>2</sup>, Olivier Kwiatek <sup>1,2</sup>, Samia Guendouz <sup>1,2</sup>, Etienne Loire <sup>1,2</sup>, Renata Servan de Almeida <sup>1,2</sup>, Geneviève Libeau <sup>1,2</sup> and Arnaud Bataille <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

<sup>2</sup> ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, France

\* Correspondence: arnaud.bataille@cirad.fr

Received: 20 July 2019; Accepted: 5 August 2019; Published: 7 August 2019



**Abstract:** Peste des Petits Ruminants (PPR) is a highly infectious disease caused by a virus of the *Morbillivirus* genus. The current PPR eradication effort relies mainly on the implementation of massive vaccination campaigns. One of the most widely used PPR vaccines is the Nigeria 75/1 strain obtained after attenuation by 75 serial passages of the wild type isolate in cell cultures. Here we use high throughput deep sequencing of the historical passages that led to the Nigeria 75/1 attenuated strain to understand the evolution of PPRV attenuation and to assess the risk of reversal in different cell types. Comparison of the consensus sequences of the wild type and vaccine strains showed that only 18 fixed mutations separate the two strains. At the earliest attenuation passage at our disposal (passage 47), 12 out of the 18 mutations were already present at a frequency of 100%. Low-frequency variants were identified along the genome in all passages. Sequencing of passages after the vaccine strain showed evidence of genetic drift during cell passages, especially in cells expressing the SLAM receptor targeted by PPRV. However, 15 out of the 18 mutations related to attenuation remained fixed in the population. In vitro experiments suggest that one mutation in the leader region of the PPRV genome affects virus replication. Our results suggest that only a few mutations can have a serious impact on the pathogenicity of PPRV. Risk of reversion to virulence of the attenuated PPRV strain Nigeria 75/1 during serial passages in cell cultures seems low but limiting the number of passages during vaccine production is recommended.

**Keywords:** PPR; morbillivirus; attenuation; virulence; wild strain; vaccine; deep sequencing

## 1. Introduction

Peste des Petits Ruminants (PPR) is a highly infectious disease caused by a virus of the *Morbillivirus* genus, within the *Paramyxoviridae* family [1]. Small ruminants (sheep and goats) are the main hosts of PPR. PPR is an important disease burden and threatens the livelihoods and food security of smallholder farmers across Africa, the Middle East, and Asia [2]. Because of its impact, the FAO and OIE launched a campaign for the global eradication of PPR [3].

The virus causing PPR is a non-segmented RNA virus of the genus *Morbillivirus* in the family *Paramyxoviridae*. Recently, the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) has changed the name of the virus from *peste des petits ruminants virus* to *Small ruminant morbillivirus* [4]. Here, the abbreviation PPRV will be used throughout the text for the PPR virus to avoid confusing non-specialist readers interested in the global PPR eradication campaign.

PPRV is an enveloped virus with a single negative RNA strand encoding six structural proteins: nucleoproteins (N), phosphoproteins (P), matrix proteins (M), fusion proteins (F), hemagglutinin proteins (H) and large proteins (L). The P gene also encodes two non-structural proteins, V and C. The N protein encapsidates the viral genome and forms a helical nucleocapsid which interacts with the

P and L proteins (RNA-dependent RNA polymerase) to form the ribonucleoprotein (RNP) complex [5]. The two membrane glycoproteins F and H are involved respectively in membrane fusion and in binding the virus to its cell receptor during infection. The M protein appears to play a complex role in virus assembly and is also necessary for infection during which the matrix protein dissociates from the viral membrane for the F glycoprotein to become fusogenic and the nucleocapsid to be released into the host's cytoplasm [6].

PPR eradication efforts rely mainly on massive vaccination campaigns. Like for other morbilliviruses such as measles and rinderpest virus, PPRV vaccines are the product of the successful attenuation of wild virus strains [7,8]. One of the most widely used PPR vaccines is the Nigeria 75/1 strain obtained after attenuation by repeated passages in cell cultures of the wild-type isolate collected from sick sheep and goats during PPR outbreaks in Nigeria [9]. Seventy-five cell passages were performed on Vero cells to produce the attenuated vaccine strain. To assess residual virulence during the attenuation process, susceptible goats were infected with intermediate passages. Infection with the 20th passage still induced mild and transient hyperthermia for 48 h, but no other clinical signs. The 55th, 58th, and 61st passages induced no clinical signs but were able to confer protection against additional experimental infection with PPRV [10]. Additional passages were necessary to obtain a purified clone to be used for vaccine production (Adama Diallo, personal communication).

The mechanisms and factors involved in the attenuation of morbilliviruses remain poorly known. Attenuation processes generally involve the occurrence and selection of several mutations along the genome. Mutation rates and selection pressure depend on the virus strain and on the cells used for isolation and attenuation.

In the measles virus (MeV), another morbillivirus, it has been shown that a strain isolated from the same patient with acute measles, whether isolated in B95a cells or on Vero cells, induced typical measles or no clinical signs at all, respectively, in infected monkeys. Both isolates differed in only two nucleotide mutations, one on the P/V/C gene and the other on the M gene. In this case, these differences appeared to be responsible for discrepancies in the cell tropism and pathogenicity of MeV [11,12].

Better assessment of the evolution of attenuation and of viral populations in cell cultures is especially important for PPRV, as it may help identify specific mutations or genome positions which influence the virulence/attenuation of PPRV. The safety and efficacy of the Nigeria 75/1 vaccine strain is already well characterized [13], and its genome has been fully sequenced, notably using deep sequencing in the framework of quality control of the master seed held by CIRAD (Sequence Read Archive, accession number SRP100964). Currently, more than 20 government-backed and private companies produce the Nigeria 75/1 vaccine. Producers are typically advised not to go further than five cell passages of the vaccine seed during production to avoid risks of reduced vaccine efficacy and of eventual reversal to virulence [14]. However, limited information is available on whether these guidelines are followed or even adopted.

Risk of reversion to virulence is poorly studied in morbilliviruses, maybe because so far, there have been no reports from the field of potential reversion to virulence of PPR, rinderpest or measles vaccines. However, due to the genetic plasticity of the RNA viruses, it would be possible for mutations associated with a reversion to virulence to be generated in a viral population. Notably, work with live attenuated vaccines of other viruses, such as Rift Valley Fever virus, show that genetic drift during cell passage may present a risk of reversal [15].

High throughput sequencing is a powerful tool to explore virus genetic diversity, and therefore, to monitor the emergence and fixation of new variants over time. In particular, the technique has been used to study intra-host diversity of RNA viruses, including West Nile, Newcastle Disease, Chikungunya, and Dengue fever viruses [16–19]. The technique could be used to monitor the evolution of genetic diversity in viral population *in vitro* during the attenuation process and could help identify specific mutations and genome positions which influence the virulence/attenuation of PPRV. CIRAD holds the original wild type strain at the origin of the vaccine Nigeria 75/1, some of the historical cell culture passages that led to the attenuation of this strain, and also up to the 140 passages produced after

the vaccine. These passages offer a unique opportunity to explore the evolution of attenuation of the PPR vaccine strain Nigeria 75/1, its genetic plasticity and risk of virulence reversion, over cell passages.

In this study, we applied high throughput sequencing to the different cell passages of PPRV during and after attenuation of the Nigeria 75/1 strain in different cell types. Additionally, we used intermediate PPRV passages to infect a murine cell line known to be differentially affected by virulent and attenuated PPRV strains [20]. The immunofluorescence test was used to analyze the level of infection at different passages in the murine cell line to help identify mutations with a putative role in virus attenuation.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Viral Strains

Viral strains available at CIRAD include the wild type Nigeria 75/1 strain, and intermediate passages 47 to 75 (passage 75 corresponds to the vaccine master seed). In the case of P47, titer was extremely low, and an additional passage on CV1 cells expressing the goat-sheep Signaling Lymphocyte Activation Molecule SLAM (CHS cells) [21] was needed to recover a culture with a sufficiently high titer to allow genome sequencing and infection studies.

During the development of the PPR Nigeria 75/1 vaccine, the viral strain, attenuated after 75 passages in cell cultures, underwent additional passages (from passage 75 up to passage 140). CIRAD also stores some of these posterior passages (P89, P90, P99, P130, P149). However, the passages directly following the vaccine strain (passages 76 to 85) were not available. To test the genetic stability of the vaccine in the first few passages in a different type of cells, 10 additional passages were performed starting from the 75th passage on two types of cells in parallel: Vero cells and CHS cells.

### 2.2. Cell Culture Passages

The Vero and CHS cells cultured in a MEM medium (minimum essential medium Eagle). C3H/10T1/2 (10T1/2) cells, a mouse fibroblastic embryonic cell line (ATCC CCL-226, Manassas, Virginia, USA) were cultured in basal medium Eagle (BME). All media were supplemented with 2 mM L-Glutamine and 10% fetal bovine serum.

The additional passages of the vaccine master seed from 76 to 85 were obtained by sequential infection from the previous passages on Vero and CHS cells. Virus solutions were first titrated on Vero cells using the method of Spearman–Karber [22]. Infection was carried out directly in 96-well plates. After a freezing-thawing procedure, supernatants from virus-infected wells were collected and titrated. The titrated cells were directly used for infection of the following cell passages.

### 2.3. High Throughput Genome Sequencing of PPR Virus Populations

Viral RNA extraction was performed with a KingFisher™ mL extraction robot and the ID kit Gene™ Mag Universal Extraction (IDvet, Grabels, France), following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and PCR amplification of the complete PPRV genome was performed on five overlapping fragments: F1 (4050 pb), F2 (3663 pb), F3 (3816 pb), F4 (3800 pb) and F5 (3335 pb). The details of the primers used are provided in Supplementary Table S1. cDNA synthesis was performed with a Reverse Transcriptase (RT) (RevertAid RT kit, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) and the specific primers of each fragment (F1 to F5), following the instructions provided with the kit. The RT-PCR program was set up as follows: 65 °C for 5 min, 42 °C for 60 min and 70 °C for 5 min. First-strand cDNA of each fragment was then amplified by PCR according to the kit protocol KAPA DNA Polymerase 250 unit (KAPA HiFi PCR Kit Kapa Biosystems, Champagne-au-Mont-d'Or, France). PCR of fragment 1 was performed with the following program: 95 °C for 3 min, 10 amplification cycles (20 s at 98 °C, 15 s at 55 °C and 4 min at 72 °C), 25 amplification cycles (20 s at 98 °C, 15 s at 58.9 °C and 4 min at 72 °C) and a final extension step at 72 °C for 4 min. The PCR program for the other fragments was 95 °C for 3 min, 10 amplification cycles (20 s at 98 °C, 15 s at 50 °C and 4 min at 72 °C), 25 amplification cycles (20 s at

98 °C, 15 s at 55.2 °C and 4 min at 72 °C) and a final extension step at 72 °C for 4 min. The PCR products were then separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel and the fragments of the expected sizes excised and purified using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit purification kit following the manufacturer's instructions (Machery-Nagel, Hoerd, France). The different amplified fragments were quantified using a Qubit fluorometer (Qubit® 2.0 fluorometer, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) and pooled in a single tube in an equimolar manner. The pool was used to prepare sequencing libraries.

For the wild type Nigeria 75/1, library preparation and sequencing had been done before this study using the HiSeq Illumina platform (Macrogen, South Korea). For the vaccine strain, deep-sequencing data had already been obtained in our laboratory (Kwiatek, personal communication). For all the other strains, the protocol below was followed. The vaccine strain was sequenced again with the following protocol.

Samples were diluted to 0.2 ng/μL, and library preparation was performed according to the instructions provided in the Nextera kit (Illumina). The libraries were prepared in "dual index", i.e., using two indexes for each sample.

The quantitative PCR (Q-PCR) "Library quantification kit" (Takara Clontech, St-Germain-en-Laye, France) was performed according to the manufacturer's instructions on a LightCycler instrument (Roche, France) to assess the exact quantity of material for each library. The distribution of fragment sizes within each library was analyzed on an Agilent 2100 bioanalyzer with the Agilent high sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France), according to the manufacturer's instructions. The quantity and average size of each library were used to pool the libraries in an equimolar manner.

Sequencing was done on a MiSeq Illumina machine at the AGAP sequencing platform (CIRAD, Montpellier, France). The samples were pooled in a group of maximum eight samples to increase the chances of obtaining a minimum depth of 100× across the entire PPR genome to study genetic diversity within viral populations.

The extremities of the genomes are usually very difficult to obtain by NGS sequencing because only a few or no good quality reads are obtained in these regions. To complete the extremities of the genome, RACE PCR (rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction) was performed following the instructions in the 5'/3' RACE kit second-generation (Roche, France) [23]. The PCR products obtained were sequenced using classical Sanger method at Genewiz (Bishop's Stortford, United Kingdom).

#### 2.4. Bioinformatic Analyses

At the end of the Illumina sequencing, the raw data obtained were first analyzed using a homemade bioinformatics pipeline (<https://github.com/loire/Varhap>) to determine the consensus sequence within the sample, as well as to detect nucleotide variations (SNVs) within the population. The pipeline calls for modules available on SAMtools [24] for the different steps of the analysis, including alignment of reads (BWA) and variant calling freebayes [25]. Variant Call Format (VCF) files summarised the exact proportion of each variant detected. These variants were determined by applying a filter on raw data. The filter most frequently used to detect variants in this study was (vcffilter -f "QA/AO > 10 & AO/RO > 0.01 & DP > 100 & RPL > 2 & RPR > 2 & SAF > 2 & SAR > 2") where QA represents the addition of base? "A" qualities, A0 (A for Alternative) represents the number of reads on the alternative base, R0 (R for reference) represents the number of reads on the reference base, DP represents the depth, RPR and RPL reads "balanced" to each side (left and right) of the site. SAF/SAR represent the number of reads on the forward/reverse sequences.

For the wild type Nigeria strain, the genome of the vaccine strain Nigeria 75/1 (GenBank Accession n° KY628761) was first used as a reference. For all other passages, the genome of the wild type Nigeria strain was used as a reference to highlight evolution towards attenuation. The analysis was performed on the SouthGreen computing cluster (CIRAD, Montpellier, France). Geneious R11 and IGV (Integrative Genome Viewer) software were used to visualize variants and to double-check alignment quality.

The genetic distance between the consensus sequence pairs obtained was calculated using the Manhattan distance method. The Manhattan distance between the viral population and consensus of the same sample was used as a measure of intra-sample genetic diversity [26]. A matrix was constructed where the part below the diagonal contains the inter-sample Manhattan distances between pairs of consensus sequences, the part above the diagonal contains the inter-sample Manhattan distances between the frequencies of the variants, and the diagonal represents the intra-sample Manhattan distances between the consensus sequence and the frequency of the variants. The different distance matrices obtained were used to visualize in two dimensions the genetic difference between strains following Höper et al. (2015) using the package Classical (Metric) Multidimensional Scaling (cmdscale) in R Studio version 1.1.456.

For the wild type, data on variant frequencies were not used for the analyses, as different sequencing protocols had been used and the results concerning genetic diversity were, therefore, not comparable.

All genomes obtained were aligned to PPRV genomes publicly available on GenBank using Clustal W as implemented in the Bioedit software to assess nucleotide variability across PPRV strains.

### 2.5. Immunofluorescence on 10T1/2 Cells

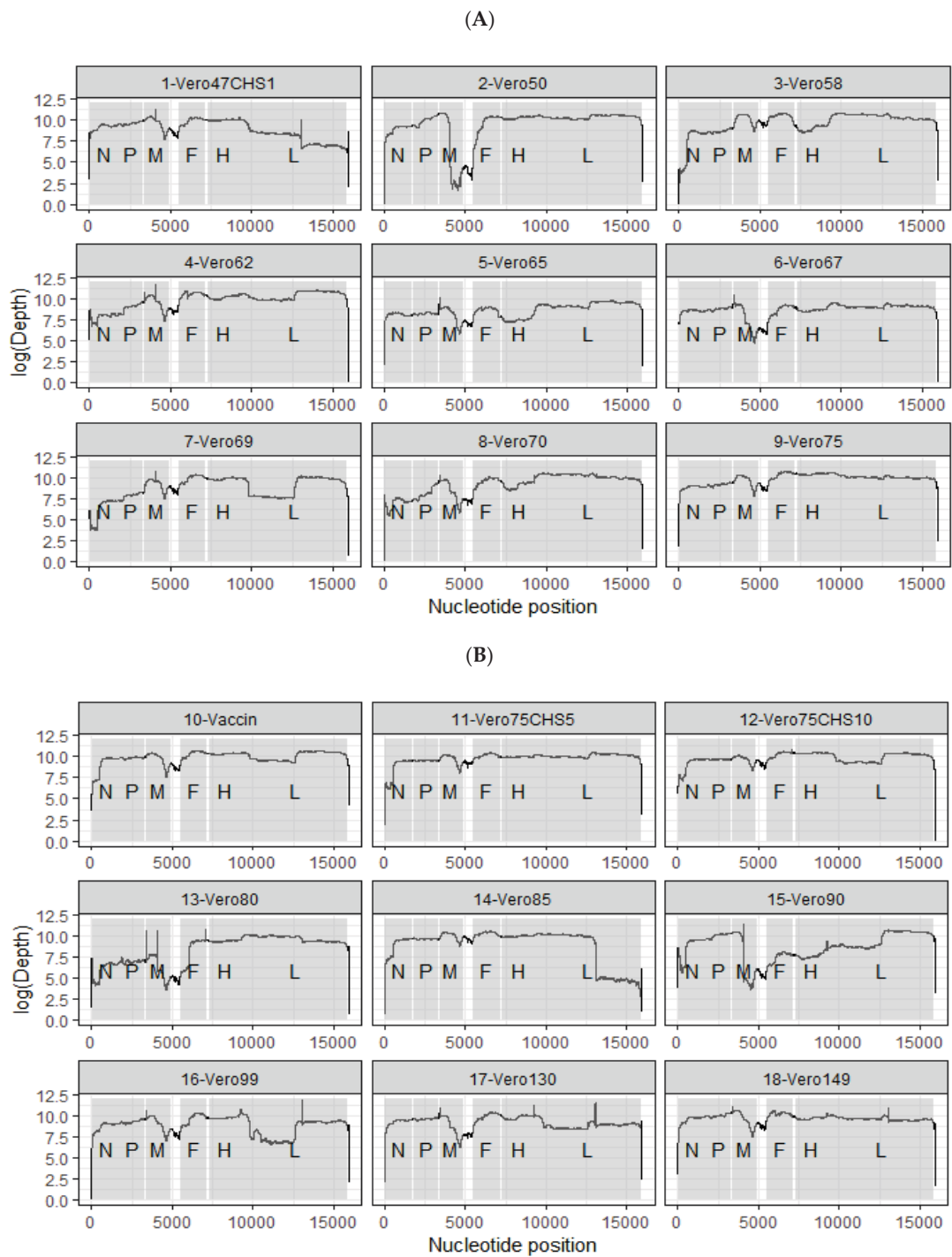
The 10T1/2 cell line was used in this study to evaluate the virulence status of different PPRV passages. Indeed, this cell line has previously shown different infection phenotype when infected by the PPRV vaccine strain or wild Nigeria 75/1 strain [20]. Virus infection was observed using immunofluorescence based on antibodies targeting the viral N protein [27]. Viral suspensions were first titrated using the method of Spearman–Karber. A 96-well flat-bottom plate was seeded with  $2.10^4$  cells per well. Different wells were infected with different viral suspensions with a multiplicity of infection (MOI) between 0.1 and 0.001 (depending on the different titers obtained). Parallel infections were carried out on Vero cells. Once the cytopathogenic effect (CPE) reached 50–60% in the Vero cells, infection of both cell types was stopped by removing the culture medium and adding an ice-cold 80% acetone solution to permeabilize cell membranes after which the cells were incubated at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min. Acetone was removed and the cells were washed three times with PBS 1X to remove excess acetone. N-antibody coupled with TRITC fluorochrome was added at a dilution of 1:100. The cells were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min and then washed three times with PBS 1X. A volume of 100  $\mu\text{l}$  of PBS was then added to each well before the cells were observed using a fluorescence microscope.

## 3. Results

### 3.1. Comparison of Consensus Genome between PPRV Wild Type and Vaccine Nigeria 75/1 Strain

Sequencing coverage and the depth obtained for each genome are shown in Figure 1 (sequencing read archive accession number XXXX, GenBank accession numbers: xxxx-yyyy). Except for the wild type strain, RACE amplification was necessary to obtain the last 1–10 bp of each extremity of the genome. Comparison of the consensus sequences for the wild type and vaccine Nigeria 75/1 strains showed that only 18 mutations differentiate the two strains. Seventeen out of 18 mutations were present at a frequency of 100% in sites with above 100x coverage, while the wild type variant at position 36 was still present at 14% frequency in the vaccine strain (Table 1). These mutations were distributed throughout the genome both in coding and non-coding regions and in the leader and trailer regions of the genome (Table 1). Nine mutations were synonymous and nine were not.





**Figure 1.** Summary of the different viral strains made available during this study. Coverage and depth of all the sequenced passages are shown in both (A) and (B). CHS: CV1 cell line stably expressing the goat SLAM.

**Table 1.** Evolution of the mutations that led to mitigation of the vaccine strain before the vaccine was obtained.

Mutations	Regions	POS	Passages										
			Wild Type	Vero 47 CHS1	Vero 50	Vero 58	Vero 62	Vero 65	Vero 67	Vero 69	Vero 70	Vero 75	Vaccin CIRAD
1	Leader	5*	A	.	.	.	.	A/G	A => G	.	.	.	.
2	Leader	36	A	A => G (100%)	.	.	A/G (3%)(97%)	A/G (0%)(100%)	.	A/G (2%)(98%)	A/G (100%)	A/G (2%)(97%)	A/G (14%)(85%)
3	N CDS	221	T	T => C (100%)	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	N CDS	1513	T	T => C (100%) L => P	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	P mRNA	1795	C	C => T (99%) G => A (99%)	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	P CDS	3158	G	G => E A => G (100%)	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	M CDS	3694	A	K => R A => C (1%)(99%)	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	M CDS	4046	A	R => S G => A (100%)	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	M mRNA	4559	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	F CDS	5627	A	.	A => G (14%)(85%)	.	A/G (4% (96%)	.	.	.	.	.	.
11	F CDS	6422	A	A => C (100%) K => E	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	F CDS	6846	A	.	A/G (68%)(32%)	.	A => G (1% (99%)	.	.	.	.	.	.
13	H CDS	7384	A	A => C (100%) N => T	A/C (3% (97%)	.	.	.	.	.	.	.	.
14	H CDS	8645	C	.	C/T (91% (9%)	C => T (4% (96%)	.	.	.	.	.	.	.

Table 1. Cont.

Mutations	Regions	POS	Passages										
			Wild Type	Vero 47 CHS1	Vero 50	Vero 58	Vero 62	Vero 65	Vero 67	Vero 69	Vero 70	Vero 75	Vaccin CIRAD
15	H CDS	8829	C	.	.	C/A (74%) (26%)	C => A (100%) R => S	C/A (17%)(83%)	C/A (3%) (97%)	.	.	.	.
16	L CDS	12193	A	A => C (100%) D => A G => A (100%) D => N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	L CDS	15777	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	Trailer	15946*	C	/	/	C => G	.	.	.	.	.	.	.

Mutations (1:18) represent the 18 mutations separating the wild type Nigeria strain from the vaccine strain; POS, position in the PPRV genome; Vero x CHS y, virus obtained after x passages in Vero cells and y passages in CHS cells; (/) no data obtained; (.) Change equal to the change observed in the previous passage. Percentages represent the frequency of presence of certain bases within the population. The positions highlighted are those that host non-synonymous mutations. \* Results obtained after RACE analysis.

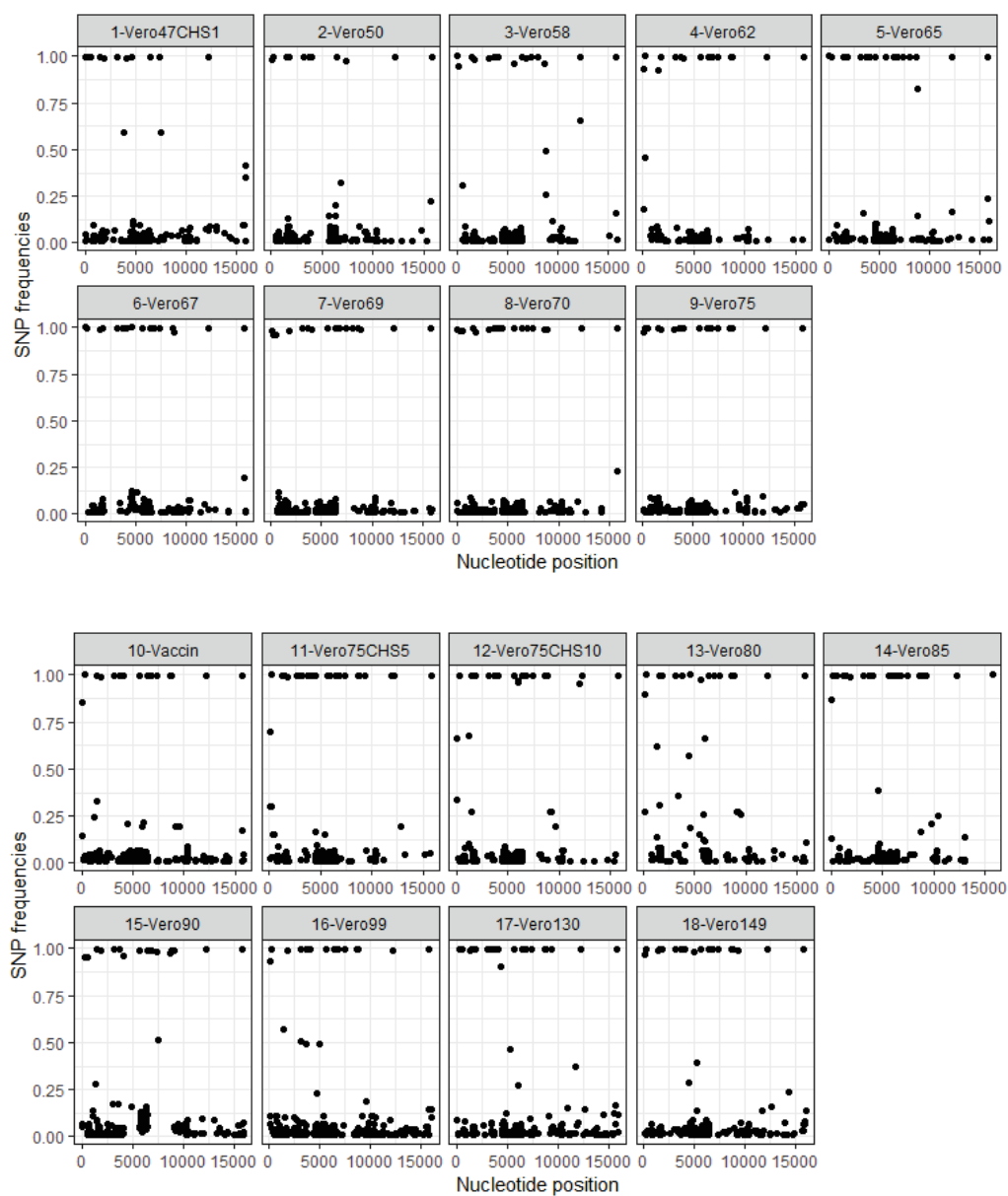


Non-synonymous mutations were observed at positions: 1513 (L => P), 3158 (G => E), 3694 (K => R), 4046 (R => S), 6422 (K => E), 7384 (N => T), 8829 (R => S), 12193 (D => A) and 15777 (D => N). All this information is summarized in Table 1.

Twelve out of the 18 mutations observed are at genome positions that are not variable in other PPRV genome strains available publicly (see Supplementary Material). The vaccine variants at position 5 and 1513 are shared with another vaccine strain (Sungri 1996). Positions 36, 221, 4046, and 4559 are variable in multiple PPRV genome included in the alignment (see Supplementary Material).

### 3.2. Appearance of Variants in Intermediate Attenuation Passages

The distribution of single nucleotide polymorphisms (SNP) along the genomes is shown in Figure 2. Variants were found throughout the genome, although fewer were observed along the L viral protein.



**Figure 2.** Distribution of SNP frequencies according to positions in the genome. SNP: Single nucleotide polymorphism. Position: PPRV genome from 0 to 15,948 bp. The Vero47CHS1 passage represents 47 passages on the Vero cells and one passage on the CHS cells. The Vero75CHS5 passage represents 75 passages on Vero cells and five passages on CHS cells.

At the earliest passage at our disposal (Passage 47 on Vero cells + one passage on CHS cells), 12 out of the 18 mutations were present at a frequency of 100% (Table 1). However, a variant was identified at a low frequency (2–3%) at position 36 in most passages after passage 47. Five of the remaining six mutations appeared between P47 and P62. Three of these mutations were already present at a frequency of 100% at P62, whereas the “vaccine” variant reached 100% frequency at P65 for position 36 and at P69 for position 8829. RACE PCR and Sanger sequencing of the PPRV genome leader and trailer regions showed that the mutation at position 15,946 appeared in the population at passage 58 on Vero cells. Both vaccine and wild type variants were observed on the chromatogram at position 5 in the leader region of PPRV genome for P65. Only the vaccine variant was observed at P67 at the same position (Supplementary Figure S1).

### 3.3. Appearance of Genetic Variants in Passages after the Vaccine Master Seed

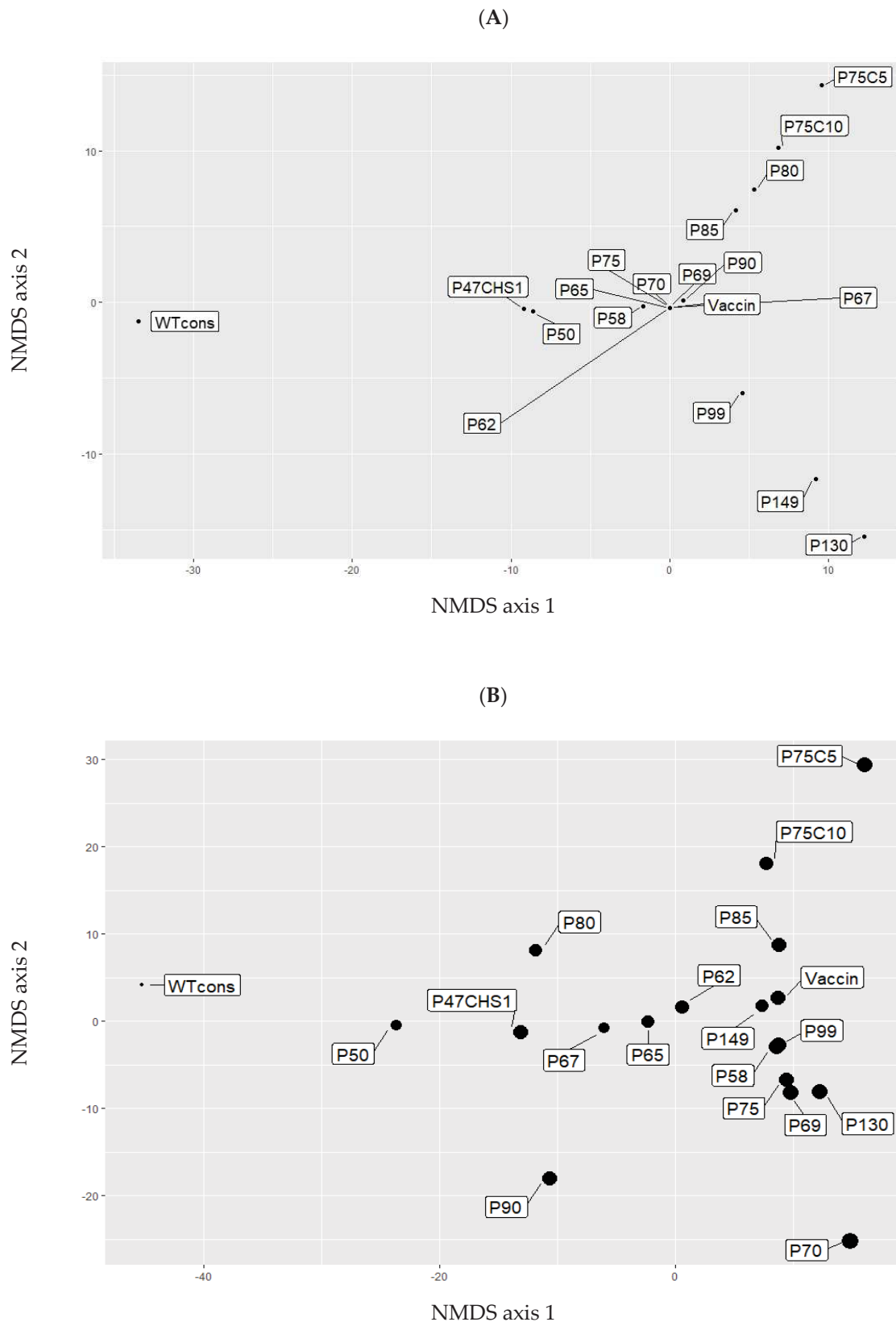
All 18 mutations differentiating the wild type and vaccine strains remained fixed in the population with no change in frequency except for mutations at positions 36, 4046 and 5627 at which the wild type variant sometimes reappeared at low frequencies (Table 2). Low-frequency variants were observed in other regions of the genome in these passages. The distribution of low-frequency variants was similar to that observed in intermediate attenuation passages, except that more variants appeared in the L gene at P90, P99, P130, and P140 (Figure 2). Some new variants increased in frequency and reached 100% in passages after the vaccine strain (Supplementary Figure S2).

Two types of cells (Vero or CHS) were used to produce up to 10 new passages from the vaccine strain. Comparison of viral genetic diversity within the two types of cells (Vero or CHS) revealed a strong increase in the amount of SNPs in the 5th passage produced on CHS (called Vero75 CHS5) compared to the 5th passage produced on Vero cells (called Vero80, 81 SNPs in Vero 80 versus 394 SNPs in Vero 75 CHS 5). However, after 10 passages, the same amount of SNPs was observed in both types of cells (Vero 85 = 366 SNPs, Vero 75 CHS 10 = 377). NMDS analyses showed that the evolution of passages after the vaccine strain differed between historical passages (P90, P99, P130, P140) and the newly produced passages (P80, P85, V75C5, V75P10, Figure 3). When only the consensus sequences were used to calculate genetic distances, the distribution of strains in the graph coincided with sequential cell passages (Figure 3A). When all the variants in each population were taken into account to compute genetic distances, the distribution appeared to be more complex (Figure 3B). The genetic differentiation of V75C5 and V75C10 from other passages was more apparent. Genetic diversity appeared especially high in P70, isolating this passage from previous or subsequent passages. P90 was in an intermediate position between wild type and vaccine strains.

**Table 2.** Evolution of the mutations that led to the mitigation of the vaccine strain after the vaccine was obtained.

Mutations	Regions	POS	Passages								
			Vaccin CIRAD	Vero 75 CHS 5	Vero 75 CHS 10	Vero 80	Vero 85	Vero 90	Vero 99	Vero 130	Vero 149
1	Leader	5	G	/	/	/	/	/	/	/	/
2	Leader	36	A/G (14%) (85%)	A/G (30%) (70%)	A/G (33%) (67%)	A/G (9%) (90%)	A/G (13%) (87%)	A/G (4%)(95%)	A/G (7%) (93%)	A/G (3%) (97%)	.
3	N CDS	221	C	.	.	.	.	.	.	.	.
4	N CDS	1513	C	.	.	.	.	.	.	.	.
5	P mRNA	1795	T	.	.	.	.	.	.	.	.
6	P CDS	3158	A	.	.	.	.	.	.	.	.
7	M CDS	3694	G	.	.	.	.	.	.	.	.
8	M CDS	4046	C	.	.	A/C (8%) (91%)	A/C (100%)	A/C (4%)(96%)	A/C (100%)	.	.
9	M mRNA	4559	A	.	.	.	.	.	.	.	.
10	F CDS	5627	G	.	.	A/G (2%) (98%)	A/G (100%)	.	.	.	.
11	F CDS	6422	C	.	.	.	.	.	.	.	.
12	F CDS	6846	G	.	.	.	.	.	.	.	.
13	H CDS	7384	C	.	.	.	.	.	.	.	.
14	H CDS	8645	T	.	.	.	.	.	.	.	.
15	H CDS	8829	A	.	.	.	.	.	.	.	.
16	L CDS	12193	C	.	.	.	.	.	.	.	.
17	L CDS	15777	A	.	.	.	.	.	.	.	.
18	Trailer	15946	G	/	/	/	/	/	/	/	/

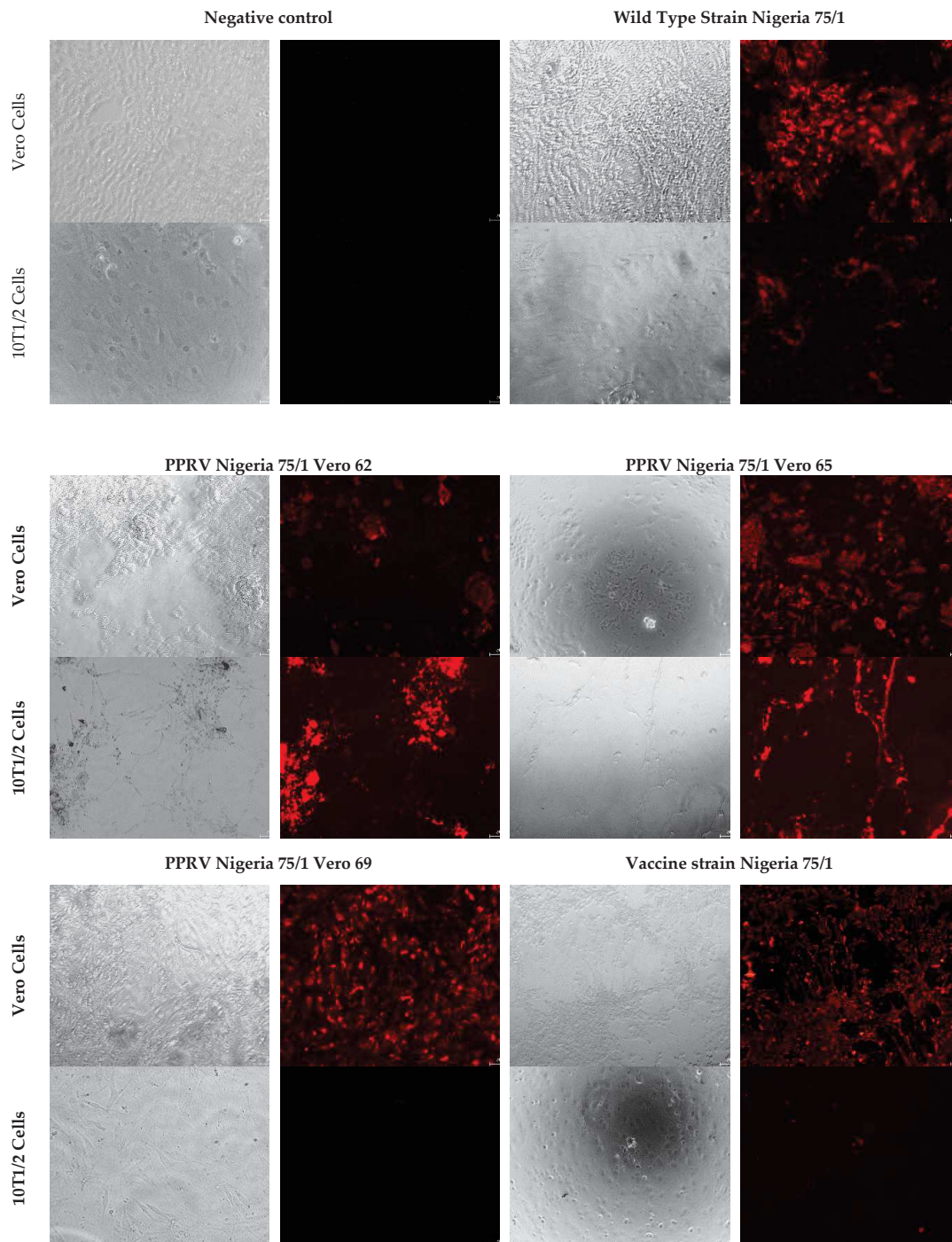
Mutations (1:18) represent the 18 mutations that led to the mitigation; (/) no data obtained; (.) Change equal to change observed in the previous passage. Percentages represent the frequency of presence of certain basis within the population. The positions highlighted are those that host non-synonymous mutations.



**Figure 3.** Non-metric multidimensional scaling (NMDS) between each sequenced passage. The obtained NMDS was calculated from matrix (Supplementary Table S2). A: NMDS of consensus sequence, B: NMDS of intraspecific diversity. WT cons: Wild type consensus. P47CHS1: Passage 47 on Vero cells + one passage on CHS cells. P50 50th passage on Vero cells (like other P . . . in these plots).

### 3.4. In Vitro Infection of 10T1/2 Cell Line

In this cellular model, immunofluorescence tests revealed a large number of viral particles in cells infected by the wild type Nigeria strain, and in all intermediate passages up to passage 65. No or few viral particles were detected in cells infected with the vaccine strain, or in passages 67 and beyond (Figure 4).



**Figure 4.** Infection of 10 T1/2 cells with different cellular passages leading to the attenuation of the vaccine strain Nigeria 75/1.

#### 4. Discussion

Mechanisms leading to attenuation in morbilliviruses are poorly understood. Many studies have been conducted on the attenuation of the measles virus, but all focused on the final formulation of the vaccine and did not investigate the process that led to the attenuation process [8,12]. High throughput sequencing of the original wild type strain and attenuation passages that led to vaccine Nigeria 75/1 strain offers a unique opportunity to identify mutations that are potentially important for PPRV attenuation and to better understand the evolution of morbillivirus during serial passages in cell cultures.

Our results show that only 18 mutations separate the wild type strain and the vaccine strain. Even if the wild type strain was not highly pathogenic, it still provoked clinical symptoms and could be transmitted [10]. Therefore, some of these mutations may play an important role in determining PPRV pathogenicity.

Thirteen mutations were located in coding regions of the viral proteins, of which nine were non-synonymous mutations. Some of these mutations may modify important protein-protein interactions. Mutations in glycoproteins F and H may affect the capacity of the viral particle to bind to cell receptors, and therefore, could directly affect the virus entry mediated by F protein and triggered by an interaction with H protein [11]. As observed in the measles virus, adaptation of PPRV to Vero cell culture may procure the ability to use the complement regulator CD46 as a major receptor to mediate virus entry and intercellular fusion [28].

Unlike virulent strains, PPRV vaccine strains are only lymphotropic and no longer epitheliotropic, impeding virus shedding, and transmission between animals [10]. Mutations in the coding sequence of P/V/C and M proteins may modify cell tropism and pathogenicity of the vaccine strain. Notably, comparative nucleotide sequence analyses revealed that only two nucleotide differences separated two measles virus strains with different cell tropism and pathogenicity, one in the P/V/C gene and the other in the M gene [11].

Mutations in the L and P coding sequence may induce dysfunctional activity of the polymerase and variable efficiency of transcription, which can directly affect protein expression [29]. The L gene of an attenuated MeV strain has also been shown to reduce gene expression and virus propagation in cell culture and in mice expressing hSLAM [30]. Therefore, mutations in the polymerase protein in PPRV could contribute to an attenuated phenotype, but also to the stability of attenuated phenotype and the increase in viral replication [31].

Synonymous mutations and mutations in non-coding regions may also be important for the Nigeria 75/1 attenuation process. Synonymous mutations may lead to codon deoptimization, a process linked to attenuation of several viruses including Zika and influenza A viruses [32,33]. Sequences of nine vaccine MeV strains compared with Edmonston wild-type measles virus sequence revealed differences in the noncoding regions of the genomes as well as in coding regions in all viral proteins [12]. The 5'/3' UTR regions are involved in the fixation of the transcription factor for the RNA-dependent viral polymerase. All cis-acting regulatory elements such as promoters and encapsidation signals are contained in the first 107 and the last 109 nucleotides of the genome [34]. Consequently, mutations detected in the leader and trailer regions may interfere with viral replication. The mutation observed in the inter-regions between M and F could affect PPRV replication and cytopathogenicity. By having both long M and F UTRs, MeV may replicate efficiently and minimize cytopathogenicity [35]. Moreover, regions rich in GC could fold in complex secondary RNA structures and play a role in regulating transcription of the M and F genes [12].

Taken together, these studies of MeV suggest that all 18 mutations observed between virulent and attenuated PPRV Nigeria 75/1 strains could play a role in its attenuation. Our study provides only a few clues to whether some mutations are more important than others. Indeed, 12 out of 18 mutations were already fixed in the viral population at passage 47. According to the results of the original attenuation experiments [10], after 20 passages in cell cultures, Nigeria 75/1 strain provoked only a transitory rise in temperature over a period of 48 h following the incubation period (5–6 days)



when inoculated in goats. From the 55th passage on, infected animals presented no clinical signs of the infection, and were unable to infect naïve goats through direct contact. Therefore, the key mutations for attenuation of the wild type strain should be among the 12 mutations that appeared before passage 55. Sequencing of the passages before passage 47 would be necessary to identify the time of appearance of the 12 mutations during the attenuation process and perhaps to be able to link some of them with the loss of symptoms in goats.

Results of *in vitro* infections of 10T1/2 cells suggested that the mutation at position 5 in the leader region of the PPRV genome is very important for the capacity of virus replication in this cell type. It is not clear if this mutation is also important for *in vivo* virulence. However, comparisons of PPRV genomes available in GenBank show that, to date, this mutation has only been found in vaccine strains and in one strain isolated in Ethiopia in 1994 (GenBank accession number: KJ867542). This mutation is present in other paramyxoviruses, either in vaccines or virulent strains [36,37]. In addition, IFIT-1, an interferon-induced antiviral effector, can bind to the 5' UTR region. Mutations in the 5' UTR have been reported to block recognition of IFIT-1, and therefore, could disrupt the function of this antiviral protein [38]. Conversely, the attenuation process may involve mutations in the 5' UTR, which could facilitate IFIT-1 binding and immune restriction.

Unfortunately, it was only possible to obtain the extremity of the genomes by Sanger sequencing, so the importance of low frequency variant could not be fully explored. Still, the presence of the two variants was identified in passage 65, a passage still able to infect cells 10T1/2, suggesting that the appearance of the vaccine variant did not impede the capacity of some of the viral population to infect these cells. Further *in vitro* and *in vivo* experiments are needed to explore the role and importance of this mutation.

Our results also identified some diversity of variants in each virus population. Low-frequency variants appeared to be distributed along the whole genome in a consistent manner across passages. Our results showed no low-frequency variants at the positions of the 18 mutations potentially associated with attenuation, except position 36 and 4046. These two positions are variable across PPRV lineages, suggesting that the presence or absence of specific variant at these positions is not important for the attenuation of PPRV. In some instances, some variants increased in frequency and became fixed in the population (for example T1359A, fixed after the passage 130, Supplementary Figure S2), suggesting selection pressure possibly favoring adaptation to the cell culture system [28]. Results from passages performed in parallel on Vero and CHS cells show that diversity is higher in CHS cells, especially after five passages. Notably, a wild type variant at one of the 18 mutations potentially associated with attenuation (position 5627) re-appeared at low frequency. These results suggest that the virus is subject to different selection pressure in different types of cells, with CHS cells representing a higher risk of reversal or loss of vaccine efficacy, possibly due to the expression of SLAM receptors in these cells. This hypothesis is supported by results of a previous infection study showing that cell culture passages affect the pathogenicity of PPRV strains, with strains passaged in cells expressing SLAM demonstrating stronger virulence [39].

Multidimensional analysis showed that the new passages produced were genetically different from historical passages after the vaccine strain. This may be due to differences in the cell culture and in the passage methodology used, resulting in a different virus replication rate, and therefore, different viral population diversity and selection pressures in the system. Therefore, the pathway to attenuation or to evolution in cell cultures, in general, may differ even for the same PPRV strain depending on the method used. For example, in another attempt to produce vaccine from the same wild-type strain, loss of clinical symptoms of PPRV was not observed before the 65th passage [40] much later than the 20th passage in the first study [10].

Our study suggests that only a few mutations can have a serious impact on the pathogenicity of PPRV. Further work on the effect of these mutations on virus replication or protein-protein interactions may provide advance our understanding of the mechanisms of attenuation in morbilliviruses. Moreover, information on the mutations involved in attenuation may help design live-attenuated viruses, notably

through genome re-encoding [41]. Importantly, our results show that the risk of reversal of PPRV strain Nigeria 75/1 after serial passages in Vero, and even CHS cell cultures, seems low. However, it is still recommended to limit the number of passages during vaccine production to ensure the quality of vaccines to be used in the eradication campaign.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4915/11/8/724/s1>. Table S1: Primer set used for long fragment analysis of the PPRV genome, Table S2: Pairwise Manhattan distances calculated based on the base frequencies and the consensus sequences (diagonal from top/left to bottom/right highlighted in bold), the base frequencies in the populations (above the diagonal), or the consensus sequences (below the diagonal), respectively; Figure S1: Chromatogram alignment of the RACE PCR Sequencing, Figure S2: Variants appeared and/or disappeared during cell passages, Supplementary FASTA file: Genomes PPRV-aligned.fas.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.B., G.L., R.-j.E., M.B.; methodology, R.-j.E., M.B., O.K., S.G., and A.B.; formal analysis, R.-j.E., M.B., E.L. and A.B.; investigation, R.-j.E., M.B., S.G., O.K. and A.B.; resources, G.L., R.S.d.A., E.L. and A.B.; software, E.L.; data curation, R.-j.E., M.B., E.L., O.K. and A.B.; writing—original draft preparation, R.-j.E.; writing—review and editing, R.-j.E., G.L., R.S.d.A., O.K., S.G. and A.B.; visualization, R.-j.E.; supervision, A.B.; funding acquisition, G.L. and A.B.

**Acknowledgments:** The research was supported by internal funds from CIRAD and a grant (SI2.756606) from the European Commission Directorate General for Health and Food Safety awarded to the European Union Reference Laboratory for Peste des Petits Ruminants (EURL-PPR).

**Conflicts of Interest:** The authors belong to the European Union’s Reference Laboratory for Peste des Petits ruminants and to the initial production of the final formulation of the Nigeria 75/1 vaccine strain.

## References

1. Kumar, N.; Maherchandani, S.; Kashyap, S.; Singh, S.; Sharma, S.; Chaubey, K.; Ly, H. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: A comprehensive review. *Viruses* **2014**, *6*, 2287–2327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jones, B.A.; Rich, K.M.; Mariner, J.C.; Anderson, J.; Jeggo, M.; Thevasagayam, S.; Cai, Y.; Peters, A.R.; Roeder, P. The economic impact of eradicating peste des petits ruminants: A benefit-cost analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. OIE; FAO. Global Control and Eradication of Peste des Petits Ruminants. 2015. Available online: <http://www.fao.org/3/a-av222e.pdf> (accessed on 6 August 2019).
4. Amarasinghe, G.K.; Bào, Y.; Basler, C.F.; Bavari, S.; Beer, M.; Bejerman, N.; Blasdel, K.R.; Bochnowski, A.; Briese, T.; Bukreyev, A.; et al. Taxonomy of the order Mononegavirales: Update 2017. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 2493–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Parida, S.; Muniraju, M.; Mahapatra, M.; Muthuchelvan, D.; Buczkowski, H.; Banyard, A.C. Peste des petits ruminants. *Vet. Microbiol.* **2015**, *181*, 90–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Battisti, A.J.; Meng, G.; Winkler, D.C.; McGinnes, L.W.; Plevka, P.; Steven, A.C.; Morrison, T.G.; Rossmann, M.G. Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13996–14000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Baron, M.D.; Banyard, A.C.; Parida, S.; Barrett, T. The Plowright vaccine strain of Rinderpest virus has attenuating mutations in most genes. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 1093–1101. [[CrossRef](#)]
8. Griffin, D.E. Measles Vaccine. *Viral Immunol.* **2018**, *31*, 86–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Taylor, W.P.; Abegunde, A. The isolation of peste des petits ruminants virus from Nigerian sheep and goats. *Res. Vet. Sci.* **1979**, *26*, 94–96. [[CrossRef](#)]
10. Diallo, A.; Taylor, W.P.; Lefèvre, P.C.; Provost, A. Atténuation d’une souche de virus de la peste des petits ruminants: Candidat pour un vaccin homologue vivant. *Rev. Elev. Pays Trop.* **1989**, *42*, 311–319.
11. Takeuchi, K.; Miyajima, N.; Kobune, F.; Tashiro, M. Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes* **2000**, *20*, 253–257. [[CrossRef](#)]
12. Bankamp, B.; Takeda, M.; Zhang, Y.; Xu, W.; Rota, P.A. Genetic Characterization of Measles Vaccine Strains. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, S533–S548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



13. Enchery, F.; Hamers, C.; Kwiatek, O.; Gaillardet, D.; Montange, C.; Brunel, H.; Goutebroze, S.; Philippe-Reversat, C.; Libeau, G.; Hudelet, P.; et al. Development of a PPRV challenge model in goats and its use to assess the efficacy of a PPR vaccine. *Vaccine* **2019**, *37*, 1667–1673. [CrossRef] [PubMed]
14. OIE. Peste des petits ruminants (infection par le virus de la peste des petits ruminants). In *Manuel des Tests de Diagnostic et des Vaccins pour les Animaux Terrestres*; OIE: Paris, France, 2019; Available online: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.07.09\\_PPR.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.07.09_PPR.pdf) (accessed on 6 August 2019).
15. Lokugamage, N.; Ikegami, T. Genetic stability of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine during serial passages in culture cells. *NPJ Vaccines* **2017**, *2*, 20. [CrossRef] [PubMed]
16. Parameswaran, P.; Wang, C.; Trivedi, S.B.; Eswarappa, M.; Montoya, M.; Balmaseda, A.; Harris, E. Intrahost Selection Pressures Drive Rapid Dengue Virus Microevolution in Acute Human Infections. *Cell Host Microbe* **2017**, *22*, 400–410. [CrossRef] [PubMed]
17. Ehrbar, D.J.; Ngo, K.A.; Campbell, S.R.; Kramer, L.D.; Ciota, A.T. High levels of local inter- and intra-host genetic variation of West Nile virus and evidence of fine-scale evolutionary pressures. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *51*, 219–226. [CrossRef] [PubMed]
18. Satharasinghe, D.A.; Murulitharan, K.; Tan, S.W.; Yeap, S.K.; Munir, M.; Ideris, A.; Omar, A.R. Detection of Inter-Lineage Natural Recombination in Avian Paramyxovirus Serotype 1 Using Simplified Deep Sequencing Platform. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1907. [CrossRef] [PubMed]
19. Stapleford, K.A.; Moratorio, G.; Henningsson, R.; Chen, R.; Matheus, S.; Enfissi, A.; Weissglas-Volkov, D.; Isakov, O.; Blanc, H.; Mounce, B.C.; et al. Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004402. [CrossRef] [PubMed]
20. Carmelato, J.; Albina, E.; Puech, C.; Franco, A.; Minet, C.; Servan de Almeida, R. Identification of a murine cell line that distinguishes virulent from attenuated isolates of the morbillivirus Peste des Petits Ruminants, a promising tool for virulence studies. *Viruses Spec. Morbillivirus Infect* **2019**. Submitted.
21. Adombi, C.M.; Lelenta, M.; Lamien, C.E.; Shamaki, D.; Koffi, Y.M.; Traoré, A.; Silber, R.; Couacy-Hymann, E.; Bodjo, S.C.; Djaman, J.A.; et al. Monkey CV1 cell line expressing the sheep—Goat SLAM protein: A highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *J. Virol. Methods* **2011**, *173*, 306–313. [CrossRef]
22. Freeman, K.P.; Castro, A.E.; Kautz, C.E. Unusual characteristics of a parvovirus isolated from a clinically ill steer. *Vet. Microbiol.* **1986**, *11*, 61–68. [CrossRef]
23. Cheng, E.; Mir, M.A. Signatures of host mRNA 5′ terminus for efficient hantavirus cap snatching. *J. Virol.* **2012**, *86*, 10173–10185. [CrossRef] [PubMed]
24. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [CrossRef] [PubMed]
25. Garrison, E.; Marth, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. *arXiv* **2012**, arXiv:12073907Q-Bio.
26. Höper, D.; Freuling, C.M.; Müller, T.; Hanke, D.; von Messling, V.; Duchow, K.; Beer, M.; Mettenleiter, T.C. High definition viral vaccine strain identity and stability testing using full-genome population data—The next generation of vaccine quality control. *Vaccine* **2015**, *33*, 5829–5837. [CrossRef] [PubMed]
27. Libeau, G.; Lefevre, P.C. Comparison of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* **1990**, *25*, 1–16. [CrossRef]
28. Baldo, A.; Galanis, E.; Tangy, F.; Herman, P. Biosafety considerations for attenuated measles virus vectors used in virotherapy and vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* **2016**, *12*, 1102–1116. [CrossRef] [PubMed]
29. Ayata, M.; Komase, K.; Shingai, M.; Matsunaga, I.; Katayama, Y.; Ogura, H. Mutations Affecting Transcriptional Termination in the P Gene End of Subacute Sclerosing Panencephalitis Viruses. *J. Virol.* **2002**, *76*, 13062–13068. [CrossRef] [PubMed]
30. Takeda, M.; Ohno, S.; Tahara, M.; Takeuchi, H.; Shirogane, Y.; Ohmura, H.; Nakamura, T.; Yanagi, Y. Measles Viruses Possessing the Polymerase Protein Genes of the Edmonston Vaccine Strain Exhibit Attenuated Gene Expression and Growth in Cultured Cells and SLAM Knock-In Mice. *J. Virol.* **2008**, *82*, 11979–11984. [CrossRef]

31. Le Nouën, C.; McCarty, T.; Brown, M.; Smith, M.L.; Lleras, R.; Dolan, M.A.; Mehedi, M.; Yang, L.; Luongo, C.; Liang, B.; et al. Genetic stability of genome-scale deoptimized RNA virus vaccine candidates under selective pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E386–E395. [[CrossRef](#)]
32. Li, P.; Ke, X.; Wang, T.; Tan, Z.; Luo, D.; Miao, Y.; Sun, J.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Hu, Q.; et al. Zika Virus Attenuation by Codon Pair Deoptimization Induces Sterilizing Immunity in Mouse Models. *J. Virol.* **2018**, *92*, e00701-18. [[CrossRef](#)]
33. Nogales, A.; Baker, S.F.; Ortiz-Riano, E.; Dewhurst, S.; Topham, D.J.; Martinez-Sobrido, L. Influenza A Virus Attenuation by Codon Deoptimization of the NS Gene for Vaccine Development. *J. Virol.* **2014**, *88*, 10525–10540. [[CrossRef](#)]
34. Sidhu, M.S.; Chan, J.; Kaelin, K.; Spielhofer, P.; Radecke, F.; Schneider, H.; Masurekar, M.; Dowling, P.C.; Billeter, M.A.; Udem, S.A. Rescue of Synthetic Measles Virus Minireplicons: Measles Genomic Termini Direct Efficient Expression and Propagation of a Reporter Gene. *Virology* **1995**, *208*, 800–807. [[CrossRef](#)]
35. Takeda, M.; Ohno, S.; Seki, F.; Nakatsu, Y.; Tahara, M.; Yanagi, Y. Long Untranslated Regions of the Measles Virus M and F Genes Control Virus Replication and Cytopathogenicity. *J. Virol.* **2005**, *79*, 14346–14354. [[CrossRef](#)]
36. Harcourt, B.H.; Tamin, A.; Halpin, K.; Ksiazek, T.G.; Rollin, P.E.; Bellini, W.J.; Rota, P.A. Molecular Characterization of the Polymerase Gene and Genomic Termini of Nipah Virus. *Virology* **2001**, *287*, 192–201. [[CrossRef](#)]
37. Parks, C.L.; Lerch, R.A.; Walpita, P.; Wang, H.-P.; Sidhu, M.S.; Udem, S.A. Analysis of the Noncoding Regions of Measles Virus Strains in the Edmonston Vaccine Lineage. *J. Virol.* **2001**, *75*, 921–933. [[CrossRef](#)]
38. Hyde, J.L.; Gardner, C.L.; Kimura, T.; White, J.P.; Liu, G.; Trobaugh, D.W.; Huang, C.; Tonelli, M.; Paessler, S.; Takeda, K.; et al. A Viral RNA Structural Element Alters Host Recognition of Nonself RNA. *Science* **2014**, *343*, 783–787. [[CrossRef](#)]
39. Baron, J.; Bin-Tarif, A.; Herbert, R.; Frost, L.; Taylor, G.; Baron, M.D. Early changes in cytokine expression in peste des petits ruminants disease. *Vet. Res.* **2014**, *45*, 22. [[CrossRef](#)]
40. Adu, F.D.; Joannis, T.; Nwosuh, E.; Abegunde, A. Pathogenicity of attenuated peste des petits ruminants virus in sheep and goats. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* **1990**, *43*, 23–26.
41. Klitting, R.; Riziki, T.; Moureau, G.; Piorkowski, G.; Gould, E.A.; de Lamballerie, X. Exploratory re-encoding of yellow fever virus genome: New insights for the design of live-attenuated viruses. *Virus Evol.* **2018**, *4*. [[CrossRef](#)]

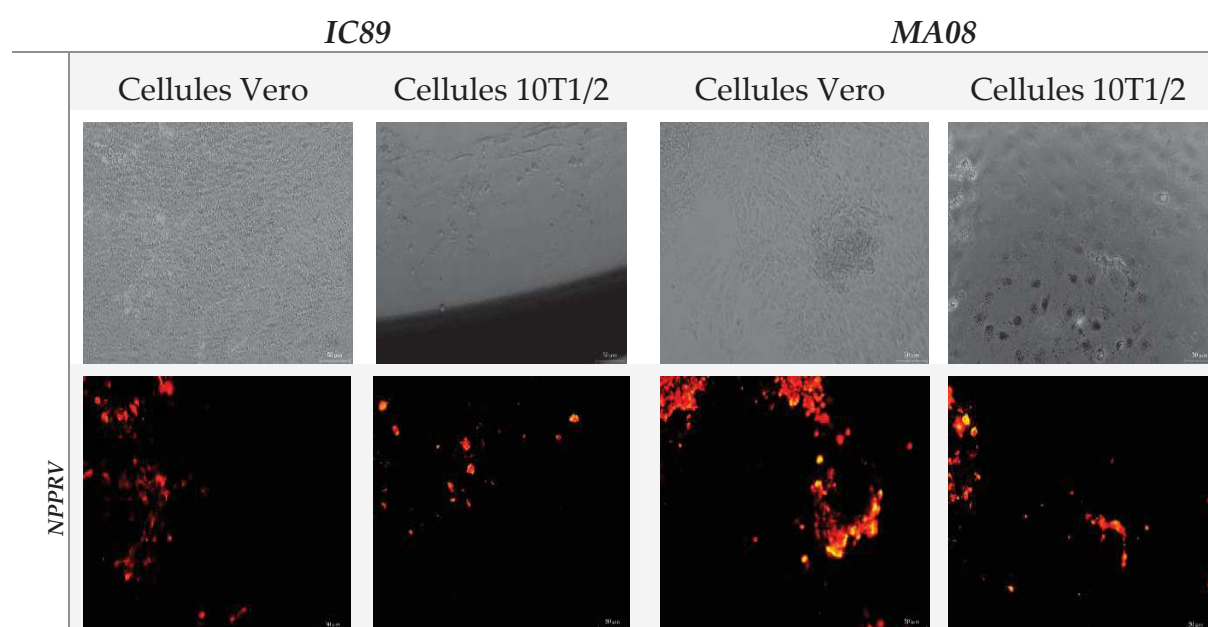


© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

b. Etude comparative des souches virulentes PPRV MA08 et PPRV IC89

Suite à l'identification de mutations associées à l'atténuation dans la souche vaccinale Nigeria 75/1, les souches PPRV Côte d'Ivoire 1989 (IC89) et Maroc 2008 (MA08) qui ont montré une virulence différente chez les chèvres Saanen ont été analysées pour la présence de ces mêmes types de mutations. Pour ce faire, la même méthodologie que celle utilisée pour analyser les mutations de la souche vaccinale a été utilisée.

