



HAL
open science

Amélioration des protocoles vaccinaux contre la grippe équine et la rhinopneumonie : apport de l'iPPVO en tant qu'adjuvant dans le modèle équin, nouvelle approche de la mesure des anticorps neutralisants

Flora Carnet

► To cite this version:

Flora Carnet. Amélioration des protocoles vaccinaux contre la grippe équine et la rhinopneumonie : apport de l'iPPVO en tant qu'adjuvant dans le modèle équin, nouvelle approche de la mesure des anticorps neutralisants. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMC413 . tel-04621418

HAL Id: tel-04621418

<https://theses.hal.science/tel-04621418v1>

Submitted on 24 Jun 2024

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

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



Normandie Université



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Amélioration des protocoles vaccinaux contre la grippe équine et la rhinopneumonie : apport de l'iPPVO en tant qu'adjuvant dans le modèle équin - nouvelle approche de la mesure des anticorps neutralisants

Présentée et soutenue par
FLORA CARNET

Thèse soutenue le 20/06/2023
devant le jury composé de

MME BÉATRICE GRASLAND	Directeur de recherche, ANSES	Rapporteur du jury
M. STÉPHAN ZIENTARA	INSPECTEUR GENERAL DE SANTE PUBLIQUE, Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire Nationale (ANSES) Maison-Alfort	Rapporteur du jury
MME HÉLÈNE AMORY	Professeur, Université de Liège	Membre du jury
M. BERNARD VERRIER	Directeur de recherche, Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique - UMR 5305 -LYON	Président du jury
M. STEPHANE PRONOST	Directeur de recherche, Laboratoire LABÉO	Directeur de thèse
M. PIERRE-OLIVIER VIDALAIN	Directeur de recherche au CNRS, Université Lyon 1 Claude Bernard	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par STEPHANE PRONOST (Biologie, Génétique et Thérapies Ostéo-Articulaires et Respiratoires) et PIERRE-OLIVIER VIDALAIN (Université Lyon 1)



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement

BTG
BIOTARGEN

Avant propos

La grippe équine et la rhinopneumonie sont considérées comme les principales maladies entraînant des affections respiratoires chez les chevaux. Très contagieuses, elles sont fréquemment à l'origine d'épizooties entraînant des conséquences sanitaires et des pertes économiques importantes pour la filière équine dans de nombreuses parties du globe. Le regroupement lors de compétitions sportives et l'augmentation des transports internationaux de chevaux augmentent le risque d'épizootie. Ce constat a poussé les grandes instances de la filière équine telle que la Fédération Equestre Internationale (FEI) à réglementer la vaccination des chevaux. En effet, des vaccins contre la grippe équine et la rhinopneumonie sont disponibles. Leur composition inclut généralement un ou plusieurs antigènes et un adjuvant permettant d'augmenter la réponse immunitaire induite lors de la vaccination. Ces vaccins offrent une protection intéressante. Cependant, il est encore possible de les améliorer pour faire face aux besoins actuels. Plusieurs possibilités existent dont l'amélioration des protocoles vaccinaux ainsi que la recherche de nouveaux adjuvants.

Ce manuscrit dressera, dans une partie introductive, l'état des connaissances actuelles sur ces virus, sur les technologies vaccinales et sur les adjuvants qui leur sont associés. Puis les objectifs de ce projet seront décrits et s'organiseront en quatre études. La première étude permettra d'établir une preuve de concept du potentiel effet adjuvant de l'iPPVO lorsqu'il est co-administré avec un vaccin contre la grippe équine. Puis le développement d'une méthode haut débit de mesure de la séroneutralisation du virus de la grippe équine élargira le panel d'outils de mesure des réponses en anticorps dans le cadre d'infection ou de vaccination. Une troisième étude présentera le potentiel adjuvant de l'iPPVO en co-administration avec un vaccin contre les herpèsvirus équins 1 et 4 par mesure des anticorps neutralisants. Enfin une étude préliminaire sur les mécanismes d'actions potentiels de l'iPPVO sera présentée. Les résultats de ce projet seront principalement présentés sous forme d'article et seront ensuite discutés. Une discussion générale ainsi que de possibles perspectives du projet seront proposées.

Financements

Ces travaux de thèse ont été réalisés sur la plateforme de recherche équine Normandie Equine Vallée (site de Saint-Contest) au sein du laboratoire BIOTARGEN (Biologie, génétique et thérapies ostéoarticulaires et respiratoires) et du pôle Recherche Développement et Innovation de LABÉO. Ils ont également été menés en collaboration avec Le Centre International de Recherche en Infectiologie INSERM U1111 - CNRS UMR 5308 - UCBLI - ENS DE LYON plus précisément dans l'équipe VIRIMI (Infections virales, Métabolisme et immunité).

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet CENTAURE co-financé par la Région Normandie et l'Union Européenne dans le cadre du programme opérationnel FEDER/FSE 2014-2020.

Ils ont été financés à 50% par la Région Normandie et à 50% par le Groupement d'Intérêt Public CENTAURE. Leur réalisation a également été rendue possible grâce au soutien financier de LABÉO et de l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE), des Fonds Eperon, du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.



Remerciements

Au terme de ces années de thèse riches en expériences scientifiques et humaines inoubliables, je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont inspirée, encouragée et motivée tout au long de cette aventure. Leur influence sur moi est indéniable, et avoir pu bénéficier de leurs expériences et conseils a contribué à la réalisation et l'aboutissement de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci au Dr. Béatrice GRASLAND et au Dr. Stéphane ZIENTARA pour avoir accepté de lire mon manuscrit et d'en être les rapporteurs. Je suis également très honorée de la présence du Pr. Hélène AMORY et du Dr. Bernard VERRIER en tant qu'examineurs de ma soutenance.

J'adresse mes profonds remerciements à mes directeur et co-directeur de thèse, Stéphane PRONOST et Pierre-Olivier VIDALAIN pour leur accompagnement tout au long de ces années de recherche. Leur expertise et leur rigueur scientifique ont été des piliers indispensables pour la réalisation de cette thèse. Merci de m'avoir orientée, toujours avec bienveillance dans mon projet.

Merci à Romain PAILLOT, de m'avoir fait confiance à mes débuts. Ta passion pour la recherche m'a donné l'envie de me lancer dans cette aventure.

Merci aux membres de mon comité de suivi individuel, Muriel BARDOR, Anne-Sophie BEIGNON, Cécile BECK et Mylène VERNEY pour m'avoir accompagnée et encouragée chaque année de thèse.

Je voudrais également remercier Magali DEMOOR pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe Biotargen. Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Guillaume FORTIER, Directeur Général de LABÉO et Directeur du pôle Recherche, Développement et Innovation, ainsi qu'à Pierre-Hugues PITEL, Coordinateur de l'axe santé équine, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de leur laboratoire.