Dans un premier temps, ces différentes souches ont été utilisées pour infecter les cellules murines 10T1/2 ayant montré leur permissivité à la réplication virale des souches virulentes du PPRV. Les résultats obtenus nous indiquent la souche IC89 ainsi que la souche MA08 continuent à se répliquer dans ce modèle (**Figure 10**).



**Figure 10. Infections des cellules Vero et 10T1/2 par les souches virulentes PPRV IC89 et MA08.** L'infection des différents types cellulaires a été faite en parallèle. Une fois l'apparition d'effets cytopathogènes sur les cellules Vero, les infections ont été arrêtées puis révélées en utilisant le protocole d'immunofluorescence détaillé dans Eloiflin et al. (2019).

Dans un second temps, nous avons séquencé les différentes souches suivant la méthode décrite dans Eloiflin *et al.* 2019. Le séquençage en profondeur de ces souches virales a fourni une bonne couverture et une bonne profondeur sur la quasi-totalité du génome viral.

Cependant, la région inter-génique entre les gènes M et F du virus a révélé un niveau de profondeur de séquençage plus faible (**Figure 11A**), probablement associé à la richesse du motif « GC » dans cette région, entraînant des erreurs de séquençage.

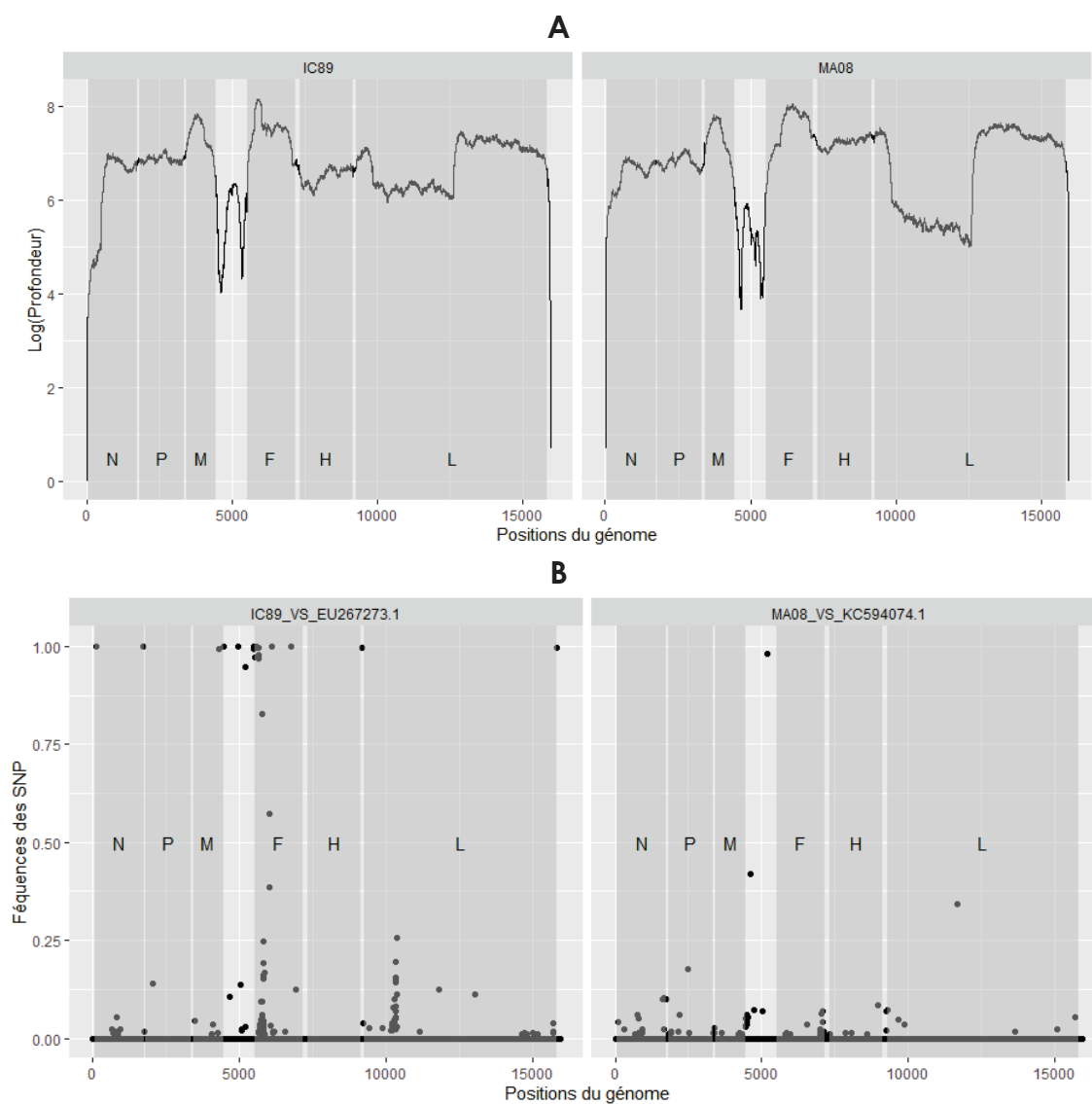
Les génomes consensus ainsi obtenus ont été comparés aux génomes publiés. Ainsi, le génome de la souche IC89 a été comparé au génome complet EU267273.1 d'une souche PPRV Côte d'Ivoire 1989 et le génome de la souche MA08 a été comparé au génome complet KC594074.1 d'un isolat PPRV Maroc 2008.

Les différences entre ces comparaisons sont matérialisées par la présence de polymorphismes de nucléotides simples (SNP) dans les différentes régions du génome.

Ces SNP ont été obtenus en appliquant le filtre suivant :  $QA/AO > 10$  &  $AO/RO > 0.01$  &  $DP > 100$  &  $RPL > 2$  &  $RPR > 2$  &  $SAF > 2$  &  $SAR > 2$ . Dans ce filtre, QA représente l'ajout des qualités de la base "A", A0 (A pour Alternative) représente le nombre de lectures sur la base alternative, R0 (R pour référence) représente le nombre de lectures sur la base de référence, DP représente la profondeur, RPR et RPL les lectures "équilibrées" de chaque côté (gauche et droite) du site et SAF/SAR représentent le nombre de lectures sur les séquences avant/arrière.

Les mutations (SNP) fixées dans le génome viral ont une fréquence  $>50\%$  ce qui signifie que plus de 50% de la population virale possède la version alternative du nucléotide. Ainsi, lors de la comparaison du génome MA08 au génome KC594074.1, une seule mutation passe ce filtre et se situe dans la région intergénique entre les gènes M et F

(Figure 11B). Cette mutation étant située dans une région intergénique, elle n'induit aucun changement d'acide aminé (Tableau 1).



**Figure 11. Analyse du séquençage des souches virulentes de PPRV IC89 et MA08.** (A) Couverture et profondeur obtenues par séquençage illumina sur chaque région du génome viral. La profondeur est donnée en logarithme (Log (Depth)). (B) Distribution des fréquences des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) en fonction des positions du génome. Les zones grises représentent les régions codantes (CDS) des gènes viraux suivants : N (Nucléocapside), P (Phosphoprotéine), M (Matrice), F (Fusion), H (Hemmaglutinine) et L (Polymérase).

En comparant le génome IC89 au génome complet EU267273.1, on remarque l'existence de plusieurs mutations fixes. Ces mutations sont distribuées à travers le génome viral et se concentrent dans la région intergénique entre les gènes M et F et dans la région codante du gène F (**Figure 10B**).

Certaines mutations sont synonymes et d'autres sont non synonymes comme indiqué dans le **Tableau 1**. Outre l'effet de ces mutations sur le changement d'acides aminés, ce tableau rassemble les informations sur les positions et les changements provoqués par l'apparition de ces mutations. Les résultats de la comparaison entre les génomes IC89 et EU267273.1 nous indiquent que la mutation dans la région codante du gène M et onze des quatorze mutations présentes dans la région codante du gène F, induisent des changements d'acides aminés dans les différentes protéines virales.

Comme observé chez un virus de la rougeole isolé de deux manières différentes (soit avec des cellules Vero ou des cellules B95a), la mutation non synonyme observée dans le gène codant la matrice pourrait être responsable d'un changement de tropisme et d'une pathogénicité différente (Takeuchi *et al.* 2000). Il a été démontré que les mutations dans la région intergénique entre les gènes M et F, modulent la virulence du virus de la maladie de Carré (CDV) en contrôlant par exemple la transcription du gène F (Anderson & Messling 2008).

De plus, plusieurs mutations non synonymes ont été observées dans la région codante du gène de la protéine de fusion et ont été représentées dans la **Figure 11**. La protéine de fusion des morbillivirus est une protéine trimérique composée d'un domaine globulaire et d'une tige. Elle est synthétisée à l'issue du clivage du précurseur F0 en deux sous unités F1 et F2 par la furine. Les différentes parties de cette protéine sont composées de différents domaines essentiels à la structuration du monomère et à la formation du trimère (Yin *et al.* 2006; Plattet *et al.* 2016). La zone codante de la protéine F du génome de la souche IC89 arbore plusieurs mutations non synonymes situées dans le peptide signal (**Tableau 1** et **Figure 11**).

Ce peptide signal sert à l'adressage du précurseur pre-F0 dans le réticulum endoplasmique (ER) et est clivé pour former F0 (Cherpillod *et al.* 2004).

Chez le CDV, ce domaine module l'expression et la stabilité de la protéine F à la membrane cellulaire et par conséquent module indirectement le pouvoir fusogène (Messling & Cattaneo 2002; Plattet *et al.* 2007). La sous-unité F2, appartenant au domaine de tête globulaire de la protéine F, présente 4 mutations non-synonymes dont une dans le domaine HRC (**Figure 12**). Cette mutation, très proche de celle observée dans la protéine F du virus de la rougeole, pourrait modifier les interactions de cette glycoprotéine et ses propriétés fusogènes en agissant, par exemple, sur la formation des syncytiums (Plempner & Compans 2003). Outre les mutations de la sous-unité F2, une mutation non synonyme a été observée dans le domaine de liaison de l'hémagglutinine (H) de la sous-unité F1 et peut également avoir un impact sur les capacités fusogènes de la protéine F (Ikegame *et al.* 2021).

En somme, ces mutations sont potentiellement responsables de la différence de virulence observée dans la souche IC89, qui se révèle très virulente en l'absence de ces mutations chez les boucs britanniques (Baron *et al.* 2014). Des études *in silico* des gènes portant les mutations pourraient nous permettre de déterminer si certaines d'entre elles induisent des changements de conformation des protéines virales qui modifieraient leur action au niveau cellulaire (Benfield *et al.* 2021).

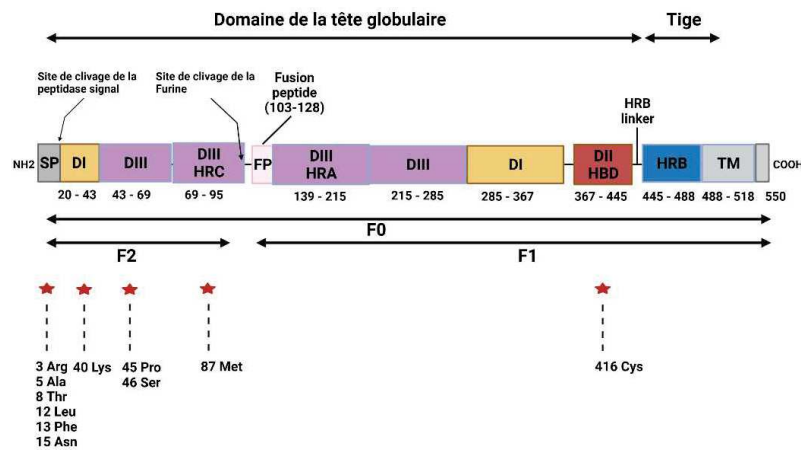
Malgré la faible virulence observée lors de l'infection des chèvres Saanen par la souche IC89, les résultats d'infection *in vitro* des cellules murines nous indiquent que la souche IC89 ainsi que la souche MA08 continuent à se répliquer dans ce modèle. Ces souches conservent donc un caractère virulent dans ce modèle, cependant, nous n'avons pas pu vérifier si la réplication virale s'accompagnait de la libération des virus.

Outre le modèle *in vitro*, la souche IC89 a fait preuve d'une virulence très élevée lorsqu'elle a été inoculée à des chèvres naines d'Afrique de l'Ouest, les animaux ayant survécu en moyenne 9 jours (Couacy-Hymann *et al.* 2007).

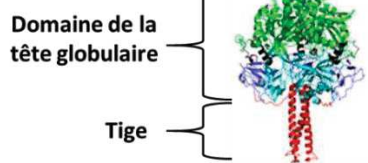


Cette souche a également été virulente chez les moutons Djallonke (Traoré et al. données non publiées) et chez des chèvres indigènes britanniques (Baron *et al.* 2014). Ainsi, la suite des expériences effectuées dans le cadre de cette thèse servira à évaluer la réponse immunitaire induite en réponse à l'infection par ces souches PPRV de différentes virulences *in vivo*.

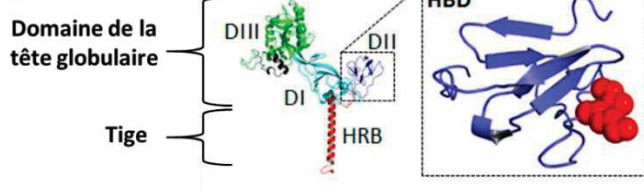
A



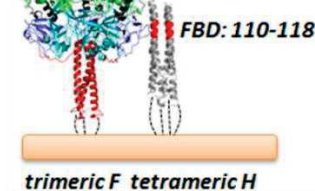
B



C



D



**Figure 12. Représentation des différents domaines de la protéine de fusion.**

(A) La protéine F est composée de deux principales parties : le domaine de la tête globulaire et la tige. Ces domaines sont formés à partir des sous unités F1 et F2. Ces sous unités dérivent du clivage de F0 et sont composés des domaines DI (jaune), DII (rouge), DIII (Violet), peptide fusion (rose), HRB (Bleue) et GCNT (gris). SP : peptide signal ; HRA-C : région de répétition des heptades A-C ; HBD : région de liaison de l'hémagglutinine. Les étoiles rouges représentent les sites de mutations non synonymes dans le génome IC89. (B) Forme trimérique de la protéine de fusion virale. (C) Répartition des domaines DI, DII, DIII, HRB et HBD dans un monomère de la protéine de fusion. (D) Interaction entre la forme trimérique de la protéine de fusion et le tétramère de l'hémagglutinine à la surface de l'enveloppe virale. Représentation adaptée de (Plattet *et al.* 2016; Yin *et al.* 2006; Ikegame *et al.* 2021).



**Tableau 1. Représentation des SNP à haute fréquence.** Les SNP à haute fréquence représentent des mutations fixes dans le génome viral. Les SNP trouvés dans la comparaison IC89 *vs* EU267273.1 sont représentés dans le tableau du haut. Les SNP provenant de la comparaison MA08 *vs* KC594074.1 sont représentés dans le tableau du bas. Les mutations non synonymes sont marquées d'un astérisque.

	Positions du génome	Nucléotides EU267273.1	Nucléotides IC89	Fréquences des SNP	Acides aminés EU267273.1	Acides aminés IC89
<b>N CDS</b>	1711	TTAATT	GCAGCA	99.87		
<b>M CDS</b>	4315	G	A*	99.46	292R	292Q
<b>Région inter génique M_F</b>	4446	ACCGG	TTCAC	100		
	4957	ATC	AC	100		
	4963	G	C	100		
	4971	T	A	100		
	5208	AT	CT	94.84		
	5473	G	T	100		
	5499	GCGATCGCC	ACAAC	99.37		
	5509	AA	AGCACA	99.37		
	5516	T	G	99.73		
	5518	AA	ATA	97.11		
<b>F CDS</b>	5532	AC	CG*	100	3T	3R
	5538	C	G*	99.65	5P	5A
	5548	A	C*	100	8K	8T
	5559	T	C*	99.68	12F	12L
	5563	C	T*	99.79	13S	13F
	5569	T	A*	100	15I	15N
	5644	G	A*	99.7	40R	40K
	5657	GCA	GCC*	96.96	45Q	45P
	5660	AGC	AAG*	97.75	46A	46S
	5782	CTC	CTA*	82.69	87L	87M
	6020	A	G	57.32		
	6104	T	G	99.85		
	6122	T	C	100		
	6773	G	T*	99.89	416W	416C
	Positions du génome	Nucléotides KC594074.1	Nucléotides MA08	Fréquences des SNP	Acides aminés KC594074.1	Acides aminés MA08
<b>Région inter génique M_F</b>	5203	TCT	CCT	95.1		

## 2. Identification *in vitro* des facteurs de la réponse immunitaire associés à la sensibilité de l'hôte à l'infection par le PPRV

Pour identifier les différents mécanismes immunitaires impliqués dans la sensibilité de l'hôte à l'infection par le PPRV, les souches virales (IC89, MA08) ayant une virulence différente *in vivo* et le vaccin Nigeria 75/1 (VN751), ainsi que les cellules immunitaires de la chèvre ont été utilisés.

La compréhension de ces différents mécanismes passe par la connaissance de la voie d'infection du PPRV. Comme le montre la **Figure 9**, le PPRV ainsi que d'autres morbillivirus pénètrent dans l'organisme par l'épithélium nasopharyngé. Les particules virales sont ensuite transportées vers les ganglions lymphatiques proximaux où une réplication intense du virus a lieu. Le virus infecte ensuite les lymphocytes activés (exprimant le récepteur SLAM) et se propage dans tout l'organisme.

En suivant cette voie d'infection, il est nécessaire de comprendre comment des souches de virulences différentes interagissent d'abord avec les cellules présentatrices d'antigènes (monocytes, cellules dendritiques et macrophages) et ensuite avec les lymphocytes activés.

---

### a. Infection des cellules présentatrices d'antigènes par des souches de différentes virulences du PPRV

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du stage de Master 2 (parcours IMHE) de Vincent Lasserre que j'ai encadré. Le mémoire de mastère est consultable à l'adresse suivante : <https://agritrop.cirad.fr/599352/>

L'interaction entre les monocytes, les cellules dendritiques (DC), les macrophages et le PPRV reste encore peu connue. Ces cellules sentinelles constituent la première ligne de défense du système immunitaire contre les infections virales (cf. [introduction](#)). Les monocytes peuvent, en présence de cytokines, se différencier en macrophages (*Monocyte-derived macrophages* : MoMs) ou en cellules dendritiques (*Monocyte-derived dendritic cells* : MoDCs).

Le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) induit la différenciation des monocytes en MoMs. Les MoMs partagent les fonctions des macrophages résidents classiques, mais produisent davantage de médiateurs pro-inflammatoires. Le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et l'interleukine 4 (IL-4) induisent la différenciation des monocytes en MoDCs. Les MoDCs sont spécialisées dans l'activation des cellules T CD4 et ces cellules sont de grandes productrices de médiateurs pro-inflammatoires.

Trois chèvres alpines adultes et une chèvre Saanen adulte naïves pour la PPR ont servi de donneuses pour des prélèvements sanguins. Ces prélèvements ont été effectués en conformité avec la réglementation française sur le bien-être animal et au maximum une fois par semaine. Les PBMCs de chèvre ont été isolées à partir du sang périphérique par séparation en gradient de densité. Ces cellules ont ensuite été utilisées pour l'isolement par séparation magnétique des monocytes exprimant le marqueur cellulaire CD14.

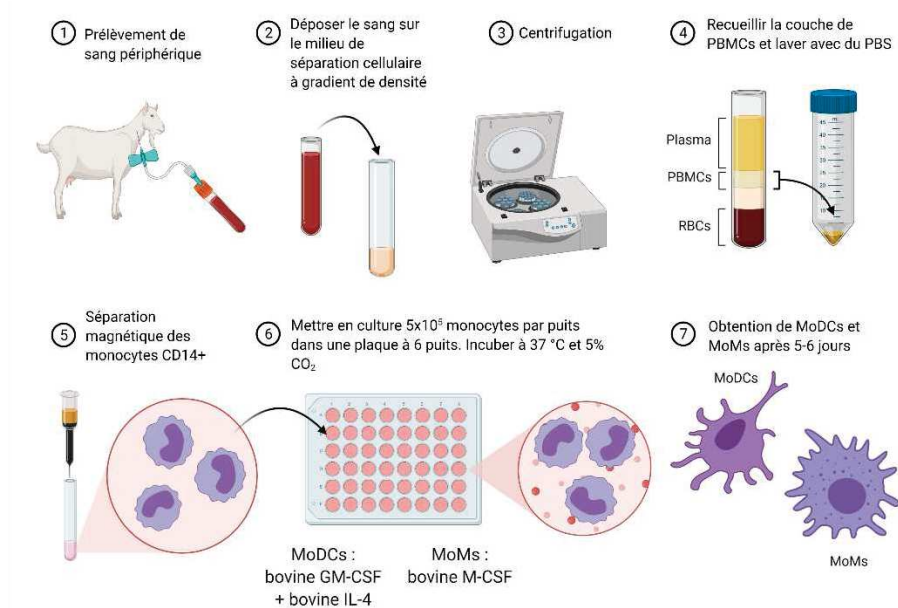
Les monocytes CD14<sup>+</sup> ont ensuite été mis en culture avec les cytokines recombinantes bovines IL4 et GMCSF pour permettre la différenciation en MoDCs et avec le bM-CSF pour permettre la différenciation en MoMs.

Les cytokines bovines recombinantes IL-4, GM-CSF et M-CSF ont été produites par transfection transitoire de cellules HEK-293T avec des plasmides codants pour les cytokines d'intérêt. Ces plasmides ont été fournis par l'institut de virologie et d'immunologie (IVI) de Berne et les cytokines produites ont été dosées en utilisant des

kits ELISA commerciaux. Le processus d'isolement et de différenciation des monocytes est résumé dans la **Figure 13**.

Une fois obtenus, les monocytes, les MoMs et les MoDCs ont été caractérisés par leurs tailles, granulosités et par l'expression de plusieurs marqueurs cellulaires en cytométrie en flux. Le niveau d'expression des marqueurs CD14, CD6, CMHII, CD172a, CD11c, CD209, CD205 et SLAMF9 a été évalué.

Le marqueur CD14 est fortement exprimé à la surface des monocytes mais varie fortement chez les MoDCs et les MoMs en fonction de l'espèce étudiée. Le marqueur CD6, spécifique aux lymphocytes T exprimant le TCR $\alpha\beta$  (CD4, CD8, NKT) et pouvant être retrouvé chez une sous-population de lymphocytes B, a principalement été utilisé pour vérifier la pureté des préparations de monocytes.



**Figure 13. Schéma récapitulatif de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (MoDCs) et macrophages (MoMs).** Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) ont été extraites par séparation en gradient de densité à partir du sang d'animaux sains (étapes 1 à 4). Par la suite, les monocytes CD14<sup>+</sup> ont été séparé magnétiquement des PBMCs totaux (étape 5) puis mis en culture pendant 5 à 6 jours en présence des cytokines recombinantes bovines IL4, GM-CSF et MCSF (étapes 6 et 7).

L'expression de marqueurs de la lignée myéloïde a aussi été évaluée chez les différents types cellulaires. Le CMH II est une molécule présente à la surface des cellules présentatrice d'antigènes (CPA) dont les monocytes, les DC, les macrophages et les lymphocytes B. Cette molécule permet la présentation des antigènes aux lymphocytes T naïfs. Le CD172a ou *signal regulatory protein  $\alpha$*  (SIRP $\alpha$ ) est un marqueur des cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes, les DC, les macrophages ou les granulocytes. Par son interaction avec CD47, cette molécule participe à l'inhibition de la phagocytose et au signal « don't eat me ». Le CD11c est une intégrine exprimée entre autres chez les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages.

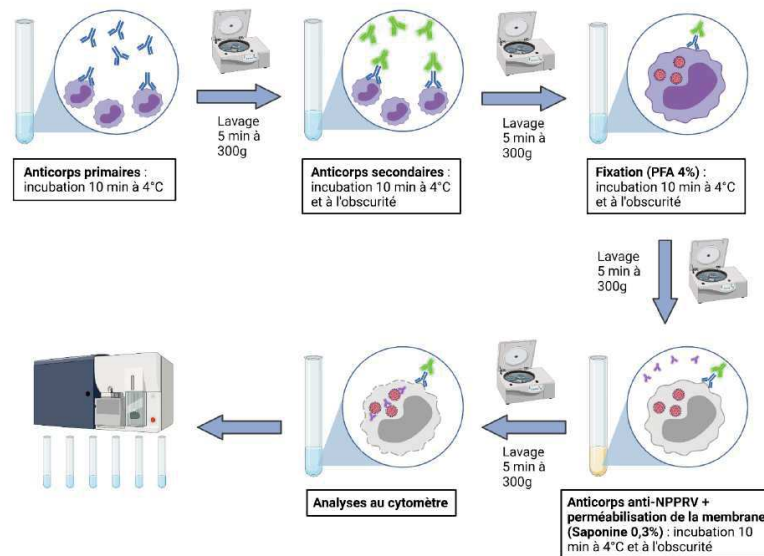
Outre les marqueurs de la lignée myéloïde, l'expression de certains marqueurs de la modulation immunitaire tels que le CD209 et le CD205 a aussi été évaluée. Le CD209 ou DC-SIGN est un récepteur lectine de type C. Il s'agit d'un PRR qui permet l'activation de la phagocytose via la reconnaissance de PAMPs. Le marqueur CD209 est présent sur les DCs et les macrophages. Le CD209 est également impliqué dans l'infection des cellules dendritiques par des morbillivirus et est impliqué dans leur dissémination.

Le CD205 est un récepteur de l'endocytose, c'est un récepteur de reconnaissance des cellules apoptotiques et nécrotiques. Il est exprimé sur les DC chez l'Homme. Selon les espèces, il est exprimé ou non par les monocytes.

L'expression des molécules SLAMF1 (récepteur d'entrée du PPRV) et du SLAMF9, protéines de la famille des SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) a aussi été évaluée. Le récepteur SLAMF1 est présent à la surface des lymphocytes, DC, macrophages et monocytes activés.

Les monocytes, MoDCs et MoMs ont ensuite été infectés par les souches PPRV de virulences différentes avec une multiplicité d'infection de 0.1. Le niveau d'infection de ces cellules a aussi été déterminé par cytométrie en flux en utilisant un anticorps

ciblant la protéine N virale. La **Figure 14** récapitule le processus de marquage cellulaire employé pour caractériser et évaluer le niveau d'infection de ces différentes cellules.

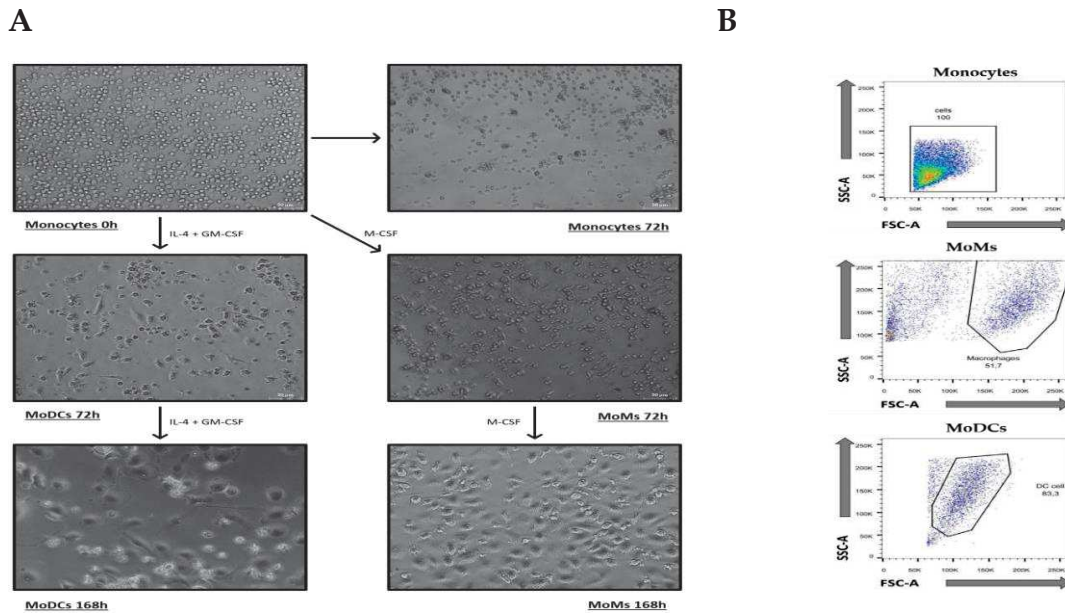


**Figure 14. Schéma récapitulatif du processus de marquage cellulaire des cellules infectées par le PPRV.** Après l'infection, les cellules sont récoltées, lavées (PBS1X) et incubées à froid (4°C) en présence des anticorps primaires. Après 10 min d'incubation, les cellules sont à nouveau lavées puis incubées avec les anticorps secondaires pendant 10 min. Les cellules sont ensuite fixées à la paraformaldéhyde (PFA) puis marquées de manière intracellulaire avec l'anticorps anti NPPRV couplé à un fluorochrome (dilué dans 0.3% de saponine) avant l'analyse au cytomètre.

### i. Caractérisations morphologiques des monocytes, MoMs et MoDCs

Les CPA présentent différentes morphologies cellulaires. L'observation par microscopie optique a montré qu'il n'y a pas de changements morphologiques significatifs lorsque les monocytes sont laissés en culture. En ajoutant des cytokines de différenciation au milieu de culture, les cellules semblent grossir et se couvrir d'excroissances (MoDCs) ou se remplir de vésicules (MoMs) (**Figure 15A**). L'observation par cytométrie en flux a confirmé ces différences de taille des cellules.

Les monocytes sont plus simples en taille et en structure que les MoDCs et les MoMs (Figure 15B).



**Figure 15. Aspects morphologiques des cellules présentatrices d'antigènes de chèvres.** (A) Observations par microscopie optique du processus de différenciation des monocytes. Les monocytes CD14<sup>+</sup> ont été différenciés en MoMs et MoDCs par l'addition de cytokines bovines recombinantes : M-CSF, IL4 et GM-CSF. Des photographies à différents moments (72 et 168h) ont été prises au cours de la différenciation. (B) Analyses par cytométrie en flux de la morphologie des monocytes, MoMs et MoDCs. La taille (FSC-A) et la granularité (SSC-A) permettent de différencier les trois populations cellulaires. Les différentes données ont été acquises avec des voltages identiques.

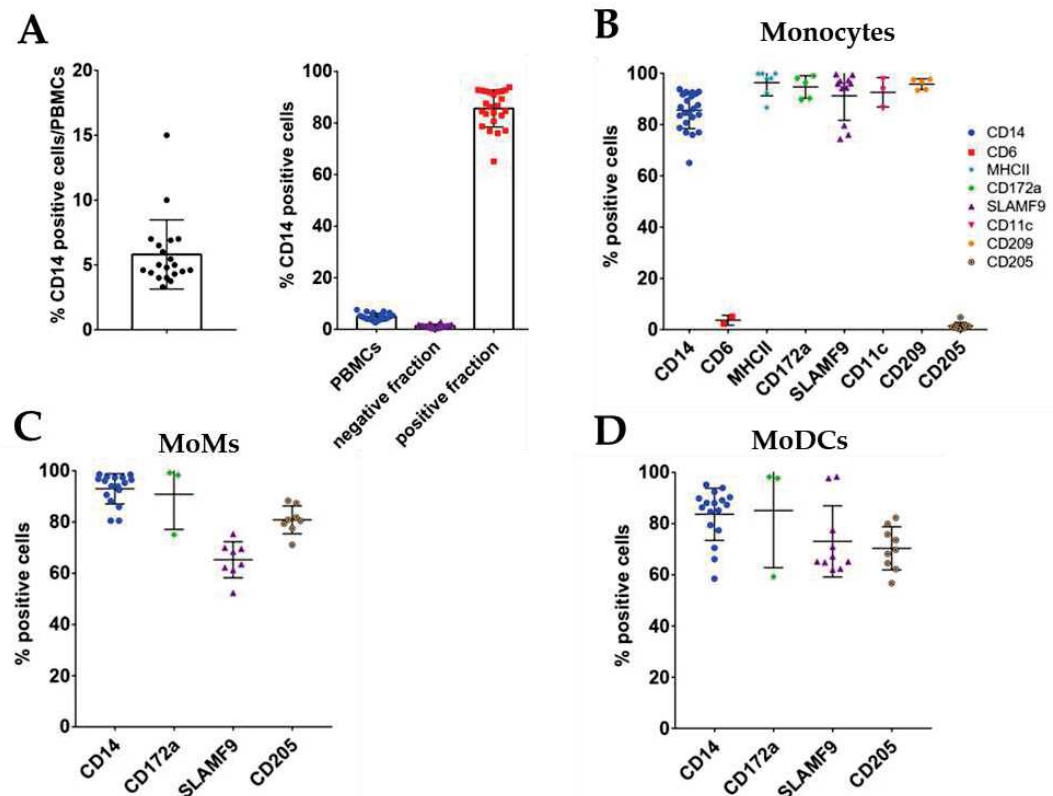
ii. Niveaux d'expression de différents marqueurs cellulaires et caractérisation des schémas d'infection des CPA

Après plusieurs purifications, le pourcentage moyen de monocytes CD14<sup>+</sup> est de 5% dans la population totale de PBMC avec une pureté d'extraction de plus de 80% (Figure 16A). Ces cellules ont été utilisées pour obtenir des MoMs et des MoDCS.



La caractérisation des marqueurs cellulaires dans ces différents types de cellules a permis de déterminer des profils d'expression différents.

Ainsi, les monocytes de chèvre sont : CD14+, CD6-, MHCII+, CD172a+, SLAMF9+, CD11c+, CD209+, CD205- (**Figure 16B**) et les MoMs et MoDCs de chèvre sont : CD14+, CD172a+, SLAMF9+, CD205+ (**Figure 16C, D**).



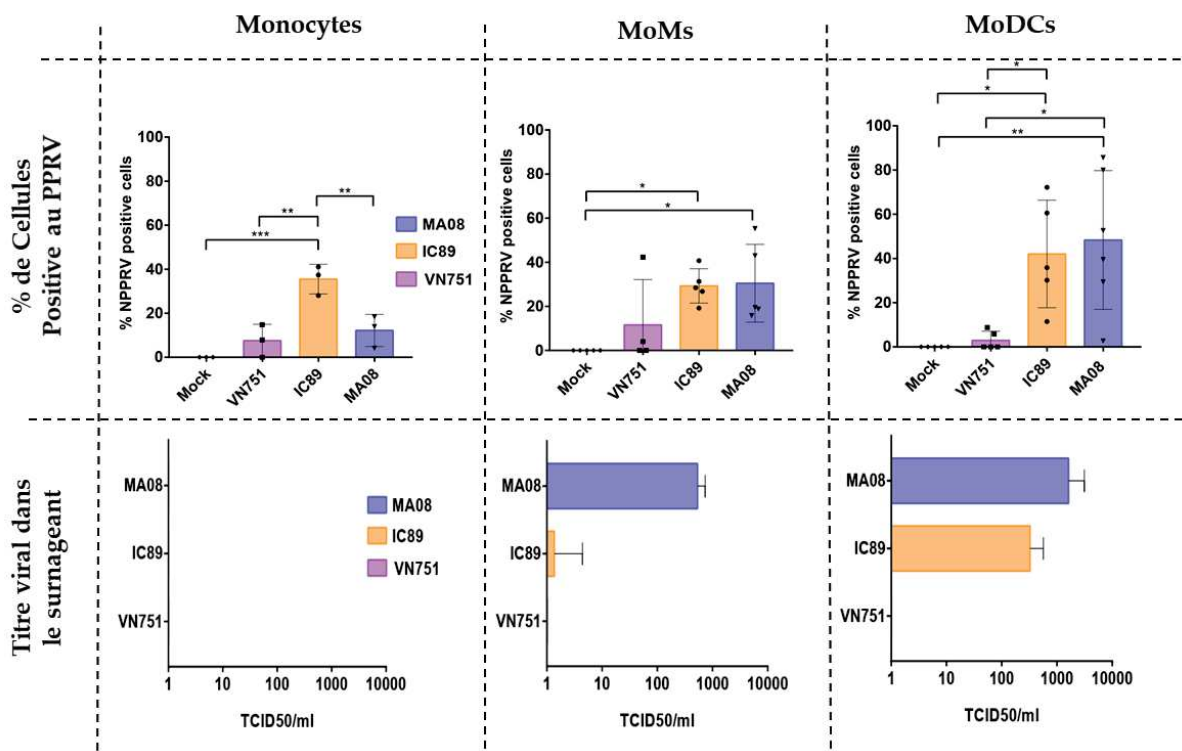
**Figure 16. Marqueurs cellulaires exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes de chèvres.** (A) Pourcentage de monocytes CD14+ contenu dans les PBMCs de chèvres. Pourcentage de monocytes (B), MoMs (C) et MoDCs (D) positifs à l'expression de certains marqueurs cellulaires.

Les cellules ont ensuite été infectées pendant 48 heures avec les différentes souches impliquées dans cette étude à une MOI de 0,1. Tous les types de cellules ont été infectés de manière égale par la souche IC89, tandis que la souche MA08 semble préférentiellement infecter les MoMs et les MoDCs. La souche vaccinale présente le plus faible niveau d'infection, quel que soit le type de cellule (**Figure 17**, partie du haut).



La quantité de virus libérée dans le surnageant après l'infection a été évaluée par titrage. Aucun virus n'a été libéré par les monocytes, alors que les souches IC89 et MA08 ont été libérées dans le surnageant des MoMs et MoDCs infectés.

La souche MA08 semble être libérée plus efficacement par les cellules différenciées, alors que seuls les MoDCs libèrent IC89. La souche vaccinale n'est présente dans aucun des surnageants de culture (**Figure 17**, partie du bas).



**Figure 17. Infection des cellules présentatrices d'antigènes avec différentes souches du PPRV.** Les monocytes, MoMs et MoDCs ont été infectés avec la souche vaccinale Nigeria75/1 (VN751) et les souches virulentes IC89, MA08 à une MOI de 0.1 pendant 48h. Dans un premier temps le pourcentage de cellules infectées a été déterminé en marquant de manière intracellulaire la protéine N du PPRV (partie du haut). Ensuite le relargage des particules virales dans le surnageant a été quantifié par titrage viral (partie du bas). Les p values ont été calculées en utilisant le test de Turkey : \* :P<0.05, \*\*:P<0.01 et \*\*\*:P<0.001.

iii. Discussion des résultats préliminaires de cette étude

Le processus de purification des monocytes a permis d'obtenir une moyenne de 5% de cellules CD14+ (monocytes). Ce pourcentage est en moyenne de 10% chez l'Homme et de 20% chez la vache (Autissier *et al.* 2010; Corkum *et al.* 2015; Ceciliani *et al.* 2021). Ce faible pourcentage chez la chèvre n'a pas été un obstacle à l'obtention de cellules dérivées.

Cependant, la pureté des extractions peut biaiser l'interprétation des résultats obtenus. En effet, une pureté d'environ 80% signifie la présence de 20% de contaminants. L'analyse de ces contaminants a révélé qu'il s'agissait principalement de cellules T (exprimant le marqueur CD6). La présence de ces contaminants pourrait être due soit à l'utilisation de billes CD14+ humaines qui sélectionneraient des molécules peu similaires chez la chèvre, soit à l'ajout d'un trop grand nombre de PBMCs lors de la purification ou encore à la présence de doublons cellulaires (cellules CD14+ liées à des cellules CD6+) qui permettraient aux contaminants de passer à travers la colonne de sélection positive.

Néanmoins, ces cellules T, qui ont généralement une courte durée de vie sans stimulation dans le milieu de culture, meurent lors de la différenciation des monocytes en MoMs et MoDCs. Ces contaminants posent essentiellement un problème lors de l'infection des monocytes, car les monocytes sont infectés le jour de l'extraction, contrairement aux MoMs et MoDCs qui sont infectés 6 jours après.

L'expression de marqueurs cellulaires nous a permis de commencer la caractérisation de ces CPA. Les résultats obtenus montrent que les monocytes de chèvre ont le profil d'expression suivant : CD14+, CD6-, MHCII+, CD172a+, SLAMF9+, CD11c+, CD209+, CD205- alors que les MoMs de chèvre ainsi que les MoDCs sont : CD14+, CD172a+, SLAMF9+, CD205+.

Les monocytes humains et bovins expriment certains de ces marqueurs de manière similaire. Les marqueurs CD14, CD6 (marqueur des cellules T), MHCII, CD172a sont exprimés de la même manière dans les monocytes humains, bovins et caprins (Pilling *et al.* 2009; Talker *et al.* 2018). Le marqueur CD11c est exprimé par les monocytes bovins alors que, selon le sous-type de monocyte (classique, intermédiaire ou non classique), ce marqueur est exprimé différemment chez l'Homme (Thomas *et al.* 2017). Les monocytes humains expriment le marqueur CD205 (Kato *et al.* 2006) tandis que les monocytes bovins ne l'expriment pas (Talker *et al.* 2018).

Le marqueur CD209 n'est exprimé sur aucun des monocytes humains ou bovins (Park *et al.* 2016; Chometon *et al.* 2020). Ainsi, l'expression du marqueur CD209 semble être spécifique aux monocytes de chèvre.

De même que pour les chèvres, l'expression du marqueur SLAMF9 a été vérifiée sur les monocytes humains (Zhang *et al.* 2001). Le récepteur de l'entrée du morbillivirus dans le système immunitaire est documenté comme étant SLAMF1 et non SLAMF9 (Tatsuo *et al.* 2001). Cependant, il existe un haut degré d'homologie entre les récepteurs de la famille SLAM et, comme SLAMF1, SLAMF9 est généralement exprimé à la surface des lymphocytes activés, comme c'est le cas pour les CD4 et CD8 bovins (Park *et al.* 2015).

En résumé, la caractérisation des monocytes de chèvre est très comparable à celle des monocytes bovins, mais ces cellules se distinguent par l'expression du marqueur CD209 spécifique à la chèvre.

À l'exception du marqueur CD14, très faiblement exprimé chez les MoDCs humains (Guinan & Lopez 2020), les marqueurs étudiés pour les MoDCs et les MoMs de chèvre présentent le même profil d'expression chez les humains et les bovins (Park *et al.* 2016; Guinan & Lopez 2020; Nunez *et al.* 2004). Une étude a montré que le marqueur CD14 n'était pas exprimé par les MoDC de chèvre (Nfon *et al.* 2012).

Cette différence pourrait potentiellement s'expliquer par les concentrations des cytokines utilisées, qui étaient beaucoup plus élevées que les nôtres. Pour confirmer ces résultats, l'expression des marqueurs des MoDCs et des MoMs devrait être testée pour plusieurs concentrations de cytokine au cours de la différenciation de ces cellules.

A ce jour, les marqueurs étudiés ne permettent pas de différencier les MoDCs des MoMs chez la chèvre, mais l'expression du marqueur CD205 semble les différencier des monocytes. Néanmoins, ces cellules présentent des morphologies cellulaires différentes. En effet, les MoDCs présentent des excroissances cellulaires qui peuvent être assimilées à des dendrites. L'analyse par cytométrie en flux montre que les MoDCs de chèvre obtenus dans cette étude ont des caractéristiques communes avec les MoDCs de mouton (Rojas *et al.* 2021a). Les MoMs ont une plus grande complexité cytoplasmique qui peut être expliquée par la présence de vésicules.

L'infection de ces différents types de cellules avec les différentes souches de virulence a permis de déterminer plusieurs phénotypes d'infection. Le niveau d'infection des cellules a été mesuré par la présence de la protéine N virale. Tous les types de cellules sont infectés par les différents virus mais à des niveaux différents. La souche IC89 semble infecter les monocytes plus efficacement que les autres souches. Cependant, aucune souche virale n'est libérée dans le surnageant lorsque ces cellules sont infectées. Les niveaux d'infection observés dans les monocytes peuvent être dus à la phagocytose des lymphocytes contaminants infectés. Lors d'une infection *in vivo*, il a été observé que les monocytes circulants ne sont pas infectés par le PPRV, ce qui signifierait que ces cellules jouent un rôle minime dans l'infection par le PPRV (Wani *et al.* 2019).

Les MoMs et les MoDCs sont infectés de manière efficace et similaire par les souches MA08 et IC89 alors que la souche vaccinale présente un faible niveau d'infection et n'est libérée dans aucun des milieux de culture. Cette souche, ayant subi de nombreux passages cellulaires dans les cellules Vero (Eloiflin *et al.* 2019), peut avoir perdu sa capacité à se répliquer efficacement dans ces modèles cellulaires.

Comme en témoigne une étude sur les DCs de souris suggère que la souche vaccinale Nigeria 75/1 ne s'y réplique pas (Li *et al.* 2019a). La souche IC89 est libérée dans le surnageant uniquement par les MoDCs, alors que la souche MA08 est libérée à la fois par les MoMs et les MoDCs. Les MoDCs infectés par la souche MA08 libèrent 10 fois plus de virus que ceux infectés par la souche CI89.

Les MoDCs semblent être un hôte privilégié et un cheval de Troie parfait pour la dissémination du PPRV dans l'organisme, notamment pour atteindre les ganglions lymphatiques. Les DC humains sont aussi infectés de manière efficace par le virus de la rougeole. Cette infection non seulement productive (augmentation de la quantité de virus infectieux dans le surnageant) (Grosjean *et al.* 1997) est à l'origine de la perte de la fonction d'allostimulation de ces cellules (Grosjean *et al.* 1997; Romanets-Korbut *et al.* 2016). Ainsi, le transport du MV par les DC facilite la propagation du virus vers les organes lymphoïdes et la réplication du MV dans les DC peut jouer un rôle central dans la suppression immunitaire générale observée pendant la rougeole (Grosjean *et al.* 1997; Marie *et al.* 2001; Romanets-Korbut *et al.* 2016).

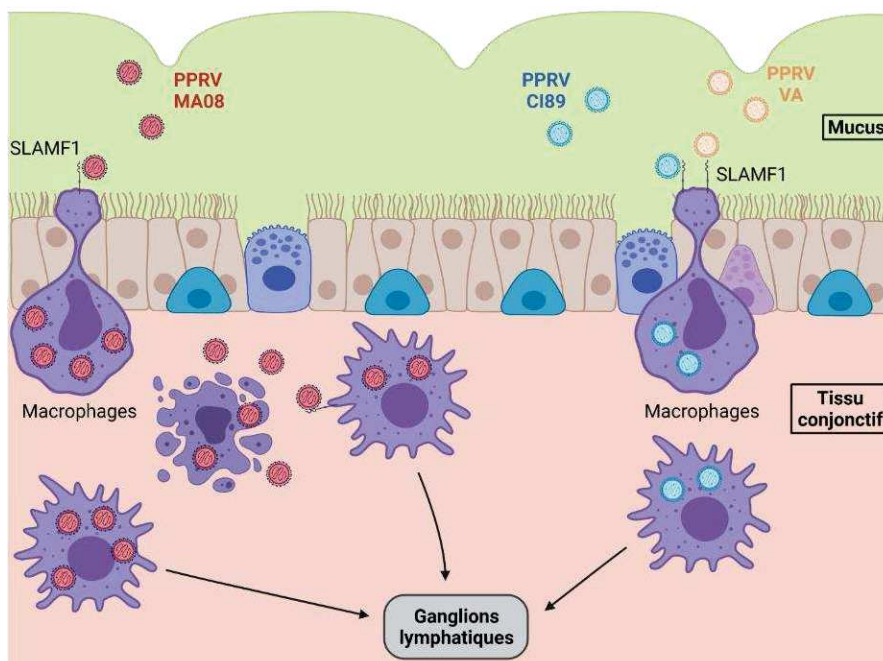
Un tel système d'infection pourrait hypothétiquement être mis en place lors de l'infection des MoDCs par la souche MA08. Le défaut de relargage de la souche IC89 entretenue au CIRAD pourrait également être lié à la présence dans cette souche de mutations dans les protéines F et M (voir [section II.1.b](#)), ce qui pourrait expliquer la différence de capacité de bourgeonnement dans les macrophages (Harrison *et al.* 2010).

Les macrophages sont également des cellules clés dans le déroulement de l'infection par le PPRV. Des macrophages alvéolaires montrant la présence d'antigène PPRV ont été découverts chez des chèvres infectées lors d'une épidémie de PPR au Bangladesh (Chowdhury *et al.* 2014).

Cette observation a également été faite chez des chèvres lors d'une infection expérimentale au cours de laquelle des syncytia de macrophages (CD68+) se sont révélés positifs pour la présence du PPRV 8 jours après infection (Truong *et al.* 2014).

Puisque cette détection a été faite de manière tardive dans les deux cas, il pourrait s'agir d'un rôle tardif de ces cellules dans l'élimination des cellules infectées restantes ou dans le processus d'excrétion virale.

Les différences dans le profil d'infection des MoMs observées dans notre étude pourraient être un point de départ pour expliquer la différence de virulence observée entre les souches. Ces observations nous ont conduit à l'hypothèse présentée dans la **Figure 18**. Dans ce scénario hypothétique, nous supposons la présence de SLAMF1 dans les macrophages, bien que son expression n'ait pas encore été confirmée sur les MoMs de la chèvre.



**Figure 18. Mécanisme hypothétique du rôle des macrophages (MoMs) dans les premiers stades de l'infection par le PPRV.** Dans les premiers stades de l'infection, les particules virales présentes dans le mucus sont absorbées par les macrophages et conduites vers les ganglions lymphatiques. La souche MA08, très virulente, peut pénétrer et facilement induire une lyse cellulaire des macrophages, ce qui entraîne la migration d'un plus grand nombre de macrophages vers le site de l'infection. La souche faiblement virulente, en revanche, peut pénétrer dans les macrophages sans induire de lyse cellulaire, alors que les souches vaccinales ont du mal à pénétrer dans ce type de cellules. Les macrophages infectés migrent vers les ganglions lymphatiques et le processus d'infection se poursuit.



b. Infection des lymphocytes activés par des souches du PPRV de virulences différentes

Au cours de l'infection par le PPRV, les CPA migrent vers les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes et activer les cellules de l'immunité adaptative. A ce stade, ces cellules, principalement des lymphocytes, sont infectées lorsqu'elles sont activées et expriment le récepteur SLAMF1. Les lymphocytes sont les principales cellules qui disséminent le virus dans tout l'organisme (**Figure 9**). L'infection des lymphocytes est suivie de l'induction d'une lymphopénie, qui est marquée par un nombre très faible de cellules immunitaires circulantes.

Plusieurs études tentent de déterminer les facteurs qui induisent la lymphopénie au cours d'une infection virale (Guo *et al.* 2021). Par exemple, la réduction de la prolifération des PBMC suite à la stimulation antigénique ou par un mitogène, la modification des profils de cytokines, l'inhibition de la lymphopoïèse ainsi que la déplétion des lymphocytes mémoires sont certains des mécanismes qui ont été proposés pour expliquer la nature de l'immunosuppression induite par le MV (Laksono *et al.* 2016).

Les facteurs induisant cette lymphopénie ou l'immunosuppression sont encore très mal connus chez le PPRV. Il a été démontré que l'induction de l'apoptose lors de l'infection *in vitro* des lymphocytes par des souches de PPRV pourrait être impliqué dans l'immunosuppression (Mondal *et al.* 2001).

Afin d'élucider les effets du PPRV sur les lymphocytes, nous avons entrepris d'infecter des lymphocytes de chèvres Saanen saines avec les différentes souches de PPRV impliquées dans cette étude. Les lymphocytes activés étant les cibles principales lors de l'infection par le PPRV, nous avons décidé de stimuler leur activation par l'ajout de la concanavalline A (ConA) dans le milieu de culture.



La stimulation par la ConA induit une augmentation de l'expression de l'ARN messenger codant pour le SLAMF1 et augmente le niveau d'infection des cellules par le PPRV (Pawar *et al.* 2008b; Nizamani *et al.* 2014). Ainsi dans ce contexte favorable à la réplication virale, nous avons évalué les effets des virus sur la viabilité et la prolifération des cellules. Les mécanismes qui sous-tendent les phénotypes observés ont été analysés par cytométrie en flux, séquençage de l'ARN et spectrométrie de masse.

Les résultats indiquent que toutes les souches virales sont capables de réduire la viabilité et la prolifération des cellules, avec un effet précoce et plus prononcé pour la souche hautement virulente (MA08) qui se réplique plus efficacement. La réponse interféron de type I antivirale est induite indépendamment de la virulence de la souche et a été détectée par les approches transcriptomiques et protéomiques.

La souche hautement virulente a induit une réponse pro-inflammatoire plus forte et une dégradation du métabolisme cellulaire conduisant à une forte induction de l'apoptose. Une induction de mécanismes complémentaires à la réponse antivirale a été observée lors de l'infection par la souche vaccinale Nigeria 75/1 et la souche IC89. Ces mécanismes complémentaires semblent jouer un rôle essentiel dans le contrôle de la réplication virale

Ces résultats nous permettent de comprendre qu'une réplication virale efficace, telle que celle de la souche MA08, est essentielle pour déjouer la réponse immunitaire des cellules.

- i. *Article 2: Identification of differential responses of goat PBMCs to PPRV virulence using a multi-omics approach*
-



# Identification of Differential Responses of Goat PBMCs to PPRV Virulence Using a Multi-Omics Approach

Roger-Junior Eloiflin<sup>1,2\*</sup>, Gaël Auray<sup>3,4</sup>, Sylvie Python<sup>3,4</sup>, Valérie Rodrigues<sup>2,5</sup>, Martial Seveno<sup>6</sup>, Serge Urbach<sup>7</sup>, Khadija El Koulali<sup>6</sup>, Philippe Holzmüller<sup>1,2</sup>, Philippe Totte<sup>1,2</sup>, Genevieve Libeau<sup>1,2</sup>, Arnaud Bataille<sup>1,2\*</sup> and Artur Summerfield<sup>3,4\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Pierre ROQUES,  
CEA Saclay, France

### Reviewed by:

Verónica Martín García,  
Centro de Investigación en Sanidad  
Animal (CISA), Spain  
Murat Şevik,  
Necmettin Erbakan University, Turkey

### \*Correspondence:

Roger-Junior Eloiflin  
roger-junior.eloiflin@cirad.fr  
Arnaud Bataille  
arnaud.bataille@cirad.fr  
Artur Summerfield  
Artur.Summerfield@ivi.admin.ch

### Specialty section:

This article was submitted to  
Viral Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 21 July 2021

**Accepted:** 14 September 2021

**Published:** 04 October 2021

### Citation:

Eloiflin R-J, Auray G, Python S, Rodrigues V, Seveno M, Urbach S, El Koulali K, Holzmüller P, Totte P, Libeau G, Bataille A and Summerfield A (2021) Identification of Differential Responses of Goat PBMCs to PPRV Virulence Using a Multi-Omics Approach. *Front. Immunol.* 12:745315. doi: 10.3389/fimmu.2021.745315

<sup>1</sup> CIRAD (Agricultural Research Centre for International Development), UMR (Unité Mixte de Recherche), ASTRE (Animal, Health, Territories, Risks and Ecosystems), Montpellier, France, <sup>2</sup> ASTRE (Animal, Health, Territories, Risks and Ecosystems), University of Montpellier, CIRAD (Agricultural Research Centre for International Development), INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement), Montpellier, France, <sup>3</sup> Institute of Virology and Immunology, Mittelhäusern, Switzerland, <sup>4</sup> Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Bern, Switzerland, <sup>5</sup> CIRAD (Agricultural Research Centre for International Development), UMR (Unité Mixte de Recherche), ASTRE (Animal, Health, Territories, Risks and Ecosystems), Petit-Bourg, France, <sup>6</sup> BCM (BioCampus Montpellier), Univ. Montpellier, CNRS (Centre national de la recherche scientifique), INSERM, Montpellier, France, <sup>7</sup> IGF (Institut de Génétique Fonctionnelle), Univ. Montpellier, CNRS (Centre national de la recherche scientifique), INSERM, Montpellier, France

Peste des petits ruminants (PPR) is an acute transboundary infectious viral disease of small ruminants, mainly sheep and goats. Host susceptibility varies considerably depending on the PPR virus (PPRV) strain, the host species and breed. The effect of strains with different levels of virulence on the modulation of the immune system has not been thoroughly compared in an experimental setting so far. In this study, we used a multi-omics approach to investigate the host cellular factors involved in different infection phenotypes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from Saanen goats were activated with a T-cell mitogen and infected with PPRV strains of different virulence: Morocco 2008 (high virulence), Ivory Coast 1989 (low virulence) and Nigeria 75/1 (live attenuated vaccine strain). Our results showed that the highly virulent strain replicated better than the other two in PBMCs and rapidly induced cell death and a stronger inhibition of lymphocyte proliferation. However, all the strains affected lymphocyte proliferation and induced upregulation of key antiviral genes and proteins, meaning a classical antiviral response is orchestrated regardless of the virulence of the PPRV strain. On the other hand, the highly virulent strain induced stronger inflammatory responses and activated more genes related to lymphocyte migration and recruitment, and inflammatory processes. Both transcriptomic and proteomic approaches were successful in detecting viral and antiviral effectors under all conditions. The present work identified key immunological factors related to PPRV virulence *in vitro*.

**Keywords:** peste des petit ruminant virus, PBMC, analysis, virulence, saanen goat

## INTRODUCTION

Peste des petits ruminants (PPR) is an acute transboundary infectious viral disease of small ruminants, mainly sheep and goats which threatens the livelihoods and food security of smallholder farmers across Africa, the Middle East and Asia (1, 2). Recent outbreaks in Georgia, Bulgaria and the current distribution of the disease point to potential risks to Europe (3–5). Wild and captive artiodactyls, cattle, camelids and suids can also be infected by the disease (6, 7). The causal agent of this disease is the peste des petits ruminants virus (PPRV) (family: *Paramyxoviridae*, genus: *Morbillivirus*). Genotypic classification of PPRV has identified four lineages. These lineages are all circulating in Africa (8) while lineages III and IV are circulating in Middle East (9) and lineage IV in Asia (10) with a recent incursion in Europe (11).

Infected animals are characterised by marked hyperthermia, apathy, anorexia, diarrhoea, ocular and nasal discharge, and lip and nose lesions. Mortality can reach 50–100% in naïve small ruminant populations. Due to the impact of the disease on food security and on the global economy, the OIE and FAO launched a worldwide campaign to eradicate PPRV by 2030 (12). Such an eradication programme requires effective vaccines and diagnostic tests. Two live attenuated PPRV vaccines, Nigeria 75/1 and Sungri96, are currently in use worldwide. Both vaccines provide complete clinical protection against all four PPRV lineages (13), irrespective of whether they are administered intranasally or subcutaneously (14). One dose of Nigeria75/1 vaccine ( $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>) has been shown to induce protective immunity for at least 3 years in vaccinated animals (15). Host susceptibility varies considerably depending on the PPRV strain, and on the species and breed of the host (16, 17). Identifying factors that influence host-pathogen interactions and the outcome of an infection may greatly help develop efficient PPR control strategies.

Like other morbilliviruses, PPRV is lymphotropic and epitheliotropic. PPRV infection is associated with immunosuppression, as indicated by leukopenia and lymphopenia, providing a window of opportunity for the virus to replicate and spread (18). This phenomenon appears to be a multifactorial process involving interactions between PPRV haemagglutinin H and the cellular receptors (PPR and SLAM) and the suppression of the interferon antiviral response by the non-structural viral proteins V and C (19, 20). Vaccination with live attenuated vaccines may also cause transient leukopenia without significantly affecting the immune response (21, 22).

Immune cells (lymphocytes, monocytes and dendritic cells) are responsible for transport of the virus to the tonsillar tissue and lymph nodes draining the initial site of infection where extensive viral replication occurs before propagation to epithelial and lymphoid tissues of other organs (23). In-vitro studies using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) have shed some light on the immune response to PPRV infections (24–26). In PBMCs infected with PPRV apoptotic indices were found including peripheral condensation of chromatin, nucleus and cell fragmentation leading to the formation of apoptotic bodies (27). These findings suggest that PPRV can induce apoptosis in

goat lymphocytes. Transcriptome analysis of PBMCs infected by the PPRV vaccine strain Sungri/96 showed the dysregulation of both immune regulatory pathways and the expression of genes encoding the transcription factors that govern the response to viral infection (24). Innate immune molecules and antiviral genes seem to play an important role at the earliest state in infection of PBMCs, suggesting a link between innate and adaptive immune response to PPRV infection (25, 26).

In-vitro studies have generally only focussed on either a vaccine strain or highly virulent strains. The effect of strains with different levels of virulence on the modulation of the immune system has not been thoroughly compared in an experimental setting so far. Furthermore, gene expression studies of immune response to PPR have never been combined with protein expression analyses to confirm patterns of immune responses, except for the modulation of microRNA expression (28, 29). Multi-omics approaches are now favoured to increase our understanding of complex biological processes (30).

Reliable and reproducible challenge models to study host-PPRV interactions are needed for in-depth investigation of host-PPRV interactions. In a previous study by our team, a model of PPRV challenge in Saanen goats was developed to test PPR vaccine efficacy (31). In that experiment, two virulent strains of PPRV were used to infect Saanen goats. In the Saanen goat breed, the Morocco 2008 PPRV strain was highly virulent, while the Ivory Coast 1989 PPRV strain only induced mild symptoms of the disease. No symptoms or virus shedding were observed with the PPRV vaccine strain Nigeria 75/1. In the present study, we use an in-vitro approach to explore the mechanisms behind the different levels of virulence of these three PPRV strains in the new challenge model.

In this study, we infected PBMCs from Saanen goats with the two virulent strains, Morocco 2008 and Ivory Coast 1989, and also with the vaccine strain Nigeria 75/1, the most commonly used PPRV vaccine strain (32). PPRV is known to interact with the signalling lymphocyte activation molecule (SLAM) (33). The mitogen Concanavalin A (ConA) was used to enhance virus susceptibility through enhanced SLAM expression and T cell activation. The level of SLAM expression in ConA-stimulated PBMCs is higher than in unstimulated cells and thus increases viral replication and titer (34). In this favourable context, PPRV strains have an optimal level of infectivity and inhibit lymphoblastogenesis in a dose-dependent manner (35). In the present study, we explored the response of PBMCs to infection by PPRV strains of different virulence using flow cytometry, transcriptomic analyses and proteomic analyses.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

Five adult Saanen goats (males, castrated) kept at the Institute of Virology and Immunology IVI in Mittelhäusern, Switzerland served as blood donors. Blood sampling was performed in compliance with the Swiss animal protection law (TSchG SR 455; TSchV SR 455.1; TVV SR 455.163) under the authorization

number BE8/19. The experiments were reviewed by the cantonal committee on animal experiments of the canton of Bern, Switzerland, and approved by the cantonal veterinary authority (Amt für Landwirtschaft und Natur LANAT, Veterinärdepartement VeD, Bern, Switzerland).

## PBMC Isolation, Proliferation Assay and Virus Infection

Goat PBMCs were isolated from whole blood ( $n = 5$  healthy adult Saanen goat donors) by gradient density separation using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Isolated PBMCs from each goat were divided into two sets of cultures.

Cell trace violet-labelled (see below) PBMCs were used for flow cytometry-based proliferation analysis, while unlabelled cells were used for RNA sequencing and proteomic analysis. PBMCs were cultured in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% non-essential amino acids, 1% sodium pyruvate, 1% HEPES and 0.02 mM beta-mercaptoethanol (all components were purchased from ThermoFisher Scientific).

The highly virulent PPRV strain Morocco 2008 (PPRV MA08 VSD2 Vero 4 VSD1, lineage IV), the weakly virulent PPRV strain Ivory Coast 1989 (PPRV IC89 PM3 Vero 5, lineage I), and vaccine PPRV strain Nigeria 75/1 (PPRV N75/1, Cirad Master seed batch LK1 BK1 Vero 75, lineage II) were used to infect PBMCs. The 50% tissue culture infective dose per ml (TCID<sub>50</sub>/ml) was  $10^{3.7}$  TCID<sub>50</sub>/ml for PPRV MA08,  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml for PPRV IC89 and  $10^{5.6}$  TCID<sub>50</sub>/ml for PPRV N75/1.

For virus infection, labelled and unlabelled goat PBMCs were seeded in 96-well plates at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells per well and inoculated with the different strains at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001. PBMCs from different donors were distributed and then infected in different plates. After 1 h of adsorption, infected PBMCs were washed with 1X PBS and maintained in DMEM supplemented with 2% of FBS and Concanavalin A (ConA, 2.5 µg/ml, Sigma Aldrich). Mock-infected PBMCs underwent the same treatment and were used as controls. A pool of three culture replicates of PPRV- and mock-infected cultures of PBMCs was harvested at 24, 48, 72, 96 and 120 hours post infection (hpi).

## Flow Cytometry Assay

A cell proliferation assay was performed using the CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Infected PBMCs were analysed by flow cytometry (BD FACSCanto II Cell Analyzer, BD Biosciences) using an anti-PPRV-N-FITC monoclonal antibody (clone 38-4, CIRAD, Montpellier, France). PBMCs were washed and 7AAD (Biolegend) was added in the dark 10 min prior to acquisition to assess the percentage of live cells. For the intracellular staining of the virus, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilised in 1X PBS supplemented with 0.1% of Saponin. Fixed and permeabilised cells were stained with a FITC-conjugated monoclonal antibody against PPRV N protein (1:100) diluted in 1X PBS supplemented with 0.3% of Saponin.

## RNA Isolation and RNA Library Construction

Total RNA was extracted from goat PBMCs using TRIzol (Invitrogen). Briefly, PBMCs were harvested in TRIzol (Life Technologies), and Chloroform : IAA (49:1, Sigma-Aldrich) was added to each tube. After a centrifugation step at 12,000g at 4°C for 15 min, the upper aqueous phase was transferred to a fresh tube containing 0.5 ml of 75% ethanol. After 10 minutes incubation at room temperature, the nucleic acids in 75% ethanol were loaded onto a NucleoSpin RNA column placed in a collection tube. The remaining RNA isolation steps were performed using the NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Total RNA quality and concentration were measured and the library prepared at the Next Generation Sequencing platform of the University of Bern, Switzerland. Only samples with RNA Quality Number (RQN) score  $\geq 8$  were sequenced on a NovaSeq 6000 instrument using an SP flow cell.

## RNA Seq Data Processing

Raw sequencing reads from each library were aligned with the *Capra hircus* Ensembl genome (ARS1 GCF\_001704415.1) and the PPRV genome (GCF\_000866445.1\_ViralProj15499) using Hisat2 (v.2.1.0). Read count data were obtained using StringTie (v.2.0.3) and were imported in RStudio software (v.1.1.456) using the tximport package (v.1.20.0). Differential expression analysis between PPRV-infected and not-infected PBMCs was performed using the DESeq2 package. A false discovery rate (FDR)  $< 0.05$  and a  $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$  were set as the default thresholds for significant differential expression. Venn diagrams between up- and downregulated genes were drawn with InteractiVenn (accessible at <http://www.interactivenn.net/>). Gene ontology categories based on biological processes, molecular functions and cellular components were retrieved for all up- and downregulated genes using gProfiler (36).

Ingenuity Pathways Knowledge Base in QIAGEN's IPA software (QIAGEN, Redwood City, USA) was used with the lists of differentially expressed genes to identify the canonical pathways, upstream regulators and the most significant biological processes. Core and multiple analyses were performed for each dataset to identify the activated ( $Z$  score  $> 2$ ) or inactivated ( $Z$  score  $< -2$ ) canonical pathways and bio functions.

DEG lists were also ranked based on the P-values adjusted (FDR) for a gene set enrichment analysis with goat blood transcriptional modules (BTM). BTM represent gene sets created based on a high level of interactions identified *ex vivo* in human PBMC (37), we had previously adapted for use in sheep (38) and pigs (39). The annotation of these genes was based on either the gene descriptions given in the ENSEMBL data based or on homology with other species, including cattle, pigs, human and/or mouse. Homologies were obtained using the Biomart software accessible on the ENSEMBL web site. The goat BTMs were adapted to the goat by replacing human genes with their goat homologs. This step required extensive manual curation for genes that differed in name or have not yet been annotated in goats. The homologies, novel annotations, and the



final lists of BTM genes are provided in **Supplementary Materials**. Module activity during the different infections was compared using a false discovery rate < 0.01. This threshold was set to select specific BTMs and to reduce false positive BTMs.

## Proteomic Data Acquisition and Processing

PPRV-infected and not-infected PBMCs were prepared for proteome analysis using a homemade protocol. First PBMCs were washed twice with 1X PBS and collected in DIGE buffer at different times. DIGE buffer comprised 7 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) and 30 mM TrisHCl. The pH was adjusted to 8 with HCl. This step allowed cell lysis and the conservation of protein structure. The quantity of proteins obtained was evaluated using a 2D gel and colorimetric dosage.

Samples were transferred to the Functional Proteomics Platform (FPP, Montpellier, France) where tryptic digestion of the samples was carried out on S-Trap Mini Spin columns (Protifi). Samples were loaded onto a 50-cm reversed-phase column (75 mm internal diameter; Acclaim PepMap 100 C18; Thermo Fisher Scientific) and separated with an UltiMate 3000 RSLC system (Thermo Fisher Scientific) coupled to a QExactive HF system (Thermo Fisher Scientific). Tandem mass spectrometry analyses were performed in a data-dependent mode. Full scans (375–1,500 m/z) were acquired in the Orbitrap mass analyser with a resolution of 60,000 at 200 m/z. For the full scans,  $3 \times 10^6$  ions were accumulated within a maximum injection time of 60 ms. The 12 most intense ions with charge states  $\geq 2$  were sequentially isolated ( $1 \times 10^5$ ) with a maximum injection time of 100 ms and fragmented by higher-energy collisional dissociation in the collision cell (normalised collision energy of 28%) and detected in the Orbitrap analyser at a resolution of 30,000.

Raw spectra were processed with MaxQuant (v 1.6.10.43) (40) using standard parameters with label-free quantification (LFQ), iBAQ and matched between run options using Andromeda (41). Tandem mass spectrometry spectra were matched against the UniProt reference proteomes (release 2020\_04; <http://www.uniprot.org>) of *C. hircus* and Peste-des-petits-ruminants virus (proteome IDs UP000291000 and UP000118493, respectively) and 250 frequently observed contaminants, as well as reversed sequences of all entries. The maximum false peptide and protein discovery rate was set at 0.01. The representative protein ID in each protein group was automatically selected using our in-house Leading tool (v3.4) (42). The protein-protein interaction was predicted using the STRING database (STRING: functional protein association networks, accessible at [string-db.org](http://string-db.org)) with *Capra hircus* as the reference species (43).

## Statistical Analysis

Differences in survival between PPRV-infected and not-PPRV-infected PBMCs at different times were analysed using two-way ANOVA. Differences between goat proteins detected by proteomics were analysed using Student's t-test. Statistical tests

were carried out with graphpadprism (v7) and Perseus (v1.6.10.43) on LFQ data (44).

## RESULTS

### PPRV Infection Induces a Decline in Viability and Cell Division in PBMCs

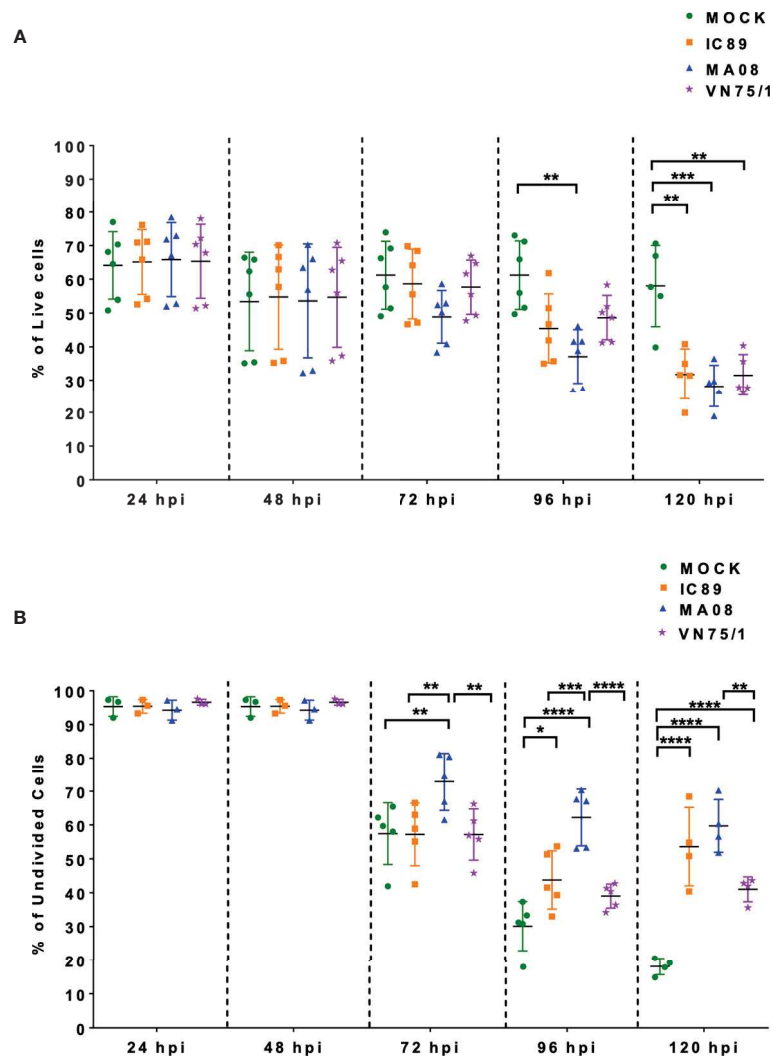
Survival and proliferation of ConA stimulated PBMCs in response to infection with different PPRV strains were assessed by flow cytometry. Cell viability significantly decreased at 96 hours post-infection (hpi) after infection with MA08 compared to mock-infected cells. This significant effect was also observed with all PPRV strains at 120 hpi (**Figure 1A**). ConA stimulation induced multiple divisions of PBMCs. During the experiment, the proportion of undivided cells decreased from 100% to 20% in mock-infected PBMCs, from 100% to 50% in PBMCs infected with IC89, from 100% to 60% in PBMCs infected with MA08 and from 100% to 40% in PBMCs infected with VN751. This decrease started to significantly differ from that in the controls at 72 hpi when PBMCs were infected with MA08, at 96 hpi with IC89 and at 120 hpi with VN751 (**Figure 1B**).

### Viral Replication in PBMCs Differs Among PPRV Strains

The level of infection in PBMCs was first determined by staining for the intracellular presence of PPRV N. In ConA-stimulated PBMCs, MA08 showed higher infectivity over time compared to IC89 and VN751 (**Figure 2A**). This was linked with higher levels of mRNA in many viral genes (N, P, V, C, M, F, H, and L) at 72 hpi quantified by RNA sequencing (**Figure 2B**) and viral proteins quantified by mass spectrometry (**Figure 2C**).

### More Genes Are Differentially Regulated During Infection With the Highly Virulent PPRV Strain

Principal component analysis of the transcriptomic data at 72 hpi revealed distinct clusters that allowed further analysis. In this analysis, only the MA08 group was clearly distinguished from the IC89 and VN751 groups and the control group (**Supplementary Figure 1A**). Infections of PBMCs with PPRV strains induced up- and downregulation of genes compared to mock-infected cells. Analysis of mRNA expression at 72 hpi showed that VN751 and IC89 strains mainly induced gene upregulation while MA08 induced both gene up- and downregulation. A total of 82 upregulated genes were common to the three infection groups, while 20 genes were specific to VN751 and IC89, and 19 genes were specific to VN751 and MA08. In addition, MA08 strain induced upregulation of 132 genes and downregulation of 242 genes not observed in other groups (**Figure 3**). The upregulated genes identified in the annotated reference genome and common to all treatment groups show similar expression levels. Categories retrieved from gene ontology show that most of commonly expressed genes are involved in immune processes such as the

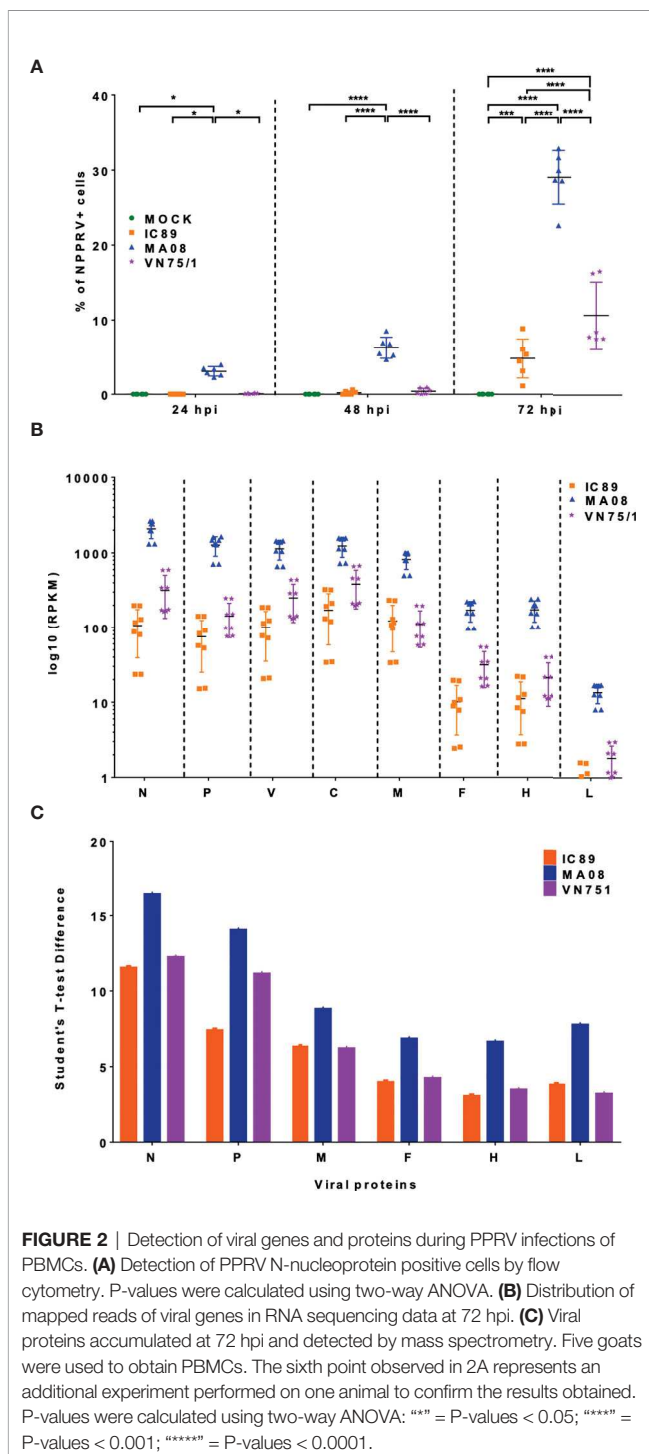


**FIGURE 1** | Effect of PPRV strains on ConA stimulated PBMC survival and proliferation over a period of five days. **(A)** Viability of the cells during infection expressed as the percentage of live cells (7AAD negative cells). **(B)** Frequencies of undivided cells after infection with the different virus strains. Five goats were used to obtain PBMCs. Goat PBMCs were infected with PPRV strains IC89, MA08 and VN75/1 at MOI of 0.001. The sixth point observed in 1A represents an additional experiment performed on one animal to confirm the results obtained. P-values were calculated using two-way ANOVA: "\*" = P-values < 0.05; "\*\*" = P-values < 0.01; "\*\*\*" = P-values < 0.001; "\*\*\*\*" = P-values < 0.0001.

type I interferon-mediated antiviral response (**Supplementary Figure 2A**). Complementary genes such as those encoding RNASEL, TDRD7, UBA7 and UBE2L6 of this antiviral response are activated in common between IC89 and VN75/1 infections (**Supplementary Figure 2D**). Several non-coding RNA (7SK, Metazoa\_SRP, U1 and 5\_8S\_rRNA) involved in the transcription mechanisms are expressed in common between the IC89, MA08 and MA08, VN751 infections (**Supplementary Figures 2E, F**). Genes involved in endoplasmic stress response, immune response, gene transcription and cytokine and chemokine activity are specifically upregulated upon infection with MA08 (**Supplementary Figure 2B**) while those involved in biosynthesis processes, development and maintenance of cell shape and function are downregulated (**Supplementary Figure 2C**).

## PPRV Infection of Cells Induces Differential Expression of Antiviral Genes and Proteins

DEG lists were used to identify pathways, functions and regulators that are dysregulated in the different infection groups. Production of cytokines and chemokines, PRR recognition of virus, IRF activation and the role of PKR in antiviral pathways were upregulated in all conditions. Specifically, upregulation of MAPK TREM1 and IL17 signalling pathways and downregulation of erythropoietin and cholesterol biosynthesis pathways were observed after infection with MA08. These pathways have been classified as belonging to the antiviral response, cell death and survival and/or lipid metabolism (**Figure 4A**). More upstream regulators were also observed after infection with MA08 than with the other strains.



Like the pathways, these regulators have been classified for their potential role in antiviral response, cell death and survival, MAPK signalling, cell proliferation and/or lipid metabolism (**Figure 4B**). Biological functions involved in antiviral response, differentiation and apoptosis of immune cells (lymphocytes and phagocytes) were activated in all infection groups. VN751 and IC89 activated similar functions. MA08 also activated several other functions. These specific functions were mainly related to the formation of

lymphocytes and natural killer cells, migration, recruitment and inflammatory processes such as cell degranulation (**Figure 5A**). Biological functions involved in replication of the virus were significantly repressed across infections, particularly VN751 and IC89 strains that have a greater number of functions with a zscore lower than -2 (**Figure 5B**). Genes involved in this mechanism are shown in **Supplementary Figure 3**. Gene set enrichment analysis detected activated blood transcriptional modules (BTMs) involved in the antiviral type I interferon response and in antigen presentation by dendritic cells. BTMs involved in the role of myeloid cells in inflammation were found to be repressed upon infection with VN751 (**Figure 5C**).

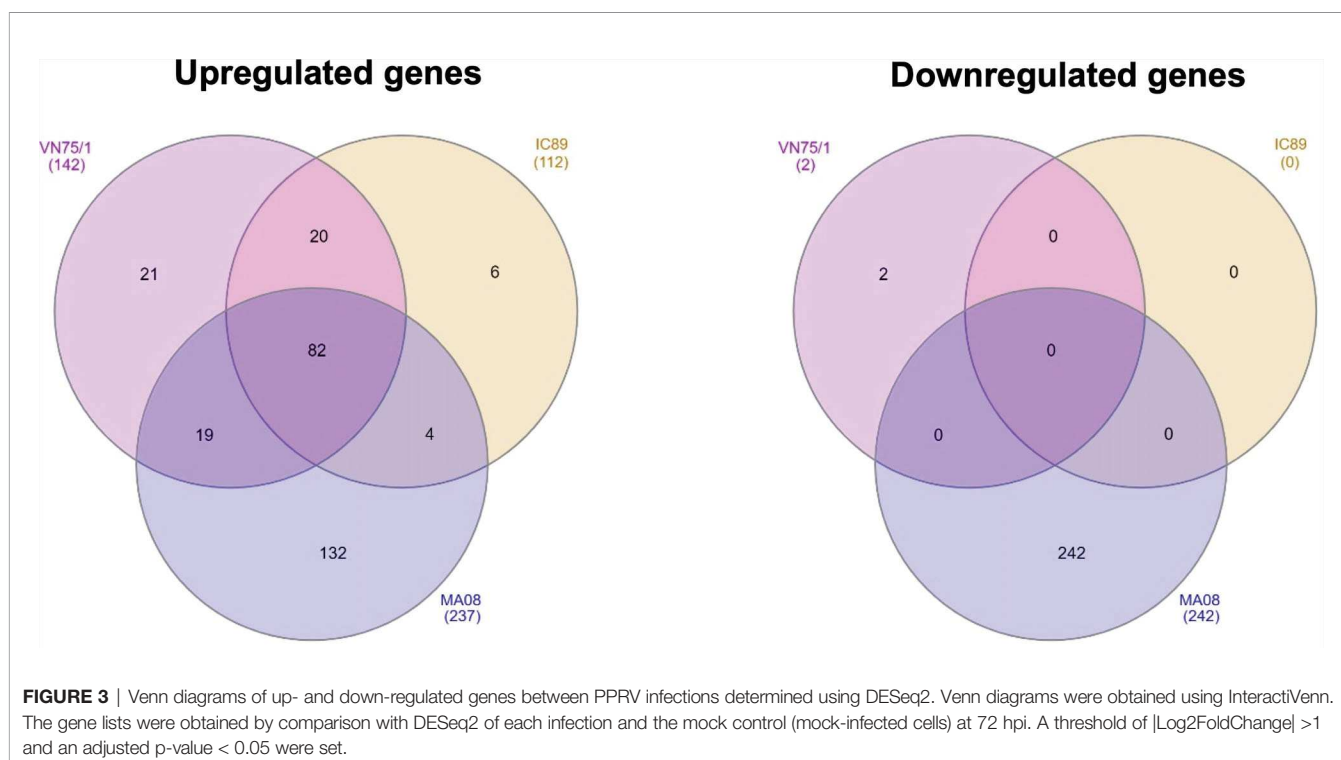
Proteins differentially expressed between infections were analysed using a proteomic approach. Principal component analysis of the proteomic data at 48, 72 and 96 hpi revealed distinct clusters that reflect the course of the infections. The IC89 and VN751 groups had similar protein distribution and expression, while the MOCK and MA08 groups showed distinctive patterns (**Supplementary Figure 1B**). A set of proteins involved in the antiviral response was differentially expressed among the infection groups from 72 to 96 hpi (**Figure 6**). These proteins were significantly detected in all infections but at different expression levels. Fewer proteins were detected in the MA08 infection group. Some proteins identified at 72 hpi were no longer detected at 96 hpi, e.g., ISG15 in all conditions, IFIT1 and DDX58 (RIG I) in the MA08 group only. In addition, some proteins were detected only in specific infection groups: EIF2B5, POLE4 and LYPLA1 at 48 hpi, TCHHL1, RPF2 at 72 hpi and JAK3, NT5C3 and TNFAIP8L2 at 96 hpi for VN75/1; TCHHL1, PARP10 at 72 hpi and TCHHL1, JAK3 and ANXA4 at 96 hpi for IC89; FN1, MX2 and IFIT2 at 48 hpi, FN1, NT5C3 and LAMTOR5 at 72 hpi and TOMM6, CNTRL, ASPSCR1, APOC3 and TNFAIP8L2 at 96 hpi for MA08 (**Figure 6**).

## DISCUSSION

The virulence of PPR viral strains depends on the host, the environment and the intrinsic abilities of the strains to replicate in infected cells. Host susceptibility has already been described in several in-vivo studies (17, 45) but the host factors underlying the differences in virulence of the viral strains are not yet clearly understood. In this study, an in-vitro approach was used to explore the mechanisms behind the different levels of virulence of three PPRV strains in Saanen goat PBMCs.

A very low MOI was used to monitor viral replication and its effect on lymphocyte survival and proliferation. After infection, PBMCs were stimulated with ConA, allowing increased surface expression of SLAM receptors and higher infectivity of PPRV strains (35, 46). In this context, the highly virulent Morocco 2008 (MA08) strain had a higher level of replication than the vaccine Nigeria 75/1 (VN75/1) and Ivory Coast 1989 (IC89) strains. In addition, all the strains used in this study had a negative impact on cell viability and inhibited lymphocyte proliferation, and the effect was earlier and stronger when PBMCs were infected with the MA08 strain. The inhibition of lymphocyte proliferation was concluded from a significantly higher level of undivided cells compared to that



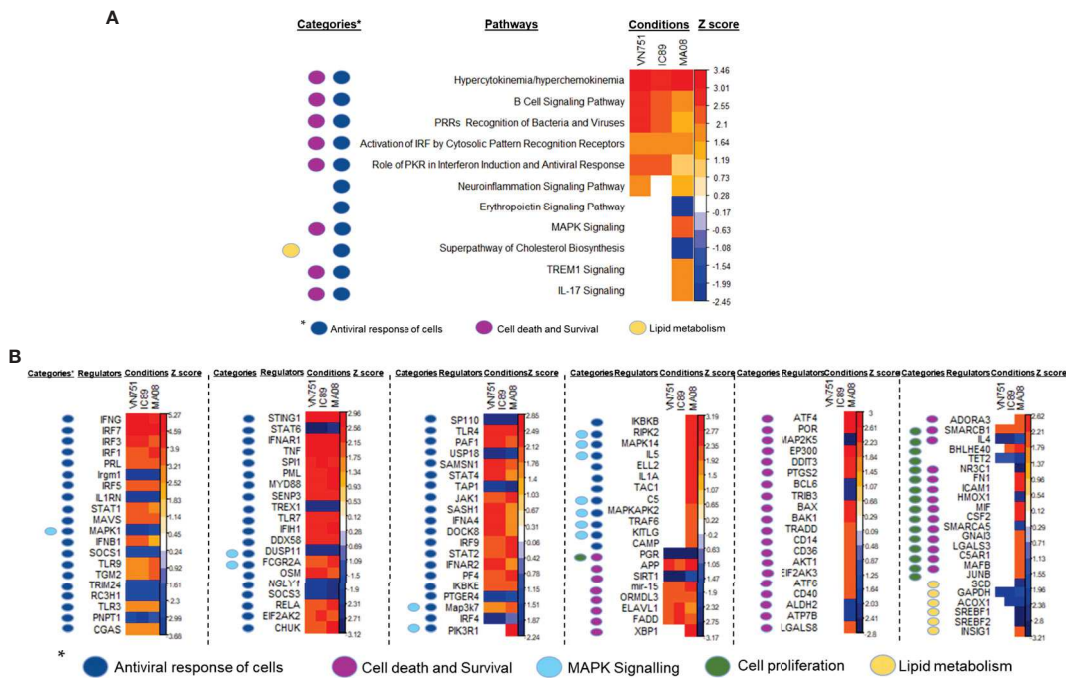


in the control group. Taken together, these results indicate that, in this cellular context, the highly virulent strain MA08 was able to replicate better and rapidly induce cell death and inhibit lymphocyte proliferation. Vaccine Nigeria 75/1 (VN75/1) and Ivory Coast 1989 (IC89) replicated more slowly and had a delayed inhibitory effect on lymphocyte proliferation. Therefore, this model was effective in distinguishing between highly and weakly virulent PPRV strains and suggests that the death of infected cells may play an important role in the *in vitro* inhibition of lymphocytes proliferation by PPRV. Similar behaviour has been observed in other *Morbilliviruses*. Measles virus-induced immunosuppression is caused by direct killing of infected memory T and B lymphocytes and indirect mechanisms such as deregulation of cytokines or surface contact-mediated signalling, which may lead to apoptosis or alter the proliferative response of uninfected PBMCs (47).

RNA sequencing and proteomic approaches were used to investigate the host cellular factors associated with the difference in replication between strains in stimulated PBMCs. Differentially expressed genes (DEGs) were widely present upon infection with the highly virulent MA08 strain, whereas VN75/1 and IC89 induced milder gene regulation and almost no down-regulation at 72 hpi. With respect to the upregulated genes expressed in a common way between strains, most of them appear to be IFN antiviral response genes that are induced at a similar level between infections. Previous studies have also shown that these interferon-stimulated genes (ISGs) are upregulated in the early stages of PPRV infection (25, 26). In addition, these ISGs help to strengthen host defence and reduce PPRV replication in goats and cattle (48).

Some upregulated genes were common to the VN75/1 and IC89 infection groups, but not expressed in MA08 infection. This

small set of genes include genes such as HAVCR2, TDRD7, UBA7, UBE2L6 and RNASEL involved in altering viral replication. HAVCR2, also known as TIM3, is known to induce downregulation of cytokine production, in particular IL2, by T cells, and to suppress NFAT dephosphorylation (49). The interaction between galectin-9 and TIM3 expressed on the surface of activated CD4+ T cells induce resistance of activated CD4+ T cells to HIV-1 infection and replication (50). TDRD7 (Tudor Domain-containing 7) is a novel antiviral ISG expressed at low endogenous levels in various cell types and transcriptionally upregulated upon viral infection or IFN treatment. TDRD7 is antiviral by inhibiting the cellular autophagy pathway, which is required for paramyxo-/pneumovirus replication (51). UBA7 and UBE2L6 are essential enzymes for ISG15 conjugation (ISGylation). ISGylation plays an important role in establishing the antiviral state of infected cells (52). RNASEL (Ribonuclease L) limits viral infections by degrading viral and cellular RNA, inducing autophagy and apoptosis, and producing RNA degradation products that enhance type I interferon (IFN) production *via* RIG-I receptors (53). The regulatory status of genes involved in RNASEL synthesis, such as PDE12 (a negative regulator of the innate immune response), could be a major factor in resistance to PPRV replication (48). Taken together, our results and observations in the literature confirm that PPRV infections induce an antiviral state characterised by the induction of an antiviral IFN response. Other mechanisms involved in the inhibition of viral replication are induced by the activation of specific ISGs during infections with IC89 and VN75/1 strains. These mechanisms may explain the lower level of replication observed when these strains are used to infect PBMCs. A higher

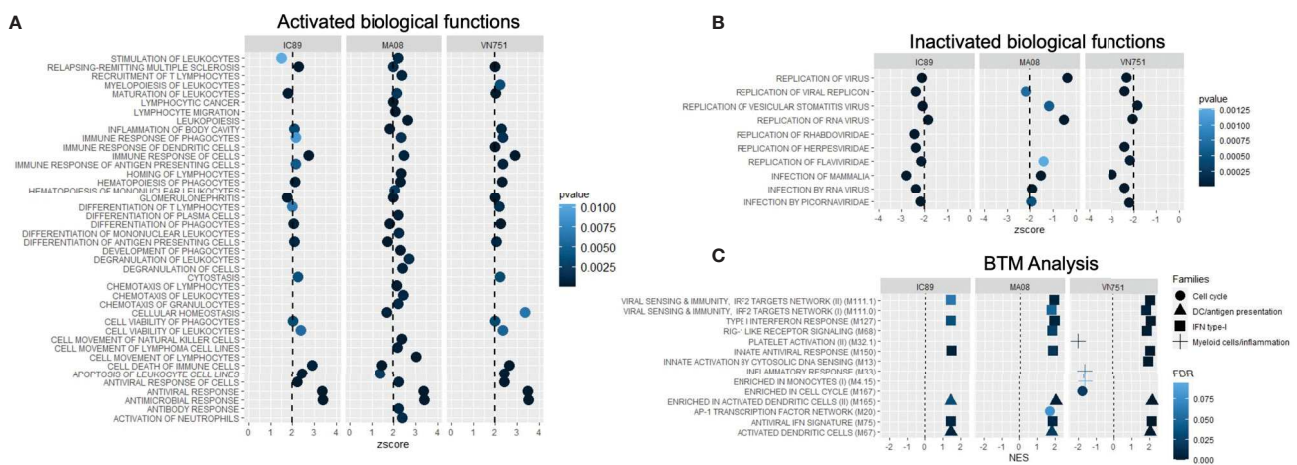


**FIGURE 4 |** Identification of pathways and upstream regulators modified by PPRV infections at 72 hpi. Qiagen's IPA software provided a Zscore that informs on the activation status of pathways (A) and upstream regulators (B). Positive zscores (upregulated) are represented by an orange gradient while negative zscores (downregulated) are represented by a blue gradient. Pathways and upstream regulators have been classified in categories related to antiviral cell responses (dark blue square), MAPK signalling (light blue square), lipid metabolism (yellow square), cell death, survival (violet square) and proliferation (green square).

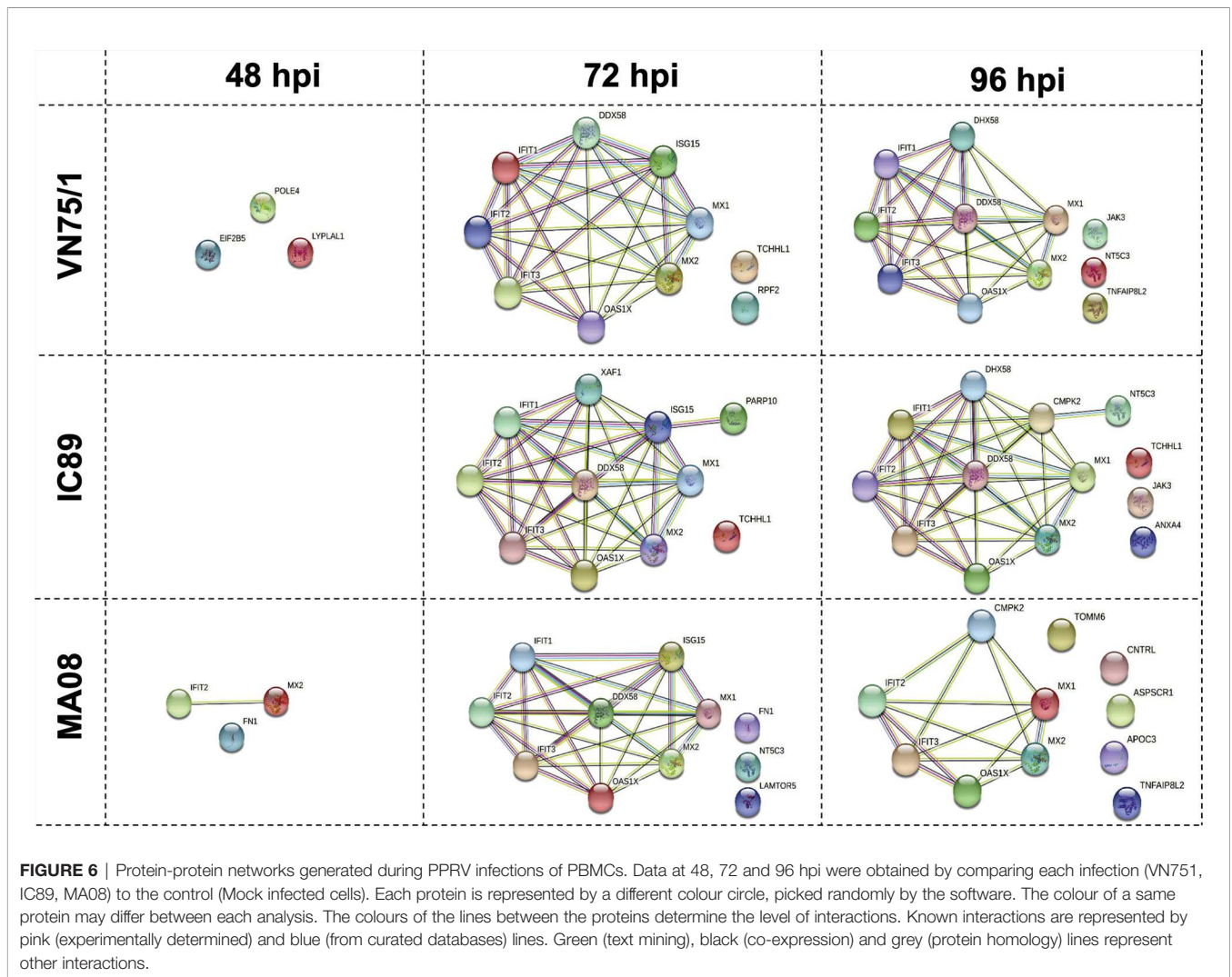
number of DEGs was found in the infection with the MA08 strain. This stronger regulation may be due to the higher replication capacity of this strain, which induces greater alteration in cell metabolism. This response at 72 hpi also

correlates with the beginning of the decrease in cell viability and the inhibition of cell proliferation induced by this strain.

DEGs lists were used to analyse pathways and regulators involved in the response of cells to infection with PPRV strains of



**FIGURE 5 |** Analysis of the activation of biofunctions and BTMs during PPRV infections at 72 hpi. Activated (A) and inactivated (B) biofunctions were found during the analysis. Qiagen's IPA software provided a zscore that determines the activation (zscore>2) and the inactivation (zscore<-2) status of biological functions. All inactivated functions represent virus infection and replication functions and therefore reflect the induction of antiviral activities in the cells. (C) Analysis of goat blood transcriptional modules (BTMs) during PPRV infections of PBMCs at 72 hpi. Goat BTMs were activated or inactivated during infections (significance level: FDR < 0.1). Positive normalized enrichment score (NES > 0) means activation of a set of genes while negative NES (NES < 0) means inactivation.



different virulence. Production of large amount of cytokines (hypercytokemia/hyperchemokemia), B cell signalling, pathogen recognition receptors (PRRs) recognition of viruses, activation of interferon regulatory factors (IRF) by cytosolic PRRs (MDA-5, RIG-I and LGP2) and the role of protein kinase R (PKR) in interferon induction were found to be upregulated in all infection groups at 72 hpi. These pathways, involved in the induction of the antiviral state and cell death, further confirmed the common effect on PBMCs generated by PPRV infections. BTM analysis of the lists of ranked DEGs at 72 hpi also confirmed the involvement of type I interferon modules in the response to infection by all PPRV strains. Overall, the genes involved in these pathways and in BTMs seemed to orchestrate a classical antiviral response regardless of the virulence of the PPRV strain. In addition, specific upregulation of the MAPK, TREM1 and IL17 signalling pathways was induced after infection with MA08. These specific pathways are part of the cellular pro-inflammatory and antiviral response induced by this strain (54, 55). These specific responses were also accompanied by downregulation of erythropoietin (EPO)

signalling pathways and cholesterol biosynthesis. Therefore, our results suggest that the highly virulent MA08 strain is capable of inducing a more diverse response of cells. For instance, cell death could be indirectly activated by the inhibition of the anti-apoptotic EPO signalling (56). This strain could also have an impact on cellular metabolism by altering cholesterol biosynthesis, a complementary mechanism that enhances the antiviral response of cells (57). BTM analysis succeed in the detection of the main induced response of infected cells and was also able to detect inactivation of certain modules involved in the role of myeloid cells in inflammation, dendritic cell activation and in the cell cycle. Thus, this tool has confirmed its effectiveness and could be used in the future to detect the mechanism of action and factors related to the response of veterinary species to infection or vaccination (38).

Upstream regulators are genes or transcriptional regulators that govern multiple pathways and gene activation. These regulators may explain the observed changes in gene expression and pathway activation. Upstream regulator analysis is based on knowledge of the expected effects between



transcriptional regulators and their target genes stored in the Ingenuity knowledge database. Since the activation zscore of these regulators is obtained by a calculation based on the presence and activation status of their known targets, it is not surprising to have inactivated upstream regulators although there are no downregulated genes in the data set (58). Categories extracted from the IPA analysis showed that these regulators are involved in the activation of the antiviral response of cells, cell death and proliferation, MAPK signalling and lipid metabolism. The activation status of these regulators is consistent with the pathway's activation status. For instance, the inactivation of the cholesterol biosynthetic super-pathway must be governed by the downregulation of GAPDH, ACOX1, SREBF1/2 and the upregulation of INSIG1. INSIG1 is an important upstream regulator that effectively controls the transcription of SREBF elements preventing the activation of lipid biosynthesis genes (59). Upstream regulators involved in the control of cell proliferation are specifically activated upon infection with PPRV MA08 strain. These regulators have typically double-edged sword abilities, as they are involved in both cell proliferation and cell death and survival. Taken together, these results suggest that the induction of the antiviral state is governed by the activation of several upstream regulators. These regulators could have many effects on cellular responses and, therefore, these experiments provide some specific key targets to study that could be involved in the cell division inhibition induced by PPRV infection.

Many of them had the same regulatory status in all the conditions, but some of them were specific to the MA08 infection. For instance, the upregulation of MAPK14 and MAPKAAPK2 could explain the upregulation of MAPK signalling pathways observed after infection with MA08.

Several biological functions were regulated in similar ways in all infection groups at 72 hpi, with a higher number of functions activated after infection with MA08. These functions included antiviral response, differentiation and apoptosis of immune cells (lymphocytes and phagocytes). VN751 and IC89 have mainly activated similar functions, while MA08 induced the activation of several other functions. These specific functions are related to cell formation and migration (lymphocytes and natural killer cells) and granule cell degranulation. In addition, the biological functions involved in virus replication were significantly repressed during infections, especially VN751 and IC89 strains.

Genes specifically involved in the repression of viral replication such as HAVCR2, TDRD7, UBA7, UBE2L6 and RNASEL were first found in the comparison of DEGs between the two infections VN751 and IC89. The repression of biofunctions related to viral replication thus confirmed the previous analysis and furthermore suggests the potential involvement of these mechanisms in the virulence of a PPRV strain. These genes were upregulated in VN751 and IC89 infections, while not in MA08 infection. For instance, HAVCR2 involved in NFAT dephosphorylation (49) was not significantly regulated in MA08 infection and was accompanied by upregulation of IL2 and downregulation of NFATC2 (nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 2). The downregulation of one of the cytoplasmic form of NFAT

in the MA08 infection (**Supplementary Figure 3**) suggests dephosphorylation and translocation of this factor into the nucleus. AGO4, SNX9, SCD were also downregulated after infection with MA08. Decreased expression of AGO4 (Argonaute 4) leads to a reduction of replication in RSV infection (60), but a contradictory role for this gene was found *in vivo* in mice infected with the influenza virus. AGO4 deficiency in influenza infection results in higher viral titres *in vivo* (61). The opposing effects of decreased expression of this gene may raise questions about its pro- or antiviral role in PPRV infection. Downregulation of SNX9 (Sorting nexin-9) is associated with a state of chronic inflammation and immunosuppression and its monitoring, together with that of CD247 expression, could serve as an "optimal sensing" tool to define the severity of chronic inflammation and induced immunosuppression (62). SCD1 (Stearoly-CoA desaturase 1) inhibition disrupts virus replication and induces the production of non-infectious virus particles (63, 64). Taken together, these results may indicate that the high replication rate of the highly virulent PPRV MA08 strain may be due to the involvement of certain viral proteins that interact directly with the activation of certain antiviral gene such as HAVCR2 and RNASEL. However, complementary mechanisms seemed to be induced to compensate for the absence of these genes. SNX9 could be an *in-vitro* marker for the interruption of mitogen-induced immunosuppression by PPRV.