Merci à toute l'équipe du pôle recherche de LABÉO. Merci à Christine pour avoir pris le temps de me former sur les méthodes utilisées pendant ma thèse. Pour tous nos échanges grippe, parfois prise de tête ! Merci d'avoir toujours répondu présente pour m'aider chaque fois qu'il le fallait. Merci pour ton oreille attentive et les nombreux goûters qui remontent le moral ! Erika, merci pour tes conseils, ta gentillesse et le temps que tu m'as accordé au cours de ces années de thèse. Merci à Marie-Pierre et Margot pour leur gentillesse et leurs petites marques d'attention. Agathe, merci de m'avoir aidé sur mon projet quand j'en ai eu besoin. Merci à Albertine, Sophie et Elena pour tous les échanges et les conseils. Merci aux services de virologie, biologie moléculaire et biochimie pour tous les services rendus.

Et parce que réaliser cette thèse sans des partenaires de galère aurait été impossible, un très grand merci à tous les doctorants actuels et ceux qui sont maintenant docteurs ! Merci à Gabrielle et Côme, pour le temps que vous avez pris à me former à mes débuts. Gabrielle, merci d'avoir toujours été présente quand j'en avais besoin. Nous avons finalement eu raison des caprices de nos cellules ! Merci également à Bastien, Clovis et Clément, pour tous nos échanges et les pauses café passées ensemble. Enorme merci à la Dream Team ! Mes deux premières partenaires dans cette aventure, Marine (*alias* « Mme Popo ma trop bonne copiiiine ») et Aurélie (*alias* Aurel la gazelle). Ces années ont été riches en émotion et vous avez toujours répondu présentes dans cet ascenseur émotionnel. Finalement, nous n'irons pas élever nos lamas au Pérou ! Et parce que la Dream Team s'est agrandie, merci à la Dream Team 2.0... Manon je ne peux pas te remercier sans évoquer ton humour, qui a parfois provoqué un dysfonctionnement de mon cerveau pour réussir à le comprendre. Matthieu, (le bactérios) merci pour ton humour, tes playlists improbables et ton « Wesh » du matin qui m'a toujours mis de bonne humeur ! Clément, merci d'avoir compris notre humour à tous dès ton arrivé dans le bureau, plein de courage pour ta thèse. Camille, mon binôme de paillasse ou « paillaxée » durant ces années de thèse, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton aide durant ces folles années. Merci pour tous ces moments partagés dans le labo et tous les fous rires sans lesquels le quotidien aurait été bien plus difficile !

Merci aux membres de l'équipe Biotargen, Philippe GALÉRA et Alain RINCÉ. Merci à Romain, toujours de bon conseil. Ton rire sans émettre un son dont toi seul a le secret a toujours été très communicatif. Frédéric, merci pour les échanges, les conseils et la bienveillance dont tu fais preuve. Merci à Florence.

Merci à toute l'équipe du RESPE.

Merci à Laurie BRIOT, Frédéric DE GEOFFROY et toute l'équipe de la Jumenterie du Pin qui ont permis d'organiser les différents projets de manière optimale. Merci pour leur implication et leur intérêt. Laurie, merci pour tous tes conseils pour remplir les DAP et ton investissement toujours avec sérieux sur ce projet.

Merci à Vincent LOTTEAU et Laure PERRIN-COCON pour leur aide et conseils sur ce projet.

Merci à ma famille. A mes chers parents, Géraldine et Patrick, pour tout ce que vous avez fait pour moi tout au long de ma vie. Vous avez été les premiers à croire en moi et à me soutenir dans toutes mes décisions. Vous m'avez montré qu'aucune épreuve, aussi difficile soit-elle, n'est insurmontable. Vous êtes un modèle de force, de courage et de persévérance. Au cours de ma thèse, vous avez été à mes côtés à chaque étape. Vous avez compris les moments de stress et les moments de doute et votre confiance en moi m'a donné la force de poursuivre. A ma grande sœur, Audrey et à mon grand frère, Romain, qui sont, peut-être sans le savoir, mes modèles depuis toujours. Merci pour vos encouragements pendant toutes ces années. A Aurélien et Virginie, pour leur soutien et leur gentillesse. Merci pour toutes ces fois où vous m'avez écouté parler de science ! A mes nièces adorées, Ilona et Maelle, ça y est j'ai enfin fini mon travail ! A mon parrain pour tout son amour et pour avoir toujours su qu'un jour je serai docteur ! A ma marraine, qui a toujours été présente pour moi. Ton amour, tes petits messages et tes encouragements m'ont permis d'avancer au quotidien. Et à toi, Tonton, qui connaissais l'importance des études. Toi, avec qui j'aurai aimé partager ce moment. Aujourd'hui, plus que jamais, je mesure la chance que j'ai d'avoir une famille aussi unie et je sais que c'est grâce à elle que je suis arrivée jusqu'ici.

Table des matières

Table des illustrations	4
Liste des abréviations.....	7
Chapitre 1 : Introduction.....	13
1. GENERALITES SUR LES VIRUS RESPIRATOIRES EQUINS.....	15
2. IMMUNITE LIEE AUX VIRUS RESPIRATOIRES	16
2.1. Réponse immunitaire innée	16
2.2. Réponse immunitaire adaptative	17
2.2.1. Réponse humorale	18
2.2.2. Réponse cellulaire	18
3. VIRUS DE LA GRIPPE EQUINE (EIV)	19
3.1. Structure de l'EIV.....	19
3.2. Infection cellulaire et réplication virale.....	20
3.3. Sous-type et évolution virale.....	23
3.4. Physiopathologie de la grippe équine.....	26
3.5. Signes cliniques induits par l'EIV	27
3.6. Réponse immunitaire après infection par l'EIV	27
3.6.1. Réponse immunitaire innée	28
3.6.2. Réponse immunitaire adaptative	29
a) Réponse humorale	30
b) Réponse cellulaire	31
3.7. Méthode de mesure de la réponse en anticorps anti-EIV	32
3.7.1. Test d'hémolyse radiale simple	32
3.7.2. Test d'inhibition de l'hémagglutination	35
3.7.3. Test ELISA.....	35
4. HERPESVIRUS EQUIN 1 (EHV-1).....	36
4.1. Structure de l'EHV-1.....	36
4.2. Infection cellulaire et réplication virale de l'EHV-1	38
4.3. Propagation virale et physiopathologie	42
4.3.1. Infection du tractus respiratoire.....	42
4.3.2. Virémie associée aux cellules et réplication dans les nœuds lymphatiques	44
4.4. Formes secondaires de la maladie	47
4.4.1. Système reproducteur	47
4.4.2. Système nerveux central.....	48
4.4.3. Système oculaire.....	50
4.5. Latence	50
4.6. Épidémiologie	51
4.7. Réponse immunitaire après infection par l'EHV-1	53
4.7.1. Réponse immunitaire innée : rôle du tractus respiratoire	54
4.7.2. Réponse immunitaire adaptative	55
a) Réponse humorale	55
b) Réponse cellulaire	57
4.7.3. Système d'évasion immunitaire	58
4.8. Méthode de mesure de la réponse en anticorps anti-EHV.....	61
4.8.1. Test de séroneutralisation.....	61
4.8.2. Test ELISA.....	61
4.8.3. Test de séroneutralisation en temps réel.....	62