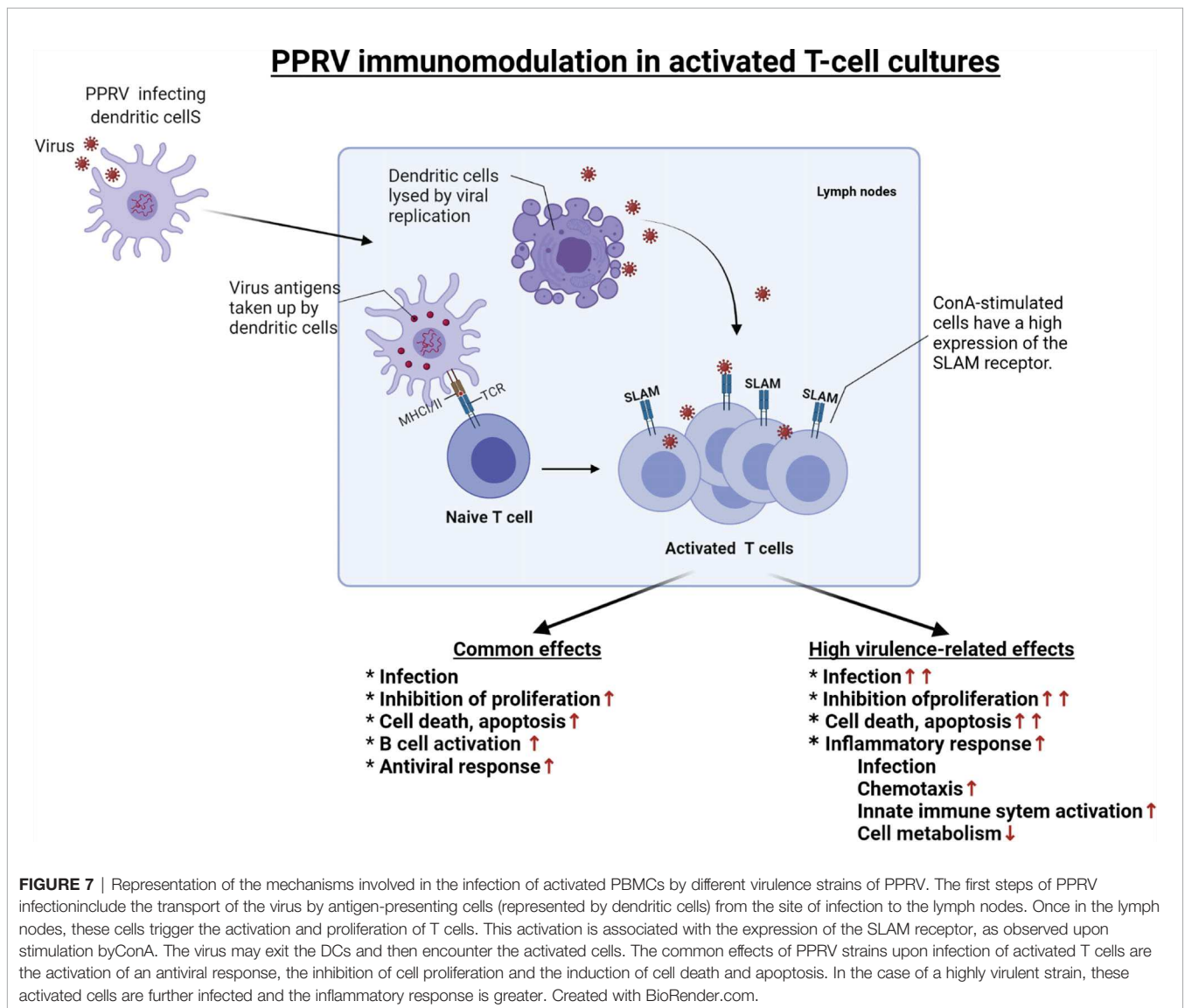
A proteomic analysis was performed in an attempt to link gene and protein expression. As observed in the transcriptomic data, the proteins involved in the type I interferon antiviral response were observed in all infections. Clear kinetics of this response were observed during infection with MA08, starting with the production of ISGs, IFIT2 and MX2 at 48 hpi. The induction of interferon antiviral molecules has already been observed at earliest infection stages (26, 65). Then, the results of our study confirmed that interferon stimulated elements are not only transcriptionally but also translationally activated in the early stages of infection.

A core of interferon-related proteins was detected in all infections at 72 hpi, although expression of XAF1 and PARP10 was also detected only after infection with IC89. At 96 hpi, overall expression of proteins belonging to the core interferon-related proteins was similar in IC89 and VN751 infections. At this stage, fewer proteins were detected after infection with MA08. This could be due to the exhaustion of the cells, which started to react at 48 hpi. Some specific proteins also appeared at different stages of the infections. For example, after infection with MA08, these were proteins such as CNTRL involved in cell cycle progression and the late stages of cytokinesis, TNFAIP8L2, involved in the different stages of chronic viral infection, and LAMTOR5, are essential for the coordination of nutrient and inflammatory signals to shape optimised immune response (66–68). These proteins may play a role in the phenotype observed upon infection with this strain. Some other specific proteins such as JAK3 were expressed in IC89 and VN751 infections. JAK3 is a well-known protein involved in JAK/STAT pathway which plays a major role in cytokine receptor signalling and IFN response (69).

Finally, upregulation of key antiviral genes detected by RNA sequencing was confirmed by their translation using proteomic analysis. Both transcriptomic and proteomic approaches were successful in analysing the antiviral response of cells. However, proteins involved in stress responses and other mechanisms were not significantly detected in the proteomics-based approach. Multilevel analyses of cellular response to infection with PPRV strains of different virulence provided insights into the factors underlying the observed phenotypes. In the model used in this study, the Nigeria 75/1 vaccine and the weakly virulent Ivory Coast 1989 strain acted broadly similarly during infection. Both strains replicated slowly but were able to inhibit cell proliferation and induce activation of the antiviral response and cell death. The induction of specific genes such as HAVCR2, TDRD7, UBA7, UBE2L6 and RNASEL may be associated with the lower replication capacity of these strains. The highly virulent Morocco 2008 strain replicated more

rapidly and acted earlier on cell metabolism by more strongly inhibiting proliferation, inducing antiviral responses and apoptosis using several means. Its high level of replication could be partially explained by mechanisms inhibiting activation of the same genes. The lack of activation of these genes seems to be compensated by the induction of other complementary mechanisms that are insufficient to inhibit viral replication of this strain. A summary of the mechanisms involved in this *in vitro* PPRV infection of activated PBMCs is shown in **Figure 7**.

These *in-vitro* results provide only a partial explanation for the variability observed in the field. To gain further knowledge, this type of analysis should be carried out in an *in-vivo* model to confirm the trends we observed and to identify other factors that could explain the variability in virulence. This kind of research, repeated to other virus strains and host species, could provide a better understanding of the factors underlying the spread of the



disease and help to improve surveillance and control of peste des petits ruminants.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The RNA sequencing raw data have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the following identifier PRJNA748573. The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium *via* the PRIDE (70) partner repository with the dataset identifier PXD024890 and 10.6019/PXD024890.

## ETHICS STATEMENT

Blood sampling was performed in compliance with the Swiss animal protection law (TSchG SR 455; TSchV SR 455.1; TVV SR 455.163) under the authorization number BE8/19. The experiments were reviewed by the cantonal committee on animal experiments of the canton of Bern, Switzerland, and approved by the cantonal veterinary authority (Amt für Landwirtschaft und Natur LANAT, Veterinärdienst VeD, Bern, Switzerland).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Project conceptualization, R-JE, GA, VR, AB, AS. Data acquisition and analysis, R-JE, GA, SP, MS, SU, KE, PH, and AS. Funding acquisition and investigation, GL, AB, and AS. Drafting of the manuscript, R-JE. Manuscript review and editing, R-JE, VR, MS, PT, GL, AB, and AS. Project administration and supervision, AB and AS. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## REFERENCES

- Kumar N, Maherchandani S, Kashyap SK, Singh SV, Sharma S, Chaubey KK, et al. Peste Des Petits Ruminants Virus Infection of Small Ruminants: A Comprehensive Review. *Viruses* (2014) 6:2287–327. doi: 10.3390/v6062287
- Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, Muthuchelvan D, Buczkowski H, Banyard AC. Peste Des Petits Ruminants. *Veterinary Microbiol* (2015) 181:90–106. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.08.009
- Assefa A, Tibebu A, Bihon A, Yemana M. Global Ecological Niche Modelling of Current and Future Distribution of Peste Des Petits Ruminants Virus (PPRV) With an Ensemble Modelling Algorithm. *Transbound Emerg Dis* (2020). doi: 10.1111/tbed.13967
- Kamel M, El-Sayed A. Toward Peste Des Petits Virus (PPRV) Eradication: Diagnostic Approaches, Novel Vaccines, and Control Strategies. *Virus Res* (2019) 274:197774. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197774
- ESA. *Peste des Petits Ruminants situation in Bulgaria* (2018) [cited 2021 Sep 23]. Available from: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/reg-com\\_ahw\\_20180712\\_pres\\_pdf\\_bul.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/reg-com_ahw_20180712_pres_pdf_bul.pdf).
- Rahman A-U, Dhama K, Ali Q, Hussain I, Oneeb M, Chaudhary U, et al. Peste Des Petits Ruminants in Large Ruminants, Camels and Unusual Hosts. *Vet Q* (2020) 40:35–42. doi: 10.1080/01652176.2020.1714096

## FUNDING

This research was co-funded by the European Commission through the VetBioNet (grant no. 731014) and was supported by a grant (SI2.756606) from the European Commission Directorate General for Health and Food Safety awarded to the European Union Reference Laboratory for Peste des Petits Ruminants (EURL-PPR).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.745315/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Principal component analysis (PCA) of the RNA sequencing and proteomic data collected from PPRV infections of PBMCs. **(A)** PCA of RNA sequencing data obtained in each condition at 72 hpi. **(B)** PCA of proteomic data obtained in each condition at 48 hpi (J2), 72 hpi (J3) and 96 hpi (J4). CTRL in proteomic data represent the Mock group.

**Supplementary Figure 2** | Common and specific regulated genes between PPRV infections. **(A)** Gene ontology (GO) analysis of commonly upregulated genes between all infections. **(B)** GO analysis of specifically upregulated and downregulated genes **(C)** in MA08 infection. Source represents significant (adjusted pvalue < 0.05) GO categories BP (biological processes), CC (Cellular Components), MF (Molecular Functions) and KEGG pathways obtained from g:Profiler. The rich factor is the number of genes found in the analysis divided by the number of genes in the GO category. **(D–F)** represent the log2 fold change values of upregulated genes found in common between VN75/1 and IC89 **(D)**, MA08 and VN75/1 **(E)** and VN75/1 and IC89 infections.

**Supplementary Figure 3** | Representation of genes involved in the repression of viral replication during PPRV infections. Red circles, squares, triangles or diamonds represent genes that are upregulated during infection, while green ones represent genes that are downregulated. Genes found several times in the analysis are tagged with an asterisk. The broken lines represent the predicted relationships between genes and biofunction. Blue lines lead to inhibition, yellow lines represent results inconsistent with the state of the downstream molecule and grey lines represent non-predicted effects.

- Schulz C, Fast C, Wernery U, Kinne J, Joseph S, Schlottau K, et al. Camelids and Cattle Are Dead-End Hosts for Peste-Des-Petits-Ruminants Virus. *Viruses* (2019) 11:1133. doi: 10.3390/v11121133
- Dundon WG, Diallo A, Cattoli G. Peste Des Petits Ruminants in Africa: A Review of Currently Available Molecular Epidemiological Data, 2020. *Arch Virol* (2020) 165:2147–63. doi: 10.1007/s00705-020-04732-1
- Banyard AC, Parida S, Batten C, Oura C, Kwiatek O, Libeau G. Global Distribution of Peste Des Petits Ruminants Virus and Prospects for Improved Diagnosis and Control. *J Gen Virol* (2010) 91:2885–97. doi: 10.1099/vir.0.025841-0
- Libeau G, Diallo A, Parida S. Evolutionary Genetics Underlying the Spread of Peste Des Petits Ruminants Virus. *Anim Front* (2014) 4:14–20. doi: 10.2527/af.2014-0003
- OIE. *World Animal Health Information System* (2018). Available at: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review/viewsummary?fupser=&dotohis=&reportid=27029](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review/viewsummary?fupser=&dotohis=&reportid=27029).
- FAO and OIE. *Peste Des Petits Ruminants Global Eradication Programme: Contributing to Food Security, Poverty Alleviation and Resilience* (2016). Available from: <http://www.fao.org/3/a-i6316e.pdf>
- Hodgson S, Moffat K, Hill H, Flannery JT, Graham SP, Baron MD, et al. Comparison of the Immunogenicities and Cross-Lineage Efficacies of Live

- Attenuated Peste Des Petits Ruminants Virus Vaccines PPRV/Nigeria/75/1 and PPRV/Sungri/96. *J Virol* (2018) 92:e01471–18. doi: 10.1128/JVI.01471-18
14. Mahapatra M, Selvaraj M, Parida S. Comparison of Immunogenicity and Protective Efficacy of PPR Live Attenuated Vaccines (Nigeria 75/1 and Sungri 96) Administered by Intranasal and Subcutaneous Routes. *Vaccines* (2020) 8:168. doi: 10.3390/vaccines8020168
  15. OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: (Mammals, Birds and Bees)* (2013). Available at: [https://tr-africa.oie.int/wp-content/uploads/2017/03/2-07-11\\_ppr.pdf](https://tr-africa.oie.int/wp-content/uploads/2017/03/2-07-11_ppr.pdf).
  16. Fakri FZ, Elhajjam A, Bamouh Z, Jazouli M, Boumart Z, Tadaoui K, et al. Susceptibility of Moroccan Sheep and Goat Breeds to Peste Des Petits Ruminants Virus. *Acta Vet Scand* (2017) 59:56. doi: 10.1186/s13028-017-0323-y
  17. Couacy-Hymann E, Bodjo C, Danho T, Libeau G, Diallo A. Evaluation of the Virulence of Some Strains of Peste-Des-Petits-Ruminants Virus (PPRV) in Experimentally Infected West African Dwarf Goats. *Vet J* (2007) 173:178–83. doi: 10.1016/j.tvjl.2005.08.020
  18. Rojas JM, Moreno H, Valcárcel F, Peña L, Sevilla N, Martín V. Vaccination With Recombinant Adenoviruses Expressing the Peste Des Petits Ruminants Virus F or H Proteins Overcomes Viral Immunosuppression and Induces Protective Immunity Against PPRV Challenge in Sheep. *PLoS One* (2014) 9:e101226. doi: 10.1371/journal.pone.0101226
  19. Rojas JM, Sevilla N, Martín V. PPRV-Induced Immunosuppression at the Interface of Virus-Host Interaction. *BJV* (2016) 3:140–60. doi: 10.17582/journal.bjv/2016.3.5.140.160
  20. Yamaguchi M, Kitagawa Y, Zhou M, Itoh M, Gotoh B. An Anti-Interferon Activity Shared by Paramyxovirus C Proteins: Inhibition of Toll-Like Receptor 7/9-Dependent Alpha Interferon Induction. *FEBS Lett* (2014) 588:28–34. doi: 10.1016/j.febslet.2013.11.015
  21. Rajak KK, Sreenivasa BP, Hosamani M, Singh RP, Singh SK, Singh RK, et al. Experimental Studies on Immunosuppressive Effects of Peste Des Petits Ruminants (PPR) Virus in Goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (2005) 28:287–96. doi: 10.1016/j.cimid.2005.08.002
  22. Jagtap SP, Rajak KK, Garg UK, Sen A, Bhanuprakash V, Sudhakar SB, et al. Effect of Immunosuppression on Pathogenesis of Peste Des Petits Ruminants (PPR) Virus Infection in Goats. *Microb Pathog* (2012) 52:217–26. doi: 10.1016/j.micpath.2012.01.003
  23. Pope RA, Parida S, Bailey D, Brownlie J, Barrett T, Banyard AC. Early Events Following Experimental Infection With Peste-Des-Petits Ruminants Virus Suggest Immune Cell Targeting. *PLoS One* (2013) 8:e55830. doi: 10.1371/journal.pone.0055830
  24. Manjunath S, Kumar GR, Mishra BP, Mishra B, Sahoo AP, Joshi CG, et al. Genomic Analysis of Host - Peste Des Petits Ruminants Vaccine Viral Transcriptome Uncovers Transcription Factors Modulating Immune Regulatory Pathways. *Vet Res* (2015) 46:15. doi: 10.1186/s13567-015-0153-8
  25. Manjunath S, Mishra BP, Mishra B, Sahoo AP, Tiwari AK, Rajak KK, et al. Comparative and Temporal Transcriptome Analysis of Peste Des Petits Ruminants Virus Infected Goat Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Virus Res* (2017) 229:28–40. doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.014
  26. Manjunath S, Saxena S, Mishra B, Santra L, Sahu AR, Wani SA, et al. Early Transcriptome Profile of Goat Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Infected With Peste Des Petits Ruminant's Vaccine Virus (Sungri/96) Revealed Induction of Antiviral Response in an Interferon Independent Manner. *Res Vet Sci* (2019) 124:166–77. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.03.014
  27. Mondal B, Sreenivasa BP, Dhar P, Singh RP, Bandyopadhyay SK. Apoptosis Induced by Peste Des Petits Ruminants Virus in Goat Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Virus Res* (2001) 73:113–9. doi: 10.1016/S0168-1702(00)00214-8
  28. Pandey A, Sahu AR, Wani SA, Saxena S, Kanchan S, Sah V, et al. Modulation of Host miRNAs Transcriptome in Lung and Spleen of Peste Des Petits Ruminants Virus Infected Sheep and Goats. *Front Microbiol* (2017) 8:1146. doi: 10.3389/fmicb.2017.01146
  29. Khanduri A, Sahu AR, Wani SA, Khan RI, Pandey A, Saxena S, et al. Dysregulated Mirnaome and Proteome of PPRV Infected Goat PBMCs Reveal a Coordinated Immune Response. *Front Immunol* (2018) 9:2631. doi: 10.3389/fimmu.2018.02631
  30. Haas R, Zelezniak A, Iacovacci J, Kamrad S, Townsend S, Ralsler M. Designing and Interpreting 'Multi-Omic' Experiments That may Change Our Understanding of Biology. *Curr Opin Syst Biol* (2017) 6:37–45. doi: 10.1016/j.coisb.2017.08.009
  31. Enchery F, Hamers C, Kwiatek O, Gaillardet D, Montange C, Brunel H, et al. Development of a PPRV Challenge Model in Goats and Its Use to Assess the Efficacy of a PPR Vaccine. *Vaccine* (2019) 37:1667–73. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.01.057
  32. Eloiflin R-J, Boyer M, Kwiatek O, Guendouz S, Loire E, Servan de Almeida R, et al. Evolution of Attenuation and Risk of Reversal in Peste Des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria 75/1. *Viruses* (2019) 11:724. doi: 10.3390/v11080724
  33. Prajapati M, Alfred N, Dou Y, Yin X, Prajapati R, Li Y, et al. Host Cellular Receptors for the Peste Des Petits Ruminant Virus. *Viruses* (2019) 11:729. doi: 10.3390/v11080729
  34. Pawar RM, Raj GD, Kumar TM, Raja A, Balachandran C. Effect of siRNA Mediated Suppression of Signaling Lymphocyte Activation Molecule on Replication of Peste Des Petits Ruminants Virus *In Vitro*. *Virus Res* (2008) 136:118–23. doi: 10.1016/j.virusres.2008.04.026
  35. Nizamani ZA, Servan de Almeida R, Albina E, Parveen F, Libeau G. In Vitro Study of Lymphotropic and Immunomodulatory Properties of the Peste Des Petits Ruminants Virus (Pprv). *J Anim Plant Sci* (2014) 24:1380–7.
  36. Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, et al. G: Profiler: A Web Server for Functional Enrichment Analysis and Conversions of Gene Lists (2019 Update). *Nucleic Acids Res* (2019) 47:W191–8. doi: 10.1093/nar/gkz369
  37. Li S, Roupheal N, Duraisingham S, Romero-Steiner S, Presnell S, Davis C, et al. Molecular Signatures of Antibody Responses Derived From a Systems Biology Study of Five Human Vaccines. *Nat Immunol* (2014) 15:195–204. doi: 10.1038/ni.2789
  38. Braun RO, Brunner L, Wyler K, Auray G, García-Nicolás O, Python S, et al. System Immunology-Based Identification of Blood Transcriptional Modules Correlating to Antibody Responses in Sheep. *NPJ Vaccines* (2018) 3:41. doi: 10.1038/s41541-018-0078-0
  39. Matthijs AM, Auray G, Jakob V, García-Nicolás O, Braun RO, Keller I, et al. Systems Immunology Characterization of Novel Vaccine Formulations for Mycoplasma Hypopneumoniae Bacterins. *Front Immunol* (2019) 10:1087. doi: 10.3389/fimmu.2019.01087
  40. Cox J, Mann M. MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized P.P.B.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification. *Nat Biotechnol* (2008) 26:1367–72. doi: 10.1038/nbt.1511
  41. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated Into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res* (2011) 10:1794–805. doi: 10.1021/pr101065j
  42. Raynaud F, Homburger V, Seveno M, Vigy O, Moutin E, Fagni L, et al. SNAP23-Kif5 Complex Controls Mglu1 Receptor Trafficking. *J Mol Cell Biol* (2018) 10:423–36. doi: 10.1093/jmcb/mjy031
  43. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING V10: Protein-Protein Interaction Networks, Integrated Over the Tree of Life. *Nucleic Acids Res* (2015) 43:D447–52. doi: 10.1093/nar/gku1003
  44. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote) Omics Data. *Nat Methods* (2016) 13:731–40. doi: 10.1038/nmeth.3901
  45. Diop M, Sarr J, Libeau G. Evaluation of Novel Diagnostic Tools for Peste Des Petits Ruminants Virus in Naturally Infected Goat Herds. *Epidemiol Infect* (2005) 133:711–7. doi: 10.1017/S0950268805003729
  46. Pawar RM, Dhinakar Raj G, Balachandran C. Relationship Between the Level of Signaling Lymphocyte Activation Molecule mRNA and Replication of Peste-Des-Petits-Ruminants Virus in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Host Animals. *Acta Virol* (2008) 52:231–6.
  47. Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V. Measles Virus Induced Immunosuppression: Targets and Effector Mechanisms. *Curr Mol Med* (2001) 1:163–81. doi: 10.2174/1566524013363960
  48. Tirumurugan KG, Pawar RM, Dhinakar Raj G, Thangavelu A, Hammond JA, Parida S. RNAseq Reveals the Contribution of Interferon Stimulated Genes to the Increased Host Defense and Decreased PPR Viral Replication in Cattle. *Viruses* (2020) 12:463. doi: 10.3390/v12040463
  49. Lee MJ, Woo M-Y, Chwae Y-J, Kwon M-H, Kim K, Park S. Down-Regulation of Interleukin-2 Production by CD4(+) T Cells Expressing TIM-3 Through



- Suppression of NFAT Dephosphorylation and AP-1 Transcription. *Immunobiology* (2012) 217:986–95. doi: 10.1016/j.imbio.2012.01.012
50. Elahi S, Niki T, Hirashima M, Horton H. Galectin-9 Binding to Tim-3 Renders Activated Human CD4+ T Cells Less Susceptible to HIV-1 Infection. *Blood* (2012) 119:4192–204. doi: 10.1182/blood-2011-11-389585
  51. Subramanian G, Popli S, Chakravarty S, Taylor RT, Chakravarti R, Chattopadhyay S. The Interferon-Inducible Protein TDRD7 Inhibits AMP-Activated Protein Kinase and Thereby Restricts Autophagy-Independent Virus Replication. *J Biol Chem* (2020) 295:6811–22. doi: 10.1074/jbc.RA120.013533
  52. Kim M-J, Yoo J-Y. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication by IFN-Mediated ISGylation of HCV-NS5A. *J Immunol* (2010) 185:4311–8. doi: 10.4049/jimmunol.1000098
  53. Banerjee S, Chakrabarti A, Jha BK, Weiss SR, Silverman RH. Cell-Type-Specific Effects of RNase L on Viral Induction of Beta Interferon. *mBio* (2014) 5:e00856–14. doi: 10.1128/mBio.00856-14
  54. Meineke R, Rimmelzwaan GF, Elbahesh H. Influenza Virus Infections and Cellular Kinases. *Viruses* (2019) 11:171. doi: 10.3390/v11020171
  55. Ryzhakov G, Lai CC, Blazek K, To K, Hussell T, Udalova I. IL-17 Boosts Proinflammatory Outcome of Antiviral Response in Human Cells. *J Immunol* (2011) 187:5357–62. doi: 10.4049/jimmunol.1100917
  56. Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I, Weiss G. The Pleiotropic Effects of Erythropoietin in Infection and Inflammation. *Microbes Infect* (2012) 14:238–46. doi: 10.1016/j.micinf.2011.10.005
  57. Blanc M, Hsieh WY, Robertson KA, Watterson S, Shui G, Lacaze P, et al. Host Defense Against Viral Infection Involves Interferon Mediated Down-Regulation of Sterol Biosynthesis. *PLoS Biol* (2011) 9:e1000598. doi: 10.1371/journal.pbio.1000598
  58. INGENUITY SYSTEMS. *Ingenuity Upstream Regulator Analysis in IPA*. Available at: [http://pages.ingenuity.com/rs/ingenuity/images/0812%20upstream\\_regulator\\_analysis\\_whitepaper.pdf](http://pages.ingenuity.com/rs/ingenuity/images/0812%20upstream_regulator_analysis_whitepaper.pdf).
  59. Chen K, jin p, He H, Xie Y, Xie X, Mo Z. Overexpression of Insig-1 Protects  $\beta$  Cell Against Glucolipototoxicity via SREBP-1c. *J BioMed Sci* (2011) 18:57. doi: 10.1186/1423-0127-18-57
  60. Choi E-J, Ren J, Zhang K, Wu W, Lee YS, Lee I, et al. The Importance of AGO 1 and 4 in Post-Transcriptional Gene Regulatory Function of Trf5-GluCTC, an Respiratory Syncytial Virus-Induced tRNA-Derived RNA Fragment. *Int J Mol Sci* (2020) 21:8766. doi: 10.3390/ijms21228766
  61. Adiliaghdam F, Basavappa M, Saunders TL, Harjanto D, Prior JT, Cronkite DA, et al. A Requirement for Argonaute 4 in Mammalian Antiviral Defense. *Cell Rep* (2020) 30:1690–1701.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.021
  62. Ish-Shalom E, Meirou Y, Sade-Feldman M, Kanterman J, Wang L, Mizrahi O, et al. Impaired SNX9 Expression in Immune Cells During Chronic Inflammation: Prognostic and Diagnostic Implications. *J Immunol* (2016) 196:156–67. doi: 10.4049/jimmunol.1402877
  63. Lyn RK, Singaravelu R, Kargman S, O'Hara S, Chan H, Oballa R, et al. Stearoyl-CoA Desaturase Inhibition Blocks Formation of Hepatitis C Virus-Induced Specialized Membranes. *Sci Rep* (2014) 4:4549. doi: 10.1038/srep04549
  64. Gullberg RC, Steel JJ, Pujari V, Rovnak J, Crick DC, Perera R. Stearoyl-CoA Desaturase 1 Differentiates Early and Advanced Dengue Virus Infections and Determines Virus Particle Infectivity. *PLoS Pathog* (2018) 14:e1007261. doi: 10.1371/journal.ppat.1007261
  65. Baron J, Bin-Tarif A, Herbert R, Frost L, Taylor G, Baron MD. Early Changes in Cytokine Expression in Peste Des Petits Ruminants Disease. *Vet Res* (2014) 45:22. doi: 10.1186/1297-9716-45-22
  66. Gromley A, Jurczyk A, Sillibourne J, Halilovic E, Mogensen M, Groisman I, et al. A Novel Human Protein of the Maternal Centriole Is Required for the Final Stages of Cytokinesis and Entry Into S Phase. *J Cell Biol* (2003) 161:535–45. doi: 10.1083/jcb.200301105
  67. Liu Y, Jin J, Ji J, Gao X-M, Fan Y-C. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Protein 8-Like 2 mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells Is Associated With the Disease Progression of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Virology* (2019) 16:120. doi: 10.1186/s12985-019-1224-7
  68. Zhang W, Zhuang N, Liu X, He L, He Y, Mahinthichaichan P, et al. The Metabolic Regulator Lamtor5 Suppresses Inflammatory Signaling via Regulating mTOR-Mediated TLR4 Degradation. *Cell Mol Immunol* (2019) 17:1063–76. doi: 10.1038/s41423-019-0281-6
  69. Smith GA, Uchida K, Weiss A, Taunton J. Essential Biphasic Role for JAK3 Catalytic Activity in IL-2 Receptor Signaling. *Nat Chem Biol* (2016) 12:373–9. doi: 10.1038/nchembio.2056
  70. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, et al. The PRIDE Database and Related Tools and Resources in 2019: Improving Support for Quantification Data. *Nucleic Acids Res* (2019) 47:D442–50. doi: 10.1093/nar/gky1106

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Eloiflin, Auray, Python, Rodrigues, Seveno, Urbach, El Koulali, Holzmüller, Totte, Libeau, Bataille and Summerfield. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Identification *in vivo* des facteurs de la réponse immunitaire associés à la sensibilité de l'hôte à l'infection par le PPRV

a. Pathologie induite par les différentes souches

La susceptibilité des chèvres Saanen à l'infection par le PPRV a été démontrée lors d'une étude précédente (Enchery *et al.* 2019). En effet, ces animaux sont sensibles à l'infection par la souche PPRV Maroc 2008 (MA08) tandis qu'ils sont résistants à l'infection par la souche PPRV Côte d'Ivoire 1989 (IC89). Cette étude a aussi démontré que la souche vaccinale Nigeria 75/1 (VN751) est efficace pour protéger les animaux contre les souches très virulentes du PPRV.

Néanmoins, les effets pathologiques de ces différentes souches n'ont pas été évalués au cours de cette étude. Il n'existe que très peu de rapports sur la pathologie induite par le PPRV et la plupart des connaissances acquises dans ce domaine proviennent de la pathologie induite par le virus de la rougeole. Aussi, dans la majorité des cas, les expériences animales sont réalisées sur des animaux jeunes empêchant ainsi d'explorer la variabilité des symptômes que l'on peut observer dans la nature.

Ainsi, une étude de la variabilité des pathologies induites par les souches PPRV de virulences différentes a été entreprise chez des chèvres Saanen obtenues d'exploitations agricoles. Cette nouvelle étude a permis de confirmer les phénotypes vaccinaux (VN751) et d'infections des souches virulentes (MA08 et IC89) dans ce modèle.

L'analyse des sera a permis d'observer que la présence d'anticorps (spécialement des anticorps neutralisants) anti-PPRV est essentielle pour contrôler la virémie et l'apparition des symptômes. Contrairement aux études précédentes, les sécrétions oculaires et certains tissus ont été positifs pour la présence des ARN viraux chez les animaux vaccinés en plus des animaux infectés, bien que l'excrétion observée chez les

animaux vaccinés ait été de courte durée. L'analyse de la pathologie a permis de déterminer que les lésions macroscopiques ainsi que les lésions observées dans les organes lymphoïdes sont plus sévères chez les animaux infectés par la souche hautement virulente MA08.

Ainsi, l'analyse de la pathologie induite par ces différentes souches démontre que l'état de santé des animaux n'influence pas sur la virulence des souches ou l'efficacité et la sureté du vaccin, mais peut potentiellement induire une courte excrétion virale au cours de la vaccination.

- i. Article 3: Comparative pathogenesis of peste des petits ruminants virus strains of difference virulence

[Click here to view linked References](#)

1 **Comparative pathogenesis of peste des petits ruminants virus strains**  
2 **of difference virulence**

3 Roger-Junior Eloiflin<sup>1,2</sup>, Llorenç Grau Roma<sup>3</sup>, Sylvie Python<sup>4,5</sup>, Kemal Mehinagic<sup>4,5</sup>, Aurélie  
4 Godel<sup>4,5</sup>, Geneviève Libeau<sup>1,2</sup>, Artur Summerfield<sup>4,5\*</sup>, Arnaud Bataille<sup>1,2\*</sup> and Obdulio García-  
5 Nicolás<sup>4,5\*</sup>

6 1 CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

7 2 ASTRE, University of Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, France

8 3 Institute of Animal Pathology, Department of Infectious Diseases and Pathobiology,  
9 Vetsuisse Faculty, University of Bern, Länggassstrasse 122, 3012, Bern, Switzerland

10 4 Institute of Virology and Immunology, Mittelhäusern, Switzerland

11 5 Department of Infectious Diseases and Pathobiology, Vetsuisse Faculty, University of Bern,  
12 Bern, Switzerland

13 \* All authors have contributed equally to this study

14

15 **ABSTRACT**

16 Peste des petits ruminants (PPR) is an acute disease of small ruminants caused by a  
17 morbillivirus. Clinical observation of the disease in the field revealed that several species of  
18 small ruminants are affected to varying degrees. This difference in disease-related effects could  
19 depend either on the host or on the virulence of the virus strain. A previous study highlighted  
20 the difference in virulence between two strains of PPRV used to infect Saanen goats. For this  
21 breed, PPRV Morocco 2008 strain (MA08) was highly virulent while PPRV Côte d'Ivoire 1989

22 (IC89) strain induced mild disease. Experimental studies generally based on healthy and  
23 young animals do not permit exploration of the natural variability of the host susceptibility to  
24 PPRV. Therefore, building on the previous study on Saanen goats, the current study focussed  
25 on this breed of goat and used commercially available animals with an unknown history of  
26 infection with other pathogens. Results confirmed the previous disease pattern for PPRV IC89  
27 and MA08 strains. Viral RNA detection, macroscopical and histological lesions were stronger  
28 for the highly virulent MA08 strain. We show here for the first time that viral RNA can be  
29 detected in the tissues of vaccinated animals. Viral RNA was also detected for the first time in  
30 serum samples, which is in agreement with the role of circulating immune cells in transporting  
31 the virus into host target organs. Thus, this study provides insight into the pathogenesis of  
32 strains of different virulence of PPRV and will help to better understand the onset of the  
33 disease.

34 Keywords: Peste des petits ruminants, Virulence, Pathogenesis

35

36

## 37 **INTRODUCTION**

38 Peste des petits ruminants (PPR) is one of the most widespread and devastating infectious  
39 diseases of domestic and wild small ruminants. The huge impact on small ruminant  
40 production has led the FAO and OIE to develop and endorse the PPR Global Control and  
41 Eradication Strategy (PPR GCES), aiming to eradicate the disease by 2030 [1,2]. Since the first  
42 recorded description of a PPR virus (PPRV)-related disease made by Gargadennec and  
43 Lalanne in Côte d'Ivoire in 1942 [3], the disease has steadily progressed over time across Africa,  
44 the Middle East, Asia and Europe [4].

45 PPRV is a morbillivirus that generally causes an acute disease in small ruminants characterised  
46 by high fever, oral lesions, pneumonia and diarrhoea leading to severe dehydration and often  
47 death. In the subacute form, the lesions are less pronounced and clinical signs are often limited  
48 to ocular and nasal discharge. Subclinical forms of infection can be observed in endemic areas,  
49 especially in sheep [5–8]. This means a wide range of clinical outcomes is observed, ranging  
50 from mild to acute respiratory disease and death. PPRV is transmitted mainly by direct  
51 contact. Large quantities of virus are found in nasal and ocular discharges, saliva and faeces  
52 of infected animals. Virus shedding goes on for a long period, starting from the beginning of  
53 the incubation period to the end of the diarrhoea phase. Detection of PPRV during this period  
54 can be made from swabs of ocular and nasal discharges or, less reliably, from unclotted blood  
55 samples or faeces [9–11]. PPRV detection is routinely performed with molecular biological  
56 methods such as RT-PCR or RT-qPCR and virus isolation. It has been demonstrated that  
57 animals vaccinated with the known conventional vaccines do not shed the vaccine virus [12].

58 Clinical observation of the disease in the field has revealed that several species of small  
59 ruminants are affected to varying degrees. Goats are generally more severely affected than  
60 sheep [13]. Some wild species and other endangered wild artiodactyl populations are clinically  
61 affected by PPRV in a similar manner to domestic sheep and goats, while others show no  
62 apparent sign of infection but produce antibodies against PPRV [14,15]. For these animals the  
63 impact of the disease remains largely unknown [16]. In recent years, the list of domestic and  
64 wild species susceptible to PPRV with or without clinical signs has been increasing [17]. Host  
65 susceptibility to infections by the same virus vary considerably depending on the host species,  
66 breeds, their immune status and certain environmental factors [18]. It is likely that, in the host-  
67 virus interaction, this difference in disease severity greatly depends on the susceptibility of the



68 host and on the virulence of the virus [19]. Also, passages in cell cultures can affect the degree  
69 of pathogenicity of an isolate [20]. Upon infection, PPRV can be found in both lymphoid tissue  
70 (spleen, tonsil, mesenteric, sub-maxillary, bronchial, retropharyngeal and pulmonary nodes)  
71 and non-lymphoid tissue (nostrils, trachea, abomasum, jejunum, ileum, cecum, lung, intestine,  
72 liver, kidney and heart) [21,22].

73 A previous study highlighted the difference in virulence between two strains of PPRV when  
74 used to infect Saanen goats either by the intravenous or intranasal route [9]. For this breed, the  
75 PPRV Morocco 2008 strain (MA08) was highly virulent while the PPRV Côte d'Ivoire 1989  
76 (IC89) strain induced mild disease. This study has therefore provided a reliable model for  
77 evaluating the susceptibility of Saanen goats to these two different PPRV strains. Alongside  
78 this study, others have described the pathogenesis of PPRV related to virulent strains. These  
79 reports have highlighted signs of the disease in animals and how to assess them, thereby  
80 providing evidence to improve our understanding of the disease [23–28]. A sequential study  
81 designed to define the early disease establishment and pathogenesis of a highly virulent PPRV  
82 strain revealed that the nasal cavity, trachea, bronchi, tongue and lymph nodes draining these  
83 tissues are positive for PPRV RNA from 1 day post infection. After viremia and secondary  
84 replication in generalised lymphoid tissues, PPRV infects and replicates in epithelial cells [29].  
85 However, only a few studies have described signs associated with a difference in virulence  
86 between strains [20].

87 Importantly, most experimental studies are based on healthy young animals, which makes  
88 difficult to explore the natural variability of host susceptibility to a pathogen [25,24,29]. Studies  
89 of viral and host interactions are critical for elucidating why PPRV manifests differently  
90 among species and breeds, and providing information for the design of adapted control

91 strategies. For these reasons, we investigated in detail the clinical outcome of infection by three  
92 different PPRV strains (high virulence, low virulence and vaccine) on adult Saanen goats with  
93 unknown infection histories for other pathogens. Several key parameters such as clinical  
94 scores, lymphocyte counts, PPRV RNA presence in blood circulation and secretions,  
95 seroconversion and the appearance of neutralising antibodies and pathology were also  
96 followed during the course of the infection of Saanen goats.

97

## 98 **MATERIALS AND METHODS**

### 99 **Animal Experiment**

100 Twenty-four Saanen goats ranging from 2 to 12 years old were used for this experiment. The  
101 animals were randomly divided into 4 groups (mock-inoculated, vaccinated, IC89-infected  
102 and MA08-infected) of 6 animals each with an average age of 1.98 ( $\pm 0.2$ ), 2.58 ( $\pm 2$ ), 3.84 ( $\pm 4.36$ )  
103 and 2.63 ( $\pm 1.3$ ) years respectively. Before viral inoculation, all animals were kept in the stables  
104 for one week to allow adaption to the new environment.

105 Two PPRV strains differing in virulence in Saanen goats were selected for this study. The low-  
106 virulence IC89 strain was passaged three times on sheep skin explant cells and five times on  
107 VERO cells. In addition, the highly virulent MA08 strain was passaged twice on VERO SLAM-  
108 dog cells, four times on VERO cells and once on VERO SLAM-dog cells. Virus solutions were  
109 first titrated on Vero cells using the Spearman–Karber method [30,31]. Goats were inoculated  
110 with IC89 or MA08 strains at day 0 (D0) with a total of 4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> per animal by the  
111 intranasal route (IN, 1 ml/nostril) using a specific intranasal mucosal atomization device  
112 (LMA<sup>®</sup>MAD NASAL<sup>™</sup>). Another group of goats was vaccinated at D0 using a subcutaneous  
113 injection with a low viral load (2.2 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/dose of 1 ml) of the live attenuated Nigeria

114 75/1 vaccine. Finally, a group of animals (mock-inoculated group) was intranasally inoculated  
115 with Modified Eagle's Medium (MEM, Sigma Aldrich) supplemented with an equivalent  
116 amount of Vero cell culture supernatant.

117 The goats were clinically evaluated daily during the 3 days before inoculation (D0). From D0  
118 onwards, the clinical evaluation was done once or more times per day depending on the health  
119 condition of the animals until the end of the study (D14). Follow-up of clinical signs was  
120 carried out by the same person. For all animals, the clinical signs recorded have been  
121 summarised in **Additional Table 1**. Animals reaching a critical clinical status were euthanised  
122 for ethical reasons. Criteria for discontinuation of the experiment included a cumulative score  
123 of 14 (or more), a score of 3 for at least one of the parameters 1, 3 or 5 (single criterion) or if  
124 signs of severe or chronic pain were observed. These signs were rolling, frequently looking or  
125 kicking at abdomen, falling over, walking backward, rapid shallow respiration, teeth grinding,  
126 grunting, vocalisation on handling, rigidity and unwillingness to move. Daily blood samples  
127 and ocular swabs (Sarstedt) were collected from animals in each group until D14. Serum was  
128 extracted from blood samples collected in S-Monovette neutral tubes (Sarstedt) and stored at  
129 -70°C until further analysis. Swabs were immersed in 750 µl of lysis buffer RA-1 (Macherey-  
130 Nagel) complemented with β-Mercaptoethanol (ThermoFisher Scientific) and also kept at -  
131 70°C.

### 132 **High throughput genome sequencing of PPR virus**

133 The virulent strains IC89 and MA08 used in this study were sequenced prior to the start of this  
134 study using a previously published protocol [32]. cDNA was synthesised from viral RNA and  
135 amplified by PCR using five overlapping fragments: F1 (4050 bp), F2 (3663 bp), F3 (3816 bp),  
136 F4 (3800 bp) and F5 (3335 bp). The synthesis of cDNA was performed with a reverse

137 transcriptase (RT) (RevertAid RT kit, Thermo Scientific) and the specific primers for each  
138 fragment (F1 to F5), following the instructions provided with the kit. Libraries were prepared  
139 using the Nextera kit (Illumina) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was  
140 performed on an Illumina MiSeq machine at the AGAP sequencing platform (CIRAD).  
141 Consensus sequences were obtained from the raw data using a bioinformatics pipeline  
142 (<https://github.com/loire/Varhap>) and were compared to sequences available online for  
143 related viruses. Thereby the consensus sequence obtained for the MA08 strain was compared  
144 to the complete genome KC594074.1 of a PPRV Morocco 2008 isolate, while the sequence  
145 obtained for IC89 was compared to the complete genome EU267273.1 of a PPRV ICV89 virus  
146 strain. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were determined by applying the following  
147 filter:  $QA/AO > 10$  &  $AO/RO > 0.01$  &  $DP > 100$  &  $RPL > 2$  &  $RPR > 2$  &  $SAF > 2$  &  $SAR > 2$ . In  
148 this filter, QA represents the addition of base 'A' qualities, A0 (A for Alternative) represents  
149 the number of reads on the alternative base, R0 (R for reference) represents the number of  
150 reads on the reference base, DP represents the depth, RPR and RPL represents 'balanced' to  
151 each side (left and right) of the site and SAF/SAR represents the number of reads on the  
152 forward/reverse sequences.

### 153 **Blood cell counting**

154 Five hundred  $\mu$ l of whole blood collected in EDTA Monovette (Sarstedt) tubes was used to  
155 determine the absolute amount of white blood cells and lymphocytes. The blood cell count  
156 was monitored with Vetscan<sup>®</sup> (Abaxis) using the software parameters for goats.

### 157 **Antibody detection and virus neutralisation test**

158 Serum samples were tested for the presence of antibodies against PPRV using the IDScreen<sup>®</sup>  
159 PPR competition ELISA kit (IDvet). Virus neutralisation was assessed for positive sera as

160 follows: positive sera were first treated at 56°C for 30 minutes and diluted in 2-fold serial  
161 dilutions (from 1:10 to 1:640) in MEM supplemented with 2% penicillin-streptomycin and 1%  
162 GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific). Next, 100µl of each serum dilution was added to a 96-  
163 well plate in triplicate or quadruplicate. A virus stock of 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml of the Nigeria 75/1  
164 vaccine strain was prepared in MEM medium and 100 µl (10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>) of this virus dilution was  
165 added to each well of the plate and incubated at 37°C. After one hour, 50 µl of Vero cell  
166 suspension of 2x10<sup>5</sup> cells/ml was added to each well of the plate. Results were obtained after  
167 seven days of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The observation of a cytopathic effect  
168 (CPE) indicated the absence of neutralising antibodies in the tested condition. Viral infectivity  
169 was further confirmed by an immunofluorescence assay based on the detection of N PPRV  
170 viral particles. Immunofluorescence was performed according to the protocol previously  
171 described [32]. Briefly, supernatants were removed and an ice-cold 80% acetone solution was  
172 added to each well. The cells were then incubated at -20°C for 30 minutes. After the incubation  
173 time, the acetone was removed and the cells were washed three times with 1X PBS. Anti-PPRV  
174 N antibody (clone 38-4, CIRAD) coupled to the TRITC fluorochrome was added at a 1:100  
175 dilution to the cells and they were incubated at 37°C for 30 minutes. After the incubation time,  
176 the cells were washed three times with 1X PBS and 100µl of PBS was added prior to  
177 observation with a GloMax® Discover Microplate Reader (Promega). Serum neutralisation  
178 (SN) titres were calculated as the reciprocal of the highest dilution of serum that shows  
179 complete inhibition of cytopathic effects in 50% of wells. The SN titres >10 were considered as  
180 protective [33].

## 181 **PPRV RNA detection in sera, swabs and organs**

182 Sera samples were processed directly at the Institute of Virology and Immunology (IVI, Bern)  
183 while swabs (stored in RA1 lysis buffer complemented with  $\beta$ -Mercaptoethanol, Machery  
184 Nagel) and organs (crushed and stored in TRIzol) were shipped and processed at the ASTRE  
185 unit (CIRAD, Montpellier). Total RNA was extracted from sera and swab samples using the  
186 IndiMag Pathogen Kit (Indical Bioscience) and a Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex  
187 Purification System (Thermo Fisher Scientific). During necropsy, samples from oral mucosa,  
188 abomasum, colon, Peyer patches, lung, spleen, tonsils, tracheal, mesenteric and pharyngeal  
189 lymph nodes were collected for the quantification of virus presence. Total RNA was extracted  
190 from goat organs using TRIzol (Invitrogen). Briefly, organ pieces were harvested and ground  
191 in TRIzol (Life Technologies), and Chloroform:IAA (49:1, Sigma-Aldrich) was added to each  
192 tube. After a centrifugation step at 12000 g and 4°C for 15 minutes, the upper aqueous phase  
193 was transferred to a fresh tube containing 0.5 ml of 75% ethanol. After incubation for 10  
194 minutes at room temperature, nucleic acids in 75% ethanol were loaded onto a NucleoSpin  
195 RNA column placed in a collection tube. The remaining RNA isolation steps were performed  
196 using the NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions.  
197 PPRV-specific RNA was quantified in sera, ocular swabs and organs samples by real time RT-  
198 PCR (RT-qPCR), by amplifying the partial end of the N protein gene using a one-step method  
199 with the ID Gene™ Peste des Petits Ruminants Duplex kit (IDvet).

## 200 **Pathology**

201 Full post-mortem examinations were performed from all goats immediately after euthanasia.  
202 Samples from the following organs were collected for histological examination: palate, lip,  
203 tongue, pharynx, tonsil, nasal mucosa lymph nodes (retropharyngeal, tracheobronchial and  
204 mesenteric), trachea, lung, heart, liver, spleen, urinary bladder, kidney, oesophagus, rumen,

205 abomasum, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, brain, bone marrow and uterus. When  
206 macroscopical lesions were observed, samples comprised the affected areas and, when  
207 possible, their border with normal tissue. These samples were placed in 10% formalin,  
208 routinely processed for histology and stained with haematoxylin and eosin (H&E). Gross and  
209 histological lesions typical of PPRV infection within alimentary and respiratory tracts as well  
210 as within lymphoid tissue were semi-quantified as described below.

211 Observed and assessed gross changes within the alimentary tract consisted of erosive-  
212 ulcerative lesions, while within the respiratory system the assessed parameters were changes  
213 suggestive of bronchointerstitial pneumonia. These lesions were graded from 0 to 3 as follows:  
214 0: absence; 1: focal or a few multifocal; 2: moderate and multifocal; 3: multifocal to coalescing  
215 or diffuse. Cumulative macroscopic scores ranging from 0 to 21 were calculated for each goat  
216 by summing the scores of macroscopical lesions in the oral cavity (lip, palate and tongue),  
217 oesophagus, abomasum, large intestine and lung and the mean of each group was compared  
218 (see statistical analysis section).

219 Within the lymphoid organs, lymphocytic depletion was the only consistent lesion observed  
220 and it was semi-quantitatively assessed histologically as follows: 0: normal; 1: mild; 2:  
221 moderate; 3: severe. For each goat, a cumulative index of lymphocytic depletion ranging from  
222 0 to 18 was calculated by summing the scores of all assessed lymphoid organs. Within the  
223 alimentary tract, the histological presence (1) or absence (0) of erosive-ulcerative lesions was  
224 noted and the inflammation within the lamina propria was graded from 0 (absence) to 3  
225 (severe), generating a lesional score from 0 to 4 by summing these values. The anatomically  
226 related tissues were grouped together by calculating their mean values (i.e.: 'oral mucosa  
227 lesional score' was the mean of the lesional scores in the tongue, lip, palate and pharynx;



228 'forestomach lesional score' the mean of rumen, reticulum and omasum scores; 'small intestine  
229 lesional score' the mean of the lesional scores in duodenum, jejunum and ileum; and 'large  
230 intestine' the mean of cecum and colon lesional scores), and a cumulative histologic lesional  
231 score for the alimentary tract per goat ranging from 0 to 24 was calculated. Within the  
232 respiratory tract, the degree of inflammation within the nasal cavity and trachea as well as  
233 lesions of bronchointerstitial pneumonia were graded from 0 to 3 (absence to severe). For each  
234 goat, a cumulative histologic lesional score of inflammatory lesions within the respiratory tract  
235 ranging from 0 to 9 was calculated by summing the lesional histologic scores of the assessed  
236 tissues. The mean lesional scores for all these parameters in each studied group of goats were  
237 calculated and compared. In addition, the presence of any other relevant lesions was also  
238 assessed macroscopically and histologically. Table 1 summarises the assessment of the lesions  
239 made during the study.

## 240 **Statistical analysis**

241 Statistical tests were carried out with Graphpad Prism (v9). A mixed effects model (REML)  
242 was used with the Geisser-Greenhouse correction. In this model the measures recorded over  
243 time for each of the animals were considered as matched values. P-values between the mean  
244 of the groups (vaccinated, IC89 or MA08-infected animals) and the mean of the control group  
245 (mock-inoculated animals) were calculated using Dunnett's multiple comparison test, while  
246 comparisons between the mean of the groups were performed using Tukey's multiple  
247 comparison test. Individual's variances were computed for each comparison. Asterisks on the  
248 graphs highlight statistical differences between the comparisons. '\*\*' = P-values < 0.05; '\*\*\*' = P-  
249 values < 0.01; '\*\*\*\*' = P-values < 0.001; '\*\*\*\*\*' = P-values < 0.0001. The correlation between ELISA  
250 and VSNT data was evaluated using the Pearson coefficient R-Squared calculation.

251

## 252 **RESULTS**

### 253 **Sequenced genomes contain a few mutations**

254 Sequencing of PPRV strains IC89 and MA08 was carried out to determine if there were any  
255 differences between these strains and those found in the literature. Good coverage and depth  
256 were obtained, showing that the sequencing approach chosen was effective in obtaining reads  
257 across the entire viral genome (Genbank accession numbers OL741724 and OL741725).  
258 However, the intergenic region between the M and F genes was less covered than the rest of  
259 the genomes (**Figure 1A**). Several high-frequency single nucleotide polymorphisms (SNPs)  
260 were found, mainly in the F gene and the intergenic region between the M and F genes, in the  
261 comparison between the IC89 and EU267273.1 genomes (**Figure 1B**). Twelve of the 14 SNPs  
262 found in the coding region (CDS) of the F gene caused non-synonymous amino acid mutations.  
263 SNPs in the CDS of the N gene induce a synonymous mutation while the one in the CDS of  
264 the M gene induces a non-synonymous mutation (**Table 2**). A single difference was found in  
265 the intergenic region between the M and F gene comparison between the MA08 and  
266 KC594074.1 genome (**Figure 1B, Table 2**).

### 267 **Changes in biological parameters due to PPRV infection**

268 After vaccination or intranasal infection of Saanen goats, clinical signs, rectal temperature,  
269 lymphocyte count and viral load in sera were assessed. Clinical signs and rectal temperature  
270 started to increase 4 days post infection (dpi) in animals infected with the highly virulent PPRV  
271 MA08 strain. In contrast, vaccinated, mock-inoculated and IC89-infected animals did not show  
272 any obvious signs of disease at this time. However, a slight increase in rectal temperature from  
273 6 to 10 dpi was observed in some IC89-infected animals. A sharp decrease from 100% to 20%

274 (p<0.001) of the lymphocyte count starting at 4 dpi was observed in MA08-infected animals,  
275 while a slight and not significant decrease from 100% to 80% was observed in vaccinated, IC89-  
276 infected and mock-inoculated animals. One of the IC89-infected animals appeared to have a  
277 sharp decrease in lymphocyte count between 6 and 14 dpi (**Figure 2**).

## 278 **Viremia and virus shedding**

279 Serum is not a commonly used sample for the detection of PPRV RNA. We decided to include  
280 this sample because this blood fraction is used for the detection of RNA for several other  
281 viruses [34–40]. No PPRV RNA was detected in the sera of vaccinated or mock-inoculated  
282 animals, while a low and transient level of PPRV RNA was detected from 6 to 12 dpi in sera  
283 collected from some IC89-infected animals. PPRV RNA was detected in ocular secretions in  
284 some vaccinated animals from day 4 to 14, while at day 10 all samples were positive. Ocular  
285 secretions from IC89-infected animals were also positive for the presence of PPRV RNA from  
286 6 to 14 dpi. PPRV RNA was detected on days 4 to 14 in sera collected from MA08-infected  
287 animals. Peak viremia was reached at 8 dpi and it was followed by a progressive decrease to  
288 14 dpi. All MA08-infected animals were positive for the presence of PPRV RNA in ocular  
289 secretions from 5 to 14 dpi (**Figure 3**).

## 290 **Antibody responses**

291 Based on the established positivity thresholds, a majority of vaccinated or IC89-infected  
292 animals showed seroconversion at 9 dpi while this seroconversion occurred at 7 dpi in most  
293 of the MA08-infected animals. Neutralising antibodies were detected from 7 dpi in all  
294 vaccinated and infected animals. The SN titre peaked at 9 dpi in MA08-infected animals  
295 whereas it peaked at 11 dpi in most animals vaccinated or infected with IC89. The relationship  
296 between the SN titre and the percentage of inhibition (obtained by ELISA) were moderately

297 positive in vaccinated or IC89-infected animals while it was strongly positive in MA08-  
298 infected animals (**Figure 4**).

### 299 **PPRV induced lesions are found in lymphoid and non-lymphoid** 300 **organs**

301 Erosive-ulcerative lesions were only observed in goats infected with IC89 and MA08, and were  
302 more commonly seen within the oral cavity (all animals from the MA08 group and 5 out of 6  
303 from the IC89 group) (**Figure 5A**). In the MA08 group, the lesions were of greater severity and  
304 some animals also showed lesions in the oesophagus (2 out of 6), abomasum (1 out of 6) and  
305 large intestine (1 out of 6). In the IC89 group, these lesions, when present, were always of a  
306 mild intensity and were observed only in the oral cavity or abomasum (2 out of 6 animals)  
307 (**Figure 6A**). Macroscopic lesions suggestive of bronchointerstitial pneumonia were seen only  
308 in animals from the MA08 group (3 out of 6). The mean of the accumulative scorings of the  
309 macroscopical lesions in the MA08 group was higher than the VN751, IC89 and mock-  
310 inoculated groups ( $p < 0.001$ ) (**Figure 6E**).

311 Histologically, MA08-infected animals showed higher mean scores of lymphocytic depletion  
312 in most of the assessed organs as well as the accumulative scores compared to the other groups  
313 ( $p < 0.001$ ), while no significant differences were present between vaccinated, mock-inoculated  
314 and IC89-infected groups (**Figures 6B and 6D**). In addition, moderate lymphocytosis was  
315 observed in the Peyer's patches of one goat from the MA08-infected group. This lesion was,  
316 however, not observed in any other tissue or animal.

317 The histological lesional scoring of the respiratory tract (i.e. trachea or lung) in the MA08-  
318 infected group was significantly higher than the others ( $p < 0.05$ ) (**Figure 6C**), although no  
319 significant differences were observed when comparing the accumulative scoring of the

320 respiratory tract (**Figure 6E**). Regarding the histological lesions of the alimentary tract, the  
321 lesions found in the oral cavity (oral mucosa, pharynx and tongue), oesophagus and large  
322 intestine were discriminating between group MA08 and the other groups. The lesions found  
323 in the abomasum and small intestine showed a discrimination between the IC89 and VN751  
324 groups. The remaining scores in the assessed alimentary organs did not show significant  
325 differences between the groups (**Figure 6D**). The mean of the accumulative scoring of  
326 histological lesions in the lymphoid and alimentary tract organs in the MA08 group was  
327 significantly higher than the VN751, IC89 and mock-inoculated groups (**Figure 6E**). In addition  
328 to the scored parameters, convincing features characteristic of PPRV infection (syncytial cell  
329 formation and/or inclusion bodies) were observed in the respiratory and/or alimentary tract  
330 of 4 goats, all of them belonging to the MA08-infected group (**Figure 5B**).

### 331 **Viral RNA detection in organs**

332 Some lymphoid and non-lymphoid organs were selected according to the literature and  
333 screened for the presence of PPRV RNA. Viral RNA was detected in vaccinated and IC89- and  
334 MA08-infected animals, with a higher proportion of negative samples found in the vaccinated  
335 group. Statistical differences between vaccinated and MA08-infected animals were observed  
336 in the abomasum, colon, Peyer's patches, mesenteric lymph node and lung. In addition, a  
337 significant difference was observed in the lung samples between vaccinated and IC89-infected  
338 animals (**Figure 7**).