5.	VACCINATION CONTRE LA GRIPPE EQUINE ET CONTRE LA RHINOPNEUMONIE.....	65
5.1.	Généralités.....	65
5.2.	Vaccins inertes	65
5.2.1.	Vaccins inertes contre la grippe équine.....	65
a)	<i>Vaccin à virus inactivé</i>	65
b)	<i>Vaccin sous-unitaire</i>	67
c)	<i>Vaccin ADN</i>	69
d)	<i>Vaccin à base de vecteur recombinant</i>	71
5.2.2.	Vaccins inertes contre la rhinopneumonie.....	73
a)	<i>Vaccin à virus inactivé</i>	73
b)	<i>Vaccin sous-unitaire</i>	75
c)	<i>Vaccin ADN</i>	76
d)	<i>Vaccin à base de vecteur recombinant</i>	77
e)	<i>L-particules</i>	78
5.3.	Vaccins vivants.....	79
5.3.1.	Vaccins vivants contre la grippe équine	79
a)	<i>Vaccin vivant atténué</i>	79
b)	<i>Vaccin généré par génétique inverse</i>	81
5.3.2.	Vaccins vivants contre la rhinopneumonie.....	82
a)	<i>Vaccin vivant atténué</i>	82
5.4.	Nouvelles approches vaccinales	84
5.5.	Problématique des faibles répondeurs et facteurs d'influences de la réponse vaccinale... 85	85
5.5.1.	Faibles répondeurs.....	85
5.5.2.	Facteurs liés à l'âge	86
5.6.	Calendrier vaccinal et réglementation	88
6.	ADJUVANTS ET IMMUNOSTIMULANTS	91
6.1.	Les adjuvants utilisés dans les vaccins équins : Review (Veterinary Research).....	91
6.2.	Molécule immunostimulante : l'iPPVO	112
6.2.1.	Généralités.....	112
6.2.2.	Activités immunostimulantes dans différentes espèces.....	112
a)	<i>Chez le bovin</i>	112
b)	<i>Chez les poissons</i>	113
c)	<i>Chez le porc</i>	113
d)	<i>Chez le chat</i>	114
e)	<i>Chez les ovidés</i>	115
f)	<i>Chez le chien</i>	115
g)	<i>Chez la souris</i>	116
h)	<i>Chez l'Homme</i>	117
6.2.3.	Activités immunostimulantes chez le cheval.....	118

Chapitre 2 : Objectifs des travaux de thèse 123

Chapitre 3 : Description des travaux de recherche 127

1.	PREUVE DE CONCEPT DE L'EFFICACITE DE L'IPPVO EN CO-ADMINISTRATION AVEC UN VACCIN EIV ET DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE METHODE DE SERONEUTRALISATION EN TEMPS REEL DE L'EIV.....	131
1.1.	Effet adjuvant de l'iPPVO en co-administration avec le vaccin Equilis Prequenza® Te	131
1.1.1.	Introduction	131
1.1.2.	Article 1	132
1.1.3.	Résultats et discussion.....	148
1.2.	Preuve de concept de l'utilisation de l'impédancemétrie pour l'analyse de la réponse en	

anticorps neutralisant l'EIV	150
1.2.1. Introduction	150
1.2.2. Article 2.....	151
1.2.3. Résultats et discussion.....	182
2. EFFET ADJUVANT DE L'IPPVO EN CO-ADMINISTRATION AVEC LE VACCIN EQUIP® EHV 1,4....	185
2.1. Introduction	185
2.2. Article 3.....	186
2.3. Résultats et discussion.....	209
3. ETUDE PRELIMINAIRE DU MECANISME D'ACTION DE L'IPPVO SUR LES CELLULES	
MONONUCLEES DU SANG PERIPHERIQUE	211
3.1. Introduction	211
3.2. Matériels et méthodes.....	213
3.3. Résultats	216
3.4. Discussion	226
Chapitre 4 : Discussion générale et perspectives.....	231
Chapitre 5 : Références.....	241
Chapitre 6 : Annexes.....	272
ANNEXE1 : PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	274
ANNEXE 2 : COMMUNICATIONS ORALES : CONGRÈS INTERNATIONAUX.....	275
ANNEXE 3 : COMMUNICATIONS ORALES : CONGRÈS NATIONAUX.....	275
ANNEXE 4 : POSTERS.....	276
ANNEXE 5 : REALISATIONS EN PARALLELE DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	279

Table des illustrations

Figure 1 Mécanismes immunitaires déclenchés par une infection respiratoire virale chez le cheval	17
Figure 2 Structure du virus influenza équin	20
Figure 3 Schéma du cycle de réplication de l'EIV	22
Figure 4 Évolution des virus influenza équins de 1963 à 2021	24
Figure 5 Incidence de l'EIV dans la population équine au cours de la dernière décennie, d'après les rapports de l'OIE ESP sur la composition du vaccin contre la grippe équine, 2010 à 2019	25
Figure 6 Image par microscopie électronique de l'épithélium respiratoire non infecté et infecté par l'EIV	26
Figure 7 Réponse immunitaire induite par l'infection par l'EIV dans le tractus respiratoire supérieur	30
Figure 8 Principe du test d'hémolyse radiale simple (SRH)	34
Figure 9 Observation au microscope électronique à transmission de l'EHV-1 et représentation schématique de l'EHV-1	37
Figure 10 Schématisation du cycle de réplication de l'EHV-1	42
Figure 11 Les différentes stratégies d'infection de l'EHV-1	44
Figure 12 Mécanisme de transmission supposé de l'EHV-1 d'une cellule CD172a+ à une cellule endoplasmique	46
Figure 13 Représentation schématique de la survenue d'un avortement causé par l'EHV-1 .	48
Figure 14 Répartition des foyers d'EHV-1 dans le monde	53
Figure 15 Réponse immunitaire induite par l'infection par l'EHV-1	54
Figure 16 Stratégies d'évasion de l'EHV-1	60
Figure 17 Circulation du courant électrique dans les puits de la E-plate® permettant la mesure de l'impédance	62

Figure 18 Représentation graphique de la technologie xCELLigence® et l'évolution du Cell Index au cours du temps.....	63
Figure 19 Représentation schématique de l'évolution du Cell Index et des puits de la E-plate au cours du temps lors d'une expérience RTNA.....	64
Figure 20 Réponse immunitaire induite par des vaccins inactivés à base d'EIV entiers ou de sous-unités.....	67
Figure 21 Constitution de vaccins EIV avec ISCOM ou matrice d'ISCOM et mécanismes d'absorption et de présentation du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) après la vaccination	68
Figure 22 Réponse immunitaire induite par des vaccins ADN ou avec vecteurs recombinants vivants.	71
Figure 23 Vaccin contre l'EHV-1 à base de poxvirus recombinant.	78
Figure 24 Évolution supposée dans le sérum des IgGa, IgG(T), IgGb depuis la naissance à un an chez le poulain.....	87
Figure 25 Protocoles de vaccination contre la grippe équine et la rhinopneumonie.....	90
Figure 26 Étude de l'effet de l'iPPVO sur des herpèsvirus de diverses espèces <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	119
Figure 27 Mécanisme d'action supposé de l'iPPVO.....	121
Figure 28 Schématisation des différentes démarches pour la réalisation des études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> du projet de thèse.	130
Figure 29 Reconnaissance des pathogènes par des récepteurs de surface cellulaire et intracellulaire et les différentes voies de signalisation des gènes codant pour les interférons de type I (IFN).....	212
Figure 30 Expression d'un panel de cytokines mesuré par RT-qPCR après traitement des PBMC équins avec des volumes croissants d'iPPVO.....	217
Figure 31 Quantification par ELISA d'un ensemble de trois cytokines dans les surnageant de culture de PBMC équins stimulés avec des volumes croissants d'iPPVO pendant 24h.....	219
Figure 32 Analyse des cytokines présentes dans les surnageants de culture de PBMC humains stimulés avec des volumes croissants d'iPPVO pendant 24h.	222

Figure 33 Mesure de l'effet de l'iPPVO sur la réponse interféron.	223
Figure 34 Effet de différents inhibiteurs (BX795, MRT67307, INH-18 et H151) des voies de signalisation impliquées dans la réponse interféron en présence ou absence d'iPPVO pendant 24 et 48h.	225
Figure 35 Évaluation de la toxicité de l'iPPVO sur les PBMC équins par le test d'exclusion au bleu trypan.....	225

Liste des abréviations

A

A2254 :	Adénine en position 2254 de l'ADN polymérase de l'EHV-1
ADCC :	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES :	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
AUC :	Aire sous la courbe

C

CCL :	Chemokine ligand (motif C-C)
CI :	Cell index
CMH :	Complexe majeure d'histocompatibilité
CPA :	Cellule présentatrice d'antigènes
CXCL :	Chemokine ligand (motif C-X-C)

D

D752 :	Acide aspartique en position 752 de l'ADN polymérase
DIVA :	Differentiating infected from vaccinated animals

E

E :	Early genes : gènes précoces
ECP :	Effet cytopathique
ED :	Cellules équine dermiques (E. Derm)
EHV :	Equid herpesvirus
EIV :	Equine influenza virus
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESP :	Expert Surveillance Panel
ETIF :	α -trans-inducting factor

F

FC1 :	Florida Clade 1
FC2 :	Florida Clade 2
FEI :	Fédération équestre internationale
FelV :	Virus de la leucémie féline
FFE :	Fédération française d'équitation

G

g :	glycoprotéine
G2254 :	Guanine en position 2254 de l'ADN polymérase de l'EHV-1

H

HA :	Hémagglutinine
HEK :	Human embryonic kidney
HI :	Inhibition de l'hémagglutination
HSV :	Human simplex virus

I

IBR :	Infectious bovine rhinotracheitis
IC50 :	Concentration inhibitrice 50
IE :	Immediate-early genes : gènes très précoces
IFCE :	Institut Français du Cheval et de l'équitation
IFN :	Interféron
IFNAR :	Interferon alpha and beta receptor
Ig :	Immunoglobuline
IKK ϵ :	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon
IL :	Interleukine
iPPVO :	inactivated Parapoxvirus ovis
IRF :	Interferon regulatory factors
IRS :	Internal repeat sequence
ISCOM :	Immune stimulating complexe
ISG :	Interferon-stimulated genes

J

JAK :	Janus kinases
-------	---------------

K

Kb : kilobase
KyD : Souche d'EHV-1 Kentucky D

L

L : Late (genes): gène tardif
LAT : Latency associated transcripts
LB : Lymphocyte B
LT : Lymphocyte T
LTC : Lymphocytes T Cytotoxiques

M

M1 : Protéine de matrice 1
M2 : Protéine de matrice 2
MHE : Myéloencéphalopathie Herpétique Equine
MVA : Modified vaccinia Ankara

N

N752 : Asparagine en position 752 de l'ADN polymérase
NA : Neuraminidase
NEP : Nuclear export protein
NIDM : Non Immune Defense Mecanism
NK : Natural killer
NOD : Nucleotide oligomerization domain
NP : Nucléoprotéine
NS1 : Non structural 1
NS2 : Non structural 2
NT50 : Titre d'anticorps induisant 50% de neutralisation d'une souche virale

O

OMSA : Organisation mondiale de la santé animale
ORF : Open reading frame

P

PA :	Protein acid
PAMP :	Pathogen associated molecular pattern
PB1 :	Protein basic 1
PB2 :	Protein basic 2
PBMC :	Peripheral blood mononuclear cells
PCR :	Polymerase chain reaction
PPVO :	Parapoxvirus ovis
PRR :	Pattern recognition receptor
PRTN :	Plaque Reduction Neutralization Tests

R

RESPE :	Réseau d'épidémiologie-surveillance en pathologie équine
RIG-I :	Retinoic acid-inductible gene 1
RK13 :	Cellules épithéliales rénales de lapin
RNPv :	Ribonucléoprotéine virale
ROCK 1 :	Rho associated coiled-coil kinase 1
RTCA :	Real time cell analysis
RTNA :	Real time neutralisation assay

S

SAA :	Sérum amyloïde A
SFET :	Société Française des Équidés de Travail
SHF :	Société hippique française
SNC :	Système Nerveux Central
SRH :	Single radial haemolysis
STAT :	Signal transducer and activator of transcription
STING :	Stimulator of interferon genes

T

TBK1 :	TANK-binding kinase 1
TCID50 :	Tissue culture infectious dose 50%
TCR :	T cell receptor
TGF :	Transforming growth factor

Th : lymphocytes T helper (lymphocyte auxiliaire)
TK : Thymidine kinase
TLR : Toll-Like receptor
TNF : Tumor necrosis factor
TR : Terminal Repeat
TRIF : TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon
Ts : mutant sensible à la température