### 339 **Non-PPRV related lesions**

340 The majority of the goats used in this study showed some pre-existing pathologies (mostly  
341 parasitic). Goats from all 4 groups had macroscopical and/or histological lesions of verminous  
342 pneumonia, trematodal cholangitis, nematodal abomasitis, intestinal nematodiasis/cestodiasis

343 and intestinal coccidiosis (**Additional Table 2**). In addition, one goat from the IC89-infected  
344 group suffered from an oral squamous cell carcinoma (SCC) with abscess formation and a  
345 secondary sepsis with a thromboembolic pneumonia, one goat from the MA08-infected group  
346 had a pyometra and one from the mock-inoculated group presented a mediastinal abscess.  
347 Five goats distributed among all 4 experimental groups (two being in the mock-inoculated  
348 group) showed the presence of a few multifocal lymphocytic perivascular cuffs in the brain.  
349 No relevant lesions were observed in the kidneys, heart, urinary bladder and bone marrow.  
350 Apart from the oral SCC observed in one goat, which was subsequently excluded from the  
351 study, none of the other observed lesions were severe. Considering that all the goats showed  
352 good body condition, these lesions were judged to be incidental.

353

## 354 **DISCUSSION**

355 The purpose of this study was to understand the pathological processes underlying the  
356 different clinical outcomes observed in Saanen goats infected with PPRV strains of different  
357 virulence [9]. A previous study in this breed showed that the PPRV IC89 strain induced only  
358 mild disease, whereas the PPRV MA08 strain was highly virulent and infected animals showed  
359 all the signs associated with PPRV infection. The vaccine strain Nigeria 75/1 was effective in  
360 immunising and protecting animals against PPRV infection [9,41]. In the current study, adult  
361 Saanen goats, obtained from commercial sources, were either vaccinated with the Nigeria 75/1  
362 vaccine or infected with PPRV strains of different virulence (IC89 and MA08). Clinical scoring  
363 during the experiment showed similar results to those observed in the previous experiment  
364 [9]. The animals in the current study infected with PPRV MA08 developed clinical signs of the  
365 disease accompanied by high rectal temperature and reached a peak of clinical signs with

366 lymphocyte depletion, after which the animals in this group started to recover. The return to  
367 normal body temperature highlighted this recovery stage as well as the general decrease in  
368 clinical score. In recovering animals, the lymphocyte count was not restored until the end of  
369 the experiment. One animal in this group was euthanized when it reached the criteria of  
370 cessation at day 9 post-infection. Mock-inoculated, IC89-infected and vaccinated animals did  
371 not show clear clinical signs of the disease. However, a slight nasal discharge and an increase  
372 in rectal temperature were observed during the course of the experiment in some IC89-infected  
373 animals.

374 The slight decrease in lymphocyte count observed in mock-inoculated, IC89-infected and  
375 vaccinated animals is not necessarily linked to infection, as daily blood sampling may induce  
376 a decrease in the circulating white blood cell count [42]. Taken together, the results of this  
377 study confirm the reliability of the infection model. The PPRV MA08 strain induced acute  
378 disease as observed in previous studies [43]. The PPRV IC89 strain held in our laboratory,  
379 which induced acute disease in West African dwarf goats, caused mild to unapparent disease  
380 in Saanen goats. However, the West African dwarf breed from the rainy tropical region is more  
381 susceptible to PPRV infection than the West African long-legged goat breed from the Saharan  
382 region and this difference in susceptibility is related to the breed and not the virus [44,19]. It  
383 has also been observed that this virus strain causes severe disease in British Saanen goats [26].

384 A comparison of the complete genome of the IC89 strain used in our laboratory and the  
385 genome available on GenBank reveals that the strains appear to be different, with 26  
386 nucleotide differences separating the two genomes. One of the major issues with this analysis  
387 is that the genome of both strains was not obtained using the same sequencing method. The  
388 genome available on GenBank was obtained using Sanger sequencing while the one in our



389 study was obtained using illumina sequencing. The un-optimised Sanger method is less  
390 effective in sequencing high GC containing sequences [45], therefore differences in the M-F  
391 intergenic region may be due to sequencing errors. The F CDS of the PPRV IC89 genome  
392 obtained in our study harbours a lot of bases in common with the F gene of other PPRV  
393 genomes, whereas the GenBank sequence presents variants in regions that are not variable in  
394 other PPRV genomes, suggesting a sequencing error in the latter (**Additional Figure 1**).

395 Taken together, these results indicate the possibility that most differences between sequences  
396 are due to the different method used and the Illumina sequence appears to be more reliable. It  
397 is interesting to note that one difference at position 87 in the F gene CDS seems to be specific  
398 to the sequence obtained in the present study. This mutation, which is very close to the one  
399 observed in the F protein of the measles virus, could modify the interactions of this  
400 glycoprotein and its fusogenic properties by acting, for instance, on syncytium formation [46].  
401 New sequencing using high-throughput technology of the IC89 strain held at the Pirbright  
402 Institute (the origin of the GenBank sequence) would help identify the real nucleotide  
403 differences separating the two virus stocks. Furthermore, cell culture passages are capable of  
404 generating defective interfering particles that could make PPRV less virulent by preventing  
405 replication of the standard virus [47]. The presence of interfering particles may explain the  
406 difference in virulence observed between the two strains. This hypothesis should be further  
407 investigated.

408 The samples collected during the current experiment were analysed for the presence of virus  
409 and antibodies. Results indicate that virus circulation in MA08-infected animals influences the  
410 dynamics and level of neutralising antibodies. Antibody levels rise earlier depending on the  
411 initial amount of circulating virus. However, total and neutralising antibodies to PPRV were

412 detected even in the absence or presence of small amounts of circulating virus in sera collected  
413 from vaccinated or IC89-infected animals. The decrease in lymphocyte count and the high  
414 viremia and increased antibody response in MA08-infected animals may suggest that B cells  
415 are not affected by the lymphopenia or that there may be activation of antibody responses  
416 independently of T cells. The role of antibodies is crucial in controlling the disease, as clinical  
417 signs and viremia decreased within days of their onset, coinciding with the rise of neutralising  
418 antibodies.

419 Early presence of MA08 RNA in excreta may play a role in the probably rapid transmission of  
420 this strain, with animals excreting the virus before showing signs of the disease [48]. The low  
421 circulation of the IC89 strain in the bloodstream may be related either to the inability of this  
422 strain to infect white blood cells or to a mechanism that may occur during the initial transport  
423 of the virus to the proximal lymph nodes. No significant decrease in leukocytes was induced  
424 in the present experiment and a lower replication rate was observed when peripheral blood  
425 mononuclear cells were infected in vitro with PPRV IC89, which may support the first  
426 hypothesis [49]. The presence of IC89 viral RNA in ocular excretions, also observed in previous  
427 experiments with West African dwarf goats and Saanen goats [15,27], points towards the  
428 maintenance of an epithelial tropism for this strain. Therefore, the interactions between  
429 epithelial cells or epithelial resident antigen-presenting cells and low virulent strains need to  
430 be studied to better understand the mechanisms behind this low virulence.

431 Unexpectedly, vaccine RNA was detected in ocular excretions from vaccinated animals. In the  
432 current study, viral RNA was detected in swabs from 6 to 11 days after vaccination, although  
433 the amounts of RNA were lower than those seen in animals infected with either MA08 or IC89.  
434 Other recent publications have not shown any evidence of the presence of viral RNA in ocular

435 excretion from vaccinated animals, but less sensitive molecular methods were used [9,50]. On  
436 the other hand, we have received confirmation from the Pirbright Institute that results similar  
437 to ours had been obtained in some of their previous experiments (Satya Parida, personal  
438 communication). The presence of RNA does not mean the presence of live virus.  
439 Unfortunately, we could not attempt to isolate live virus from the ocular swabs as the samples  
440 were inactivated to allow for their shipment. Attempts from other labs have failed (Satya  
441 Parida, personal communication). Moreover, no clinical signs or lesions were observed in  
442 vaccinated animals in this study and the detection of vaccine virus RNA occurred mostly after  
443 the appearance of antibodies at 8 dpi. These results still provide support for an inability of the  
444 vaccine to be transmitted by animal-to-animal contact, as was proven during the development  
445 of the vaccine strain [41]. Our findings again underline the need to carry out such studies in  
446 animals of a broad spread of ages and species. Researchers, notably those working in the field  
447 with vaccinated animals, should be aware of the possibility, although low, of detecting PPR  
448 genetic material in vaccinated animals during a short window of time, and be reminded that  
449 it does not put into question the safety and efficacy of the PPR vaccine.

450 For measles vaccines, viral RNA in urine specimens from vaccine recipients was detected early  
451 as 1 day or as late as 14 days after vaccination, but secondary transmission of the vaccine virus  
452 has never been documented [51]. In France, measles virus was isolated in a throat swab of a  
453 vaccinated child 4 days after the onset of fever. The virus was then further genetically  
454 characterised as a vaccine-type virus, showing that subcutaneous injection of an attenuated  
455 vaccine may result in respiratory excretion of this virus. Such events are very rare for this live  
456 attenuated vaccine and have only exceptionally been documented [52]. For rinderpest vaccine,  
457 viral RNA was detected in ocular secretions of Angus calves on days 9, 12 and 14 post

458 vaccination with the rinderpest bovine Old Kabete (RBOK) strain. However, no  
459 seroconversion was detected in contact animals during the experiment, highlighting the fact  
460 that the presence of RNA in animal secretions is not necessarily related to the presence of live  
461 virus [53].

462 The systematic scoring of macroscopic and histological lesions during necropsy allowed us to  
463 discriminate, to some extent, between the studied groups. Macroscopical lesions showed  
464 higher lesional scores in IC89-infected and MA08-infected animals than in vaccinated and  
465 mock-inoculated animals. These data indicate that some of the parameters assessed are useful  
466 to differentiate between the groups of goats infected with the highly virulent PPRV MA08  
467 strain from those infected with the low-virulence PPRV IC89 strain and, in turn, to  
468 discriminate these two groups from the rest. Specifically, these parameters are macroscopic  
469 erosive-ulcerative lesions in the alimentary tract, macroscopic lesions suggestive of  
470 bronchointerstitial pneumonia, lymphocytic depletion of lymphoid organs and mucosal  
471 inflammatory lesions of the alimentary tract. The presence of virus and virus-related lesions  
472 observed in several studies have been confirmed for highly and weakly virulent strains [21,54–  
473 56,28]. A recent sequential study on the pathology of PPR in black Bengal goats showed that  
474 in the early stage, the virus multiplied mostly in the lymphoid organs of the pharyngeal region  
475 and caused extensive lymphoid destruction and hemorrhages. Subsequently, the virus spread  
476 to other organs causing necrotic and hemorrhagic lesions, as well as the virus localized in the  
477 upper respiratory, oral and intestinal mucosa resulting in catarrhal, erosive, and ulcerative  
478 lesions [22]. Post-mortem evaluation in the present study confirmed this pattern in animals  
479 infected with the highly virulent PPRV MA08 strain. Interestingly, the vaccine strain was also  
480 found in all the tested organs, suggesting that, although not detected in sera, the vaccine could

481 be carried silently in the body by immune cells. As far as we know, this is the first time that  
482 viral RNA has been detected in tissue from vaccinated animals.

483 Finally, this study validates the infection model and may help to find discriminatory signs of  
484 the disease. To our knowledge, this is the first time that the PPRV genome has been detected  
485 in sera. However, a comparison with the detection of viral RNA in whole blood could not be  
486 undertaken, which could have made the results obtained even more significant. These new  
487 results also indicate that the treatment of suspected PPR-positive sera must be rigorous to  
488 avoid any risk of transmission of the disease. Sera collected from infected animals with  
489 rinderpest virus (RPV) have been considered to be RPV Containing Material (RVCM),  
490 although the risk of RPV presence in sera was negligible. A protocol for heat treatment  
491 established by the FAO and OIE has proven to be very effective in mitigating this risk and  
492 could be used to treat sera collected from PPRV-infected animals [57].

493 Neutralising antibodies are essential to control virus circulation in the bloodstream. The highly  
494 virulent MA08 strain succeeded in inducing typical clinical signs of the disease, macroscopical  
495 and histological lesions and a prolonged shedding in ocular secretions in infected animals. The  
496 low-virulence IC89 strain acted weakly, inducing only nasal discharges and a slight transient  
497 viremia in infected animals. This strain actively shed and induced macroscopical and  
498 histological lesions but in a milder way compared to the highly virulent strain. Patterns of  
499 detection of PPRV genetic material in serum supported observations of different immune  
500 responses of the host to PPRV strains of different virulence. As expected, the vaccine strain  
501 did not induce any clinical signs of the disease including or tissue lesions, however presence  
502 of viral RNA was observed for the first time in ocular excretions and organs from vaccinated  
503 animals. The high sensitivity of the method used made it possible to detect a low PPRV RNA

504 level, for a short period, in vaccinated animals. This detection does not implies a potential risk  
505 of spreading the vaccine strain, as a large number of past experimental studies and field work  
506 has confirmed that vaccinated animals do not transmit the vaccine to contact animals [41].  
507 Further studies are needed to better understand the mechanisms behind this phenomenon.

508

### 509 **Authors' contributions**

510 R-JE, OGN, LGR AB and AS designed the study; R-JE, OGN, AG, LGR, SP, KM and AS were  
511 involved in the laboratory experiments, data acquisition and analysis; OGN, LGR, GL, AS and  
512 AB supervised the study; R-JE have drafted the original paper; R-JE, OGN, LGR, GL, AS and  
513 AB have substantively revised the paper.

### 514 **Ethics approval and consent to participate**

515 The animal experimentation was carried out in the high containment facilities of the Institute  
516 of Virology and Immunology (IVI, Mithelhäusern), and under the guidance of the Swiss animal  
517 welfare, approved by Cantonal ethical committee for animal experiments holding the license  
518 BE16/20. Animal handling was carried out in strict accordance with good animal practice, as  
519 defined by European regulations and approved by the ethics committee of the Canton of Bern.

### 520 **Competing interests**

521 The authors declare that they have no competing interests.

522

523

## 524 **Funding**

525 This research was co-funded by the European Commission through the VetBioNet (grant no.  
526 731014) and was supported by a grant (SI2.756606) from the European Commission  
527 Directorate General for Health and Food Safety awarded to the European Union Reference  
528 Laboratory for Peste des Petits Ruminants (EURL-PPR).

## 529 **Acknowledgment**

530 The authors would like to thank Michael Baron who provided helpful comments on an earlier  
531 version of the manuscript.

532

## 533 **Figures**

534 **Figure 1.** Sequencing analysis of virulent PPRV IC89 and MA08 strains. (A) Gene coverage  
535 (Log(Depth)) obtained by illumina sequencing on each region of the viral genome.. (B)  
536 Distribution of single nucleotide polymorphism (SNP) frequencies according to the genome  
537 positions. Grey areas represent the coding regions (CDS) of the following viral genes: N  
538 (nucleocapsid), P (phosphoprotein), M (matrix), F (fusion), H (haemagglutinin) and L  
539 (polymerase).

540 **Figure 2.** Clinical scores, rectal temperatures and circulating lymphocyte counts. Saanen goats  
541 were grouped in vaccinated (VN751), mock-inoculated (MOCK) or infected with PPRV strains  
542 of different virulence IC89 (mild) and MA08 (high). (A) Comparison between the vaccinated  
543 and control groups. (B) Comparison between the IC89-infected and control groups. (C)  
544 Comparison between the MA08-infected and control groups. Single dark lines in each group  
545 assessment represent the median. P-values were calculated using a Dunnett multiple



546 comparison test with individual variances computed for each comparison. Asterisks highlight  
547 the statistical differences observed between the infected or vaccinated groups and the mock  
548 inoculated group. *'\*\*'* = P-values < 0.05; *'\*\*\*'* = P-values < 0.01; *'\*\*\*\*'* = P-values < 0.001.

549 **Figure 3.** Detection of viral RNA in serum and ocular swabs from vaccinated (A), IC89-infected  
550 (B) and MA08-infected (C) animals by RT-qPCR. The Ct 40 value represents the absence of the  
551 viral genome in samples. This graph plots 40-Ct values. Single dark lines in each group  
552 assessment represent the median. P-values were calculated using a Dunnett multiple  
553 comparison test with individual variances computed for each comparison. Asterisks highlight  
554 the statistical differences observed between the infected or vaccinated groups and the mock  
555 inoculated group. *'\*\*'* = P-values < 0.05; *'\*\*\*'* = P-values < 0.01; *'\*\*\*\*'* = P-values < 0.001.

556 **Figure 4.** Detection of antibodies against PPRV in (A) vaccinated (VN751), (B) IC89-infected  
557 and (C) MA08-infected animals. Detection of PPRV antibodies was monitored by competitive  
558 ELISA (expressed in % of inhibition). Thresholds are defined as follows: from 0% to 40% =  
559 negative, from 40% to 50% = doubtful and from 50% to 100% = positive. Detection of  
560 neutralised antibodies against PPRV was monitored by VSNT. Thresholds are defined as  
561 follows: seroneutralisation titres from 1 to 10 = negative and from 10 to 1000 = positive. The  
562 correlation between ELISA and VSNT was evaluated using a Pearson coefficient R-Squared  
563 calculation.

564 **Figure 5.** (A) Ulcerative glossitis, tongue, goat number 15, PPRV MA08-infected. There are  
565 multifocal erosions and ulcerations (arrows) in the dorsal aspect of the tongue. (B) Ulcerative  
566 stomatitis, lip, goat number 14, PPRV MA08-infected. The epithelium of the oral mucosa and  
567 the mucocutaneous junction is multifocally ulcerated and focally extensive covered and  
568 infiltrated by abundant neutrophils, lymphocytes and plasma cells. The remaining mucosal

569 epithelium is multifocally hyperplastic. Inset: Numerous intracytoplasmic, round,  
570 eosinophilic inclusion bodies of 1 to 5 µm in diameter are present within the affected  
571 epithelium (arrow). Hematoxylin eosin stain.

572 **Figure 6.** Pathological evaluation of PPRV-induced lesions. A shows macroscopic lesions in  
573 digestive and respiratory tracts, while B, C and D depict histological scoring in lymphoid  
574 organs, respiratory and digestive tracts. E represents the accumulative macroscopical and  
575 histological scoring of suspected PPRV-induced post-mortem lesions. LN: lymph nodes.  
576 Single lines in each organ or group assessment represent the median. P-values were calculated  
577 using Tukey multiple comparison tests with individual variances computed for each  
578 comparison. Asterisks highlight the statistical differences observed between the infected or  
579 vaccinated groups and the mock-inoculated group. '\*\*' = P-values < 0.05; '\*\*\*' = P-values < 0.01;  
580 '\*\*\*\*' = P-values < 0.001; '\*\*\*\*\*' = P-values < 0.0001.

581 **Figure 7.** Detection of viral RNA in lymphoid and non-lymphoid organs by RT-qPCR. Organ  
582 samples from vaccinated (VN751), IC89-infected and MA08-infected animals were analysed  
583 for the presence of PPRV. The Ct 40 value represents absence of viral genome in samples. This  
584 graph plots 40-Ct values. Single lines in each group assessment represent the median. P-values  
585 were calculated using Tukey multiple comparison tests with individual variances computed  
586 for each comparison. Asterisks highlight the statistical differences observed between the  
587 infected or vaccinated groups and the mock inoculated group. '\*\*' = P-values < 0.05; '\*\*\*' = P-  
588 values < 0.01.

## 589 **Tables**

590

591

**Table1.** Assessment of macroscopical and histological PRRV-related lesions.

	<b>Organ or tissue</b>	<b>Lesions</b>	
<b>Macroscopy</b>	Palate	Erosive-ulcerative lesions (0 to 3*)	
	Lip		
	Tongue		
	Esophagus		
	Abomasum		
	Large intestine		
	Lung		Bronchointerstitial Pneumonia (0 to 3)
	Accumulative scoring	Sum (0 to 21)	
<b>Histopathology</b>	Tonsil	Lymphocytic depletion (0 to 3)	
	Tracheal Lymph nodes		
	Retropharyngeal Lymph nodes		
	Peyer's Patches		
	Spleen		
	Mesenteric Lymph nodes		
		Accumulative scoring	Sum (0 to 21)
		Oral mucosa (tongue, lip, palate pharynx)	Inflammation within the lamina propria (0 to 3) + erosive-ulcerative lesions (0-1**)
	Esophagus		
	Forestomach (rumen, reticulum, omasum)		
	Abomasum		
	Small Intestine (duodenum, jejunum, ileum)		
	Large Intestine (cecum, colon)		
	Accumulative scoring	Sum (0 to 18 )	
	Nasal Cavity	Inflammation within the lamina propria (0 to 3)	
	Trachea		
	Lung	Bronchopneumonia (0 to 3)	
	Accumulative scoring	Sum (0 to 9)	

\* 0: absence; 1: mild; 2: moderate; 3: severe

\*\*0: absence; 1: presence

592

593

Table 2. Representation of high frequency SNPs.

	Genome positions	Nucleotides EU267273.1	Nucleotides IC89	SNP Frequencies	Amino acids EU267273.1	Amino acids IC89
<b>N CDS</b>	1711	TTAATT	GCAGC A	99.87		
<b>M CDS</b>	4315	G	A*	99.46	292R	292Q
<b>M_F intergenic region</b>	4446	ACCGG	TTCAC	100		
	4957	ATC	AC	100		
	4963	G	C	100		
	4971	T	A	100		
	5208	AT	CT	94.84		
	5473	G	T	100		
	5499	GCGATCGC C	ACAAC	99.37		
	5509	AA	AGCAC A	99.37		
	5516	T	G	99.73		
	5518	AA	ATA	97.11		
<b>F CDS</b>	5532	AC	CG*	100	3T	3R
	5538	C	G*	99.65	5P	5A
	5548	A	C*	100	8K	8T
	5559	T	C*	99.68	12F	12L
	5563	C	T*	99.79	13S	13F
	5569	T	A*	100	15I	15N
	5644	G	A*	99.7	40R	40K
	5659	A	C*	96.96	45Q	45P
	5661	GC	AG*	97.75	46A	46S
	5784	C	A*	82.69	87L	87M
	6020	A	G	57.32		
	6104	T	G	99.85		
	6122	T	C	100		
	6773	G	T*	99.89	416W	416C

594

	Genome positions	Nucleotides KC594074.1	Nucleotides MA08	SNP frequencies	Amino acids KC594074.1	Amino acids MA08
<b>M_F intergenic region</b>	5203	TCT	CCT	95.1		

595 \*Non-synonymous mutations.

596 **Additional Table 1.** Recording of clinical signs.

597 **Additional Table 2.** Diagnosis of other pathologies (not related to PRV) in the goats studied.

598 The majority of goats used in this study showed pre-existing pathologies (mostly parasitic, but  
599 also in some cases of bacterial origin) which may interfere in the assessment of certain  
600 immunological parameters. Saanen goats were grouped as vaccinated (VN751), mock-  
601 inoculated (Mock) or infected with PPRV strains of different virulence, IC89 (mild) and MA08  
602 (high). Fractions represent the number of positive animals per group of 6 goats.

603 **Additional Figure 1.** PPRV F protein alignment. Sequences A,B,C and D represent respectively  
604 the PPRV IC89 genome obtained in our study, the PPRV IC89 genome available on GenBank,  
605 the PPRV MA08 genome available on GenBank and the PPRV MA08 genome obtained in our  
606 study. The remaining sequences in the alignment are PPRV genomes obtained from GenBank.  
607 Highlighted amino acids represent some of the differences observed between sequences in  
608 Table 1.

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620 **REFERENCES**

- 621 1. FAO, OIE (2015) Global Strategy for the Control and Eradication of PPR. Investing in  
622 Veterinary Systems, Food Security and Poverty Alleviation. 88 p. Available:  
623 <http://www.fao.org/emergencies/resources/documents/resources-detail/en/c/282777/>.  
624 Accessed 24/07/21.
- 625 2. FAO, OIE (2016) Peste des Petits Ruminants Global Eradication Programme -  
626 Contribution to food security, poverty alleviation and resilience improvement, Five  
627 years (2017-2021). 80 p.
- 628 3. Gargadenne L, Lalanne A (1942) La peste des petits ruminants. Bull. Serv. Zoot. Epizoot.  
629 AOF. 5 (1): 16–21.
- 630 4. OIE (2021) Disease situation. Available: [https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-](https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard)  
631 [disease-dashboard](https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard). Accessed 2021 September 28.
- 632 5. Diallo A (2003) Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et  
633 régions chaudes. Paris: Tec @ Doc.
- 634 6. FAO (1999) Recognizing peste des petits ruminants. Rome: Food and Agriculture  
635 Organization of the United Nations.
- 636 7. EFSA (2015) Scientific Opinion on peste des petits ruminants. EFSA Journal 13 (1): 3985.
- 637 8. OIE (2020) Technical disease card : Peste des petits ruminants. 6 p.
- 638 9. Enchery F, Hamers C, Kwiatek O, Gaillardet D, Montange C et al. (2019) Development  
639 of a PPRV challenge model in goats and its use to assess the efficacy of a PPR vaccine.  
640 Vaccine 37 (12): 1667–1673.
- 641 10. Parida S, Selvaraj M, Gubbins S, Pope R, Banyard A et al. (2019) Quantifying Levels of  
642 Peste Des Petits Ruminants (PPR) Virus in Excretions from Experimentally Infected  
643 Goats and Its Importance for Nascent PPR Eradication Programme. Viruses 11 (3): 249.
- 644 11. Halecker S, Joseph S, Mohammed R, Wernery U, Mettenleiter TC et al. (2020)  
645 Comparative evaluation of different antigen detection methods for the detection of peste  
646 des petits ruminants virus. Transboundary and emerging diseases 67 (6): 2881–2891.
- 647 12. Rojas JM, Moreno H, Valcárcel F, Peña L, Sevilla N et al. (2014) Vaccination with  
648 recombinant adenoviruses expressing the peste des petits ruminants virus F or H  
649 proteins overcomes viral immunosuppression and induces protective immunity against  
650 PPRV challenge in sheep. PloS one 9 (7): e101226.
- 651 13. Lefèvre PC, Diallo A (1990) Peste des petits ruminants. Revue scientifique et technique  
652 (International Office of Epizootics) 9 (4): 935–981.
- 653 14. Aziz-Ul-Rahman, Wensman JJ, Abubakar M, Shabbir MZ, Rossiter P (2018) Peste des  
654 petits ruminants in wild ungulates. Tropical animal health and production 50 (8): 1815–  
655 1819.

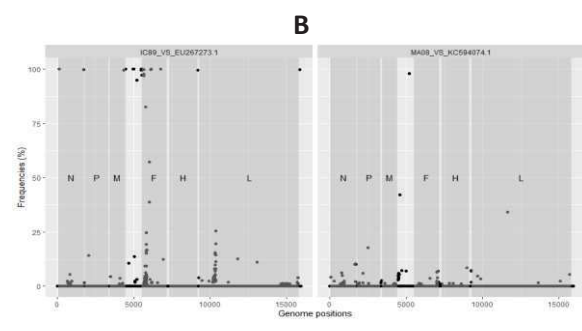
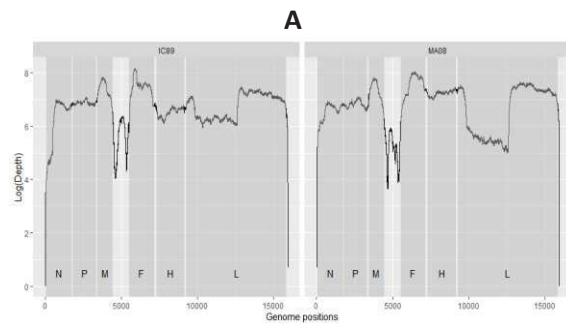


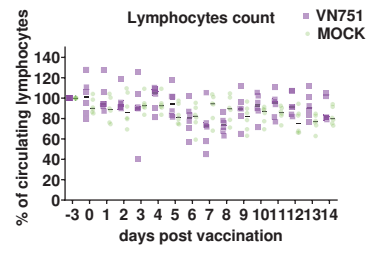
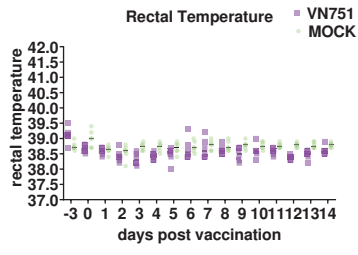
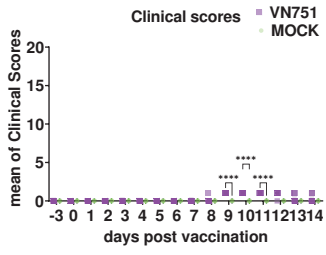
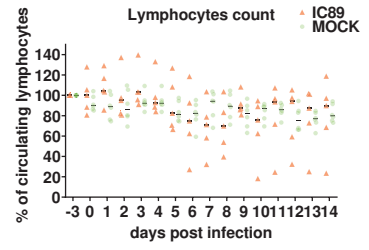
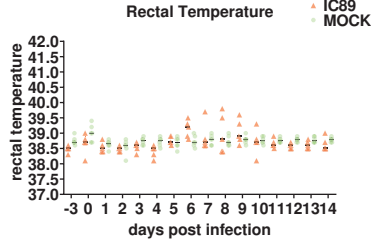
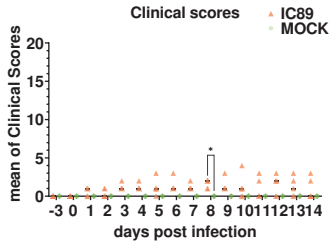
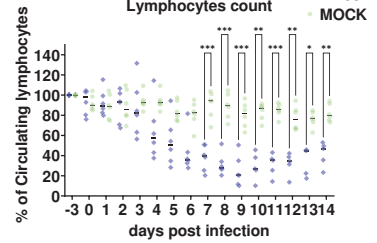
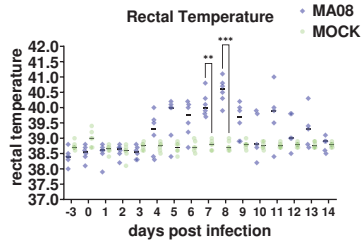
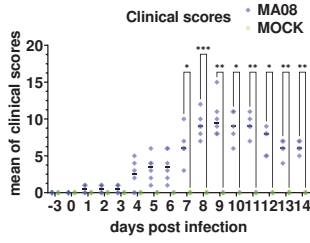
- 656 15. Pruvot M, Fine AE, Hollinger C, Strindberg S, Damdinjav B et al. (2020) Outbreak of  
657 Peste des Petits Ruminants among Critically Endangered Mongolian Saiga and Other  
658 Wild Ungulates, Mongolia, 2016-2017. *Emerging infectious diseases* 26 (1): 51–62.
- 659 16. Aguilar XF, Fine AE, Pruvot M, Njeumi F, Walzer C et al. (2018) PPR virus threatens  
660 wildlife conservation. *Science (New York, N.Y.)* 362 (6411): 165–166.
- 661 17. Dou Y, Liang Z, Prajapati M, Zhang R, Li Y et al. (2020) Expanding Diversity of  
662 Susceptible Hosts in Peste Des Petits Ruminants Virus Infection and Its Potential  
663 Mechanism Beyond. *Frontiers in veterinary science* 7: 66.
- 664 18. Fakri FZ, Elhajjam A, Bamouh Z, Jazouli M, Boumart Z et al. (2017) Susceptibility of  
665 Moroccan sheep and goat breeds to peste des petits ruminants virus. *Acta veterinaria*  
666 *Scandinavica* 59 (1): 56.
- 667 19. Diop M, Sarr J, Libeau G (2005) Evaluation of novel diagnostic tools for peste des petits  
668 ruminants virus in naturally infected goat herds. *Epidemiology and infection* 133 (4):  
669 711–717.
- 670 20. Baron J, Bin-Tarif A, Herbert R, Frost L, Taylor G et al. (2014) Early changes in cytokine  
671 expression in peste des petits ruminants disease. *Veterinary research* 45: 22.
- 672 21. Bamouh Z, Fakri F, Jazouli M, Safini N, Omari Tadlaoui K et al. (2019) Peste des petits  
673 ruminants pathogenesis on experimental infected goats by the Moroccan 2015 isolate.  
674 *BMC veterinary research* 15 (1): 452.
- 675 22. Begum S, Nooruzzaman M, Islam MR, Chowdhury EH (2021) A Sequential Study on the  
676 Pathology of Peste Des Petits Ruminants and Tissue Distribution of the Virus Following  
677 Experimental Infection of Black Bengal Goats. *Frontiers in veterinary science* 8: 635671.
- 678 23. Bundza A, Afshar A, Dukes TW, Myers DJ, Dulac GC et al. (1988) Experimental peste  
679 des petits ruminants (goat plague) in goats and sheep. *Canadian Journal of Veterinary*  
680 *research* 52 (1): 46–52.
- 681 24. Kumar P, Tripathi BN, Sharma AK, Kumar R, Sreenivasa BP et al. (2004) Pathological  
682 and immunohistochemical study of experimental peste des petits ruminants virus  
683 infection in goats. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary*  
684 *public health* 51 (4): 153–159.
- 685 25. Khan, Haider MG, Alam KJ, Hossain MG, Chowdhury S et al. (2012) PATHOLOGICAL  
686 INVESTIGATION OF PESTE DES PETITS RUMINANTS (PPR) IN GOATS. *Bangl. J.*  
687 *Vet. Med.* 3 (2): 134–138.
- 688 26. Pope RA, Parida S, Bailey D, Brownlie J, Barrett T et al. (2013) Early events following  
689 experimental infection with Peste-Des-Petits ruminants virus suggest immune cell  
690 targeting. *PloS one* 8 (2): e55830.

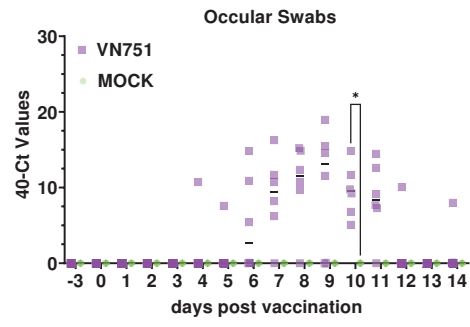
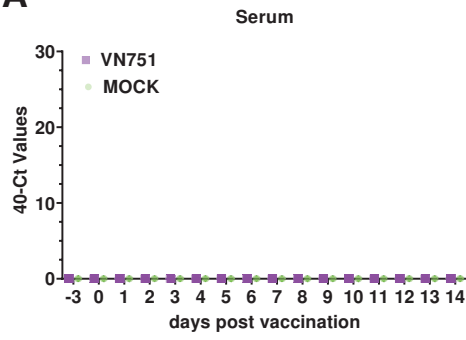
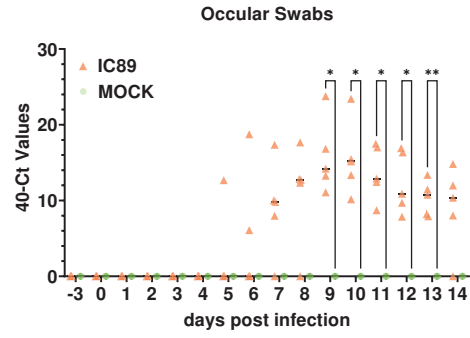
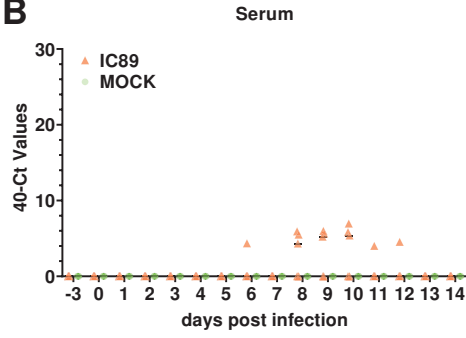
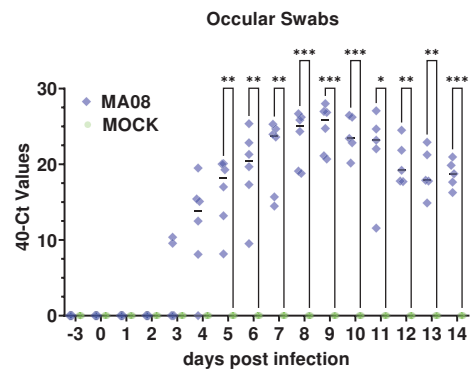
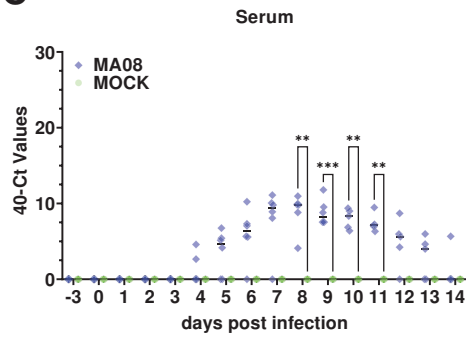
- 691 27. Wernike K, Eschbaumer M, Breithaupt A, Maltzan J, Wiesner H et al. (2014)  
692 Experimental infection of sheep and goats with a recent isolate of peste des petits  
693 ruminants virus from Kurdistan. *Veterinary microbiology* 172 (1-2): 140–145.
- 694 28. Khan A, Saleemi MK, Ali F, Abubakar M, Hussain R et al. (2018) Pathophysiology of  
695 peste des petits ruminants in sheep (Dorper & Kajli) and goats (Boer & Beetal).  
696 *Microbial pathogenesis* 117: 139–147.
- 697 29. Gautam S, Joshi C, Sharma AK, Singh KP, Gurav A et al. (2021) Virus distribution and  
698 early pathogenesis of highly pathogenic peste-des-petits-ruminants virus in  
699 experimentally infected goats. *Microbial pathogenesis* 161 (Pt A): 105232.
- 700 30. SPEARMAN C (1908) THE METHOD OF 'RIGHT AND WRONG CASES'  
701 ('CONSTANT STIMULI') WITHOUT GAUSS'S FORMULAE. *British Journal of*  
702 *Psychology*, 1904-1920 2 (3): 227–242.
- 703 31. Kärber G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer  
704 Reihenversuche. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* 162 (4): 480–483.
- 705 32. Eloiflin R-J, Boyer M, Kwiatek O, Guendouz S, Loire E et al. (2019) Evolution of  
706 Attenuation and Risk of Reversal in Peste des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria  
707 75/1. *Viruses* 11 (8).
- 708 33. Bourdin P, Bernard G (1967) Application de la méthode de séroneutralisation cinétique à  
709 la recherche des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine chez les bovins, les  
710 caprins et les ovins. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 20 (4): 531.
- 711 34. Del Pilar Martinez Viedma M, Puri V, Oldfield LM, Shabman RS, Tan GS et al. (2019)  
712 Optimization of qRT-PCR assay for zika virus detection in human serum and urine.  
713 *Virus research* 263: 173–178.
- 714 35. Hoffmann B, Schulz C, Beer M (2013) First detection of Schmallenberg virus RNA in  
715 bovine semen, Germany, 2012. *Veterinary microbiology* 167 (3-4): 289–295.
- 716 36. Huhti L, Hemming-Harlo M, Vesikari T (2016) Norovirus detection from sera of young  
717 children with acute norovirus gastroenteritis. *Journal of clinical virology : the official*  
718 *publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 79: 6–9.
- 719 37. López-Fabal M<sup>a</sup>F, Pérez-Rivilla A, Gómez-Garcés JL (2018) Valoración de sueros con  
720 bajo índice S/CO utilizando 2 sistemas de quimioluminiscencia para la detección de  
721 anticuerpos frente al virus de la hepatitis C y su correlación con la detección de ARN  
722 viral. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)* 36 (4): 222–224.
- 723 38. Mackiewicz V, Dussaix E, Le Petitcorps M-F, Roque-Afonso AM (2004) Detection of  
724 hepatitis A virus RNA in saliva. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (9): 4329–4331.
- 725 39. Rivero-Juarez A, Frias M, Lopez-Lopez P, Martinez-Peinado A, Risalde MÁ et al. (2018)  
726 Detection of hepatitis E virus RNA in saliva for diagnosis of acute infection. *Zoonoses*  
727 *and public health* 65 (5): 584–588.

- 728 40. Wiyatno A, Antonjaya U, Ma'roef CN, Riswari SF, Djauhari H et al. (2016) Detection and  
729 identification of coxsackievirus B3 from sera of an Indonesian patient with  
730 undifferentiated febrile illness. *J Infect Dev Ctries* 10 (8): 880–883.
- 731 41. Diallo A., Taylor W.P., Lefèvre P.C., Provost A. (1989) Atténuation d'une souche de  
732 virus de la peste des petits ruminants : candidat pour un vaccin homologue vivant.  
733 *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* 42 (3): 311–319.
- 734 42. Baba S.S., Fagbami A.H., Olaleye O.D. (1988) Clinical and pathological responses of  
735 West African Dwarf goats (Fouta Djallon) infected with Nigerian strain of Wesselsbron  
736 virus.
- 737 43. Hammouchi M, Loutfi C, Sebbar G, Touil N, Chaffai N et al. (2012) Experimental  
738 infection of alpine goats with a Moroccan strain of peste des petits ruminants virus  
739 (PPRV). *Veterinary microbiology* 160 (1-2): 240–244.
- 740 44. Couacy-Hymann E, Bodjo C, Danho T, Libeau G, Diallo A (2007) Evaluation of the  
741 virulence of some strains of peste-des-petits-ruminants virus (PPRV) in experimentally  
742 infected West African dwarf goats. *Veterinary journal* (London, England : 1997) 173 (1):  
743 178–183.
- 744 45. Kieleczawa J (2006) Fundamentals of sequencing of difficult templates--an overview.  
745 *Journal of Biomolecular Techniques* : JBT 17 (3): 207–217.
- 746 46. Plemper RK, Compans RW (2003) Mutations in the putative HR-C region of the measles  
747 virus F2 glycoprotein modulate syncytium formation. *J Virol* 77 (7): 4181–4190.
- 748 47. Bora M, Yousuf RW, Dhar P, Manu M, Zafir I et al. (2019) Characterization of defective  
749 interfering (DI) particles of Pestedes petitsruminants vaccine virus Sungri/96 strain-  
750 implications in vaccine upscaling. *Biologicals : journal of the International Association of*  
751 *Biological Standardization* 62: 57–64.
- 752 48. Couacy-Hymann E, Bodjo SC, Danho T, Koffi MY, Libeau G et al. (2007) Early detection  
753 of viral excretion from experimentally infected goats with peste-des-petits ruminants  
754 virus. *Preventive veterinary medicine* 78 (1): 85–88.
- 755 49. Eloiflin R-J, Auray G, Python S, Rodrigues V, Seveno M et al. (2021) Identification of  
756 Differential Responses of Goat PBMCs to PPRV Virulence Using a Multi-Omics  
757 Approach. *Front. Immunol.* 12: 745315.
- 758 50. Mahapatra M, Selvaraj M, Parida S (2020) Comparison of Immunogenicity and  
759 Protective Efficacy of PPR Live Attenuated Vaccines (Nigeria 75/1 and Sungri 96)  
760 Administered by Intranasal and Subcutaneous Routes. *Vaccines* 8 (2).
- 761 51. Rota PA, Khan AS, Durigon E, Yuran T, Villamarzo YS et al. (1995) Detection of measles  
762 virus RNA in urine specimens from vaccine recipients. *Journal of Clinical Microbiology*  
763 33 (9): 2485–2488.

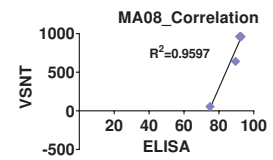
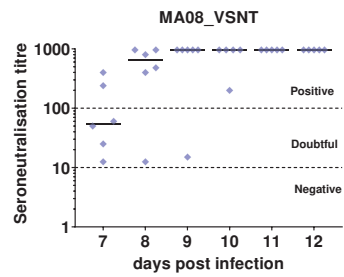
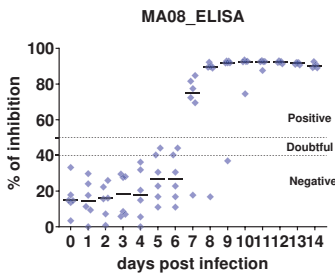
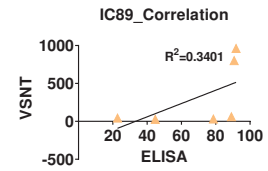
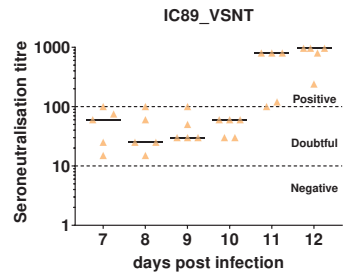
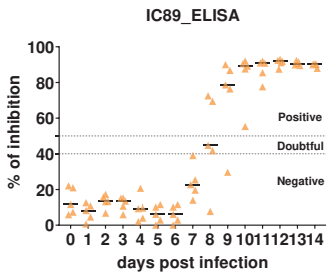
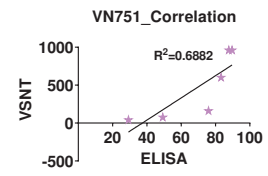
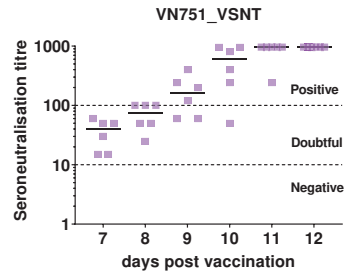
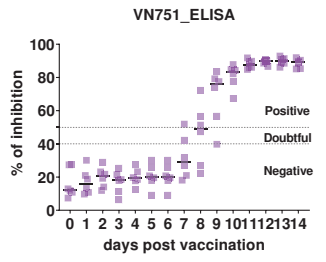
- 764 52. Morfin F, Beguin A, Lina B, Thouvenot D (2002) Detection of measles vaccine in the  
765 throat of a vaccinated child. *Vaccine* 20 (11-12): 1541–1543.
- 766 53. Haroun M, Mukhtar MM, Hajer I, Kheir S, ALi BE et al. (2007) Detection of viral  
767 riboneuclic acid in tissues, ocular and nasal secretions of calves vaccinated with  
768 rinderpest bovine Old Kabete strain. *International Journal of Molecular Medecine and*  
769 *Advance Sciences* 3 (3): 131–137. Available:  
770 [https://www.researchgate.net/publication/260791729\\_Detection\\_of\\_viral\\_riboneuclic\\_aci](https://www.researchgate.net/publication/260791729_Detection_of_viral_riboneuclic_acid_in_tissues_ocular_and_nasal_secretions_of_calves_vaccinated_with_rinderpest_bovine_Old_Kabete_strain)  
771 [d\\_in\\_tissues\\_ocular\\_and\\_nasal\\_secretions\\_of\\_calves\\_vaccinated\\_with\\_rinderpest\\_bovin](https://www.researchgate.net/publication/260791729_Detection_of_viral_riboneuclic_acid_in_tissues_ocular_and_nasal_secretions_of_calves_vaccinated_with_rinderpest_bovine_Old_Kabete_strain)  
772 [e\\_Old\\_Kabete\\_strain](https://www.researchgate.net/publication/260791729_Detection_of_viral_riboneuclic_acid_in_tissues_ocular_and_nasal_secretions_of_calves_vaccinated_with_rinderpest_bovine_Old_Kabete_strain). Accessed 18 November 2021.
- 773 54. Berkowitz A, Avni-Magen N, Bouznach A, Waner T, Litvak A et al. (2019) Pathological  
774 and molecular characterisation of peste des petits ruminants in Nubian ibex (*Capra*  
775 *nubiana*) in Israel. *Archives of virology* 164 (8): 1997–2003.
- 776 55. Chowdhury EH, Bhuiyan AR, Rahman MM, Siddique MSA, Islam MR (2014) Natural  
777 peste des petits ruminants virus infection in Black Bengal goats: virological, pathological  
778 and immunohistochemical investigation. *BMC veterinary research* 10: 263.
- 779 56. Truong T, Boshra H, Embury-Hyatt C, Nfon C, Gerds V et al. (2014) Peste des petits  
780 ruminants virus tissue tropism and pathogenesis in sheep and goats following  
781 experimental infection. *PloS one* 9 (1): e87145.
- 782 57. FAO, OIE (2017) Inactivation of Residual Rinderpest Virus in Sera Potentially  
783 Containing Rinderpest Virus. Available: <http://www.fao.org/3/ca3935en/ca3935en.pdf>.  
784 Accessed 29 September 2021.
- 785



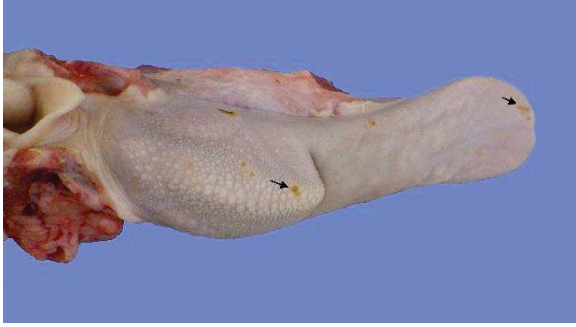
**A****B****C**

**A****B****C**

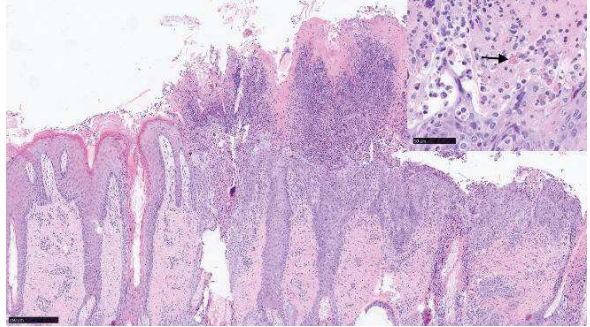


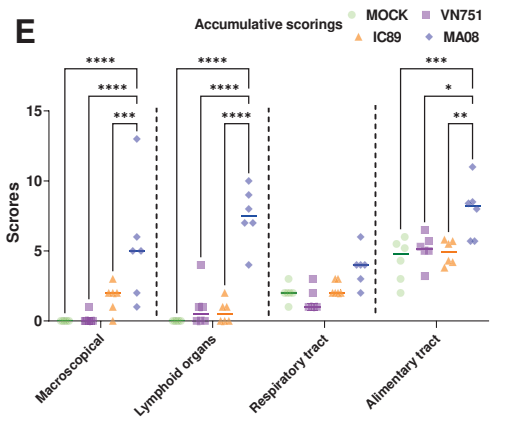
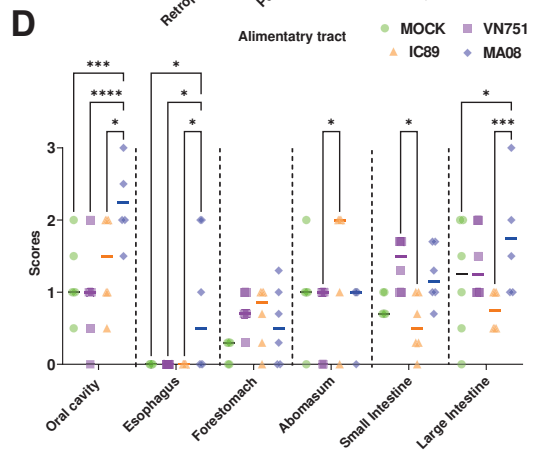
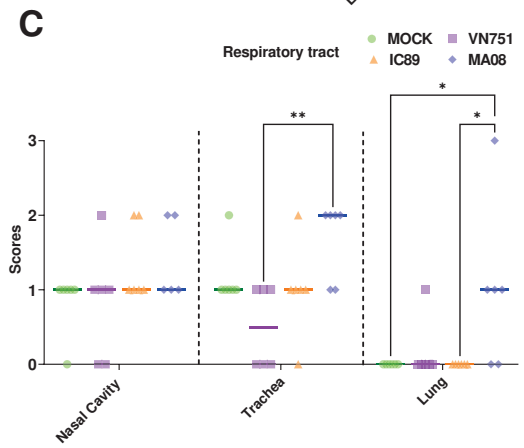
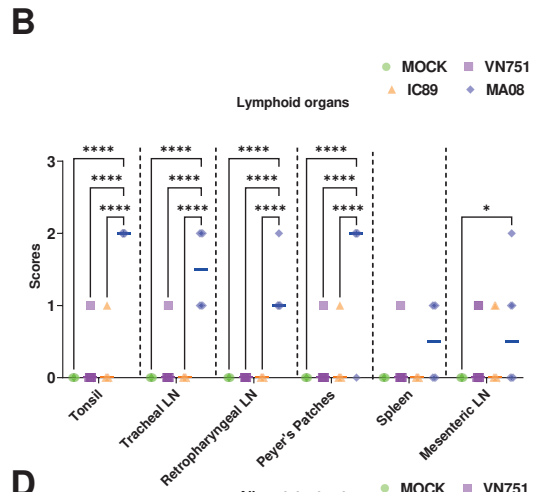
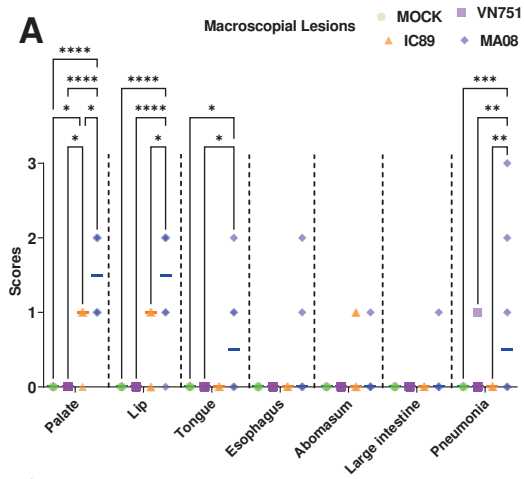


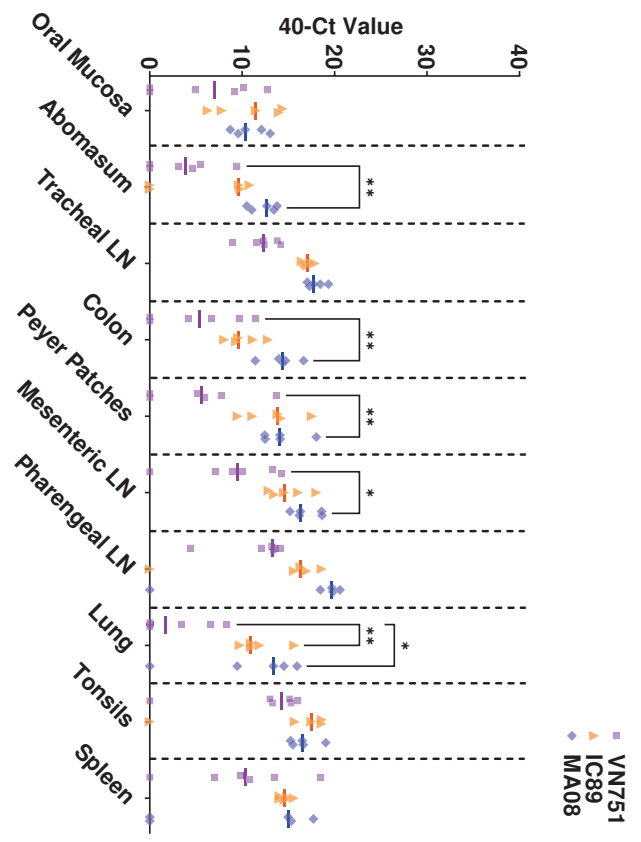
**A**



**B**







Parameter	Criteria	Score
<b>1. Liveliness / Walking</b>	• Attentive (curious, stands up immediately)	0
	• Slightly reduced (stands up hesitantly, but without help)	1
	• Tired, gets up only when forced to, lies down again and/or ataxia	2
	• Recumbent, does not stand up for more than 24h, unable to walk	3*
<b>2. Appetite</b>	• Greedy, hungry	0
	• Eats slowly	1
	• Does not eat, but sniffs food	2
	• Does not eat at all, shows no interest in food	3
<b>3. Body temperature</b>	• Physiological body temperature (39-40.5°C)	0
	• Fever (+0.5 to +1.5°C from baseline)	1
	• High fever (>+1.5 °C from baseline)	2
	• High fever for >5 days	3*
<b>4. Nose and eyes</b>	• Normal moisture, no discharge	0
	• Clear, slight aqueous discharge from eyes or nostrils	1
	• Important lachrymal or nasal discharge, nasal crusts or pustules	2
	• Large turbid or haemorrhagic nasal discharge	3
<b>5. Respiratory system</b>	• Frequency < 40/min, barely visible chest movement	0
	• Frequency 40-60/min, slightly enhanced chest movements, sporadic coughing	1
	• Frequency >60/min, slightly enhanced chest movements, coughing attacks	2
	• Frequency >60/min or dyspnoea for >3 consecutive days	3*
<b>6. Digestive system mucosa</b>	• Normal labial and perineal/vulva mucosa	0
	• Light labial lesion, perineal/vulva congestion	1
	• Moderate labial lesions, perineal/vulva purpura	2
	• Severe labial lesions, perineal/vulva necrosis	3
<b>7. Diarrhoea</b>	• Normal faeces	0
	• Soft, unformed faeces	1
	• Watery diarrhoea	2
	• Haemorrhagic diarrhoea	3

<i>Groups</i>	<i>Verminous pneumonia</i>	<i>Trematodal cholangitis</i>	<i>Nematodal abomasitis</i>	<i>Intestinal nematodiasis/ cestodiasis</i>	<i>Intestinal coccidiosis</i>	<i>Lymphadenitis</i>	<i>Mild encephalitis</i>
<i>VN751</i>	4/6	2/6	3/6	1/6	1/6	2/6	1/6
<i>IC89</i>	5/6	3/6	3/6	1/6	1/6	1/6	1/6
<i>MA08</i>	5/6	2/6	4/6	0/6	3/6	0/6	1/6
<i>Mock</i>	6/6	5/6	6/6	6/6	4/6	2/6	2/6

		..... ..... ..... ..... ..... .....	5	15	25	35	45	55
			* * *	** *			*	**
<b>A</b> →	CI - F_CDS	MTRVATLTF	FLFPNTIACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
<b>B</b> →	EU267273_-	MTTIPTLKFL	FFSPITIAcq	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYR	VMTRQAHQTL	VIKLMPNITA	
	EU267274_-	MTRVATLVFL	FLFPNTVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	HQ197753_-	MTRVATLVFL	FLFPNTVTCQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	JF939201_-	MTRVAILTFL	FLLPNVVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	JX217850_-	MTRVAILTFL	FLLPNVVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	KC594074_-	MTRVAILTFL	FLLPNVAVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	KJ867540_-	MTRVAILTSL	FLLPNVAVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSQRTL	VIKLMPNITA	
	KJ867541_-	MTRVAILKFL	FLLPNVAVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSRQTL	VIKLMPNITA	
	KJ867544_-	MTRVAILTSL	FLLTNTVASQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSQRTL	VIKLMPNITA	
	KM089830_-	MTRVAILTFL	FLFPNVVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	KR140086_-	MTRVAILTFL	FLFPNVAVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	KR261605_-	MTRVAILTSL	FLLPNVVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	KR781449_-	MTRVVTVLFL	FLFPNTVSCQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	KR828814_-	MTRVVTVLFL	FLFPNTVSCQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	KT633939_-	MTRVAILTFL	FLFPNVVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
	EU267273.1	MTTIPTLKFL	FFSPITIAcq	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYR	VMTRQAHQTL	VIKLMPNITA	
<b>C</b> →	KC594074.1	MTRVAILTFL	FLLPNVAVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	
<b>D</b> →	Maroc_-F_-	MTRVAILTFL	FLLPNVAVACQ	IHWGNLSKIG	IVGTGSASYK	VMTRPSHQTL	VIKLMPNITA	

		..... ..... ..... ..... ..... .....	65	75	85	95	105	115
					*			
<b>A</b> →	CI - F_CDS	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVKPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
<b>B</b> →	EU267273_-	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVKPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	EU267274_-	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	HQ197753_-	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFV	GAVLAGVALG	
	JF939201_-	INNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	JX217850_-	INNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KC594074_-	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KJ867540_-	IDNCTKSEIS	KYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQAL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KJ867541_-	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPVQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KJ867544_-	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQAL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KM089830_-	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KR140086_-	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KR261605_-	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KR781449_-	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQAL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KR828814_-	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQAL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
	KT633939_-	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRLA	GAVLAGVALG	
	EU267273.1	IDNCTKSEIS	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVKPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
<b>C</b> →	KC594074.1	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	
<b>D</b> →	Maroc_-F_-	IDNCTKSEIA	EYKRLITVL	KPVEDALSVI	TKNVRPIQTL	TPGRRTRRFA	GAVLAGVALG	



b. Détermination des facteurs du système immunitaire influençant la différence de virulence *in vivo* en utilisant l'approche multi-omique

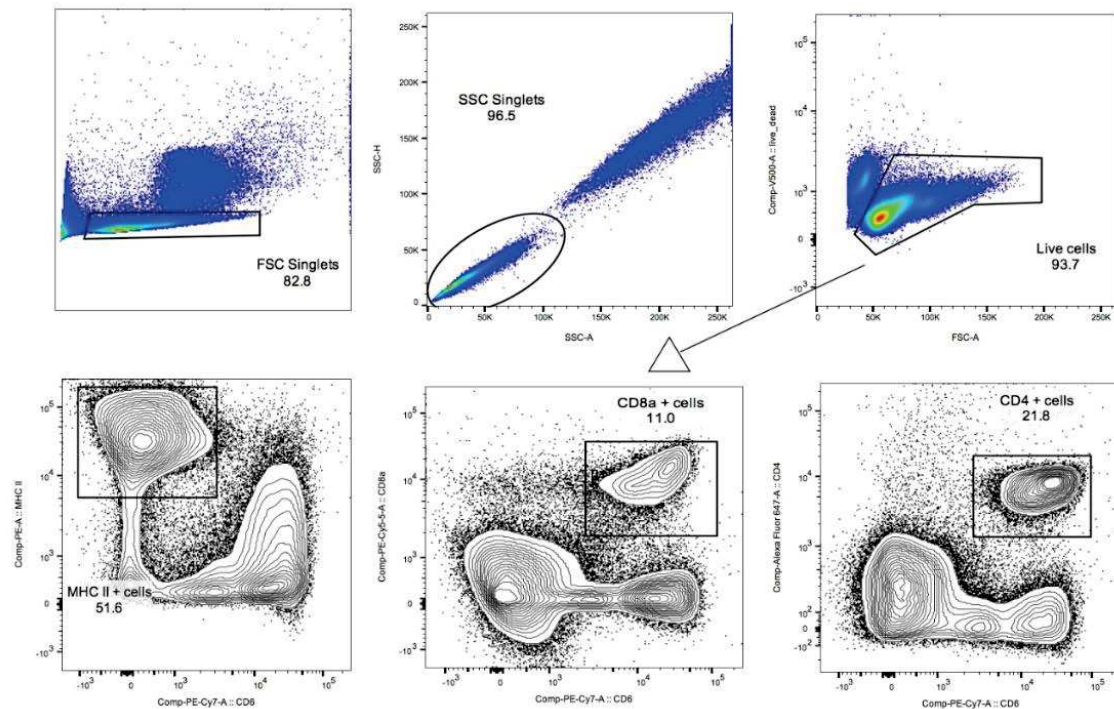
Suite à l'analyse de la pathologie induite par la vaccination ou par l'infection des chèvres Saanen, les PBMCs ont été collectées à différents temps pour l'analyse multi-omique incluant la cytométrie en flux, le séquençage de l'ARN et l'analyse de l'expression des protéines.

La dynamique et le taux d'infection de différentes sous populations de PBMCs ont été analysés par cytométrie en flux. La stratégie de sélection des différentes sous populations est donnée dans la **Figure 19**. Cette stratégie comprend dans un premier temps, l'exclusion des doublets de cellules (sélection des *FSC singlets* puis des *SSC singlets*) suivi de la sélection des cellules vivantes (négatives pour le marquage 7AAD).

Les anticorps ciblant les marqueurs suivants ont été utilisés pour analyser les sous-populations de PBMCs : CD6 (Clone BAQ91A, Monoclonal Antibody Center, Washington State University, USA), CD4 (Clone GC50A, Monoclonal Antibody Center, Washington State University, USA), CD8a (Clone CACT130A, Monoclonal Antibody Center, Washington State University, USA) et MHCII (Clone H42A, Monoclonal Antibody Center, Washington State University, USA).

Ainsi, les cellules présentatrices d'antigènes (CD6-MHCII+), les lymphocytes T CD8 (CD6+CD8a+) et les lymphocytes T CD4 (CD6+CD4+) ont été sélectionnés pour l'analyse.

Le nombre absolu de cellules (nombre de lymphocytes de chaque sous-population) et le taux d'infection ont été évalués pour ces différentes sous-populations à différents temps au cours de l'expérience. Le taux d'infection a été déterminé par marquage intracellulaire à l'aide d'un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement la protéine virale N du PPRV (clone 38-4, CIRAD, Montpellier, France).



**Figure 19. Stratégie de sélection et d'évaluation du pourcentage des sous-populations de PBMCs.** L'exclusion des doublets cellulaires a été effectuée en sélectionnant les singlets *FSC* et *SSC*. Les cellules vivantes (*Live cells*) ont été sélectionnées par l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. Parmi celles-ci, nous avons distingué les cellules présentatrices d'antigènes ou CPA (*CD6-MHCII+*), les lymphocytes T cytotoxiques (*CD6+CD8a+*) et auxiliaires (*CD6+CD4+*).

L'analyse par cytométrie en flux a été suivie du séquençage de l'ARNm. L'ARN total a été extrait des PBMCs de chèvre en utilisant le protocole détaillé dans Eloiflin et al. (2021). En bref, les cellules ont été lysées à l'aide du TRIZOL (Invitrogen) et une phase aqueuse a été obtenue en ajoutant du Chloroforme:IAA (49:1, Sigma-Aldrich). Cette phase aqueuse a ensuite été transférée dans de l'éthanol à 75 % puis le mélange a été transféré dans une colonne d'isolement d'ARN (Nucleospin) placée dans un tube collecteur. Les autres étapes d'isolement de l'ARN ont été réalisées à l'aide du kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. La mesure de la qualité et de la concentration de l'ARN total obtenu ainsi que la préparation des bibliothèques ont été réalisées sur la plateforme de séquençage de nouvelle génération de l'Université de Berne (Suisse). Un score RQN (RNA Quality Number)  $\geq 8$  était requis pour passer à l'étape de séquençage, qui a été réalisée sur le NovaSeq6000.

Les lectures brutes de séquençage de chaque librairie ont été alignées au génome Ensembl du *Capra hircus* (ARS1 GCF\_001704415.1) et au génome du PPRV (GCF\_000866445.1\_ViralProj15499). Ces alignements ont été utilisés pour obtenir des tableaux de comptage (contenant le nombre de lectures par gène) qui ont été analysés à l'aide du progiciel DESeq2 du logiciel R (v.3.6.3).

Les gènes exprimés de manière différentielle (DEGs) entre les conditions ont été déterminés en fixant un taux de fausse découverte (FDR) inférieur à 0,05 et une valeur absolue du log2 Fold Change supérieure à 1. Les DEGs ont été obtenus en comparant les données au jour 0 de chaque groupe. Ainsi, les données du jour 3, 7 et 12 correspondent aux comparaisons entre les données obtenues à ces jours et celles du jour 0. Les listes de DEGs ont été classées sur la base des p values ajustées (FDR) pour une analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (*Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) (Subramanian *et al.* 2005) avec les modules transcriptionnels du sang (*Blood transcriptional Module*, BTMs) de chèvres. Les BTMs représentent des ensembles de gènes créés sur la base d'un niveau élevé d'interactions identifiées *ex vivo* dans les PBMC humains (Li *et al.* 2014) et ont été précédemment adaptés pour une utilisation chez le mouton (Braun *et al.* 2018), le porc (Matthijs *et al.* 2019) et la chèvre (Eloiflin *et al.* 2021).

L'annotation des gènes qui composent les modules s'est basée soit sur les descriptions dans les données génomiques ENSEMBL des différentes espèces, soit sur l'homologie avec d'autres espèces, notamment les bovins, le porc, la souris et l'homme. Les homologies ont été obtenues à l'aide du logiciel Biomart accessible sur le site web de ENSEMBL. Ainsi, les BTMs ont été adaptés à la chèvre en remplaçant les gènes humains par leurs homologues caprins. Ces modules ont ensuite été classés en différentes familles en fonction de leurs activités relatives dans la réponse IFN de type I, l'inflammation, les cellules myéloïdes, les cellules dendritiques et la présentation des antigènes, les cellules T et NK, les cellules B et le cycle cellulaire (Braun *et al.* 2018). Les détails des différentes familles sont donnés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Familles correspondant aux différents BTMs. Les BTMs de la chèvre ont été classés en fonction de leur activité dans les différentes familles.

Familles	BTM	Familles	BTM	Familles	BTM
IFN-1	VIRAL SENSING & IMMUNITY, IRF2 TARGETS NETWORK (I) (M111.0)	Cellules myéloïdes	ENRICHED IN MONOCYTES (II) (M11.0)	Cellules NK/T	DOUBLE POSITIVE THYMOCYTES (M126)
	VIRAL SENSING & IMMUNITY, IRF2 TARGETS NETWORK (II) (M111.1)		ENRICHED IN MONOCYTES (IV) (M118.0)		T CELL DIFFERENTIATION (M14)
	TYPE I INTERFERON RESPONSE (M127)		ENRICHED IN MONOCYTES (SURFACE) (M118.1)		ENRICHED IN NK/NK/T cells CELLS (III) (M157)
	INNATE ACTIVATION BY CYTOSOLIC DNA SENSING (M13)		ENRICHED IN NEUTROPHILS (II) (M163)		T CELL DIFFERENTIATION VIA ITR AND PKC (M18)
	INNATE ANTIVIRAL RESPONSE (M150)		RA, WNT, CSF RECEPTORS NETWORK (MONOCYTES) (M23)		T CELL DIFFERENTIATION (TH2) (M19)
	INTERFERON ALPHA RESPONSE (I) (M158.0)		TLR8-BAFF NETWORK (M25)		ENRICHED IN T CELLS (II) (M223)
	INTERFERON ALPHA RESPONSE (II) (M158.1)		ENRICHED IN NEUTROPHILS (I) (M37.1)		SIGNALING IN T CELLS (I) (M35.0)
	TBA (M32.6)		ENRICHED IN MONOCYTES (I) (M4.15)		SIGNALING IN T CELLS (II) (M35.1)
	RIG-1 LIKE RECEPTOR SIGNALING (M68)		MYELOID CELL ENRICHED RECEPTORS AND TRANSPORTERS (M4.3)		T CELL SURFACE, ACTIVATION (M56)
	ANTIVIRAL IFN SIGNATURE (M75)		MYELOID, DENDRITIC CELLS ACTIVATION VIA NFkB (II) (M43.1)		MITOTIC CELL CYCLE IN STIMULATED CD4 T CELLS (M4.11)
Inflammation	INTEGRIN CELL SURFACE INTERACTIONS (I) (M1.0)	DC/Présentation antigénique	ENRICHED IN MONOCYTES (III) (M73)	Cycle cellulaire	MITOTIC CELL CYCLE IN STIMULATED CD4 T CELLS (M4.5)
	INTEGRIN CELL SURFACE INTERACTIONS (II) (M1.1)		MYELOID CELL CYTOKINES, METALLOPEPTIDASES AND LAMININS (M78)		CELL DIVISION IN STIMULATED CD4 T CELLS (M4.6)
	MAPK, RAS SIGNALLING (M100)		ENRICHED IN MYELOID CELLS AND MONOCYTES (M81)		T CELL SIGNALING AND COSTIMULATION (M44)
	RECEPTORS, CELL MIGRATION (M109)		TRANSMEMBRANE TRANSPORT (I) (M87)		CELL DIVISION IN STIMULATED CD4+ T CELLS (M46)
	BLOOD COAGULATION (M11.1)		MONOCYTE SURFACE SIGNATURE (S4)		T CELL ACTIVATION AND SIGNALING (M5.1)
	FORMYL PEPTIDE RECEPTOR MEDIATED NEUTROPHIL RESPONSE (M11.2)		ENRICHED IN ACTIVATED DENDRITIC CELLS (I) (M119)		T CELL ACTIVATION (IV) (M5.2)
	COMPLEMENT ACTIVATION (I) (M112.0)		CD28 COSTIMULATION (M12)		ENRICHED IN NK/NK/T cells CELLS (KIR CLUSTER) (M61.0)
	COMPLEMENT ACTIVATION (II) (M112.1)		LYSOSOMAL/ENDOSOMAL PROTEINS (M139)		ENRICHED IN NK/NK/T cells CELLS (RECEPTOR ACTIVATION) (M61.2)
	CYTOKINES - RECEPTORS CLUSTER (M115)		MHC-TLR7-TLR8 CLUSTER (M146)		IL2, IL7, TCR NETWORK (M65)
	CELL ADHESION (CO) (M117)		ENRICHED IN ACTIVATED DENDRITIC CELLS (II) (M165)		ENRICHED IN T CELLS (I) (M7.0)
Inflammation	ENRICHED FOR CELL MIGRATION (M122)	Cellules B	ENRICHED IN DENDRITIC CELLS (M168)	Cycle cellulaire	T CELL ACTIVATION (I) (M7.1)
	RECRUITMENT OF NEUTROPHILS (M132)		ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION (M200)		ENRICHED IN NK/NK/T cells CELLS (I) (M7.2)
	EXTRACELLULAR MATRIX, COMPLEMENT (M140)		LYSOSOME (M209)		T CELL ACTIVATION (II) (M7.3)
	G PROTEIN MEDIATED CALCIUM SIGNALING (M159)		PROTEASOME (M226)		T CELL ACTIVATION (III) (M7.4)
	TLR AND INFLAMMATORY SIGNALING (M16)		ANTIGEN PRESENTATION (LIPIDS AND PROTEINS) (M28)		T CELL SURFACE SIGNATURE (S0)
	LEUKOCYTE DIFFERENTIATION (M160)		COMPLEMENT AND OTHER RECEPTORS IN DCS (M40)		NK/NK/T cells CELL SURFACE SIGNATURE (S1) NA (S12)
	TBA (M192)		REGULATION OF ANTIGEN PRESENTATION AND IMMUNE RESPONSE (M5.0)		CD4 T CELL SURFACE SIGNATURE TH1-STIMULATED (S6)
	PLATELET ACTIVATION - ACTIN BINDING (M196)		CD1 AND OTHER DC RECEPTORS (M50)		CD4 T CELL SURFACE SIGNATURE TH2-STIMULATED (S7)
	PLATELET ACTIVATION & BLOOD COAGULATION (M199)		ENRICHED IN ACTIVATED DENDRITIC CELLS/MONOCYTES (M64)		E2F1 TARGETS (Q3) (M10.0)
	EXTRACELLULAR MATRIX (I) (M2.0)		ACTIVATED DENDRITIC CELLS (M67)		E2F1 TARGETS (Q4) (M10.1)
EXTRACELLULAR MATRIX (II) (M2.1)	ENRICHED IN ANTIGEN PRESENTATION (I) (M71)	CELL CYCLE (III) (M10.3)			
CELL ADHESION (LYMPHOCYTE HOMING) (M21)	ENRICHED IN ANTIGEN PRESENTATION (II) (M95.0)	NUCLEAR PORE COMPLEX (M106.0)			
CELL ACTIVATION (IL15, IL-23, TNF) (M24)	RESTING DENDRITIC CELL SURFACE SIGNATURE (S10)	NUCLEAR PORE COMPLEX (MITOSIS) (M106.1)			
CHEMOKINE CLUSTER (I) (M27.0)	ACTIVATED (LPS) DENDRITIC CELL SURFACE SIGNATURE (S11)	NUCLEAR PORE, TRANSPORT MRNA SPLICING, PROCESSING (M143)			
CHEMOKINE CLUSTER (II) (M27.1)	DC SURFACE SIGNATURE (S5)	CELL CYCLE, ATP BINDING (M144)			
PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND CHEMOKINES (M29)	ENRICHED IN B CELL DIFFERENTIATION (M123)	CYTOSKELETON/ACTIN (SRF TRANSCRIPTION TARGETS) (M145.0)			
CELL MOVEMENT, ADHESION & PLATELET ACTIVATION (M30)	TBA (SOURCE: B CELLS) (M152.0)	CYTOSKELETON/ACTIN (SRF TRANSCRIPTION TARGETS) (M145.1)			
PLATELET ACTIVATION (I) (M32.0)	TBA (SOURCE: NAIVE B CELLS) (M152.1)	RAN MEDIATED MITOSIS (M15)			
PLATELET ACTIVATION (II) (M32.1)	TBA (SOURCE: MEMORY B CELLS) (M152.2)	ENRICHED IN CELL CYCLE (M167)			
CORO1A-DEF6 NETWORK (I) (M32.2)	PLASMA CELLS & B CELLS, IMMUNOGLOBULINS (M156.0)	MITOSIS (TF MOTIF CCAATTNSNNGCC) (M169)			
INFLAMMATORY RESPONSE (M33)	PLASMA CELLS, IMMUNOGLOBULINS (M156.1)	NUCLEOTIDE METABOLISM (M181)			
IMMUNE ACTIVATION - GENERIC CLUSTER (M37.0)	TBA (SOURCE: B CELLS) (M217)	AP-1 TRANSCRIPTION FACTOR NETWORK (M20)			
ENDOPLASMIC RETICULUM (M37.2)	ENRICHED IN B CELLS (I) (M47.0)	MISMATCH REPAIR (I) (M22.0)			
CELL DIVISION (M37.3)	ENRICHED IN B CELLS (II) (M47.1)	MISMATCH REPAIR (II) (M22.1)			
CHEMOKINES AND RECEPTORS (M38)	ENRICHED IN B CELLS (III) (M47.2)	CELL CYCLE, MITOTIC PHASE (M230)			
INTEGRIN MEDIATED LEUKOCYTE MIGRATION (M39)	ENRICHED IN B CELLS (IV) (M47.3)	SPLICEOSOME (M250)			
PLATELET ACTIVATION (III) (M42)	ENRICHED IN B CELLS (V) (M47.4)	CELL CYCLE AND GROWTH ARREST (M31)			
MYELOID, DENDRITIC CELLS ACTIVATION VIA NFkB (I) (M43.0)	BCR SIGNALING (M54)	CORO1A-DEF6 NETWORK (I) (M32.2)			
MYELOID, DENDRITIC CELLS ACTIVATION VIA NFkB (II) (M43.1)	IMMUNOREGULATION - MONOCYTES, T AND B CELLS (M57)	CELL DIVISION (M37.3)			
LEUKOCYTE ACTIVATION AND MIGRATION (M45)	B CELL DEVELOPMENT/ACTIVATION (M58)	CELL CYCLE AND TRANSCRIPTION (M4.0)			
INFLAMMASOME RECEPTORS AND SIGNALING (M53)	ENRICHED IN B CELLS (VI) (M69)	CELL CYCLE (I) (M4.1)			
MITOTIC CELL DIVISION (M59)	ENRICHED IN NAIVE AND MEMORY B CELLS (M83)	CELL CYCLE (II) (M4.10)			
PLATELET ACTIVATION AND DEGRANULATION (M85)	B CELL DEVELOPMENT (M9)	C-MYC TRANSCRIPTIONAL NETWORK (M4.12)			
CHEMOKINES AND INFLAMMATORY MOLECULES IN MYELOID CELLS (M86.0)	B CELL SURFACE SIGNATURE (S2)	PLK1 SIGNALING EVENTS (M4.2)			
PROINFLAMMATORY DENDRITIC CELL, MYELOID CELL RESPONSE (M86.1)	PLASMA CELL SURFACE SIGNATURE (S3)	MITOTIC CELL CYCLE - DNA REPLICATION (M4.4)			
LEUKOCYTE MIGRATION (M88.0)	NAIVE B CELL SURFACE SIGNATURE (S8)	MITOTIC CELL CYCLE (M4.7)			
ADHESION AND MIGRATION, CHEMOTAXIS (M91)	MEMORY B CELL SURFACE SIGNATURE (S9)	CELL DIVISION - E2F TRANSCRIPTION NETWORK (M4.8)			
		MITOTIC CELL CYCLE IN STIMULATED CD4 T CELLS (M4.9)			
		LYMPHOCYTE GENERIC CLUSTER (M6)			
		DNA REPAIR (M76)			
		E2F TRANSCRIPTION FACTOR NETWORK (M8)			

Les protéines accumulées pendant la vaccination ou les infections ont été analysées par spectrométrie de masse. Le protocole utilisé pour le traitement des échantillons *in vitro* (Eloiflin *et al.* 2021) a été appliqué aux échantillons *in vivo*.

Brièvement, les PBMC recueillies à différents moments ont été lysées par application d'un tampon DIGE composé de 7M urée, 2 M thiourée, 4% de CHAPS et 30 mM TrisHCL. En plus de la lyse, ce tampon permet de conserver la structure des protéines intacte. La quantité de protéines obtenue a été évaluée à l'aide d'un gel 2D et d'un test colorimétrique.

Les échantillons ont ensuite été transférés sur la plateforme de protéomique fonctionnelle (FPP, Montpellier, France) pour être digérés à la trypsine et analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS). Le taux maximal de fausses découvertes (FDR) de peptides et de protéines a été fixé à 0,5. L'interaction entre les protéines significativement différentes entre les conditions a été prédite en utilisant la base de données STRING (*functional protein association networks*).

### ii. Evaluation de la dynamique et de l'infection des sous populations de lymphocytes T et des CPA

L'analyse par cytométrie en flux de l'évolution et du taux d'infection des sous-populations ciblées au cours de l'expérience a montré que ni la vaccination ni l'inoculation du témoin n'ont induit de changement dans le nombre ou la présence de virus dans ces populations cellulaires (**Figure 20, partie 1 A, B**). L'infection par la souche IC89 induit une baisse significative du nombre de cellules T CD6+ CD4+. Cette variation est observable entre le jour 6 et le jour 8 après infection, mais aucune des sous populations n'a été positive pour la présence du virus (**Figure 20, partie 2 C**).

L'infection par la souche MA08 a entraîné une forte diminution du nombre de toutes les sous-populations lymphocytaires. Cette diminution est fortement marquée pour les cellules T CD4. Cette population cellulaire présente également un niveau d'infection croissant. La protéine virale N est détectée lorsque le nombre de cellules est faible. Différents niveaux d'infection des différentes sous-populations sont observés. En effet, les cellules T CD4 sont plus infectées que les CPA qui sont elles-mêmes plus infectées que les cellules T CD8 (**Figure 20, partie 2 D**).

### iii. Biologie des systèmes impliqués dans les réponses des cellules immunitaires au cours des infections

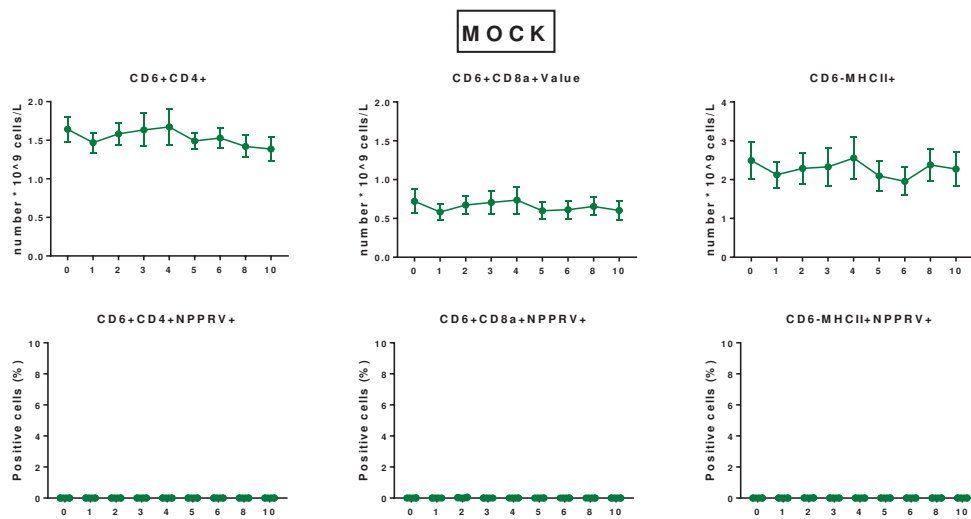
---

L'analyse de l'expression de l'ARNm des PBMCs a, dans un premier temps, révélé la présence des gènes viraux. La détection des ARN viraux a été constatée dès le 3ème jour dans les échantillons prélevés chez les animaux infectés par la souche MA08 et a été plus importante au 7ème jour pour décroître au 12ème jour après l'infection. Les animaux vaccinés (jour 7) ou infectés par la souche IC89 (jours 7 et 12) ont présenté un très faible nombre de lecture sur les gènes viraux. Le nombre de lectures observé au jour 7 dans les PBMCs collectées chez les animaux infectés par la souche MA08 est statistiquement plus élevé que celui observé dans les autres groupes (**Figure 21**).

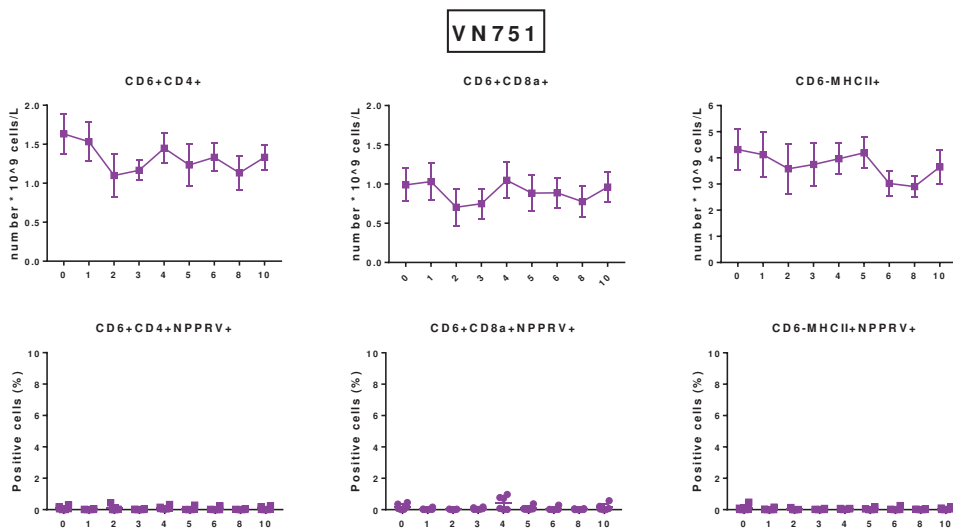
Pour mieux comprendre les différences dans l'induction des réponses immunitaires entre les souches, les données obtenues à partir du séquençage de l'ARNm de l'hôte (*Capra hircus*) ont été utilisées pour déterminer les gènes différentiellement exprimés (DEG) aux jours 3, 7 et 12 par rapport au jour 0 chez les animaux vaccinés ou infectés. Ensuite, l'analyse GSEA à partir des BTMs de la chèvre et des listes de DEGs obtenus nous a permis de déterminer l'état d'activation des différents modules liés aux familles de BTMs (cf. **Tableau 2**).



A



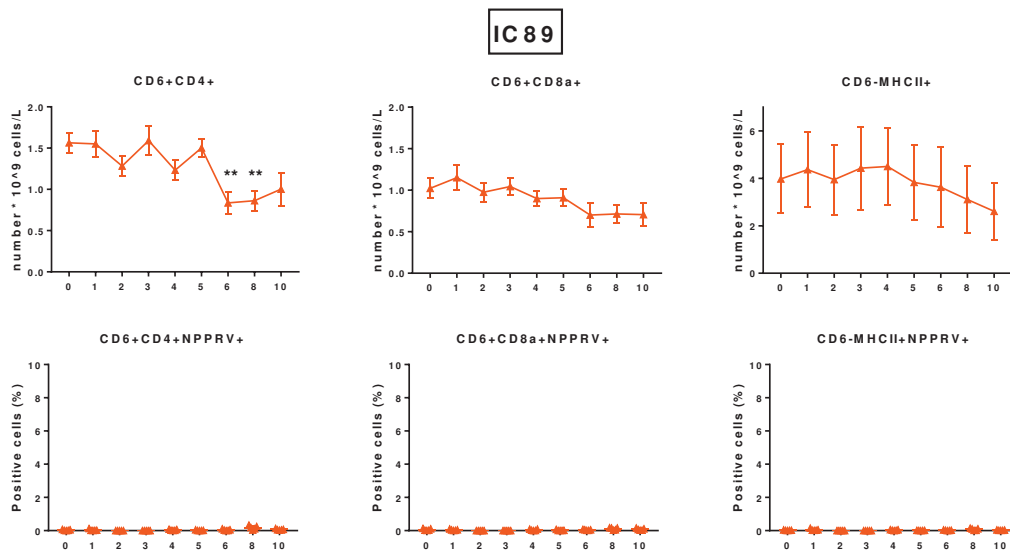
B



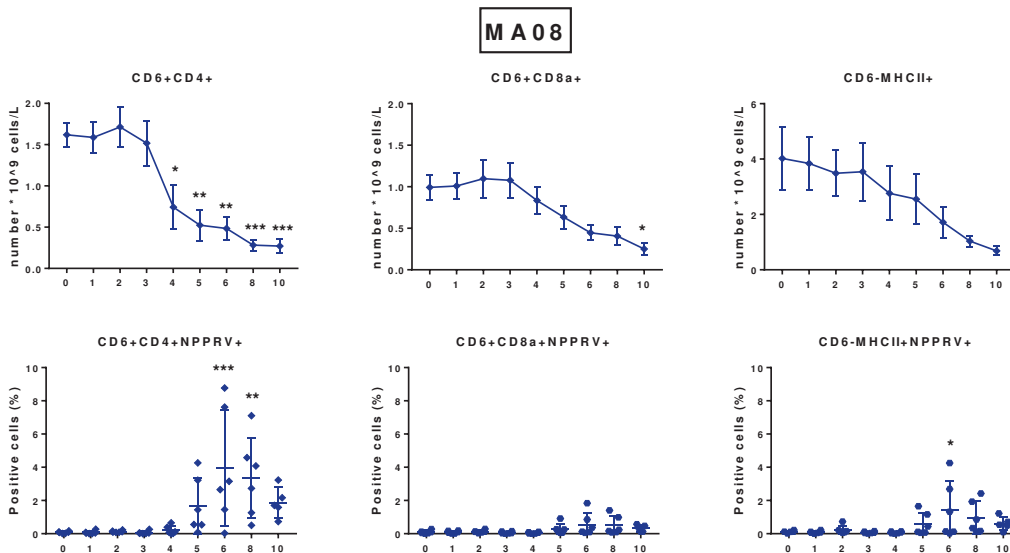
**Figure 20. (Partie 1) Dynamique et taux d'infection des sous-populations lymphocytaires et des CPA au cours de l'expérience.** Les PBMCs collectées à la suite de l'inoculation avec le témoin (A), de la vaccination par la souche vaccinale PPRV VN751 (B) ont été analysées pour la variation des populations de CPA (CD6-MHCII+), de cellules TCD4 (CD6+CD4+) et CD8 (CD6+CD8a+). Le niveau d'infection des cellules a été déterminé par le marquage de la présence de la nucléoprotéine du PPRV (NPPRV+). Les p values ont été calculées en comparant les jours 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 au jour 0 et en utilisant le test de comparaison multiple de dunnett (ANOVA unidirectionnelle) avec une seule variance groupée. "\*" = p values < 0.05; "\*\*" = p values < 0.01; "\*\*\*" = p values < 0.001.



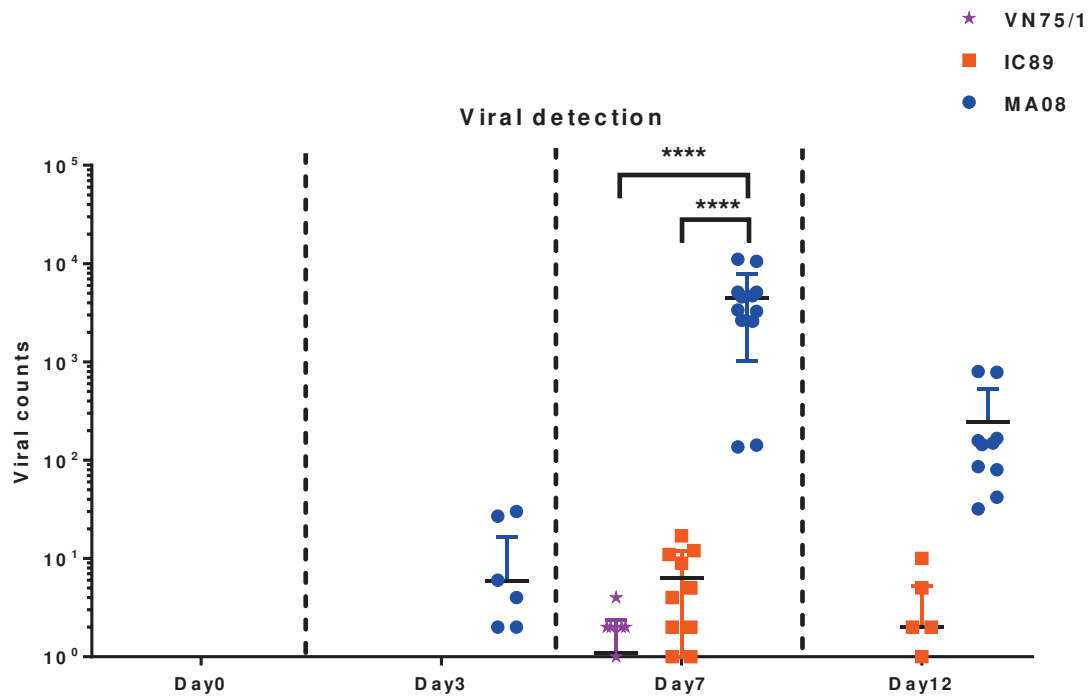
C



D

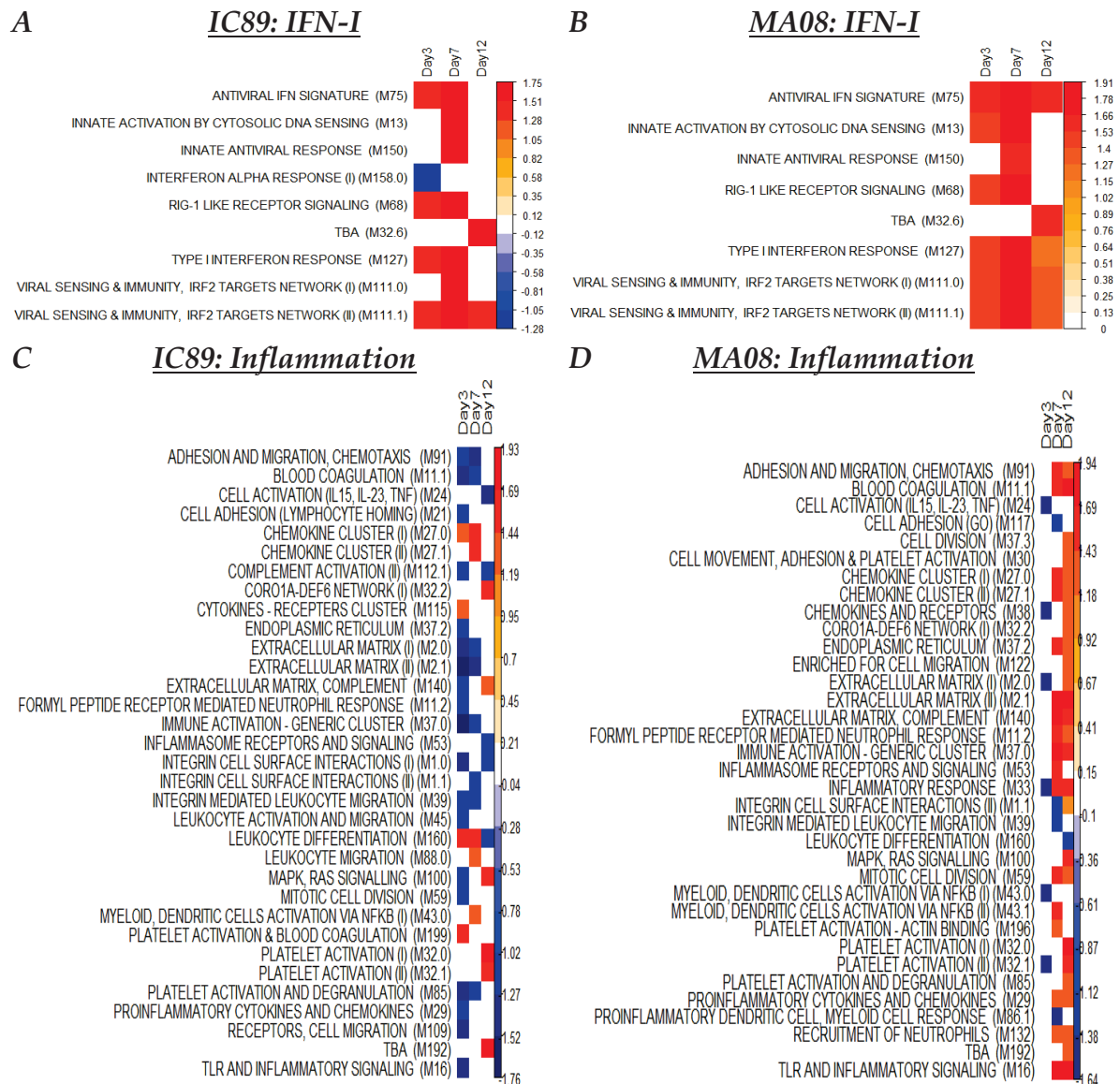


**Figure 20. (Partie 2) Dynamique et taux d'infection des sous-populations lymphocytaires et des CPA au cours de l'expérience.** Les PBMCs collectées à la suite de l'infection par la souche PPRV IC89 (C) ou par la souche PPRV MA08 (D) ont été analysées pour la variation des populations de CPA (CD6-MHCII+), de cellules TCD4 (CD6+CD4+) et CD8 (CD6+CD8a+). Le niveau d'infection des cellules a été déterminé par le marquage de la présence de la nucléoprotéine du PPRV (NPPRV+). Les p values ont été calculées en comparant les jours 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 au jour 0 et en utilisant le test de comparaison multiple de dunnett (ANOVA unidirectionnelle) avec une seule variance groupée. "\*" = p values < 0.05; "\*\*\*" = p values < 0.01; "\*\*\*\*" = p values < 0.001.



**Figure 21. Détection du nombre de lectures virales dans les PBMCs collectées pendant l'expérience.** Les p values ont été calculées en utilisant une ANOVA bidirectionnelle. Les étoiles représentent les différences statistiques observées entre les groupes infectés et vaccinés. "\*\*\*\*" = Valeurs  $P < 0,001$ .

Les modules liés à la réponse IFN de type I apparaissent globalement activés et de manière plus précoce lors des infections par les souches IC89 et MA08 (Figure 22 A, B) plus tardive lors de la vaccination (Figure 26 A). Un plus grand nombre de modules liés à l'inflammation sont inactivés par l'infection avec la souche IC89, alors que ces modules montrent une activation générale entre les jours 7 et 12 lors de l'infection avec la souche MA08 (Figure 22 C, D). La vaccination induit l'activation d'un faible nombre de modules impliqués dans l'inflammation (Figure 26 B).

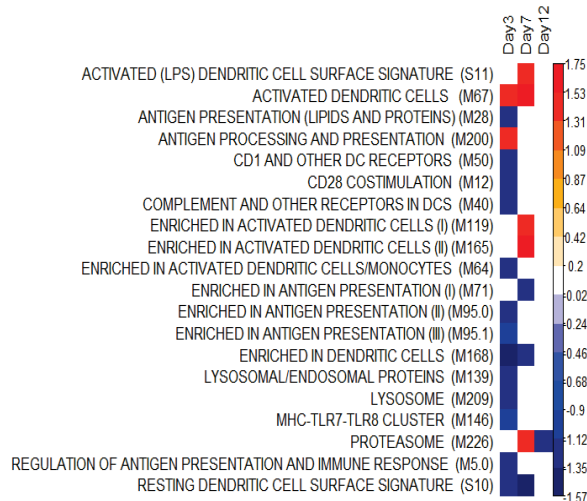


**Figure 22. Modules liés à l'interféron de type I et à l'inflammation, induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.** Les heatmaps montrent l'induction de l'activité des modules au jour 3 (jour 3 : jour 3 VS jour 0), au jour 7 (jour 7 : jour 7 VS jour 0) et au jour 12 (jour 12 : jour 12 VS jour 0). Les valeurs représentées sont les scores d'enrichissement normalisés (NES). Les modules activés (NES>0, orange à rouge) et inactivés (NES<0, bleu clair à bleu foncé) ont été sélectionnés en appliquant un taux de fausse découverte (FDR) de valeurs  $q < 0,5$ .

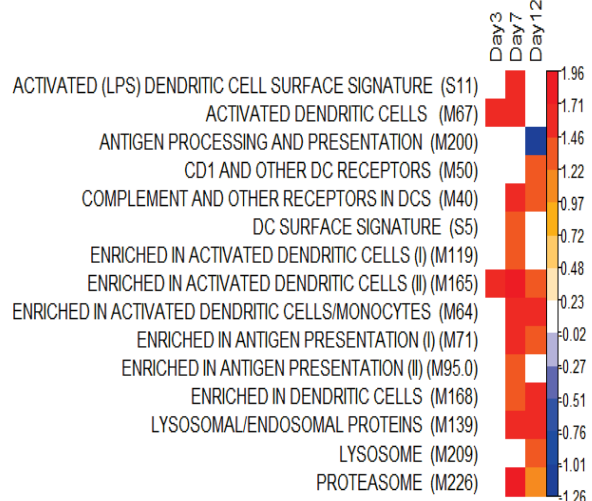
Les modules liés aux cellules myéloïdes, aux DC et à la présentation antigénique sont globalement inactivés au cours de l'infection par la souche IC89 avec certaines exceptions observées au jour 7 (chez les DC) et au jour 12 (chez les cellules myéloïdes) (Figure 23 A, C).

L'infection par la souche MA08 induit une activation générale de ces modules (Figure 23 B, D), cependant un module lié à la présentation antigénique (M200) a été inactivé au jour 12 et un autre lié aux cellules myéloïdes (M4.15) a été inactivé au jour 2. Un faible nombre de modules liés aux cellules myéloïdes et aux DC est activé au cours de la vaccination (Figure 26 C, D).

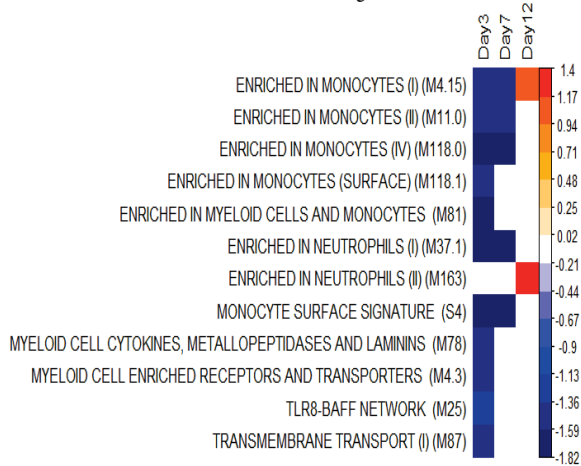
**A IC89: DC/Présentation Antigénique**



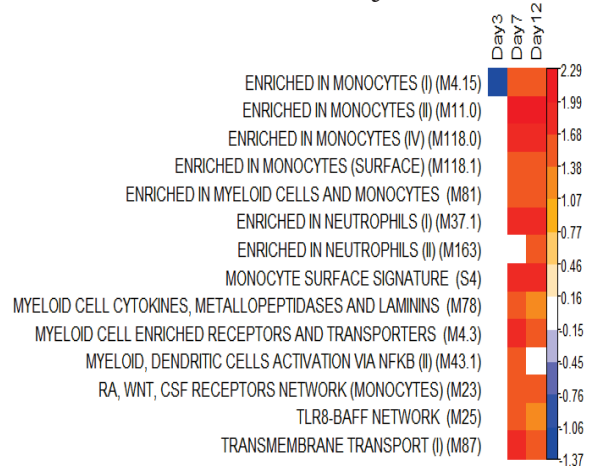
**B MA08: DC/Présentation Antigénique**



**C IC89: Cellules myéloïdes**

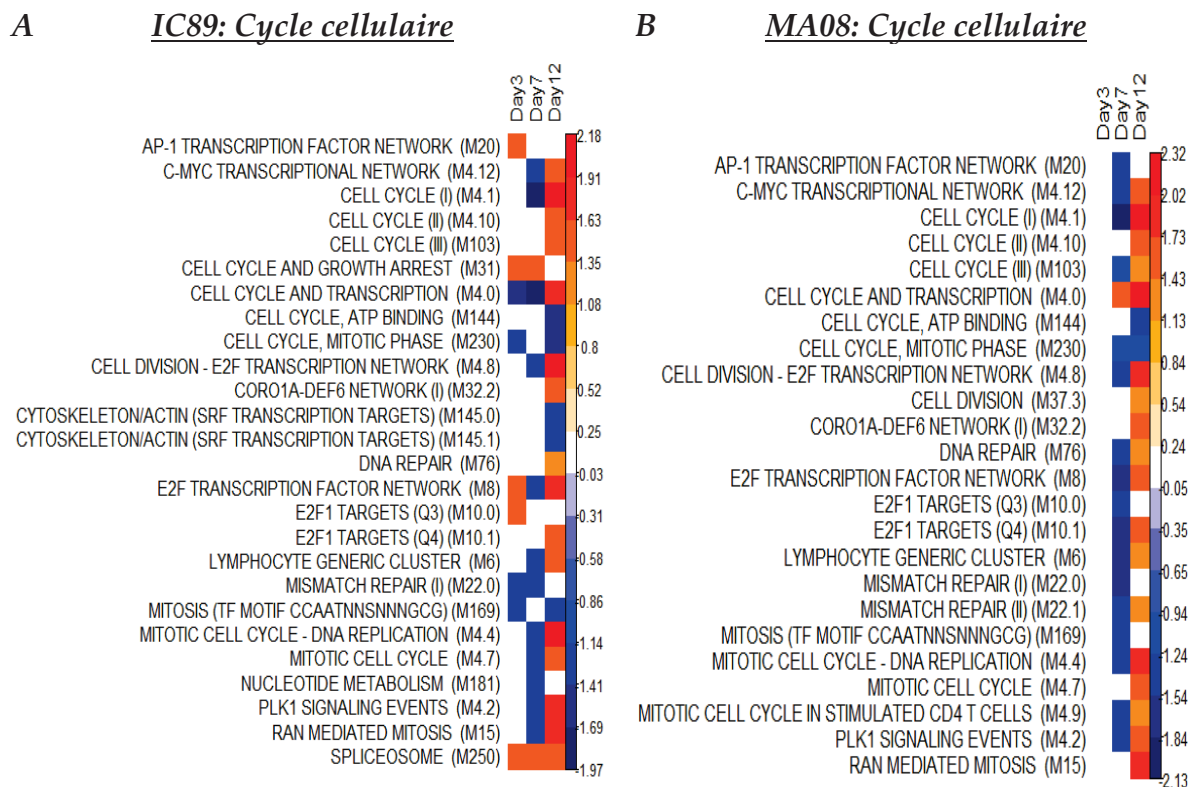


**D MA08: Cellules myéloïdes**



**Figure 23. Modules liés aux cellules myéloïdes, aux DC et à la présentation antigénique, induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.** Les heatmaps montrent l'induction de l'activité des modules au jour 3 (jour 3 : jour 3 VS jour 0), au jour 7 (jour 7 : jour 7 VS jour 0) et au jour 12 (jour 12 : jour 12 VS jour 0). Les valeurs représentées sont les scores d'enrichissement normalisés (NES). Les modules activés (NES>0, orange à rouge) et inactivés (NES<0, bleu clair à bleu foncé) ont été sélectionnés en appliquant un taux de fausse découverte (FDR) de valeurs q <0,5.

La plupart des modules liés au cycle cellulaires sont inactivés dans les premiers jours (jour 3 au jour 7) puis sont en majorité réactivés dans la phase tardive des infections par les souches IC89 et MA08 (Figure 24). La vaccination induit une activation précoce (jour 3) et tardive (jour 12) d'un faible nombre de modules liés au cycle cellulaire (Figure 26 G).

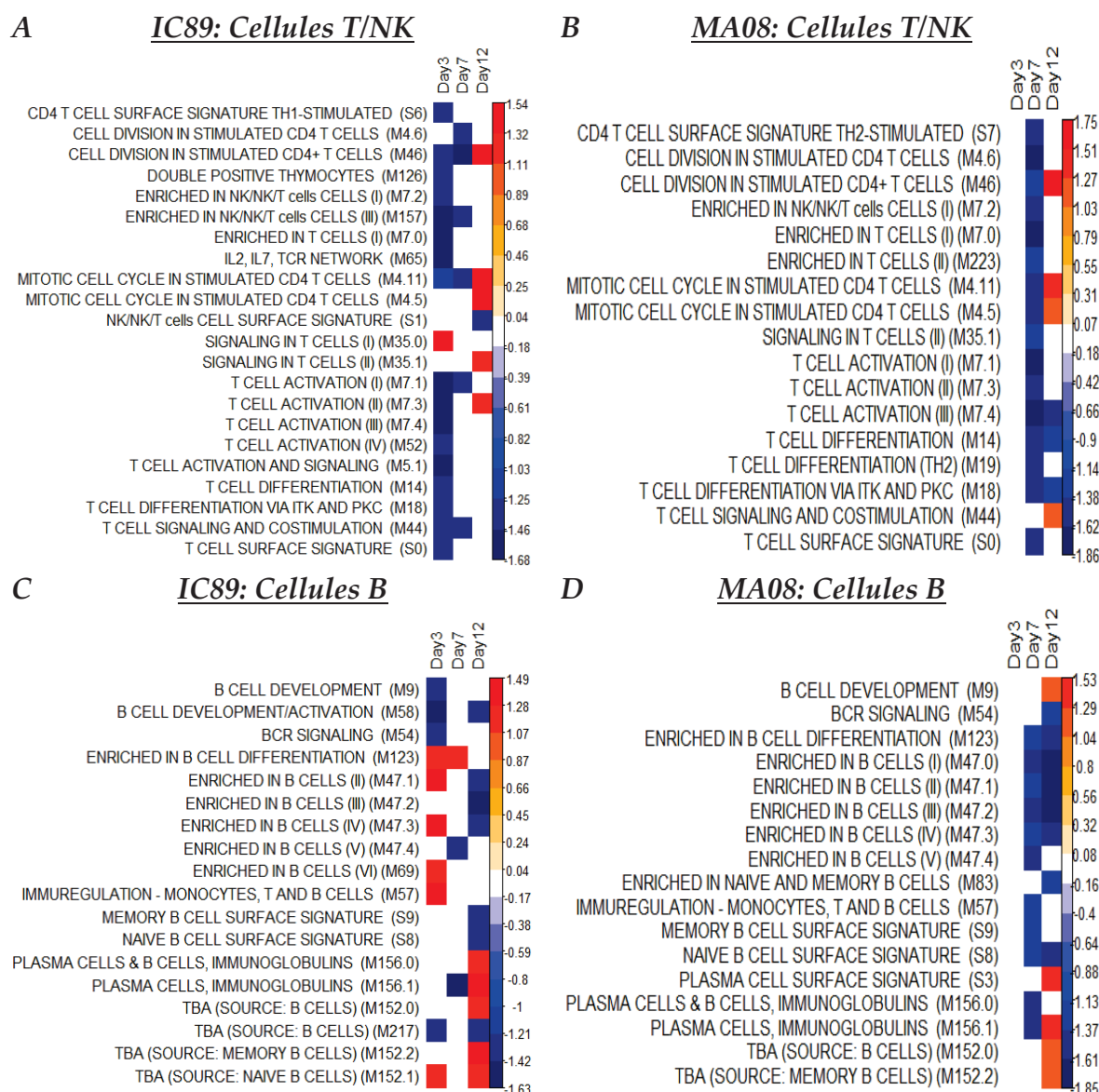


**Figure 24. Modules liés au cycle cellulaire induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.** Les heatmaps montrent l'induction de l'activité des modules au jour 3 (jour 3 : jour 3 VS jour 0), au jour 7 (jour 7 : jour 7 VS jour 0) et au jour 12 (jour 12 : jour 12 VS jour 0). Les valeurs représentées sont les scores d'enrichissement normalisés (NES). Les modules activés (NES>0, orange à rouge) et inactivés (NES<0, bleu clair à bleu foncé) ont été sélectionnés en appliquant un taux de fausse découverte (FDR) de valeurs q < 0,5.

L'infection par la souche IC89 induit une inactivation précoce des modules liés au cellules T/NK et de certains des modules liés aux cellules B. Certains de ces modules se réactivent tardivement au jour 12 (Figure 25 A, C). Lors de l'infection avec la souche MA08, les modules liés aux cellules T, NK et B sont inactivés au jour7, puis certains d'entre eux sont réactivés au jour 12.



Pour les cellules T, il s'agit des modules impliqués dans la division cellulaire des cellules CD4 et pour les cellules B, il s'agit des modules impliqués dans le développement des cellules B et des cellules plasmacytoïdes qui sont réactivés (Figure 25 B, D). La vaccination induit l'activation et l'inactivation d'un faible nombre de modules liés aux cellules T, NK et B (Figure 26 E, F).



**Figure 25. Modules liés aux cellules T, NK et B induits pendant l'infection par les souches IC89 et MA08.** Les heatmaps montrent l'induction de l'activité des modules au jour 3 (jour 3 : jour 3 VS jour 0), au jour 7 (jour 7 : jour 7 VS jour 0) et au jour 12 (jour 12 : jour 12 VS jour 0). Les valeurs représentées sont les scores d'enrichissement normalisés (NES). Les modules activés (NES>0, orange à rouge) et inactivés (NES<0, bleu clair à bleu foncé) ont été sélectionnés en appliquant un taux de fausse découverte (FDR) de valeurs q < 0,5.