V

VEEV : Venezuelan equine encephalitis virus
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
VN : Virus neutralisation

W

WNV : West Nile virus

Chapitre 1 :
Introduction

1. Généralités sur les virus respiratoires équins

Chez les chevaux, les manifestations cliniques respiratoires sont très courantes et constituent avec les maladies ostéo-articulaires une des premières raisons de consultation. Parmi les causes d'affections respiratoires on retrouve les herpèsvirus équins (equine herpes virus - EHV) et en particulier les herpèsvirus 1 et 4 responsables de la rhinopneumonie. Ces deux herpèsvirus ont longtemps été employés dans une même dénomination : virus de la rhinopneumonie. Mais dans les années 1980, des travaux ont permis de différencier ces deux herpèsvirus (Sabine et al., 1981; Studdert et al., 1981; Cullinane et al., 1988) et seul l'EHV-4 porte le nom de virus de la rhinopneumonie ; l'EHV-1, bien connu pour causer également des pathologies abortives ou nerveuses est désormais nommé virus abortif (Davison et al., 2009). Le virus de la grippe équine (equine influenza virus - EIV) est également responsable d'infections respiratoires. Ainsi, l'EIV et l'EHV-1 ont d'importantes répercussions tant au niveau sanitaire qu'économique au sein de la filière équine. Ils sont connus pour être endémiques dans de nombreux pays dont la France.

La rhinopneumonie entraîne de lourdes pertes économiques pour la filière équine et ce quelles que soient les races de chevaux considérées. Ceci a été bien illustré ces dernières années par les épizooties de 2018 en France qui ont conduit à activer la cellule de crise du RESPE (Réseau d'Epidémiologie et de Surveillance en Pathologie Equine) sur plusieurs semaines et encore tout récemment en 2021 suite à l'épizootie dite de Valence (Espagne) qui a conduit à un arrêt des manifestations équestres en Europe sur une période de 6 semaines. Cette dernière épidémie a touché un grand nombre de chevaux et entraîné la mort de 18 d'entre eux après l'apparition de la forme nerveuse de la maladie. Les travaux de caractérisation du virus isolé n'ont pas conclu à un caractère infectieux accru de ce variant et les mesures sanitaires défailtantes sur le site de concours semblent être à l'origine de l'ampleur de l'épidémie (Verecke et al., 2021; Sutton et al., 2021; Couroucé et al., 2023). Face à ces épizooties qui constituent un frein au développement économique de la filière et une atteinte au bien-être animal notamment lors de l'apparition des formes graves, les filières courses et trot ont fait évoluer en 2021 les protocoles de vaccination (AAEP, 2022; France Galop, 2023). En effet, parmi les mesures de prévention, la vaccination constitue un des éléments forts de lutte contre l'apparition de la maladie. La vaccination permet une diminution de la charge virale respiratoire lors de l'infection et donc une diminution des signes cliniques et du risque de propagation du virus. Concernant les formes

graves de la rhinopneumonie que sont les avortements et la forme nerveuse, seule une indication contre les avortements a pu être rapportée pour certains vaccins. Il est important de préciser que s'il n'y a pas de recommandation contre la forme nerveuse de la rhinopneumonie, ceci est dû à l'absence de modèle disponible pour objectiver un effet de la vaccination dans ce cas. Des travaux récents menés par une équipe américaine avec le « old mare model » pourraient permettre demain de mesurer les effets de la vaccination contre la forme nerveuse (Zarski et al., 2021).

Des épizooties de grippe équine sont également observées dans la plupart des pays. Si les cas graves liés à la maladie sont rares, l'impact pour la filière peut être très important comme en atteste l'épizootie de 2019 au Royaume-Uni qui a conduit à l'arrêt des courses pendant une semaine (Cullinane et al., 2020). Pour lutter contre cette maladie, la vaccination constitue également le moyen le plus efficace. Ceci a pu être démontré, en France, lors d'une étude publiée par Fougerolle et al. (2019), mais des cas de grippe sont également régulièrement décrits chez des chevaux vaccinés, même s'ils sont moins nombreux et présentent des formes moins sévères. Les limites qui ont pu être observées sur le terrain ont parfois conduit à un questionnement sur l'efficacité de la vaccination. Le développement de nouveaux vaccins plus efficaces est une stratégie intéressante mais un vrai défi du fait de la durée de mise au point et du coût induit. Nous avons choisi dans ce projet une autre approche qui consiste à augmenter l'efficacité d'un vaccin contre la grippe équine et la rhinopneumonie par l'ajout d'adjuvant lors du protocole vaccinal.

2. Immunité liée aux virus respiratoires

Les réponses immunitaires induites par les affections à EHV-1 et EIV sont décrites dans les chapitres consacrés à ces deux virus, et les bases de la réponse immunitaire suite à la vaccination sont présentées au chapitre 6.1 dans la revue sur les adjuvants utilisés dans les vaccins équins. Nous présentons ici en guise d'introduction un schéma très général de la réponse immunitaire chez le cheval dans le cas d'une infection virale.

2.1. Réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre un pathogène, elle est dite non spécifique. Lors d'une infection virale, une course s'établit entre le

système immunitaire de l'hôte et le virus. La reconnaissance des virus par les récepteurs Toll-like (TLR) présents à la surface des cellules du système immunitaire ou des cellules en contact avec le milieu extérieur permet l'activation des voies de transduction de signaux qui vont entraîner la sécrétion de cytokines et chimiokines ayant pour rôles le chimiotactisme et l'activation de cellules du système immunitaire (Lester and Li, 2014). L'immunité innée face aux virus repose principalement sur la réponse interféron (IFN), les cellules « Natural Killer » (NK) et les macrophages (Figure 1). Leur rôle est capital pour ralentir la propagation de l'infection.