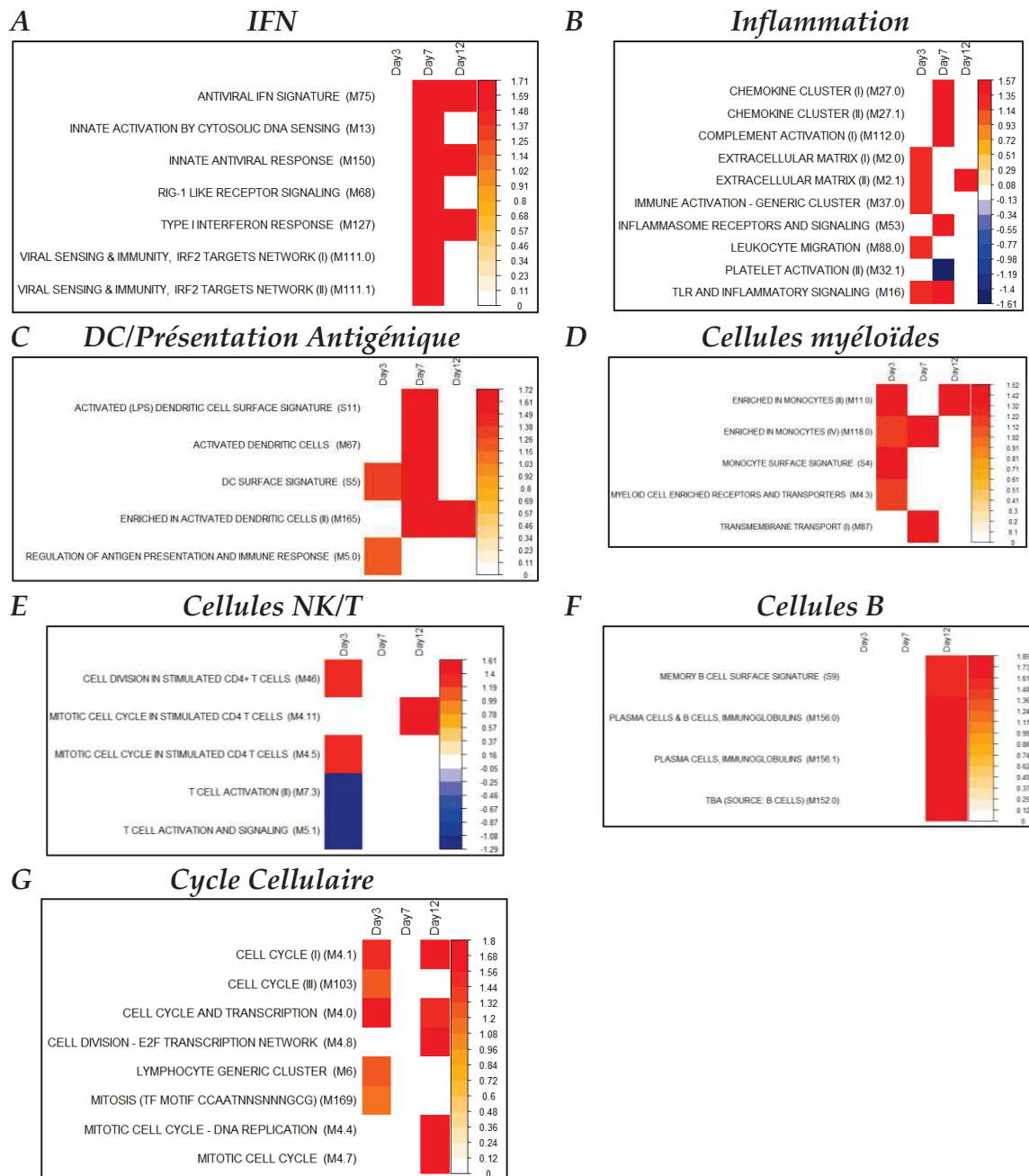
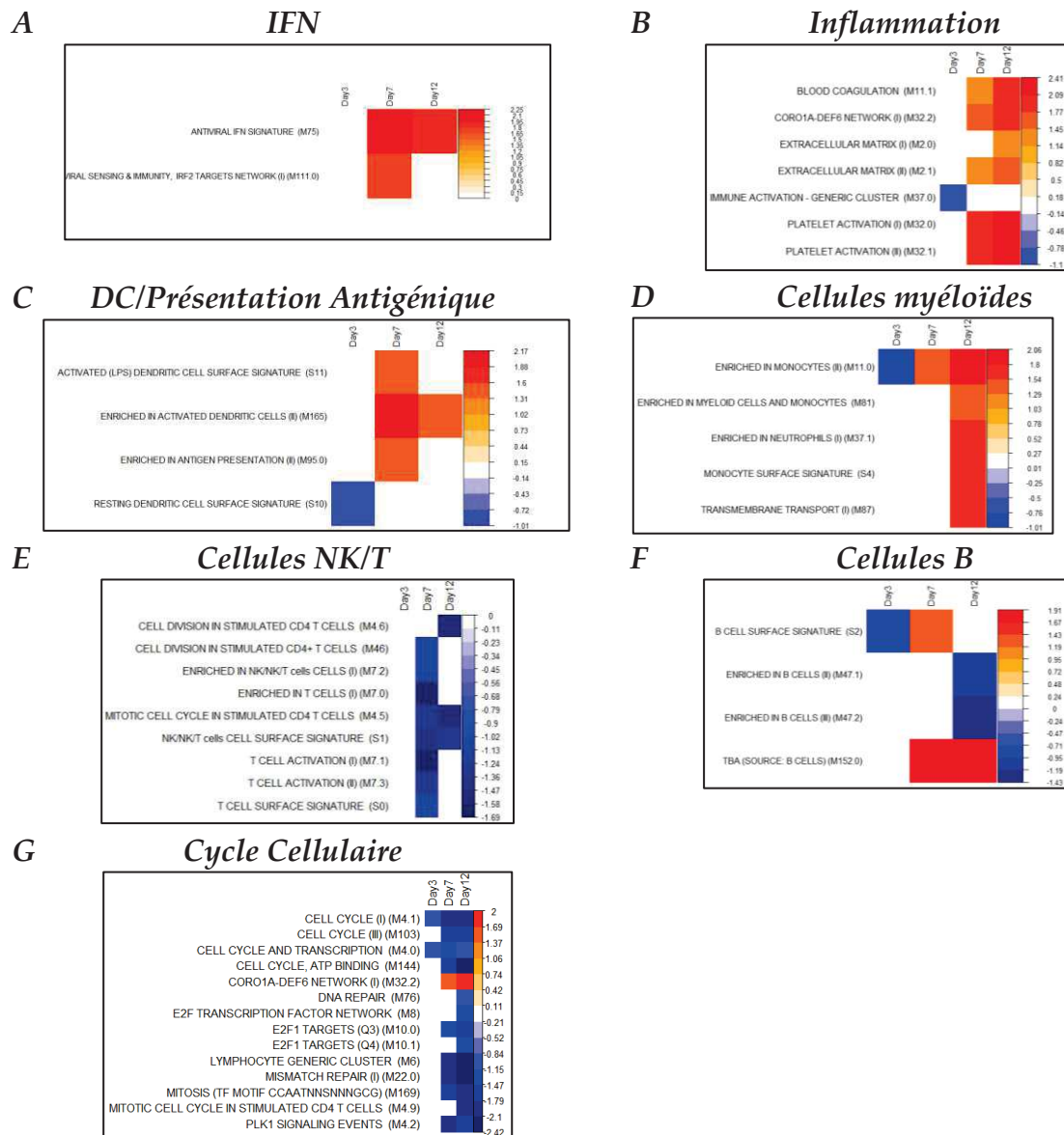


Figure 26. Modules liés aux différentes familles induites pendant la vaccination par la souche vaccinale PPRV Nigéria75/1. Les heatmaps montrent l'induction de l'activité des modules au jour 3 (jour 3 : jour 3 VS jour 0), au jour 7 (jour 7 : jour 7 VS jour 0) et au jour 12 (jour 12 : jour 12 VS jour 0). Les valeurs représentées sont les scores d'enrichissement normalisés (NES). Les modules activés (NES>0, orange à rouge) et inactivés (NES<0, bleu clair à bleu foncé) ont été sélectionnés en appliquant un taux de fausse découverte (FDR) de valeurs q <0,5.



L'inoculation par le témoin induit l'activation de plusieurs modules liés à l'IFN-I, à l'inflammation, aux cellules myéloïdes, aux DC et à la présentation antigénique. Les modules liés aux cellules T/NK et au cycle cellulaire sont généralement inactivés tandis que, les modules liés aux cellules B montrent une activation contrastée (Figure 27).

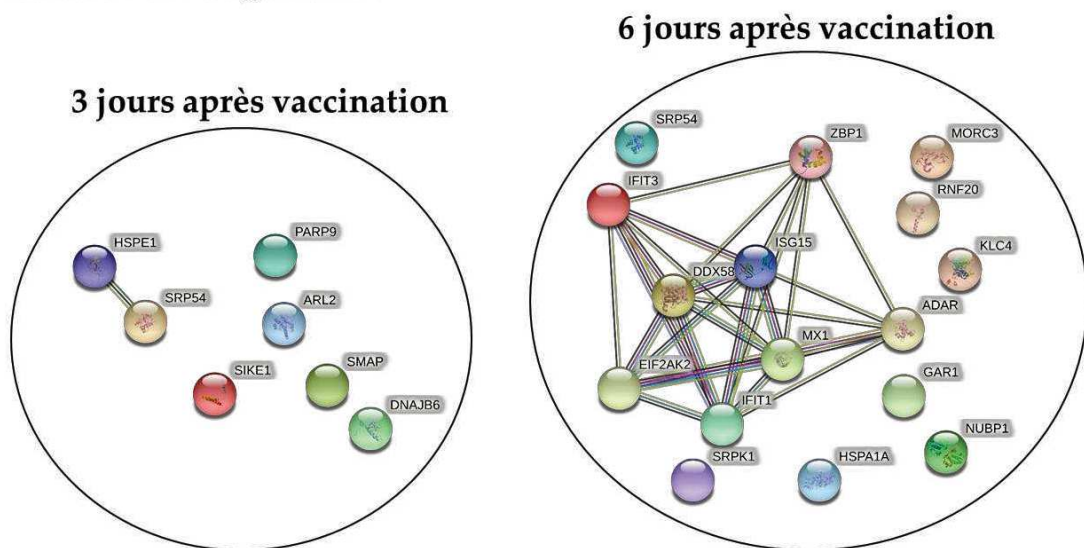


**Figure 27. Modules liés aux différentes familles induites après l'inoculation par le témoin.** Les heatmaps montrent l'induction de l'activité des modules au jour 3 (jour 3 : jour 3 VS jour 0), au jour 7 (jour 7 : jour 7 VS jour 0) et au jour 12 (jour 12 : jour 12 VS jour 0). Les valeurs représentées sont les scores d'enrichissement normalisés (NES). Les modules activés (NES>0, orange à rouge) et inactivés (NES<0, bleu clair à bleu foncé) ont été sélectionnés en appliquant un taux de fausse découverte (FDR) de valeurs q <0,5.

iv. Analyse de l'accumulation de protéines cellulaires au cours des infections

Certaines protéines synthétisées pendant la vaccination ou les infections des chèvres Saanen se sont accumulées de manière différentielle dans les PBMCs. Ces différences ont été détectées en utilisant une approche protéomique. Un petit nombre de protéines accumulées de manière différentielle (PDA) a été détecté dans les PBMC trois jours après la vaccination. Parmi celles-ci, seules les protéines HSPE1 et SRP54 présentent des interactions. Le nombre de PDA est plus important six jours après vaccination et plusieurs d'entre elles interagissent entre elles. Il s'agit des protéines de réponse stimulées par l'interféron de type I (ISG15, IFIT1, IFIT3, MX1, RIG-I (DDX58), ZBP1, EIF2AK2) et d'une protéine de liaison à l'ARN ADAR (**Figure 28**).

❖ *Vaccin PPRV Nigeria75/1*

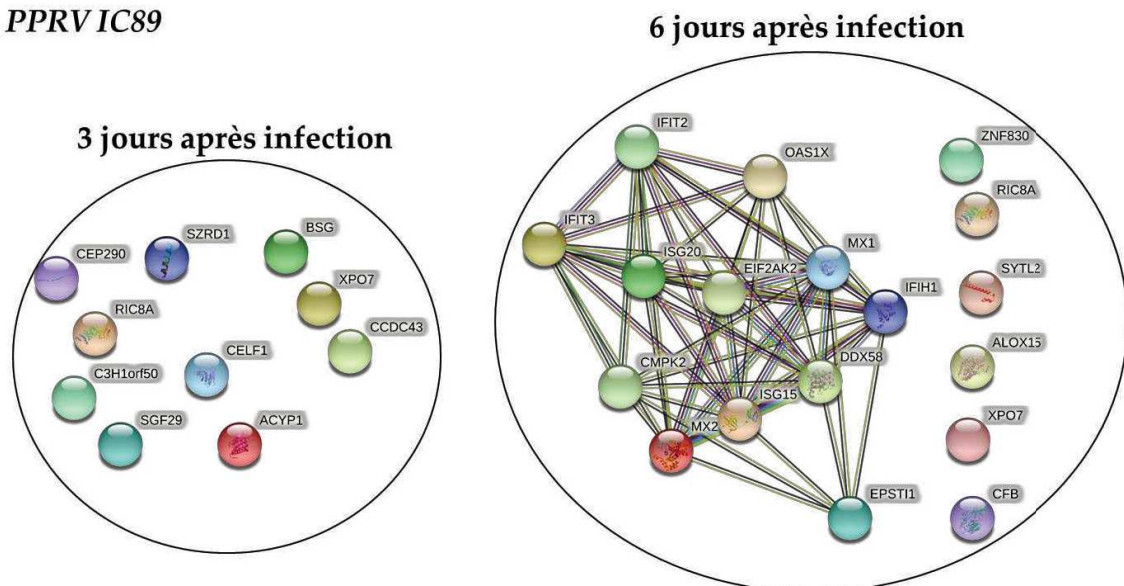


**Figure 28. Réseaux d'interactions protéines-protéines générés pendant la vaccination des chèvres Saanen.** Les données à 3 et 6 jours après vaccination ont été obtenues par comparaison aux cellules prélevées avant la vaccination. Chaque protéine est représentée par un cercle de couleur différente, choisi au hasard par le logiciel. La couleur d'une même protéine peut différer entre chaque analyse. Les couleurs des lignes entre les protéines déterminent le niveau d'interactions. Les interactions connues sont représentées par des lignes roses (déterminées expérimentalement) et bleues (provenant de bases de données validées). Les lignes vertes (extraction de texte), noires (co-expression) et grises (homologie des protéines) représentent les autres interactions.

Par comparaison avec la vaccination, une plus grande quantité de PDA est détectée trois jours après l'infection par la souche IC89. Cependant, ces protéines ne présentent pas d'interactions. Six jours après l'infection par la souche IC89, un réseau plus important de protéines de réponse de type IFN est observé. Il s'agit des protéines ISG15, ISG20, MX1, MX2, CMPK2, IFIT2, IFIT3, IFIH1, OAS1X, RIG-I (DDX58), EIF2AK2 et EPSTI1. Outre ce réseau principal, plusieurs autres PDA sont détectées mais ne présentent pas d'interactions (**Figure 29**).

L'infection avec la souche MA08 permet l'observation de deux réseaux PDA dès le troisième jour après l'infection (**Figure 30**).

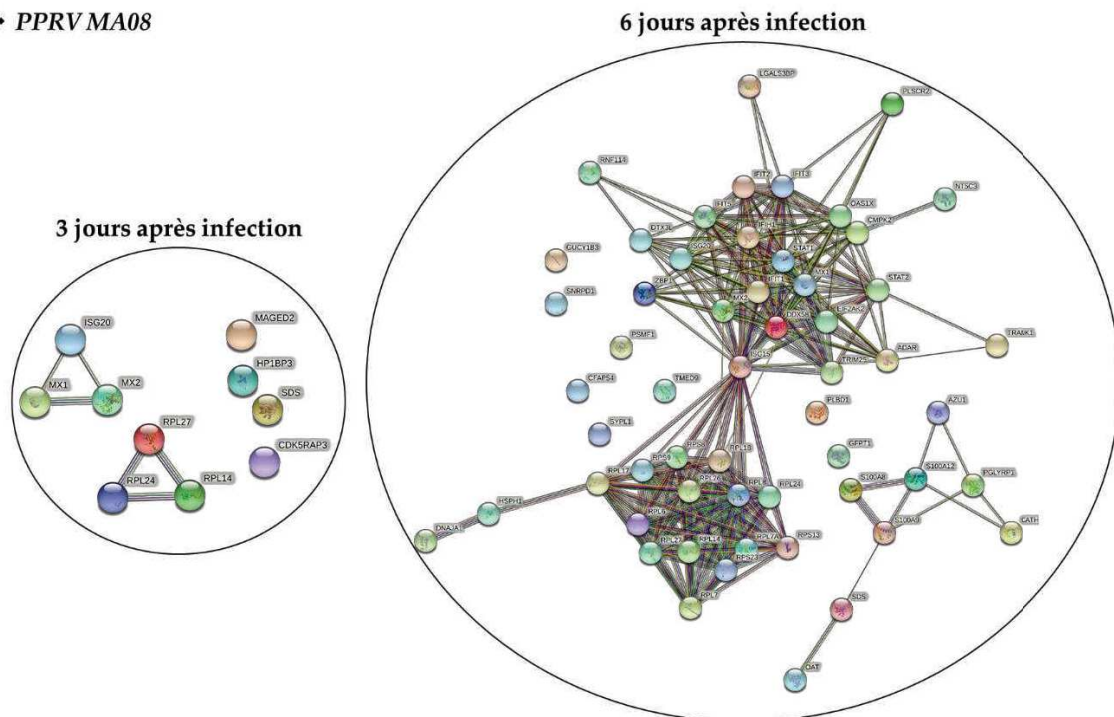
❖ *PPR VIC89*



**Figure 29. Réseaux d'interactions protéines-protéines générés après l'infection des chèvres Saanen par la souche IC89.** Les données à 3 et 6 jours après infection ont été obtenues par comparaison aux cellules prélevées avant l'infection. Chaque protéine est représentée par un cercle de couleur différente, choisi au hasard par le logiciel. La couleur d'une même protéine peut différer entre chaque analyse. Les couleurs des lignes entre les protéines déterminent le niveau d'interactions. Les interactions connues sont représentées par des lignes roses (déterminées expérimentalement) et bleues (provenant de bases de données validées). Les lignes vertes (extraction de texte), noires (co-expression) et grises (homologie des protéines) représentent les autres interactions.

Chacun de ces réseaux est constitué de 3 protéines appartenant soit à la réponse interféron (ISG20, MX1, MX2) soit à la grande sous-unité du ribosome (RPL14, RPL24, RPL27). D'autres protéines sont également détectées à ce stade, mais elles ne présentent pas d'interactions. Après six jours d'infection, les réseaux PDA observés à 3 jours d'infection sont à nouveau détectés et contiennent un plus grand nombre de protéines. Ces deux réseaux sont reliés par la protéine ISG15, stimulée par l'interféron. À ce stade, le réseau de protéines ribosomiques contient des protéines provenant à la fois de la grande (60S) et de la petite (40S) sous-unité du ribosome. Un troisième réseau de protéines (S100A8/9/12, CATH, SDS, OAT, AZU1, PGLYRP1), impliquées dans la régulation de l'inflammation, est également observé à ce stade (**Figure 30**).

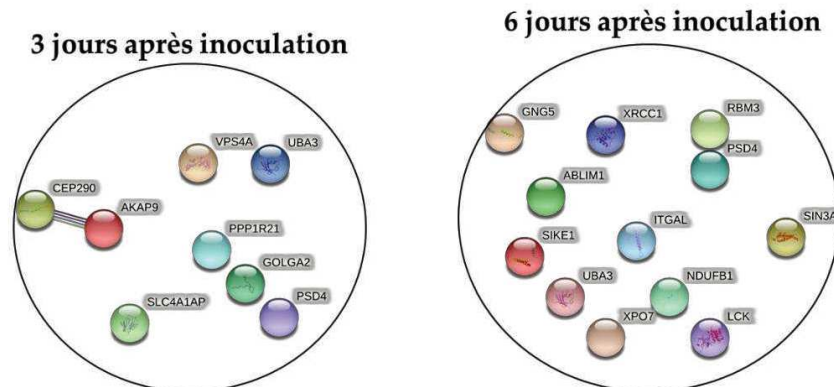
❖ PPRV MA08



**Figure 30. Réseaux d'interactions protéines-protéines générés après l'infection des chèvres Saanen par la souche MA08.** Les données à 3 et 6 jours après infection ont été obtenues par comparaison aux cellules prélevées avant l'infection. Chaque protéine est représentée par un cercle de couleur différente, choisi au hasard par le logiciel. La couleur d'une même protéine peut différer entre chaque analyse. Les couleurs des lignes entre les protéines déterminent le niveau d'interactions. Les interactions connues sont représentées par des lignes roses (déterminées expérimentalement) et bleues (provenant de bases de données validées). Les lignes vertes (extraction de texte), noires (co-expression) et grises (homologie des protéines) représentent les autres interactions.

L'inoculation témoin (groupe contrôle) induit l'accumulation d'un faible nombre de PDA au cours du temps. Un réseau impliqué dans la fonction du centrosome et formé par les protéines CEP290 et AKAP9 est observé 3 jours après l'inoculation (**Figure 31**).

❖ **MOCK**



**Figure 31. Réseaux d'interactions protéines-protéines générés après l'inoculation des chèvres Saanen par le témoin.** Les données à 3 et 6 jours après infection ont été obtenues par comparaison aux cellules prélevées avant l'infection. Chaque protéine est représentée par un cercle de couleur différente, choisi au hasard par le logiciel. La couleur d'une même protéine peut différer entre chaque analyse. Les couleurs des lignes entre les protéines déterminent le niveau d'interactions. Les interactions connues sont représentées par des lignes roses (déterminées expérimentalement) et bleues (provenant de bases de données validées). Les lignes vertes (extraction de texte), noires (co-expression) et grises (homologie des protéines) représentent les autres interactions.

v. Discussion des résultats de l'étude multi-omique

Le but de cette étude a été de déterminer les facteurs immunitaires qui sous-tendent la différence de virulence observée lors de la vaccination ou de l'infection des chèvres Saanen avec différentes souches PPRV. Pour ce faire, la dynamique et le taux d'infection des PBMCs collectées au cours de l'expérience ont été évalués par cytométrie en flux. La réponse immunitaire induite par la vaccination ou par les différentes infections a été analysée grâce aux données du séquençage de l'ARN. Et finalement, les protéines exprimées au cours du temps ont été détectées par spectrométrie de masse.



L'analyse de la dynamique et du taux d'infection des cellules présentatrices d'antigènes, des CD4 et des CD8 a montré que la vaccination ne change pas de façon significative le nombre de ces cellules au cours du temps, tandis que l'infection par la souche IC89 induit une diminution significative du nombre de cellules T CD4 entre le 6<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour après l'infection. Les protéines virales n'ont pas pu être détectées au cours du temps par cytométrie de flux pendant la vaccination ou l'infection par la souche IC89. Néanmoins, le séquençage de l'ARNm a permis de détecter un faible nombre de comptes viraux (compte = Read de séquençage) dans les PBMC prélevés le 7<sup>ème</sup> jour après la vaccination et les 7<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jours après l'infection par la souche IC89.

Ainsi, ce faible compte pourrait expliquer l'absence de détection du virus par cytométrie de flux (qui est une technique moins sensible) et la présence d'ARN viral dans les différents organes prélevés lors de la nécropsie. Le faible compte viral observé lors de l'infection par la souche IC89 corrèle parfaitement avec la détection de l'ARN viral dans les sera (voir section 3.a.i ; Eloiflin et al., 2021, en préparation).

Ces observations démontrent que les souches peu virulentes et vaccinales circulent à faible niveau dans le sang et sont transportées par les lymphocytes vers les organes.

L'infection par la souche MA08 induit une baisse significative du nombre de cellules immunitaires au cours du temps. Cette baisse est beaucoup plus marquée chez les lymphocytes T CD4 et semble plus progressive chez les autres sous-types cellulaires. Le niveau d'infection est différent entre types cellulaires, avec une plus grande quantité de protéines virales détectée chez les CD4.

La diminution du nombre de lymphocytes circulants est directement corrélée à la détection du virus. Les cellules infectées étant prélevées dans le sang périphérique, elles témoignent de l'importante répllication virale qui a lieu dans les ganglions lymphatiques.

Ce niveau élevé d'infection par la souche MA08 a été confirmé par le séquençage de l'ARNm et la présence d'ARN viral dans les sérums (voir section 3.a.i ; Eloiflin et al., 2021, en préparation). Les résultats indiquent que des nombres croissants d'ARN viraux sont détectés jusqu'au jour 7 (ou 8) après l'infection avant de chuter. Ces résultats montrent également qu'au-delà de 100 comptes sur les gènes viraux, les protéines virales sont détectables par cytométrie de flux.

Par ailleurs, les résultats obtenus avec la souche MA08 confirment ceux observés dans la littérature lorsque des chèvres sont infectées par des souches virulentes de PPRV (Fakri *et al.* 2017). Toutefois, à notre connaissance, c'est la première fois que des protéines virales sont détectées à l'intérieur de cellules immunitaires pendant l'infection, confirmant ainsi une partie de l'hypothèse de la propagation du virus dans l'organisme (Rojas *et al.* 2016).

La réponse immunitaire induite par la vaccination ou l'infection par les différentes souches a été évaluée à l'aide du système d'analyse d'enrichissement des gènes au moyen des modules transcriptionnels du sang (BTM) de chèvre.

La réponse interféron (IFN) de type I antivirale est induite quelle que soit la virulence de la souche mais de manière plus prolongée lors de l'infection par la souche MA08 (plus de modules activés au jour 12), confirmant ainsi les résultats obtenus lors des expériences *in vitro* (Eloiflin *et al.* 2021).

Cette réponse détectée dans un premier temps par l'activation de plusieurs modules liés à l'IFN de type I, a été confirmée par l'analyse de l'expression des protéines. En effet, les protéines différentiellement accumulées entre conditions au 6<sup>ème</sup> jour après vaccination ou infections, sont majoritairement liées à cette réponse antivirale. Lors de la vaccination de chèvres par la souche PPRV Sungri 96, la synthèse majoritaires des protéines liés à la réponse interféron antivirale a aussi été observée (Wani *et al.* 2021b).



L'infection par la souche MA08 présente une réponse plus complexe que celle observée avec les autres souches et cette réponse semble liée la synthèse de nombreuses protéines ribosomiques associées à l'induction de l'ISG15.

Néanmoins, les nombreuses protéines ribosomiques détectées de manière différentielle, peuvent être induites pour permettre la synthèse virale. La plupart des interactions entre virus et protéines ribosomiques sont essentielles à la traduction et à la réplication, ce qui favorise l'infection et l'accumulation des gènes et protéines du virus (Li 2019). Ainsi, la forte présence des protéines virales (détectées par cytométrie en flux) observée lors de l'infection par la souche MA08 pourrait être liée à l'induction de ces protéines ribosomiques.

Cependant, une minorité d'interactions permet la signalisation de défense des cellules hôtes en activant la voie immunitaire contre le virus. Par exemple, des gènes ribosomiques ont été régulés à la hausse dans les PBMCs collectés 5 jours après vaccination de chèvres avec la souche PPRV Sungri 96. La prédiction des réseaux d'interactions a démontré que ces gènes ribosomiques sont liés à l'expression de l'ISG15 (Wani *et al.* 2021a).

Les modules liés à l'inflammation sont globalement activés par la souche MA08 tandis que ceux-ci sont inactivés par la souche IC89. Cette réponse inflammatoire a été observée lors de l'infection des animaux par la souche MA08 et est caractérisée par l'augmentation de la température rectale et l'apparition des symptômes (voir section 3.a.i ; Eloiflin *et al.*, 2021, en préparation). L'analyse de l'expression des protéines a également démontré la présence d'un réseau de protéines impliquées dans l'inflammation lors de l'infection par la souche MA08. Par exemple, au cours d'une inflammation, les protéines S100A8/A9 sont activement libérées et exercent un rôle critique dans la modulation de la réponse inflammatoire en stimulant le recrutement des leucocytes et en induisant la sécrétion de cytokines (Wang *et al.* 2018).

PGLYRP1 a été identifié comme l'un des gènes impliqué dans l'inflammation pulmonaire (Banskar *et al.* 2019). La cathélicidine (CATH) peut moduler l'activité de diverses populations cellulaires impliquées dans les processus inflammatoires et dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes envahissants. Elle induit la migration des neutrophiles, des monocytes/macrophages, des éosinophiles et des mastocytes et prolongent la durée de vie des neutrophiles. C'est un peptide qui active les cellules inflammatoires et permet la production des cytokines et chimiokines pro- et anti-inflammatoires (Agier *et al.* 2015; Alford *et al.* 2020).

L'activation des modules liés aux DC et à la présentation antigénique ainsi que ceux liés aux cellules myéloïdes lors de l'infection par la souche MA08 pourrait être liée à l'action de ces différents médiateurs de l'inflammation.

L'infection par la souche IC89 a induit une inactivation précoce et globale des modules liés à l'inflammation, aux DC et à la présentation antigénique ainsi que ceux liés aux cellules myéloïdes au cours du temps. La souche vaccinale quant à elle, induit l'activation de très peu de modules liés à ces réponses. Mis à part les protéines liées à la réponse de l'interféron, aucun autre réseau de protéines différenciellement accumulées n'est observé lors de la vaccination ou de l'infection par la souche IC89.

L'activation des modules liés au cycle cellulaire est globalement similaire entre infections. La majorité de ces modules est inactivée au jour 7 et se réactive au jour 12. Ainsi les cellules circulantes collectées au jour 7 ont leur cycle cellulaire arrêté. Ces résultats suggèrent que, les cellules provenant des ganglions lymphatiques ne se divisent plus, ce qui indique un arrêt de la prolifération cellulaire en amont, ou qu'il s'agit de cellules non activées ou naïves qui s'échappent des ganglions.

Lors de l'infection par la souche MA08, l'inhibition des modules liés au cycle cellulaire au jour 7 est suivi par celle des modules liés à l'activité des cellules T/NK et B. Mis à part ceux liés aux cellules B, ces modules se réactivent au jour 12 après infection.

Cette inactivation et réactivation des modules est en corrélation avec les variations observées dans les populations lymphocytaires (voir section 3.a.i ; Eloiflin et al., 2021, en préparation).

L'activation des modules liés aux cellules T, NK et B est beaucoup plus contrastée lors de l'infection par la souche IC89. Ces modules montrent une inactivation globale au début de l'infection (dès le jour 3) pour les cellules T/NK tandis qu'à ce stade, la majorité des modules liée aux cellules B est activée.

Les modules liés à l'activité des cellules plasmacytoïdes sont activés au jour 12 au cours des infections et de la vaccination au cours de laquelle, un module lié à l'activité des cellules B mémoires est activé en plus. L'activation des modules liés à ces cellules productrices d'anticorps reflète la détection d'anticorps dirigés contre le PPRV dans les sera au jour 12 (voir section 3.a.i ; Eloiflin et al., 2021, en préparation).

Les animaux témoins ont permis d'observer qu'il y a une activation des gènes liés à l'inflammation. Ces gènes sont activés sans que les protéines soient synthétisées, démontrant qu'il s'agit d'une réponse basale des cellules. Cette réponse basale peut aussi être liée à l'état d'inactivation des modules liés au cycle cellulaire ainsi qu'aux cellules T/NK. Aucune modification du nombre de cellules blanches circulantes n'a été observée chez ces animaux.

En résumé, ces résultats confirment que la réponse IFN antivirale est induite de manière indépendante de la virulence de la souche (Eloiflin *et al.* 2021). Lors de l'infection par la souche MA08, hautement virulente, des protéines virales sont détectées dans les cellules sanguines. Cette infection induit une activation de l'inflammation (activation des modules liés à l'inflammation, aux cellules myéloïdes, aux DC et à la présentation antigénique) et une diminution du nombre de lymphocytes circulants.

Ainsi, la réponse cellulaire induite suite à l'infection par la souche MA08 est apparue inefficace pour contrôler la propagation virale ainsi que la survenue des symptômes,

confirmant que la réponse humorale est essentielle pour stopper l'infection. La réponse cellulaire semble intervenir plus tard, comme en témoigne l'activation des modules T/NK lors des infections par les souches MA08 et IC89.

Lors de l'infection par la souche IC89, faiblement virulente, l'inflammation semble être inhibée de manière précoce dès le jour 3 (inactivation des modules liés à l'inflammation, aux cellules myéloïdes, aux DC et à la présentation antigénique).

Cette inhibition précoce suivi de l'activation de la réponse IFN antivirale semble jouer un rôle primordial dans l'absence des symptômes observée suite à l'infection par cette souche. La vaccination montre un profil de réponse immunitaire très différent de celui observé lors des infections. En effet, la plupart des modules détectés sont activés en réponse à la vaccination et une absence d'inhibition de la réponse cellulaire est observée. Ces résultats indiquent que la réponse cellulaire et la réponse humorale sont essentielles dans l'induction du phénotype vaccinal. Cependant, l'induction d'une réponse cellulaire reste à vérifier en confirmant la présence ou non de cellules T mémoires spécifiques du PPRV par stimulation in vitro des PBMCs. La stimulation par le virus ou par des peptides viraux, de PBMCs collectés 17-21 jours après la vaccination ou l'infection de moutons par la souche IC89, a induit la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4 et CD8 (Rojas *et al.* 2017).

# *Discussion Générale*

### III DISCUSSION GENERALE

La virulence peut être définie de plusieurs manières en fonction du domaine d'étude. En épidémiologie, le terme désigne généralement la mortalité de l'hôte induite par l'agent pathogène tandis qu'en milieu clinique, la virulence fait souvent référence à la gravité des symptômes de la maladie induite par un agent pathogène (Delgado-Eckert *et al.* 2011). Combinant ces deux aspects, on peut observer que dans les milieux naturels ou pendant les infections expérimentales, les souches du PPRV possèdent des virulences différentes. Au cours de cette thèse, nous nous sommes attelés à déterminer des facteurs influençant la virulence des souches du PPRV.

Cette tâche a débuté par la détermination des mutations associées à l'atténuation de la souche vaccinale Nigeria 75/1. Cette souche vaccinale a été obtenue en effectuant 75 passages successifs de la souche sauvage sur des cellules Vero. La disponibilité de certains passages cellulaires ayant conduit à l'obtention du vaccin nous a permis, via les méthodes de séquençage de nouvelle génération, de déterminer les mutations associées à l'atténuation et dans quel ordre elles apparaissent.

#### *α Les mutations comme moyen d'atténuation*

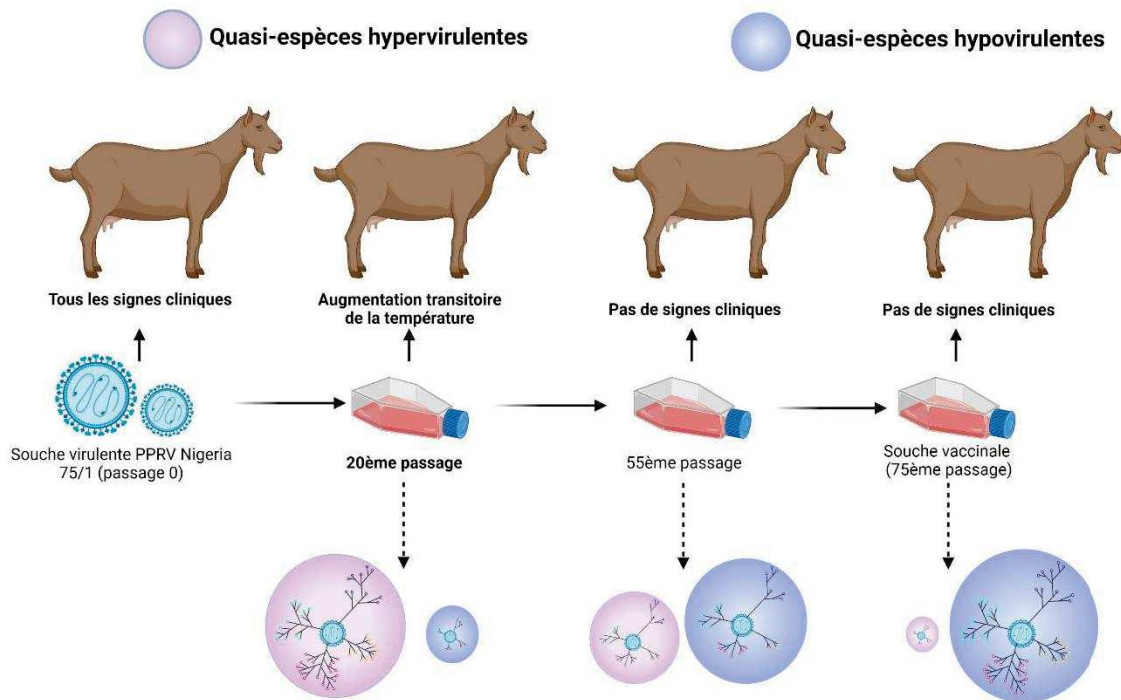
La comparaison entre les séquences consensus des souches sauvages et vaccinales Nigeria 75/1 a permis de déterminer que 18 mutations dont 9 non synonymes sont réparties à travers le génome viral et différentient les deux souches. Ces mutations apparaissent, se fixent, se maintiennent au cours des passages et présentent un faible risque de réversion (Eloiflin *et al.* 2019). Un faible nombre de mutations dispersées au hasard dans le génome viral a aussi été observé lors de passages répétées d'une souche PPRV isolée au Tibet en 2007 (Wu *et al.* 2016).

Ainsi, le processus d'atténuation des morbillivirus semble emprunter un chemin unique à chaque souche virale, qui passe par l'apparition d'un faible nombre de mutations synonymes ou non et est lié à la disparition des symptômes lors de l'inoculation *in vivo*. Néanmoins, l'atténuation de la virulence ne peut pas être attribuée uniquement à des mutations génétiques dans un génome consensus représentant la population virale majoritaire. En effet, l'évolution des virus à ARN se produit par le biais de déséquilibres, de collections de spectres mutants ou de nuages mutants étroitement apparentés, appelés quasi-espèces virales (Domingo *et al.* 2012).

De ce fait, les virus à ARN doivent être vus comme des populations constituées de nuages de mutants plutôt que de génomes possédant des séquences nucléotidiques similaires. L'analyse de l'évolution des populations virales au cours de l'atténuation de la souche PPRV Nigeria 75/1 montre que la taille de ces populations varie peu au cours des passages cellulaires. Si l'on fait abstraction des génomes consensus, l'histoire évolutive de l'élaboration du vaccin reste la même, à l'exception de certains passages cellulaires (Eloiflin *et al.* 2019). Ces résultats permettent de postuler que, comme dans le cas du vaccin contre le virus de la peste bovine, les quasi-espèces virales générées par les passages en série (**Figure 32**) sont un facteur majeur pour élucider la loi évolutive selon laquelle chaque génération est moins virulente que la précédente (Liu *et al.* 2016).

En plus d'être non virulente et d'induire une immunité protectrice qui peut durer toute la vie, la souche vaccinale PPRV Nigeria 75/1 a fait preuve d'une réplication défective lorsqu'elle est utilisée pour infecter des cellules de fibroblastes murins (Comerlato *et al.* 2020). Cette caractéristique, commune aux souches vaccinales de la PPR, a fait de ce modèle cellulaire, un outil pouvant servir à différencier les souches vaccinales des souches virulentes du PPRV. Par exemple, au cours des passages en série, l'apparition de la dernière mutation différenciant la souche sauvage de la souche vaccinale Nigeria75/1 a été responsable de la différence de réplication observée dans ce type cellulaire (Eloiflin *et al.* 2019).





**Figure 32. Relations théoriques entre la virulence du PPRV et les quasi-espèces virales au cours des passages en série *in vitro*.** La souche virulente PPRV Nigéria 75/1 isolée d'une chèvre morte de la PPR (Taylor & Abegunde 1979) a graduellement perdu sa virulence *in vivo* au cours des passages *in vitro*. Dès le 20<sup>ème</sup> passage, cette souche n'induit qu'une légère augmentation de la température chez les animaux (Diallo *et al.* 1989). Les relations théoriques entre les quasi-espèces hypervirulentes et hypovirulentes ont été illustrées uniquement aux 20<sup>ème</sup>, 55<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> passages. Représentation adaptée de Liu *et al.* (2016).

Dans les milieux naturels, la PPR revêt trois formes essentielles : une forme suraiguë, une forme aiguë et une forme subaiguë voire inapparente. Les formes inapparentes sont particulièrement fréquentes dans certaines régions endémiques en raison d'une résistance des races locales. Ces formes sont particulièrement graves car elles favorisent l'apparition de pneumopathies que l'on ne peut rapporter à la PPR (Lefèvre & Diallo 1990) et participent à la propagation silencieuse de la maladie.

Les souches du PPRV présentent des niveaux de virulence plus ou moins similaires chez les moutons et les chèvres, cependant, les chèvres et plus particulièrement les chevreaux sont plus gravement touchés (El Hag Ali & Taylor 1984; Lefèvre & Diallo 1990).

Au cours d'une expérimentation animale réalisée dans le but d'établir un modèle d'infection fiable permettant d'évaluer l'efficacité des vaccins, une différence de virulence a été observée chez des chèvres Saanen. En effet, la souche PPRV Ivory Coast (IC89) s'est montrée faiblement virulente tandis que la souche PPRV Morocco 2008 (MA08) a été fortement virulente (Enchery *et al.* 2019). Ainsi, notre recherche de facteurs de virulence nous a conduit à essayer de déterminer ceux qui influencent la différence observée chez les chèvres Saanen.

Tout d'abord, les souches utilisées pour infecter les animaux ont été analysées pour détecter la présence de variations nucléotidiques. Par comparaison avec les séquences disponibles dans les bases de données, il a été constaté que la souche hautement virulente MA08 ne présentait qu'une seule différence par rapport à la référence, alors que la souche IC89 en présentait plusieurs. Ces différences dans le génome de la souche IC89 peuvent potentiellement avoir un impact sur la perte de virulence chez les chèvres Saanen et expliquer les différences observées lorsque cette souche est utilisée pour infecter des chèvres britanniques indigènes (Hodgson *et al.* 2018; Baron *et al.* 2014) ou des chèvres naines d'Afrique de l'Ouest (Couacy-Hymann *et al.* 2007).

Ces observations, en plus de la réplique de la souche IC89 dans le modèle cellulaire murin, montrent que cette souche possède toujours son caractère virulent. En outre, la sensibilité des animaux à l'infection peut être liée à la race. Par exemple, la race naine ouest-africaine de la région tropicale pluvieuse est plus sensible à l'infection par le PPRV que la race de chèvre ouest-africaine à longues pattes de la région saharienne (Diop *et al.* 2005).

Ces résultats indiquent que certains facteurs de l'hôte, en plus des facteurs viraux, sont impliqués dans l'apparition ou non des symptômes de la maladie. À cet égard, il est essentiel de comprendre le chemin d'infection du virus pour déterminer le niveau d'implication des facteurs de l'hôte dans la virulence des souches.

Le virus pénètre par l'épithélium nasopharyngé et est transporté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) vers les ganglions lymphatiques proximaux. Tout naturellement, la première étape pour déterminer les facteurs liés à l'hôte consiste à étudier les interactions entre les souches virales et les CPA.

### *β Les CPA : cheval de Troie ou réponse primaire efficace*

Les monocytes de chèvres ainsi que des cellules dendritiques et macrophages dérivés de ces monocytes ont été infectés par les souches de virulences différentes du PPRV. La caractérisation de ces cellules indique que l'expression du marqueur CD205 semble différencier les monocytes des cellules qui en sont dérivées, mais aucun marqueur ne permet de différencier les cellules dérivées (cellules dendritiques et macrophages) entre elles. Lors de l'infection *in vitro*, les différents types de cellules sont infectées de manière similaire par les souches virulentes (IC89 et MA08) mais faiblement par la souche vaccinale. De plus, les souches virulentes ont été détectées dans le surnageant et un nombre plus élevé de virus infectieux a été trouvé lors de l'infection par la souche MA08. Les macrophages dérivés de monocytes ont montré le profil le plus discriminant entre les souches, avec un relargage du virus infectieux environ 100 fois plus important lors de l'infection par la souche MA08 que par la souche IC89. Cette grande différence nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une possible transmission différentielle des souches par ce type de cellule (**Figure 18**).

Le défaut de relargage de la souche IC89 pourrait être attribué à certaines des mutations trouvées dans la protéine de fusion virale qui peuvent empêcher le virus de bourgeonner (Harrison *et al.* 2010). Pour l'heure, nous n'avons réalisé que l'étude de la permissivité des cellules aux différents virus. Pour une meilleure compréhension de l'impact de l'infection par le PPRV sur la fonction de ces cellules, il est nécessaire en plus des études de permissivité, d'analyser l'expression des marqueurs d'activation ainsi que la synthèse de cytokines.

En effet, comme cela a été observé avec le virus de la rougeole, il est possible que l'infection des CPA par le PPRV entraîne une diminution de l'expression de CD80/83/86 et de MHCII et une perte de la fonction d'allostimulation de ces cellules (Grosjean *et al.* 1997; Marie *et al.* 2001; Romanets-Korbut *et al.* 2016).

Pendant l'infection, une fois à l'intérieur des CPA, les virus sont transportés vers les ganglions lymphatiques. La présentation antigénique permet de mobiliser une armée de lymphocytes qui sont spécifiquement activés pour combattre l'infection. L'activation des lymphocytes par les CPA, qui peut être caractérisée par l'expression du marqueur SLAM, est une aubaine pour la réplication virale dans les ganglions lymphatiques. Nous nous sommes donc intéressés aux effets des différents virus sur les lymphocytes activés.

### *γ Une réplication virale efficace, clé de voûte de la virulence*

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) collectées à partir de chèvres Saanen naïves pour la PPR ont été stimulées par le concanavaline A (expression augmentée du SLAM) puis infectées soit par les souches virulentes IC89 et MA08, soit par la souche vaccinale Nigeria 75/1. Les résultats de ces infections nous ont permis d'observer que toutes les souches virales ont un effet négatif sur la survie et la prolifération cellulaire. Ces effets négatifs ont été précoces (3 jours après infection) lors de l'infection par la souche MA08. En plus d'induire des effets précoces, cette souche a démontré un niveau de réplication supérieur qui a été confirmé par une approche multi-omique incluant des analyses par cytométrie en flux, de l'expression des ARN messagers (transcriptomique) et des protéines (protéomique).

Les approches transcriptomiques et protéomiques ont permis de montrer que la principale réponse des cellules à l'infection par le PPRV est la réponse antivirale liée à la synthèse de l'interféron. Cette réponse est induite de manière similaire, indépendamment de la virulence de la souche et son induction a également été confirmée par l'analyse des modules transcriptionnels du sang (BTMs) de chèvre.

L'induction d'une réponse d'interféron antiviral en réaction à l'infection par le PPRV a également été démontrée dans des études précédentes (Manjunath *et al.* 2017; Manjunath *et al.* 2019). En outre, les gènes stimulés par l'interféron contribuent à renforcer la défense de l'hôte et à réduire la réplication du PPRV chez les caprins et les bovins (Tirumurugaan *et al.* 2020).

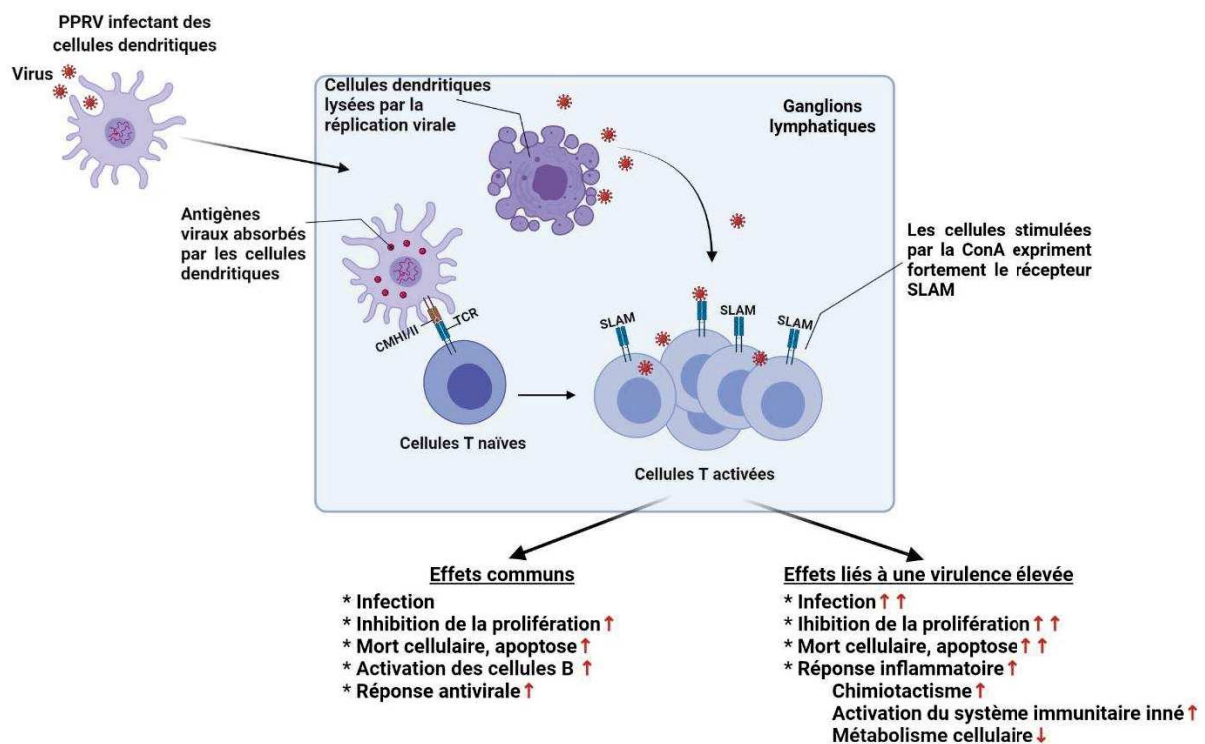
Lors de l'infection par la souche vaccinale et la souche IC89, des mécanismes complémentaires à la réponse antivirale semblent être mis en jeu pour inhiber la réplication virale. L'infection par la souche MA08 induit quant à elle une altération profonde du métabolisme cellulaire ainsi qu'une induction de voies métaboliques impliquées dans la réponse pro inflammatoire et la mort cellulaire (Eloiflin *et al.* 2021). Les mécanismes potentiellement impliqués dans l'infection *in vitro* de PBMCs activées par des souches de virulences différentes du PPRV sont présentés dans la **Figure 33**.

Une fois infectés, les lymphocytes sont transportés par la circulation sanguine et conduisent à l'infection des organes, puis à l'apparition des symptômes de la maladie. Ces symptômes peuvent apparaître ou non selon le degré de sévérité et ont été décrits pour la plupart sur la base de la pathologie induite par le virus de la peste bovine (RPV) ou d'autres infections à morbillivirus telles que la rougeole (Parida *et al.* 2015a). Ainsi, une étude de la variabilité des pathologies induites par des souches de PPRV de virulences différentes a été entreprise chez les chèvres Saanen.

### *δ L'activation de la réponse immunitaire innée module la virulence*

Les souches MA08 (hautement virulente) et IC89 (faiblement virulente) ainsi que la souche vaccinale Nigeria75/1 ont confirmé leur phénotype d'infection chez les chèvres Saanen. Cette étude nous a permis de décrire avec précision la pathologie induite par ces différentes souches.

Les lésions macroscopiques ainsi que celles retrouvées dans les organes lymphoïdes et ceux des voies respiratoires ont été significativement induites lors de l'infection par la souche MA08. La présence d'ARN viraux a été détecté dans les sécrétions oculaires et de manière précoce chez les animaux infectés par la souche MA08. La présence transitoire d'ARN viraux dans les sécrétions des animaux vaccinés est un résultat inattendu.



**Figure 33. Représentation des mécanismes impliqués dans l'immunomodulation *in vitro* lors de l'infection des PBMCs activées par souches de virulences différentes du PPRV.** Les cellules présentatrices d'antigènes (représentées ici par les cellules dendritiques) transportent les virus du site d'infection aux ganglions lymphatiques proximaux. Une fois dans les ganglions lymphatiques, ces cellules déclenchent l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Cette activation est associée à l'expression du récepteur SLAM. Les virus peuvent sortir des cellules dendritiques par lyse et rencontrer ensuite les cellules activées. Les effets communs des souches de PPRV ainsi que ceux spécifiques aux souches hautement virulentes sont présentés dans cette figure. Les flèches rouges pointant vers le haut représentent l'activation tandis que celles pointant vers le bas représentent l'inhibition ou la dégradation.



Les facteurs influençant cette excrétion ne sont pas encore compris, néanmoins la détection d'ARN viral n'implique pas nécessairement la présence d'un virus infectieux. Le titrage viral permettrait de déterminer le nombre de particules infectieuses présentes dans les sécrétions. Malheureusement, les échantillons ont été inactivés pour le transport, ce qui a fortement limité la poursuite de ces expériences. Cette détection pourrait être simplement liée à une meilleure sensibilité des méthodes PCR développées récemment et utilisées pour cette étude. Cependant, il serait important d'investiguer un effet de l'écologie et de l'histoire de vie de l'hôte sur l'excrétion viral et leur susceptibilité en générale.

Les PBMCs ont été collectées après l'infection ou la vaccination et analysées par cytométrie de flux, transcriptomique et protéomique. Le pourcentage de toutes les sous-populations de PBMCs a été négativement affecté par l'infection avec la souche MA08. En plus de la diminution significative du nombre total de cellules, ces cellules ont été testées positives pour la présence de protéines virales.

La vaccination ainsi que l'infection par la souche IC89 n'ont pas eu d'effet majeur sur le nombre de PBMCs en circulation, à l'exception d'une diminution transitoire des cellules TCD4 observée lors de l'infection par la souche IC89. Toutes les cellules collectées dans les deux cas étaient négatives pour la présence de protéines virales.

Cependant, le séquençage de l'ARN messenger a permis de détecter l'ARN viral dans les cellules prélevées chez les animaux infectés par les souches virulentes. Cette détection, faible dans le cas de l'infection par la souche IC89, est corrélée à l'induction de la virémie. La détection de l'ARN viral dans les PBMCs a été observée dans l'expérience *in vitro* (Eloiflin *et al.* 2021), mais aussi dans des infections expérimentales de chèvres et de moutons avec une souche virulente du PPRV (Wani *et al.* 2018). Dans cette étude, les auteurs n'ont pas pu détecter d'ARN viral dans les PBMCs des animaux vaccinés, ce qui est également en accord avec nos résultats, car un très faible nombre de comptes viraux est uniquement détecté au jour 7 après la vaccination.



La présence d'ARN et de protéines virales dans les PBMCs collectés lors de l'infection par la souche MA08 suggère qu'une réplication virale active a lieu dans ces cellules. Ainsi, le virus vivant serait délivré aux organes, ce qui pourrait potentiellement expliquer l'observation d'un grand nombre de lésions.

L'absence de protéines virales mais la présence d'un faible nombre d'ARN viraux dans les PBMCs collectées après vaccination suggère que les particules virales ont été dégradées et que seul l'ARN viral est transporté par une partie des PBMCs. Ces ARN viraux s'accumuleraient dans les organes, ce qui pourrait expliquer leur détection. Lors de l'infection par la souche IC89, des quantités minimales d'ARN viral (mais supérieures à celles observées dans la vaccination) sont détectées sur une période plus longue. Un titrage viral à partir de lysats des PBMCs collectés et préservés pendant l'expérience pourrait confirmer la présence ou non de particules virales infectieuses.

L'analyse des ARN et protéines cellulaires a permis de déterminer la réponse de l'organisme induite par la vaccination ou par l'infection avec les différentes souches. La réponse interféron antivirale est induite indépendamment de la virulence de la souche, ce qui confirme les résultats obtenus lors de l'expérience *in vitro* (Eloiflin *et al.* 2021).

L'analyse des BTMs montre que l'infection par la souche MA08 induit une activation de l'inflammation et de l'activité des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces résultats confirment l'importance des réponses immunitaires innées dans l'induction d'une forte réponse immunitaire adaptative caractérisée par la synthèse des anticorps. Néanmoins, l'induction de cette réponse adaptative est accompagnée d'une chute du nombre de lymphocytes circulants dû à la présence du virus.

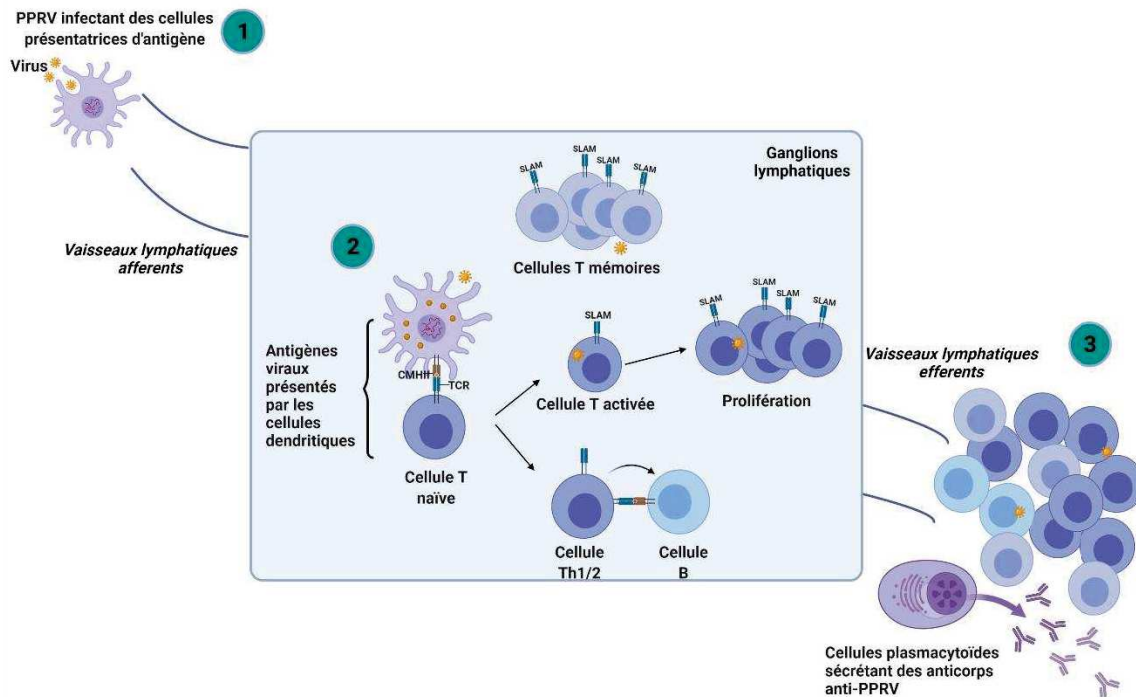
Les modules liés au cycle cellulaire et à l'activité des cellules T/NK et B sont inactivés au même moment dans cette infection. Cela pourrait refléter le fait qu'à ce stade de l'infection, les rares cellules qui quittent les ganglions lymphatiques sont soit des cellules naïves, soit des cellules incapables de proliférer.