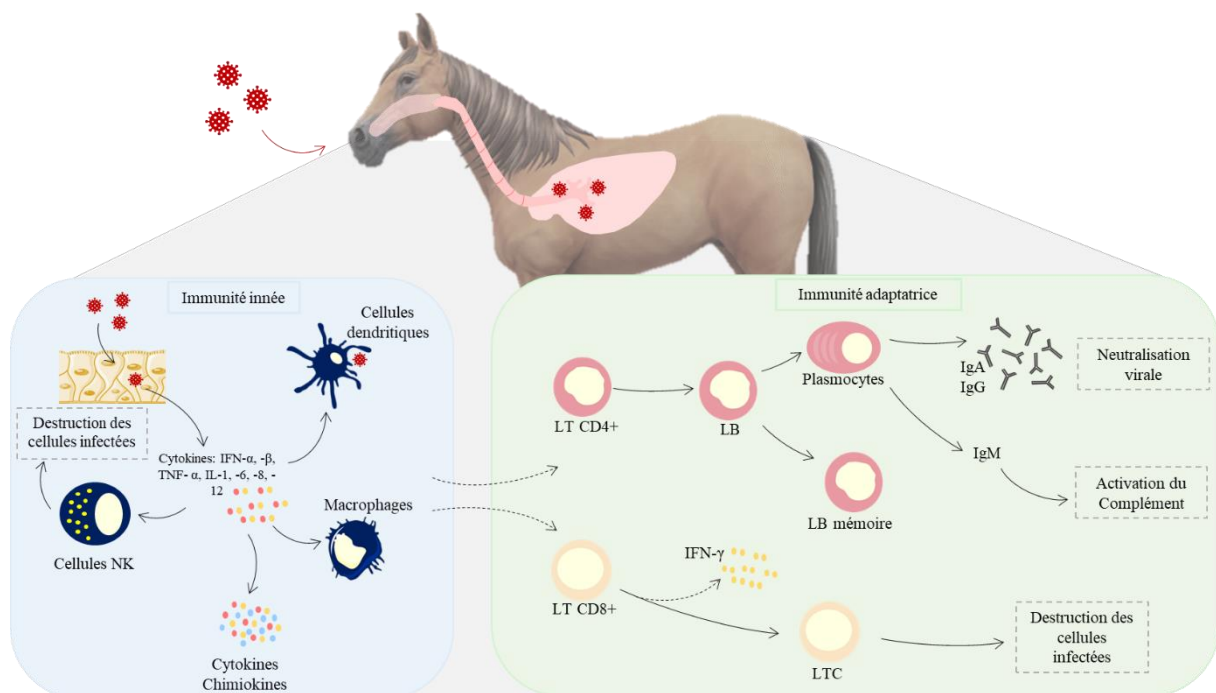


Figure 1 Mécanismes immunitaires déclenchés par une infection respiratoire virale chez le cheval. L'infection des voies respiratoires par un virus entraîne le déclenchement de l'immunité innée médiée par la production de cytokines inflammatoires et les cellules immunitaires : les macrophages, les cellules tueuses naturelles (NK), et les cellules dendritiques. L'immunité adaptative est médiée par les lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+ qui conduisent à la production d'immunoglobulines et de lymphocytes T cytotoxiques (LTC), respectivement. La production d'IgA et IgG permet la neutralisation virale, les IgM sont impliqués dans l'activation du complément. Les LTC permettent de détruire les cellules infectées.

2.2. Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative, spécifique au pathogène, constitue la deuxième ligne de défense et fait suite à l'immunité innée. Cette immunité, mémoire, initiée par la

présentation de l'antigène se décompose en deux stratégies : l'immunité humorale qui met en jeu les lymphocytes B et l'immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T (Figure 1). L'identification de l'antigène viral est la première étape avant son élimination.

2.2.1. Réponse humorale

Lors de la progression de l'infection virale, la réponse humorale est d'une grande importance. Les anticorps qui la composent font partie d'une ligne de défense indispensable dans le contrôle de la virémie. Les lymphocytes B activés vont permettre la production d'anticorps de classes IgM ou IgG qui sont spécifiques du pathogène. Les anticorps ont différentes fonctions et lors de la réponse humorale primaire, de fortes concentrations d'IgM sont sécrétées. Une fois liées à leur cible, les IgM sont de puissants activateurs de la voie classique du complément. Les IgG et les IgA sont les anticorps qui prédominent dans la réponse humorale secondaire (Perkins et al., 2019; Schnabel et al., 2019). Les IgG sont retrouvées dans le sérum mais également dans les compartiments extravasculaires permettant une circulation au niveau systémique. Les anticorps IgA, quant à eux, opsonisent leurs antigènes et permettent l'activation de la phagocytose par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires Fc. Les IgA sont fortement sécrétées dans les muqueuses en cas d'infection virale dans le tractus respiratoire du cheval, assurant une protection des voies respiratoires supérieures, permettant de limiter une réinfection (Landolt, 2014; Slater, 2014). Les anticorps neutralisants le virus sont donc d'une importance capitale dans le contrôle d'une infection virale. Les anticorps sont ainsi capables de bloquer l'infection de nouvelles cellules et ainsi de contribuer à neutraliser les virus soit en agissant directement sur le virus et sa réplication soit en facilitant les mécanismes de défense cellulaire.

2.2.2. Réponse cellulaire

En complément de la réponse humorale, les mécanismes de la réponse cellulaire permettent la destruction des cellules infectées par un virus. La réponse immunitaire cellulaire fait intervenir les lymphocytes T cytotoxiques. Ceux-ci assurent différentes fonctions dans l'immunité antivirale. L'essentiel des réponses en anticorps dépend des lymphocytes T CD4+ et ces derniers contribuent à la différenciation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques ainsi qu'au recrutement et à l'activation des macrophages sur le lieu de l'infection. Les lymphocytes

T CD8⁺ assurent le rôle de prévention de réinfection. Les lymphocytes T sont de véritables sentinelles, ils sont à la fois très sélectifs et très efficaces en cas d'infection virale. Les lymphocytes T CD8⁺ se concentrent localement au niveau du foyer infectieux pour détruire les cellules infectées (Landolt, 2014; Slater, 2014). Toutes les cellules de l'organisme expriment les molécules du CMH-I, qui sont reconnues par les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺. Ainsi, les lymphocytes T CD8⁺ sont capables de reconnaître les antigènes présentés par les molécules du CMH-I. La réponse cellulaire joue donc également un rôle important dans la protection contre les virus respiratoires.

3. Virus de la grippe équine (EIV)

Les virus influenza sont représentés par 4 genres : A, B, C et D. Les influenza A sont endémiques dans le monde entier. Contrairement au virus influenza B retrouvés uniquement chez l'Homme, les influenza A sont considérés comme anthroponozoonotiques. Ils sont retrouvés dans diverses espèces notamment chez l'Homme, le porc, les oiseaux, les chiens, les mammifères marins et les chevaux. Les différents sous-types retrouvés chez ces espèces sont issus de réservoirs naturels aviaires. Les influenza A illustrent parfaitement le phénomène de franchissement de barrière d'espèces, qui explique qu'un sous-type peut à la fois être retrouvé chez les oiseaux et d'autres animaux tels que les chevaux.