Par exemple, il a été observé dans des expériences *in vivo* et *in vitro* que les cellules T mémoires sont plus sensibles à l'infection par le virus de la rougeole que les cellules T naïves, en raison d'une expression plus élevée du CD150 (Condack *et al.* 2007; Vries *et al.* 2012).

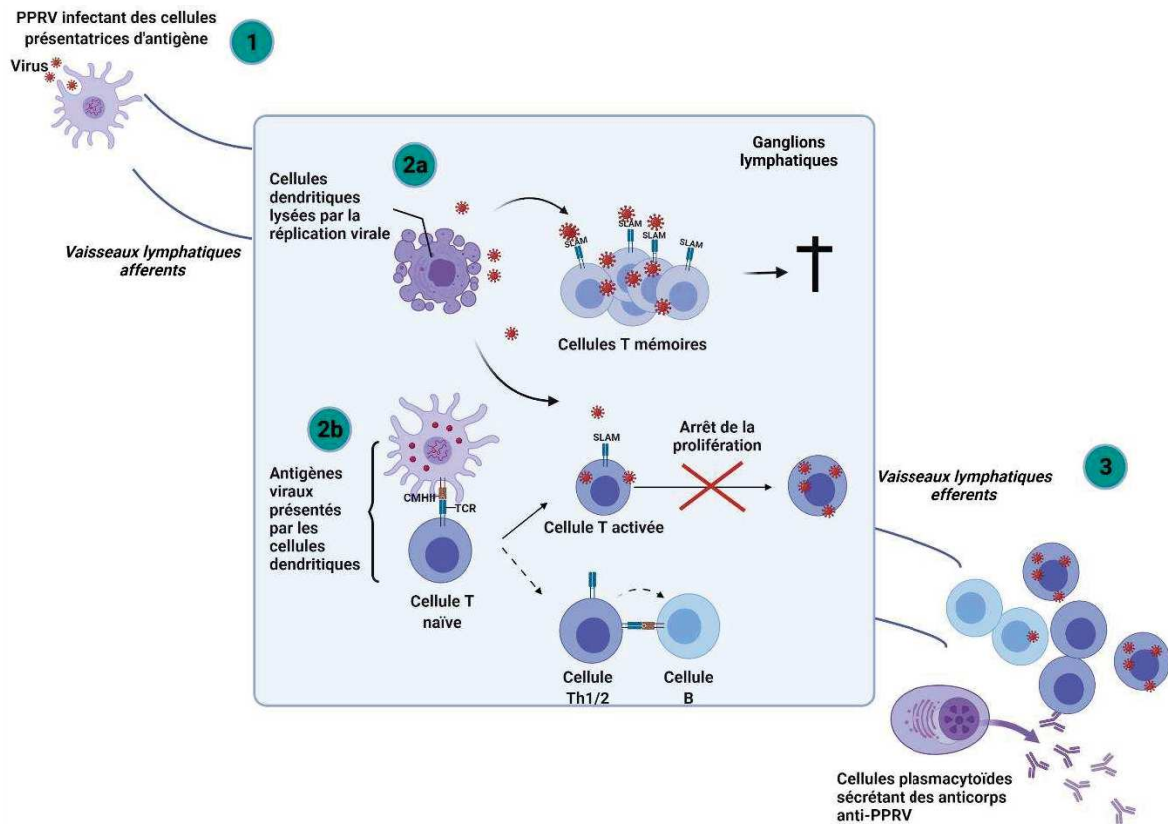
La réponse inflammatoire plus faible lors de l'infection par la souche IC89 ainsi que l'absence de protéines virales dans les PBMCs, pourraient signifier que la réponse interféron induite est capable à elle seule de contrôler l'infection.

L'inactivation des modules liés à l'activité des cellules T et NK lors de cette infection pourrait aussi témoigner de la circulation de lymphocytes naïfs. Cependant, la baisse transitoire du nombre de TCD4 ainsi que la présence de quelques ARN viraux pourraient signifier qu'une faible réplication virale a lieu dans les ganglions lymphatiques. La vaccination induit une activation des modules liés au cycle cellulaire, à l'inflammation et à l'activité des CPA tandis que l'activation des modules liés aux cellules T est plus contrastée. La stimulation des cellules collectées pendant l'infection avec des antigènes viraux ou des mitogènes pourrait déterminer si ces cellules circulantes sont spécifiques ou non du PPRV et si elles ont conservé leur capacité intrinsèque à proliférer.

L'activation tardive lors des infections ou de la vaccination des modules liés aux cellules plasmacytoïdes productrices d'anticorps témoigne de la synthèse d'anticorps anti-PPRV et d'anticorps neutralisants. Si l'on compare les deux souches virulentes, la réponse anticorps et en particulier l'apparition d'anticorps neutralisants est inversement proportionnelle à la virulence (cf. Figx, page x) mais elle est directement corrélée à la disparition des symptômes et au contrôle de la virémie. De plus, pour la souche MAO8, la présence à j7 d'anticorps circulant en l'absence d'activation des TCD4 suggère l'existence d'une réponse humorale indépendante des *T helper*. L'ensemble des résultats nous permet de postuler les hypothèses présentées dans les **Figures 34 et 35**.



**Figure 34. Schéma hypothétique des mécanismes d'immunomodulation induits lors de la vaccination ou de l'infection des chèvres Saanen par la souche faiblement virulente IC89.** 1) Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont infectées par le virus et le transporte vers les ganglions lymphatiques. 2) Les cellules dendritiques (DCs) présentent les antigènes viraux et permettent l'activation et la prolifération des lymphocytes T (détection à j12 seulement avec les BTM peut être en raison du faible nombre de prélèvements analysés). Les lymphocytes T activent ensuite les lymphocytes B qui se différencient en cellules plasmacytoïdes sécrétant des anticorps. Il est possible que dans l'infection par la souche IC89, certaines particules virales puissent sortir des DC et infecter un petit nombre de cellules qui finissent par recirculer, avec les cellules naïves et plasmacytoïdes, dans la circulation sanguine.



**Figure 35. Schéma hypothétique des mécanismes d'immunomodulation induits lors de l'infection de chèvres Saanen par la souche hautement virulente MA08.** 1) Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont infectées par le virus et le transporte vers les ganglions lymphatiques. 2) Les virus peuvent sortir des CPA par lyse cellulaire et rencontrer ensuite des cellules à mémoire ou activées. La lymphopénie associée à cette infection peut être hypothétiquement associée à la destruction des cellules T mémoires qui expriment naturellement plus de SLAM (2a) et à l'inhibition de la prolifération des cellules T activées suite à la présentation antigénique (2b). La capacité des cellules dendritiques à présenter l'antigène et à activer les lymphocytes peut également être affectée par l'infection. 3) L'activation des cellules B spécifiques de l'antigène et leur différenciation en cellules plasmacytoïdes sécrétant des anticorps peut se faire indépendamment des *T helper* (ligne en pointillés). Certaines cellules infectées passent dans la circulation sanguine et participent à la propagation du virus et à l'apparition des symptômes.

# *Conclusions et Perspectives*

## IV CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les expériences menées au cours de cette thèse permettent de conclure que la virulence d'une souche est un processus multifactoriel comprenant des facteurs viraux et des facteurs de l'hôte (notamment ceux associés à la réponse immunitaire innée) qui contribuent ensemble à l'apparition ou non des symptômes de la maladie.

L'importance relative de certains facteurs identifiés durant les travaux de cette thèse devrait faire l'objet d'études ultérieures dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, l'implication des sous-types des cellules dendritiques et en particulier des macrophages dans les mécanismes d'entrée et de propagation du PPRV doit être davantage explorée. Ces cellules doivent être mieux caractérisées chez la chèvre pour permettre une meilleure analyse des résultats. Récemment, il a été démontré que les macrophages M2c, un sous-type de macrophage également appelé "macrophages désactivés" exprimant des niveaux élevés de SLAM, sont peu susceptibles de jouer un rôle dans la pathogenèse précoce et la transmission du PPRV (Gautam *et al.* 2021).

L'étude *in silico* ou dans des systèmes de pseudotypage ou de mini-génome (Abdullah *et al.* 2018) des mutations dans le génome de la souche PPRV IC89 en notre possession pourrait aider à comprendre l'implication de celles-ci dans la faible réplication observée lors des expériences *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats obtenus lèvent une partie du voile sur la complexité des interactions entre le PPRV et le système immunitaire de l'hôte. Certaines hypothèses ont été proposées pour expliquer partiellement la variabilité des symptômes observés chez les petits ruminants infectés par cette maladie d'intérêt mondial pour la sécurité alimentaire et l'économie des populations rurales à faibles revenus. Ces résultats font écho à la pandémie mondiale causée par le virus Covid-19, dans laquelle on a constaté que la virulence dépendait à la fois du variant du virus et du système immunitaire de l'hôte.

# *Communications*



## V COMMUNICATIONS

**Les travaux menés au cours de cette thèse ont conduit la publication des articles scientifiques suivants :**

- ❖ **Eloiflin RJ**, Boyer M, Kwiatek O, Guendouz S, Loire E, Servan de Almeida R, Libeau G, Bataille A. Evolution of Attenuation and Risk of Reversal in Peste des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria 75/1. *Viruses*. 2019 Aug 7;11(8):724. doi: 10.3390/v11080724 . PMID: 31394790 ; PMCID: PMC6724400.
- ❖ Comerlato J, Albina E, Puech C, Franco AC, Minet C, **Eloiflin RJ**, Rodrigues V, Servan de Almeida R. Identification of a murine cell line that distinguishes virulent from attenuated isolates of the morbillivirus Peste des Petits Ruminants, a promising tool for virulence studies. *Virus Res*. 2020 Sep;286:198035. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198035 . Epub 2020 May 24. PMID: 32461190.
- ❖ **Eloiflin RJ**, Auray G, Python S, Rodrigues V, Seveno M, Urbach S, El Koulali K, Holzmuller P, Totte P, Libeau G, Bataille A and Summerfield A (2021). Identification of Differential Responses of Goat PBMCs to PPRV Virulence Using a Multi-Omics Approach. *Front. Immunol.* 12:745315. doi: 10.3389/fimmu.2021.745315

**Ces travaux ont été présentés lors de congrès nationaux et internationaux.**

**Communications orales :**

- ❖ 13th EPIZONE Annual Meeting "Breaking Walls", 26-28 August 2019, Berlin, Germany; Oral Communication: Evolution of attenuation and risk of reversal in Peste des Petits Ruminants vaccine strain Nigeria 75/1. Roger-Junior ELOIFLIN
- ❖ 7<sup>th</sup> European Veterinary Immunology Workshop (EIVW), 29-31 August 2021, Livestreaming; Oral Communication: Identification of Differential Responses of Goat PBMCs to PPRV Virulence Using a Multi-Omics Approach. **Award for Best Student Oral Contribution at the 7<sup>th</sup> EIVW**. Roger-Junior ELOIFLIN
- ❖ Combined annual meeting Capripox-PPR, 5 October 2021, Livestreaming; Oral communication: Pathogenicity of different virulence PPRV strains in Saanen goats. Roger-Junior ELOIFLIN

Posters:

- ❖ XXIIIèmes Journées Francophones de Virologie, 26-27 Avril 2021, Livestreaming ; Poster : Les mécanismes d'immunité cellulaire de la chèvre varient en fonction de la virulence du *Morbillivirus*

**ID: 343413**

**Les mécanismes d'immunité cellulaire de la chèvre varient en fonction de la virulence du *Morbillivirus***

Roger-Junior ELOJUNJ<sup>1,2</sup>, Gaël AURAY<sup>2</sup>, Sylvie PYTHON<sup>2</sup>, Valérie RODRIGUES<sup>1</sup>, Martial Severno<sup>3</sup>, Serge Urbach<sup>3</sup>, Khadija El Kouilal<sup>3</sup>, Philippe HOLZMULLER<sup>1</sup>, Philippe TOTTE<sup>1</sup>, Genevieve LIBEAU<sup>1</sup>, Arthur SUMMERFIELD<sup>2</sup> et Arnaud BATAILLE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIRAD, UMR ASTRE, Université de Montpellier, Montpellier, France <sup>2</sup> Institut für Virologie und Immunologie, Berne, Suisse <sup>3</sup> PPM, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier @ email: roger-junior.elojun@cirad.fr

### Introduction

❖ La Peste des Petits Ruminants (PPR) est une maladie virale des petits ruminants causée par un *Morbillivirus*

❖ Le degré de sévérité de la maladie dépend de la race et de l'espèce infectée et de la souche virale

**Objectifs**

- 1) Etablir un modèle d'étude in vitro permettant de différencier la virulence des souches
- 2) Déterminer les facteurs influençant la différence de virulence

### Matériels

❖ 3 souches du virus de la PPR (PPRV) de différents niveaux de virulence :

- **Souche vaccinale:** PPRV Nigéria 7511 (VN7511)
- **Souche de virulence faible:** PPRV Côte d'Ivoire 1989 (CS9)
- **Souche de virulence forte:** PPRV Maroc 2008 (MA08)

❖ Cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de chèvres et Concanavaline A (Con A)

### Méthodes

❖ Cytométrie en flux

❖ Séquençage RNASeq de l'ARNm des cellules infectées

❖ Analyse de l'expression des protéines par spectrométrie de masse

### Résultats

❖ Les voies métaboliques impliquées dans la réponse antivirale sont régulées de manière commune entre infections

**Canonical pathways : 72 tpi**

### Conclusion

❖ **Discrimination in vitro des souches virales**

- > Haut niveau de réplication et d'inhibition de la prolifération cellulaire de la Souche de virulence forte PPRV Maroc 2008

❖ **Les voies métaboliques impliquées dans la réponse antivirale sont activées de manière commune à toutes les infections**

- > Activation spécifique des voies métaboliques pro-inflammatoires et apoptotiques par la souche PPRV Maroc 2008

❖ **Forte corrélation entre les données transcriptomiques et protéomiques**

- > Les protéines IFIT1, IFIT2, IFIT3, MX1, MX2, OAS1X et ISG15 de la réponse interféron antivirale ont été détectées par les deux techniques

❖ Les protéines antivirales sont accumulées de manière commune entre infections

❖ PPRV MA08 a un niveau de réplication supérieur

**Prolifération cellulaire à 96 hpi**

**Inhibition de la prolifération cellulaire**

# *Références*

## REFERENCES

- Abdullah N, Kelly JT, Graham SC *et al.* (2018) Structure-Guided Identification of a Nonhuman Morbillivirus with Zoonotic Potential. *Journal of virology*, doi: 10.1128/JVI.01248-18.
- Abubakar M, Mahapatra M, Muniraju M *et al.* (2017) Serological Detection of Antibodies to Peste des Petits Ruminants Virus in Large Ruminants. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi: 10.1111/tbed.12392.
- Agier J, Efenberger M, Brzezińska-Błaszczyk E (2015) Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Central European Journal of Immunology*, doi: 10.5114/ceji.2015.51359.
- Alford MA, Baquir B, Santana FL, Haney EF, Hancock REW (2020) Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance. *Frontiers in microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2020.01902.
- Alfred N, Qian B, Qin X *et al.* (2021) Inhibition of eIF2 $\alpha$  Phosphorylation by Peste des Petits Ruminant Virus Phosphoprotein Facilitates Viral Replication. *Frontiers in veterinary science*, doi: 10.3389/fvets.2021.645571.
- Alves L, Khosravi M, Avila M *et al.* (2015) SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus in astrocytes. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.00004-15.
- Anderson DE, Messling V von (2008) Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.01419-08.
- Arruda B, Shen H, Zheng Y, Li G (2021) Novel Morbillivirus as Putative Cause of Fetal Death and Encephalitis among Swine. *Emerging infectious diseases*, doi: 10.3201/eid2707.203971.
- Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC (2010) Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry Part A*, doi: 10.1002/cyto.a.20859.
- Ayasoufi K, Pfaller CK (2020) Seek and hide: the manipulating interplay of measles virus with the innate immune system. *Current opinion in virology*, doi: 10.1016/j.coviro.2020.03.001.
- Aymeric J, Lefranc G (2009) *Immunologie humaine*. de boeck.

- Bamouh Z, Fakri F, Jazouli M, Safini N, Omari Tadlaoui K, Elharrak M (2019) Peste des petits ruminants pathogenesis on experimental infected goats by the Moroccan 2015 isolate. *BMC Veterinary Research*, doi: 10.1186/s12917-019-2164-6.
- Banskar S, Detzner AA, Juarez-Rodriguez MD, Hozo I, Gupta D, Dziarski R (2019) The Pglyrp1-Regulated Microbiome Enhances Experimental Allergic Asthma. *The Journal of Immunology*, doi: 10.4049/jimmunol.1900711.
- Baron J, Bin-Tarif A, Herbert R, Frost L, Taylor G, Baron MD (2014) Early changes in cytokine expression in peste des petits ruminants disease. *Veterinary research*, doi: 10.1186/1297-9716-45-22.
- Baron MD, Hodgson S, Moffat K, Qureshi M, Graham SP, Darpel KE (2020) Depletion of CD8+ T cells from vaccinated goats does not affect protection from challenge with wild-type peste des petits ruminants virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi: 10.1111/tbed.13936.
- Bataille A, Salami H, Seck I *et al.* (2021) Combining viral genetic and animal mobility network data to unravel peste des petits ruminants transmission dynamics in West Africa. *PLoS pathogens*, doi: 10.1371/journal.ppat.1009397.
- Beineke A, Baumgärtner W, Wohlsein P (2015) Cross-species transmission of canine distemper virus-an update. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, doi: 10.1016/j.onehlt.2015.09.002.
- Benfield CTO, Hill S, Shatar M *et al.* (2021) *Molecular epidemiology of peste des petits ruminants virus emergence in critically endangered Mongolian saiga antelope and other wild ungulates.*
- Bieback K, Lien E, Klagge IM *et al.* (2002) Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.76.17.8729-8736.2002.
- Bieringer M, Han JW, Kendl S, Khosravi M, Plattet P, Schneider-Schaulies J (2013) Experimental adaptation of wild-type canine distemper virus (CDV) to the human entry receptor CD150. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0057488.
- Birch J, Juleff N, Heaton MP, Kalbfleisch T, Kijas J, Bailey D (2013) Characterization of ovine Nectin-4, a novel peste des petits ruminants virus receptor. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.02792-12.



- Blancou J (1994) Les anciennes méthodes de surveillance et de contrôle de la peste bovine. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **47**, 21–31.
- Blaszczyk K, Nowicka H, Kostyrko K, Antonczyk A, Wesoly J, Bluysen HAR (2016) The unique role of STAT2 in constitutive and IFN-induced transcription and antiviral responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.02.010.
- Braun RO, Brunner L, Wyler K *et al.* (2018) System immunology-based identification of blood transcriptional modules correlating to antibody responses in sheep. *NPJ vaccines*, doi: 10.1038/s41541-018-0078-0.
- Britton A, Caron A, Bedane B (2019) Progress to Control and Eradication of Peste des Petits Ruminants in the Southern African Development Community Region. *Frontiers in veterinary science*, doi: 10.3389/fvets.2019.00343.
- Burns RJL, Douangngeun B, Theppangna W *et al.* (2019) Peste des Petits Ruminants (PPR) virus serological surveillance in goats in Lao PDR: Issues for disease eradication in a low-resource disease-free setting. *Transboundary and emerging diseases*, doi: 10.1111/tbed.13109.
- Butina TV, Denikina NN, Belikov SI (2010) Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (*Phoca sibirica*) population. *Veterinary microbiology*, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.027.
- Calain P, Roux L (1993) The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/jvi.67.8.4822-4830.1993.
- Cardone J, Le Friec G, Kemper C (2011) CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clinical and experimental immunology*, doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04400.x.
- Ceciliani F, Ávila Morales G, Matteis G de *et al.* (2021) Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages. *Methods*, doi: 10.1016/j.ymeth.2020.06.017.
- Chang Q, Guo F, Liu J *et al.* (2019) Basal interferon signaling and therapeutic use of interferons in controlling peste des petits ruminants virus infection. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, doi: 10.1016/j.meegid.2019.103981.

- Cherpillod P, Zipperle L, Wittek R, Zurbriggen A (2004) An mRNA region of the canine distemper virus fusion protein gene lacking AUG codons can promote protein expression. *Archives of virology*, doi: 10.1007/s00705-004-0342-7.
- Chinnakannan SK, Nanda SK, Baron MD (2013) Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0057063.
- Chometon TQ, Da Siqueira MS, Sant Anna JC *et al.* (2020) A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0231132.
- Chowdhury EH, Bhuiyan AR, Rahman MM, Siddique MSA, Islam MR (2014) Natural peste des petits ruminants virus infection in Black Bengal goats: virological, pathological and immunohistochemical investigation. *BMC Veterinary Research*, doi: 10.1186/s12917-014-0263-y.
- Colenutt C, Brown E, Paton DJ *et al.* (2021) Environmental sampling for the detection of foot-and-mouth disease virus and peste des petits ruminants virus in a live goat market, Nepal. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi: 10.1111/tbed.14257.
- Comerlato J, Albina E, Puech C *et al.* (2020) Identification of a murine cell line that distinguishes virulent from attenuated isolates of the morbillivirus Peste des Petits Ruminants, a promising tool for virulence studies. *Virus research*, doi: 10.1016/j.virusres.2020.198035.
- Condack C, Grivel J-C, Devaux P, Margolis L, Cattaneo R (2007) Measles virus vaccine attenuation: suboptimal infection of lymphatic tissue and tropism alteration. *The Journal of Infectious Diseases*, doi: 10.1086/519689.
- Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI (2015) Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunology*, doi: 10.1186/s12865-015-0113-0.
- Cosby SL, Weir L (2018) Measles vaccination: Threat from related veterinary viruses and need for continued vaccination post measles eradication. *Human vaccines & immunotherapeutics*, doi: 10.1080/21645515.2017.1403677.



- Couacy-Hymann E, Bodjo C, Danho T, Libeau G, Diallo A (2007) Evaluation of the virulence of some strains of peste-des-petits-ruminants virus (PPRV) in experimentally infected West African dwarf goats. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, doi: 10.1016/j.tvjl.2005.08.020.
- Couacy-Hymann E, Koffi MY, Kouadio VK *et al.* (2019) Experimental infection of cattle with wild type peste-des-petits-ruminants virus - Their role in its maintenance and spread. *Research in veterinary science*, doi: 10.1016/j.rvsc.2019.02.011.
- Delgado-Eckert E, Ojosnegros S, Beerenwinkel N (2011) The evolution of virulence in RNA viruses under a competition-colonization trade-off. *Bulletin of Mathematical Biology*, doi: 10.1007/s11538-010-9596-2.
- Delpeut S, Noyce RS, Richardson CD (2014) The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. *Viruses*, doi: 10.3390/v6062268.
- Di Guardo G, Mazzariol S (2013) Dolphin Morbillivirus: a lethal but valuable infection model. *Emerging microbes & infections*, doi: 10.1038/emi.2013.74.
- Di Guardo G, Mazzariol S (2016) Cetacean Morbillivirus-Associated Pathology: Knowns and Unknowns. *Frontiers in microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2016.00112.
- Diallo A (1990) Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Veterinary microbiology*, doi: 10.1016/0378-1135(90)90145-L.
- Diallo A, Taylor WP, Lefèvre PC, Provost A (1989) Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants : candidat pour un vaccin homologue vivant. *Revue Elev. Méd. Pays trop*, **42**, 311–319.
- Diop M, Sarr J, Libeau G (2005) Evaluation of novel diagnostic tools for peste des petits ruminants virus in naturally infected goat herds. *Epidemiology and infection*, doi: 10.1017/S0950268805003729.
- Domingo E, Sheldon J, Perales C (2012) Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, doi: 10.1128/MMBR.05023-11.
- Donduashvili M, Goginashvili K, Toklikishvili N *et al.* (2018) Identification of Peste des Petits Ruminants Virus, Georgia, 2016. *Emerging infectious diseases*, doi: 10.3201/eid2408.170334.

- Dörig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*, doi: 10.1016/0092-8674(93)80071-L.
- Dou Y, Liang Z, Prajapati M, Zhang R, Li Y, Zhang Z (2020) Expanding Diversity of Susceptible Hosts in Peste Des Petits Ruminants Virus Infection and Its Potential Mechanism Beyond. *Frontiers in veterinary science*, doi: 10.3389/fvets.2020.00066.
- Drexler JF, Corman VM, Müller MA *et al.* (2012) Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nature Communications*, doi: 10.1038/ncomms1796.
- Dundon WG, Diallo A, Cattoli G (2020) Peste des petits ruminants in Africa: a review of currently available molecular epidemiological data, 2020. *Archives of virology*, doi: 10.1007/s00705-020-04732-1.
- Duque-Valencia J, Sarute N, Olarte-Castillo XA, Ruíz-Sáenz J (2019) Evolution and Interspecies Transmission of Canine Distemper Virus-An Outlook of the Diverse Evolutionary Landscapes of a Multi-Host Virus. *Viruses*, doi: 10.3390/v11070582.
- Düx A, Lequime S, Patrono LV *et al.* (2020) Measles virus and rinderpest virus divergence dated to the sixth century BCE. *Science (New York, N.Y.)*, doi: 10.1126/science.aba9411.
- El Hag Ali B, Taylor WP (1984) Isolation of peste des petits ruminants virus from the Sudan. *Research in veterinary science*, doi: 10.1016/S0034-5288(18)31991-X.
- Eloiflin R-J, Auray G, Python S *et al.* (2021) Identification of Differential Responses of Goat PBMCs to PPRV Virulence Using a Multi-Omics Approach. *Frontiers in Immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2021.745315.
- Eloiflin R-J, Boyer M, Kwiatek O *et al.* (2019) Evolution of Attenuation and Risk of Reversal in Peste des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria 75/1. *Viruses*, doi: 10.3390/v11080724.
- Enchery F, Hamers C, Kwiatek O *et al.* (2019) Development of a PPRV challenge model in goats and its use to assess the efficacy of a PPR vaccine. *Vaccine*, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.01.057.
- Fakri FZ, Elhajjam A, Bamouh Z *et al.* (2017) Susceptibility of Moroccan sheep and goat breeds to peste des petits ruminants virus. *Acta veterinaria Scandinavica*, doi: 10.1186/s13028-017-0323-y.

- Fakri F-Z, Bamouh Z, Jazouli M, Omari Tadlaoui K, Elharrak M (2019) Experimental infection of dromedary camels with virulent virus of Peste des Petits Ruminants. *Veterinary microbiology*, doi: 10.1016/j.vetmic.2019.07.004.
- FAO, OIE (2015) Global Strategy for the Control and Eradication of PPR. Investing in Veterinary Systems, Food Security and Poverty Alleviation. <http://www.fao.org/emergencies/resources/documents/resources-detail/en/c/282777/>.
- FAO, OIE (2016) Peste des Petits Ruminants Global Eradication Programme - Contribution to food security, poverty alleviation and resilience improvement, Five years (2017-2021).
- Fukuhara H, Ito Y, Sako M *et al.* (2019) Specificity of Morbillivirus Hemagglutinins to Recognize SLAMF of Different Species. *Viruses*, doi: 10.3390/v11080761.
- Furuse Y, Suzuki A, Oshitani H (2010) Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virology Journal*, doi: 10.1186/1743-422X-7-52.
- Gautam S, Joshi C, Sharma AK *et al.* (2021) Virus distribution and early pathogenesis of highly pathogenic peste-des-petits-ruminants virus in experimentally infected goats. *Microbial pathogenesis*, **161**, 105232.
- Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, Hart BA 't, van Kooyk Y (2004) Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104558.
- Georgel P, Bahram S (2006) Immunité innée antivirale: rôle des mécanismes Toll-dépendants et Toll-indépendants. *médecine/sciences*, doi: 10.1051/medsci/20062211961.
- Goodbourn S, Randall RE (2009) The regulation of type I interferon production by paramyxoviruses. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, doi: 10.1089/jir.2009.0071.
- Grosjean I, Caux C, Bella C *et al.* (1997) Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, doi: 10.1084/jem.186.6.801.
- Guinan J, Lopez BS (2020) Generating Bovine Monocyte-Derived Dendritic Cells for Experimental and Clinical Applications Using Commercially

- Available Serum-Free Medium. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2020.591185.
- Guo Z, Zhang Z, Prajapati M, Li Y (2021) Lymphopenia Caused by Virus Infections and the Mechanisms Beyond. *Viruses*, doi: 10.3390/v13091876.
- Hamilton K, Baron MD, Matsuo K, Visser D (2017) Rinderpest eradication: challenges for remaining disease free and implications for future eradication efforts. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, doi: 10.20506/rst.36.2.2676.
- Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP (2010) Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, doi: 10.1016/j.biocel.2010.04.005.
- Hodgson S, Moffat K, Hill H *et al.* (2018) Comparison of the Immunogenicities and Cross-Lineage Efficacies of Live Attenuated Peste des Petits Ruminants Virus Vaccines PPRV/Nigeria/75/1 and PPRV/Sungri/96. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.01471-18.
- Ikegame S, Hashiguchi T, Hung C-T *et al.* (2021) Fitness selection of hyperfusogenic measles virus F proteins associated with neuropathogenic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/pnas.2026027118.
- Jaisree S, Aravindhbabu RP, Roy P, Jayathangaraj MG (2018) Fatal peste des petits ruminants disease in Chowsingha. *Transboundary and emerging diseases*, doi: 10.1111/tbed.12694.
- Kamel M, El-Sayed A (2019) Toward peste des petits virus (PPRV) eradication: Diagnostic approaches, novel vaccines, and control strategies. *Virus research*, doi: 10.1016/j.virusres.2019.197774.
- Kato M, McDonald KJ, Khan S *et al.* (2006) Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International Immunology*, doi: 10.1093/intimm/dxl022.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, doi: 10.1038/ni.1863.
- Kennedy S (1998) Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of comparative pathology*, doi: 10.1016/S0021-9975(98)80045-5.

- Kumar N, Maherchandani S, Kashyap SK *et al.* (2014) Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review. *Viruses*, doi: 10.3390/v6062287.
- Kwiatek O, Ali YH, Saeed IK *et al.* (2011) Asian lineage of peste des petits ruminants virus, Africa. *Emerging infectious diseases*, doi: 10.3201/eid1707.101216.
- Laksono BM, Vries RD de, McQuaid S, Duprex WP, Swart RL de (2016) Measles Virus Host Invasion and Pathogenesis. *Viruses*, doi: 10.3390/v8080210.
- Laksono BM, Vries RD de, Verburgh RJ *et al.* (2018) Studies into the mechanism of measles-associated immune suppression during a measles outbreak in the Netherlands. *Nature Communications*, doi: 10.1038/s41467-018-07515-0.
- Lefèvre PC (1991) Une maladie en pleine expansion : la peste des petits ruminants. *Revue Mondiale de Zootechnie*, **66**, 55–58.
- Lefèvre PC, Diallo A (1990) Peste des petits ruminants. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, doi: 10.20506/rst.9.4.532.
- Lemon K, Vries RD de, Mesman AW *et al.* (2011) Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS pathogens*, doi: 10.1371/journal.ppat.1001263.
- Li J, Li L, Wu X *et al.* (2017) Diagnosis of Peste des Petits Ruminants in Wild and Domestic Animals in Xinjiang, China, 2013-2016. *Transboundary and emerging diseases*, doi: 10.1111/tbed.12600.
- Li L, Wu J, Cao X *et al.* (2019a) Proteomic analysis of murine bone marrow derived dendritic cells in response to peste des petits ruminants virus. *Research in veterinary science*, doi: 10.1016/j.rvsc.2019.06.011.
- Li L, Wu J, Liu D *et al.* (2019b) Transcriptional Profiles of Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells in Response to Peste des Petits Ruminants Virus. *Veterinary sciences*, doi: 10.3390/vetsci6040095.
- Li P, Zhu Z, Zhang X *et al.* (2019c) The Nucleoprotein and Phosphoprotein of Peste des Petits Ruminants Virus Inhibit Interferons Signaling by Blocking the JAK-STAT Pathway. *Viruses*, doi: 10.3390/v11070629.
- Li S (2019) Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Cells*, doi: 10.3390/cells8050508.

- Li S, Roupael N, Duraisingham S *et al.* (2014) Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nature immunology*, doi: 10.1038/ni.2789.
- Linjie L, Xiaoling S, Xiaoxia M, Xin C, Ali A, Jialin B (2021) Peste des petits ruminants virus non-structural C protein inhibits the induction of interferon- $\beta$  by potentially interacting with MAVS and RIG-I. *Virus genes*, doi: 10.1007/s11262-020-01811-y.
- Liu F, Wu X, Li L, Zou Y, Liu S, Wang Z (2016) Evolutionary characteristics of morbilliviruses during serial passages in vitro: Gradual attenuation of virus virulence. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, doi: 10.1016/j.cimid.2016.05.007.
- Liu F, Wu X, Zou Y *et al.* (2015) Small interfering RNAs targeting peste des petits ruminants virus M mRNA increase virus-mediated fusogenicity and inhibit viral replication in vitro. *Antiviral Research*, doi: 10.1016/j.antiviral.2015.08.011.
- Ma X, Yang X, Nian X *et al.* (2015) Identification of amino-acid residues in the V protein of peste des petits ruminants essential for interference and suppression of STAT-mediated interferon signaling. *Virology*, doi: 10.1016/j.virol.2015.03.039.
- Maarifi G, Smith N, Nisole S (2020) La réponse interféron - Un grand pouvoir implique de grandes responsabilités. *Medecine sciences : M/S*, doi: 10.1051/medsci/2020032.
- Mahapatra M, Selvaraj M, Parida S (2020) Comparison of Immunogenicity and Protective Efficacy of PPR Live Attenuated Vaccines (Nigeria 75/1 and Sungri 96) Administered by Intranasal and Subcutaneous Routes. *Vaccines*, doi: 10.3390/vaccines8020168.
- Mamaev LV, Visser IK, Belikov SI *et al.* (1996) Canine distemper virus in Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.138.18.437.
- Manjunath S, Mishra BP, Mishra B *et al.* (2017) Comparative and temporal transcriptome analysis of peste des petits ruminants virus infected goat peripheral blood mononuclear cells. *Virus research*, doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.014.
- Manjunath S, Saxena S, Mishra B *et al.* (2019) Early transcriptome profile of goat peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) infected with peste



- des petits ruminant's vaccine virus (Sungri/96) revealed induction of antiviral response in an interferon independent manner. *Research in veterinary science*, doi: 10.1016/j.rvsc.2019.03.014.
- Marashi M, Masoudi S, Moghadam MK *et al.* (2017) Peste des Petits Ruminants Virus in Vulnerable Wild Small Ruminants, Iran, 2014-2016. *Emerging infectious diseases*, doi: 10.3201/eid2304.161218.
- Marie JC, Kehren J, Trescol-Biémont M-C *et al.* (2001) Mechanism of Measles Virus–Induced Suppression of Inflammatory Immune Responses. *Immunity*, doi: 10.1016/S1074-7613(01)00090-5.
- Martella V, Elia G, Buonavoglia C (2008) Canine distemper virus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, doi: 10.1016/j.cvsm.2008.02.007.
- Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J (2016) Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Veterinary Research*, doi: 10.1186/s12917-016-0702-z.
- Martin-Gayo E, Yu XG (2019) Role of Dendritic Cells in Natural Immune Control of HIV-1 Infection. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2019.01306.
- Matthijs AMF, Auray G, Jakob V *et al.* (2019) Systems Immunology Characterization of Novel Vaccine Formulations for Mycoplasma hyopneumoniae Bacterins. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2019.01087.
- Meng X, Dou Y, Zhai J *et al.* (2011) Tissue distribution and expression of signaling lymphocyte activation molecule receptor to peste des petits ruminant virus in goats detected by real-time PCR. *Journal of Molecular Histology*, doi: 10.1007/s10735-011-9352-4.
- Messling V von, Cattaneo R (2002) Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.76.9.4172-4180.2002.
- Miao Q, Qi R, Meng C *et al.* (2021) Caprine MAVS Is a RIG-I Interacting Type I Interferon Inducer Downregulated by Peste des Petits Ruminants Virus Infection. *Viruses*, doi: 10.3390/v13030409.
- Mina MJ, Kula T, Leng Y *et al.* (2019) Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, doi: 10.1126/science.aay6485.



- Mondal B, Sreenivasa BP, Dhar P, Singh RP, Bandyopadhyay SK (2001) Apoptosis induced by peste des petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells. *Virus research*, doi: 10.1016/S0168-1702(00)00214-8.
- Nambulli S, Sharp CR, Acciardo AS, Drexler JF, Duprex WP (2016) Mapping the evolutionary trajectories of morbilliviruses: what, where and whither. *Current opinion in virology*, doi: 10.1016/j.coviro.2016.01.019.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F *et al.* (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/jvi.67.10.6025-6032.1993.
- Nfon CK, Marszal P, Zhang S, Weingartl HM (2012) Innate immune response to Rift Valley fever virus in goats. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, doi: 10.1371/journal.pntd.0001623.
- Nikolin VM, Osterrieder K, Messling V von *et al.* (2012) Antagonistic pleiotropy and fitness trade-offs reveal specialist and generalist traits in strains of canine distemper virus. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0050955.
- Niyokwishimira A, D Baziki J de, Dundon WG *et al.* (2019) Detection and molecular characterization of Peste des Petits Ruminants virus from outbreaks in Burundi, December 2017-January 2018. *Transboundary and emerging diseases*, doi: 10.1111/tbed.13255.
- Nizamani ZA, Servan de Almeida R, Albina E, Parveen F, Libeau G (2014) In vitro study of lymphotropic and immunomodulatory properties of the peste des petits ruminants virus (pprv). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **24**, 1380–1387.
- Noyce RS, Richardson CD (2012) Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. *Trends in microbiology*, doi: 10.1016/j.tim.2012.05.006.
- Nunez R, Garay N, Bruno A, Villafane C, Bruno E, Filgueira L (2004) Functional and structural characterization of two populations of human monocyte-derived dendritic cells. *Experimental and Molecular Pathology*, doi: 10.1016/j.yexmp.2004.05.001.
- O'Connell P, Amalfitano A, Aldhamen YA (2019) SLAM Family Receptor Signaling in Viral Infections: HIV and Beyond. *Vaccines*, doi: 10.3390/vaccines7040184.

- Ohishi K, Maruyama T, Seki F, Takeda M (2019) Marine Morbilliviruses: Diversity and Interaction with Signaling Lymphocyte Activation Molecules. *Viruses*, doi: 10.3390/v11070606.
- OIE (2018a) *Event summary: Peste des petits ruminants, Bulgaria*. ip.
- OIE (2018b) *Immediate notification report*.  
www.oie.int/wahis\_2/temp/reports/en\_imm\_0000029015\_20181220\_185141.pdf.
- OIE, FAO (2015) *Global control and eradication of peste des petits ruminants*.  
http://www.fao.org/3/I4477E/i4477e.pdf.
- Otsuki N, Sekizuka T, Seki F *et al.* (2013) Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor. *Virology*, doi: 10.1016/j.virol.2012.10.033.
- Parida S, Couacy-Hymann E, Pope RA *et al.* (2015a) Pathology of Peste des Petits Ruminants. In: *Peste des Petits Ruminants Virus*. (ed. Munir M), pp. 51–67. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, Muthuchelvan D, Buczkowski H, Banyard AC (2015b) Peste des petits ruminants. *Veterinary microbiology*, doi: 10.1016/j.vetmic.2015.08.009.
- Park KT, ElNaggar MM, Abdellrazeq GS *et al.* (2016) Phenotype and Function of CD209+ Bovine Blood Dendritic Cells, Monocyte-Derived-Dendritic Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0165247.
- Park KT, Seo KS, Godwin NA *et al.* (2015) Characterization and expression of monoclonal antibody-defined molecules on resting and activated bovine  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$  T and NK cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, doi: 10.1016/j.vetimm.2015.09.002.
- Pawar RM, Raj GD, Kumar TMAS, Raja A, Balachandran C (2008a) Effect of siRNA mediated suppression of signaling lymphocyte activation molecule on replication of peste des petits ruminants virus in vitro. *Virus research*, doi: 10.1016/j.virusres.2008.04.026.
- Pawar RM, Raj GD, Kumar TMAS, Raja A, Balachandran C (2008b) Effect of siRNA mediated suppression of signaling lymphocyte activation molecule on replication of peste des petits ruminants virus in vitro. *Virus research*, doi: 10.1016/j.virusres.2008.04.026.

- Petrova VN, Sawatsky B, Han AX *et al.* (2019) Incomplete genetic reconstitution of B cell pools contributes to prolonged immunosuppression after measles. *Science immunology*, doi: 10.1126/sciimmunol.aay6125.
- Pfeffermann K, Dörr M, Zirkel F, Messling V von (2018) Morbillivirus Pathogenesis and Virus-Host Interactions. *Advances in virus research*, doi: 10.1016/bs.aivir.2017.12.003.
- Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH (2009) Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0007475.
- Plattet P, Alves L, Herren M, Aguilar HC (2016) Measles Virus Fusion Protein: Structure, Function and Inhibition. *Viruses*, doi: 10.3390/v8040112.
- Plattet P, Cherpillod P, Wiener D *et al.* (2007) Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.01287-07.
- Plempner RK, Compans RW (2003) Mutations in the putative HR-C region of the measles virus F2 glycoprotein modulate syncytium formation. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/jvi.77.7.4181-4190.2003.
- Pope RA, Parida S, Bailey D, Brownlie J, Barrett T, Banyard AC (2013) Early events following experimental infection with Peste-Des-Petits ruminants virus suggest immune cell targeting. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0055830.
- Prajapati M, Alfred N, Dou Y *et al.* (2019) Host Cellular Receptors for the Peste des Petits Ruminant Virus. *Viruses*, doi: 10.3390/v11080729.
- Prajapati M, Dou Y, Zhu X *et al.* (2020) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on CD150/SLAM for the Detection of Peste des Petits Ruminant Virus. *Frontiers in veterinary science*, doi: 10.3389/fvets.2020.00196.
- Pruvot M, Fine AE, Hollinger C *et al.* (2020) Outbreak of Peste des Petits Ruminants among Critically Endangered Mongolian Saiga and Other Wild Ungulates, Mongolia, 2016-2017. *Emerging infectious diseases*, doi: 10.3201/eid2601.181998.

- Qi X, Wang T, Li Z *et al.* (2019) MicroRNA-218 Regulates Signaling Lymphocyte Activation Molecular (SLAM) Mediated Peste des Petits Ruminants Virus Infectivity in Goat Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2019.02201.
- Qi X, Wang T, Xue Q, Li Z, Yang B, Wang J (2018) MicroRNA expression profiling of goat peripheral blood mononuclear cells in response to peste des petits ruminants virus infection. *Veterinary Research*, doi: 10.1186/s13567-018-0565-3.
- Rahman A-U, Dhama K, Ali Q *et al.* (2020) Peste des petits ruminants in large ruminants, camels and unusual hosts. *The veterinary quarterly*, doi: 10.1080/01652176.2020.1714096.
- Rajko-Nenow PZ, Cunliffe TG, Flannery JT *et al.* (2017) Complete Genome Sequence of Peste des Petits Ruminants Virus from Georgia, 2016. *Genome announcements*, doi: 10.1128/genomeA.01091-17.
- Randall RE, Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *The Journal of general virology*, doi: 10.1099/vir.0.83391-0.
- Rijks JM, Osterhaus, A. D. M. E., Kuiken T (2008) *Phocine distemper revisited. Multidisciplinary analysis of the 2002 phocine distemper virus epidemic in the Netherlands.*
- Rima BK, Duprex WP (2006) Morbilliviruses and human disease. *The Journal of Pathology*, doi: 10.1002/path.1873.
- Rojas JM, Avia M, Pascual E, Sevilla N, Martín V (2017) Vaccination with recombinant adenovirus expressing peste des petits ruminants virus-F or -H proteins elicits T cell responses to epitopes that arises during PPRV infection. *Veterinary Research*, doi: 10.1186/s13567-017-0482-x.
- Rojas JM, Moreno H, Valcárcel F, Peña L, Sevilla N, Martín V (2014) Vaccination with recombinant adenoviruses expressing the peste des petits ruminants virus F or H proteins overcomes viral immunosuppression and induces protective immunity against PPRV challenge in sheep. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0101226.
- Rojas JM, Pascual E, Wattedgedera SR *et al.* (2021a) Hemagglutinin protein of Peste des Petits Ruminants virus (PPRV) activates the innate immune

- response via Toll-like receptor 2 signaling. *Virulence*, doi: 10.1080/21505594.2021.1882246.
- Rojas JM, Rodríguez-Martín D, Avia M, Martín V, Sevilla N (2018) Peste des Petits Ruminants Virus Fusion and Hemagglutinin Proteins Trigger Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Infected Cells. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2018.03172.
- Rojas JM, Sevilla N, Martín V (2016) PPRV-Induced Immunosuppression at the Interface of Virus-Host Interaction. *British Journal of Virology*, doi: 10.17582/journal.bjv/2016.3.5.140.160.
- Rojas JM, Sevilla N, Martín V (2021b) A New Look at Vaccine Strategies Against PPRV Focused on Adenoviral Candidates. *Frontiers in veterinary science*, doi: 10.3389/fvets.2021.729879.
- Romanets-Korbut O, Kovalevska LM, Seya T, Sidorenko SP, Horvat B (2016) Measles virus hemagglutinin triggers intracellular signaling in CD150-expressing dendritic cells and inhibits immune response. *Cellular & Molecular Immunology*, doi: 10.1038/cmi.2015.55.
- Sanz Bernardo B, Goodbourn S, Baron MD (2017) Control of the induction of type I interferon by Peste des petits ruminants virus. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0177300.
- Sarkar J, Sreenivasa BP, Singh RP, Dhar P, Bandyopadhyay SK (2003) Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Vaccine*, doi: 10.1016/S0264-410X(03)00512-7.
- Satoh T, Kato H, Kumagai Y *et al.* (2010) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/pnas.0912986107.
- Sawatsky B, Cattaneo R, Messling V von (2018) Canine Distemper Virus Spread and Transmission to Naive Ferrets: Selective Pressure on Signaling Lymphocyte Activation Molecule-Dependent Entry. *Journal of virology*, doi: 10.1128/JVI.00669-18.
- Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, Meulen V ter (1995) Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *European journal of immunology*, doi: 10.1002/eji.1830250418.

- Schoenborn JR, Wilson CB (eds.) (2007) *Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses*. *Advances in Immunology*.
- Schulz C, Fast C, Schlottau K, Hoffmann B, Beer M (2018) Neglected Hosts of Small Ruminant Morbillivirus. *Emerging infectious diseases*, doi: 10.3201/eid2412.180507.
- Schulz C, Fast C, Wernery U *et al.* (2019) Camelids and Cattle Are Dead-End Hosts for Peste-des-Petits-Ruminants Virus. *Viruses*, doi: 10.3390/v11121133.
- Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y (2003) Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.77.18.9943-9950.2003.
- Şevik M, Oz ME (2019) Detection of Peste des petits ruminants virus RNA in *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey. *Veterinaria italiana*, doi: 10.12834/VetIt.1069.5784.2.
- Shatar M, Khanui B, Purevtseren D *et al.* (2017) First genetic characterization of peste des petits ruminants virus from Mongolia. *Archives of virology*, doi: 10.1007/s00705-017-3456-4.
- Sieg M, Busch J, Eschke M *et al.* (2019) A New Genotype of Feline Morbillivirus Infects Primary Cells of the Lung, Kidney, Brain and Peripheral Blood. *Viruses*, doi: 10.3390/v11020146.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK *et al.* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- Swart RL de, Ludlow M, Witte L de *et al.* (2007) Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS pathogens*, doi: 10.1371/journal.ppat.0030178.
- Takeuchi K, Miyajima N, Kobune F, Tashiro M (2000) Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus genes*, doi: 10.1023/A:1008196729676.
- Talker SC, Baumann A, Barut GT, Keller I, Bruggmann R, Summerfield A (2018) Precise Delineation and Transcriptional Characterization of



- Bovine Blood Dendritic-Cell and Monocyte Subsets. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2018.02505.
- Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y (2001) Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.75.13.5842-5850.2001.
- Taylor WP, Abegunde A (1979) The isolation of peste des petits ruminants virus from Nigerian sheep and goats. *Research in veterinary science*, **26**, 94–96.
- Thakur N, Conceicao C, Isaacs A *et al.* (2021) Micro-fusion inhibition tests: quantifying antibody neutralization of virus-mediated cell-cell fusion. *Journal of General Virology*, doi: 10.1099/jgv.0.001506.
- Thomas GD, Hamers AAJ, Nakao C *et al.* (2017) Human Blood Monocyte Subsets: A New Gating Strategy Defined Using Cell Surface Markers Identified by Mass Cytometry. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309145.
- Tirumurugaan KG, Pawar RM, Dhinakar Raj G, Thangavelu A, Hammond JA, Parida S (2020) RNAseq Reveals the Contribution of Interferon Stimulated Genes to the Increased Host Defense and Decreased PPR Viral Replication in Cattle. *Viruses*, doi: 10.3390/v12040463.
- Tough DF (2004) Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leukemia & lymphoma*, doi: 10.1080/1042819031000149368.
- Toukara K, Kwiatek O, Sidibe CAK *et al.* (2021) Persistence of the historical lineage I of West Africa against the ongoing spread of the Asian lineage of peste des petits ruminants virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, doi: 10.1111/tbed.14066.
- Toukara K, Nwankpa N (2017) Rinderpest experience. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, doi: 10.20506/rst.36.2.2675.
- Truong T, Boshra H, Embury-Hyatt C *et al.* (2014) Peste des petits ruminants virus tissue tropism and pathogenesis in sheep and goats following experimental infection. *PloS one*, doi: 10.1371/journal.pone.0087145.
- Vries RD de, Duprex WP, Swart RL de (2015) Morbillivirus infections: an introduction. *Viruses*, doi: 10.3390/v7020699.



- Vries RD de, McQuaid S, van Amerongen G *et al.* (2012) Measles immune suppression: lessons from the macaque model. *PLoS pathogens*, doi: 10.1371/journal.ppat.1002885.
- Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J (2018) S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2018.01298.
- Wani SA, Praharaj MR, Sahu AR *et al.* (2021a) Systems Biology behind Immunoprotection of Both Sheep and Goats after Sungri/96 PPRV Vaccination. *mSystems*, doi: 10.1128/mSystems.00820-20.
- Wani SA, Sahu AR, Khan RIN *et al.* (2019) Contrasting Gene Expression Profiles of Monocytes and Lymphocytes From Peste-Des-Petits-Ruminants Virus Infected Goats. *Frontiers in immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2019.01463.
- Wani SA, Sahu AR, Khan RIN *et al.* (2021b) Proteome Modulation in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Peste des Petits Ruminants Vaccinated Goats and Sheep. *Frontiers in veterinary science*, doi: 10.3389/fvets.2021.670968.
- Wani SA, Sahu AR, Saxena S *et al.* (2018) Expression kinetics of ISG15, IRF3, IFN $\gamma$ , IL10, IL2 and IL4 genes vis-a-vis virus shedding, tissue tropism and antibody dynamics in PPRV vaccinated, challenged, infected sheep and goats. *Microbial pathogenesis*, doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.027.
- Wasee Ullah R, Bin Zahur A, Latif A *et al.* (2016) Detection of Peste des Petits Ruminants Viral RNA in Fecal Samples of Goats after an Outbreak in Punjab Province of Pakistan: A Longitudinal Study. *BioMed research international*, doi: 10.1155/2016/1486824.
- Witte L de, Abt M, Schneider-Schaulies S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH (2006) Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *Journal of Virology*, doi: 10.1128/JVI.80.7.3477-3486.2006.
- Witte L de, Vries RD de, van der Vlist M *et al.* (2008) DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. *PLoS pathogens*, doi: 10.1371/journal.ppat.1000049.
- Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL *et al.* (2012) Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/pnas.1119972109.

- Wu X, Liu F, Li L, Zou Y, Liu S, Wang Z (2016) Major mutation events in structural genes of peste des petits ruminants virus through serial passages in vitro. *Virus genes*, doi: 10.1007/s11262-016-1317-y.
- Yanagi Y, Takeda M, Ohno S (2006) Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *The Journal of general virology*, doi: 10.1099/vir.0.82221-0.
- Yang B, Qi X, Guo H *et al.* (2018) Peste des Petits Ruminants Virus Enters Caprine Endometrial Epithelial Cells via the Caveolae-Mediated Endocytosis Pathway. *Frontiers in microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2018.00210.
- Yang B, Xue Q, Guo J *et al.* (2020) Autophagy induction by the pathogen receptor NECTIN4 and sustained autophagy contribute to peste des petits ruminants virus infectivity. *Autophagy*, doi: 10.1080/15548627.2019.1643184.
- Yin H-S, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS (2006) Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*, doi: 10.1038/nature04322.
- Yirsaw A, Baldwin CL (2021) Goat  $\gamma\delta$  T cells. *Developmental and comparative immunology*, doi: 10.1016/j.dci.2020.103809.
- Zakian A, Nouri M, Kahroba H, Mohammadian B, Mokhber-Dezfouli M-R (2016) The first report of peste des petits ruminants (PPR) in camels (*Camelus dromedarius*) in Iran. *Tropical animal health and production*, doi: 10.1007/s11250-016-1078-6.
- Zhang W, Wan T, Li N *et al.* (2001) Genetic approach to insight into the immunobiology of human dendritic cells and identification of CD84-H1, a novel CD84 homologue. *Clin Cancer Res*, 7, 822s-829s.
- Zhao L, Du M, Liu X *et al.* (2020) Interaction with the Receptor SLAM and Baculovirus Surface Display of Peste des petits ruminants Virus Hemagglutinin. *DNA and cell biology*, doi: 10.1089/dna.2020.5414.
- Zhou J, Wang Y, Chang Q, Ma P, Hu Y, Cao X (2018) Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, doi: 10.1159/000495172.
- Zhu Z, Li P, Yang F *et al.* (2019) Peste des Petits Ruminants Virus Nucleocapsid Protein Inhibits Beta Interferon Production by Interacting

with IRF3 To Block Its Activation. *Journal of Virology*, doi:  
10.1128/JVI.00362-19.

La peste des petits ruminants est une maladie virale causée par le virus de la peste des petits ruminants. Ce virus, qui appartient au genre *Morbillivirus*, provoque une maladie grave chez les petits ruminants domestiques (chèvres et moutons) mais atteint également les suidés et artiodactyles sauvages. Dans la nature, la maladie se présente sous trois formes principales : une forme suraiguë, une forme aiguë et une forme subaiguë, voire asymptomatique. Les formes aiguës sont caractérisées par l'apparition de symptômes (tels que la toux, la diarrhée, l'écoulement oculaire et nasal) entraînant une morbidité et une mortalité élevées. Les formes inapparentes, qui sont difficiles à détecter, peuvent contribuer à la propagation silencieuse de la maladie. Dans cette thèse, nous avons cherché à déterminer les facteurs viraux ou de l'hôte qui conduisent à l'apparition ou non des symptômes de la maladie. Pour ce faire, nous avons appliqué une approche multi-omique comprenant des méthodes de séquençage de nouvelle génération (ADN, ARN), la cytométrie de flux et la spectrométrie de masse.

Les résultats obtenus montrent qu'un petit nombre de mutations peut influencer la virulence d'une souche de PPRV. Ces mutations, distribuées dans l'ensemble du génome viral, peuvent être associées à l'atténuation d'une souche virulente à travers, notamment, d'une réduction de la capacité répliquative. La virulence d'une souche virale dépend également de son interaction avec le système immunitaire de l'hôte, donc nous avons analysé la réponse des chèvres Saanen à l'infection par des souches de PPRV de virulences différentes. La vaccination ainsi que l'infection par la souche PPRV Côte d'Ivoire 1989 (faible virulence) n'ont induit aucun symptôme de maladie. Ces souches ont montré une faible répliquative dans les cellules du système immunitaire (macrophages et lymphocytes). Cette faible répliquative, en plus de l'induction d'une réponse antivirale efficace, est en partie responsable de l'absence de symptômes observés. La souche PPRV Maroc 2008 (forte virulence) présente un niveau élevé de répliquative et induit une forte activation de la réponse antivirale et inflammatoire qui s'atténue après la synthèse d'anticorps spécifiques du virus. Les éléments clés qui sous-tendent ces réponses sont expliqués et discutés dans les différents chapitres de cette thèse.

Mots-clés : Peste des Petits Ruminants, Réponse immunitaire, Virulence, Multi-omique