3.1. Structure de l'EIV

L'EIV est un virus influenza de type A de la famille des Orthomyxoviridae. L'EIV de type A est similaire au virus de la grippe humaine de type A. L'EIV est un virus polymorphe généralement sphérique ayant un diamètre compris entre 80 et 120 nm. Les particules virales se composent de différents éléments (Figure 2). L'EIV est constitué d'une enveloppe formée par une bicouche lipidique comportant à sa surface deux glycoprotéines : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). L'HA est un homotrimère ancré à la surface cellulaire et permettant la liaison du virus avec les récepteurs cellulaires alors que la NA permet la libération des particules virales néoformées hors de la cellule infectée. Le précurseur de l'HA appelé HA0 se compose de deux sous-unités : l'HA1 contenant le domaine de liaison au récepteur et l'HA2 qui contient le peptide de fusion. Ces deux sous-unités sont liées entre elles par des liaisons disulfures (Sriwilaijaroen and Suzuki, 2012). L'enveloppe est recouverte sur sa face interne de

protéines de matrices (M1) et présente des protéines transmembranaires (M2) sous forme de canaux ioniques. Cette structure renferme les 8 segments d'ARN génomique viral, qui représentent un total d'environ 13.6 kb. Chaque segment d'ARN est associé à des protéines et forme un complexe ribonucléoprotéique viral (RNPv). Ce RNPv est formé par la liaison entre un ARNv, des molécules NP et le complexe polymérase. Le génome viral est composé d'un ensemble de 8 RNPv différentes. Les segments d'ARN sont linéaires de polarité négative et codent les protéines: HA, NA, nucléoprotéine (NP), polymérases (PA, PB1 et PB2), protéines de matrice (M1 et M2), protéines non-structurales 1 (NS1) et protéines d'export nucléaire (NS2/NEP).

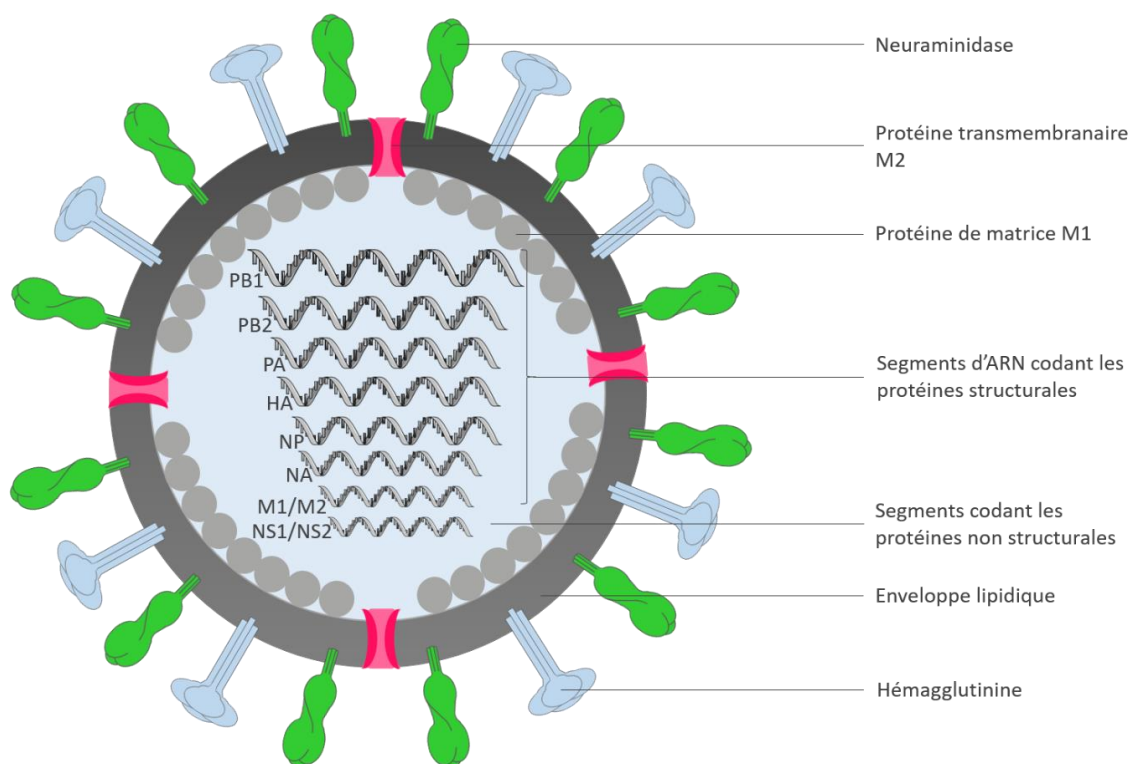


Figure 2 Structure du virus influenza équin. L'EIV est un virus à ARN segmenté possédant huit segments d'ARN simple brin de sens négatif. Le génome segmenté code huit protéines structurales et deux protéines non structurales.

3.2. Infection cellulaire et réplication virale

Attachement viral

Le cycle de réplication des virus influenza débute lorsque le virus se lie aux cellules cibles du tractus respiratoire. Pour se faire, l'HA se lie spécifiquement sur un récepteur : les

acides sialiques présents à la surface des cellules épithéliales des voies respiratoires (Figure 3). Les molécules d'acide sialique sont liées à la surface cellulaire par des saccharides et peuvent être divisées en deux sous-types en fonction de leurs liaisons aux résidus galactose : les liaisons Neu5Ac $\alpha(2,3)$ -Gal et Neu5Ac $\alpha(2,6)$ -Gal (Sriwilaijaroen and Suzuki, 2012). La structure des différents sous-types de l'HA favorise l'un ou l'autre des deux types de récepteurs d'acide sialique. Cette caractéristique est un facteur déterminant dans la spécificité d'hôte vis-à-vis des virus de la grippe des différentes espèces. Les influenza humains reconnaissent la liaison glycosidique $\alpha(2,6)$, tandis que les influenza aviaires et équins reconnaissent la liaison glycosidique $\alpha(2,3)$. Les influenza porcins, quant à eux, ont la capacité de reconnaître et de se fixer aux deux sous-types de récepteurs ce qui les rend particulièrement infectieux (Suzuki et al., 2000).

Fusion membranaire et internalisation virale

La liaison de l'HA sur les acides sialiques présents sur la cellule hôte va permettre le mécanisme d'endocytose : l'internalisation des virus dans des endosomes. L'endosome subit alors une acidification entraînant d'une part un changement de conformation de l'HA permettant de libérer le peptide de fusion du domaine HA2 et d'autre part une baisse de pH interne. Le processus de fusion membranaire est alors lancé. L'enveloppe virale va fusionner avec la membrane de l'endosome créant un pore par lequel les RNPv peuvent s'échapper. Parallèlement, la chute du pH de la particule virale provoque une activation des pompes M2, qui vont permettre aux protons de l'endosome de franchir les pores fragilisant ainsi les interactions protéines-protéines et entraînant un changement conformationnel de la protéine M1 induisant la dissociation des RNPv liées aux protéines M1 (McCown and Pekosz, 2006). Cette étape entraîne la libération des RNPv dans le cytoplasme (Cao et al., 2012; Noton et al., 2007).

Transcription, réplication et export des RNPv

La transcription et la réplication ont lieu dans le noyau de la cellule infectée. Les RNPv constituent les formes actives des ARNv. La transcription et la réplication peuvent être initiées grâce à la complémentarité des extrémités 5' et 3' du génome leur permettant de s'apparier entre elles pour former une configuration en « tire-bouchon » agissant comme un promoteur pour la polymérase. Après l'entrée du virus dans la cellule hôte, la transcription primaire des ARNv en ARNm viraux est initiée, permettant l'expression de protéines ayant un rôle dans la réplication. Puis la phase de réplication permettra la synthèse de nouveaux ARNv en passant par une étape d'ARN complémentaire. La réplication des ARNv à partir d'ARNc est permise grâce à la

présence d'un binucléotide pppApG (Fodor and te Velthuis, 2020). L'export de l'ARNm vers le cytoplasme est contrôlé par la protéine d'export nucléaire (NEP), également impliquée dans les étapes d'épissage et de traduction de l'ARN (Paterson and Fodor, 2012). En fin de réplication, les RNPv sont exportées du noyau et transportées vers les régions de bourgeonnement où elles seront incorporées dans le nouveau virion.

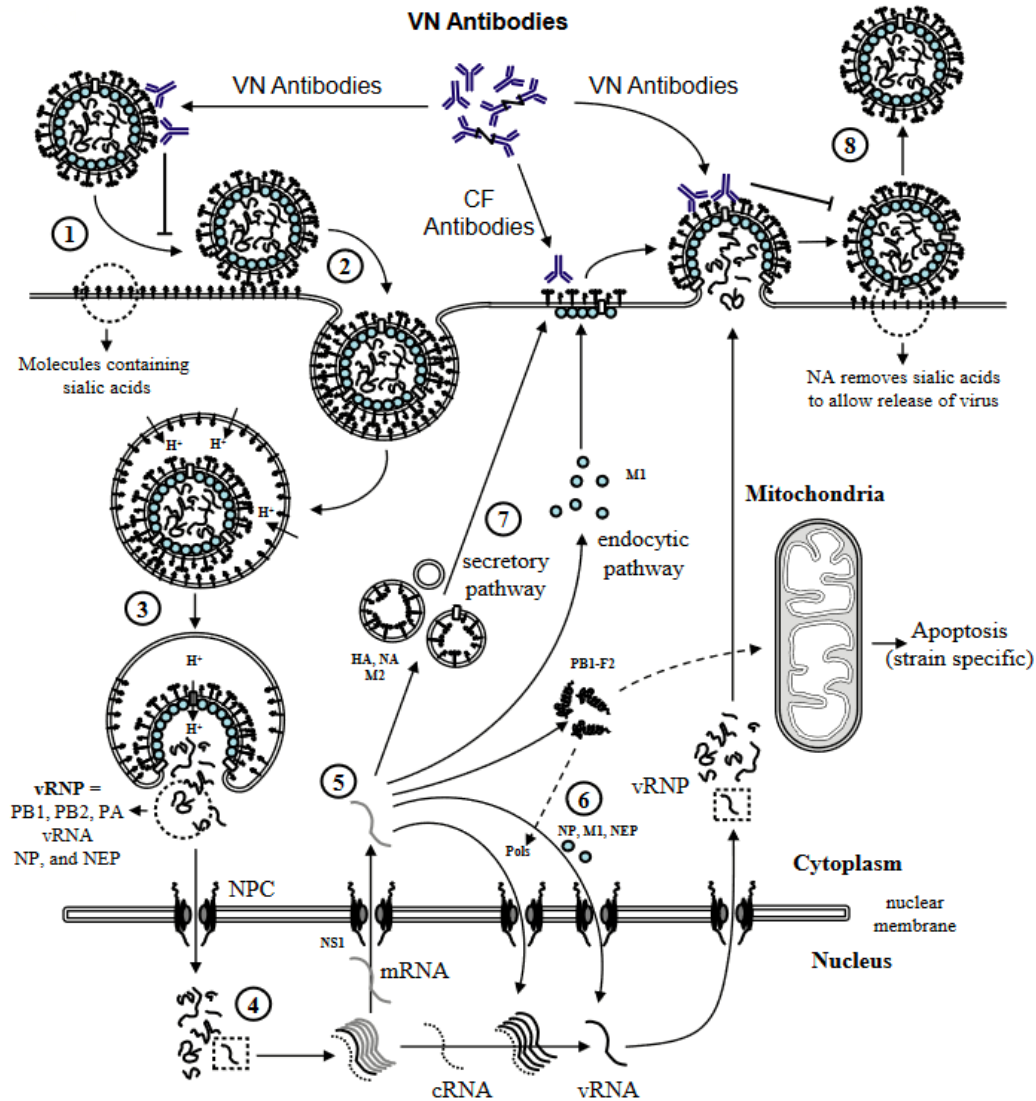


Figure 3 Schéma du cycle de réplication de l'EIV. Le virus se lie à des récepteurs de surface cellulaires situés sur les cellules respiratoires (1) et est internalisé dans les endosomes (2). La modification du pH dans l'endosome et dans les particules virales induit la fusion des membranes et la libération des RNPv (3). Ceux-ci sont libérés dans le cytoplasme puis transportés dans le noyau où aura lieu la réplication virale (4). Les ARNm produits sont ensuite exportés dans le cytoplasme pour la synthèse protéique (5). Les protéines virales nouvellement formées vont soit assister la réplication virale et la formation de la RNPv dans le noyau (6), soit former de nouveaux virus à la surface cellulaire (7). Les virus néo-formés sont alors assemblés et bourgeonnent à partir de la membrane cellulaire pour être libérés dans le milieu extérieur (8). Schéma d'après Paillot

Assemblage, bourgeonnement et libération des virions

Les particules virales sont formées et opèrent leur bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique au pôle apical des cellules. Les protéines membranaires destinées à l'enveloppe virale sont synthétisées par les ribosomes associés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Après la synthèse, les protéines s'oligomérisent et sont transportées à travers l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Deux modèles d'incorporation des vRNP existent : aléatoire ou spécifique. Dans le modèle aléatoire les 8 types de vRNP ne seraient pas discriminés au moment de leur incorporation dans les particules virales tandis que le modèle spécifique mettrait en jeu un mécanisme de discrimination des différents vRNP et assurerait ainsi l'incorporation d'un exemplaire de chacun des 8 segments dans le virion (Hutchinson et al., 2010). Les protéines HA et NA sont incorporées dans des « radeaux » lipidiques. Les protéines M2 se lient au cholestérol et contribuent au rapprochement des « radeaux » lipidiques entre eux. L'étape de bourgeonnement implique principalement les protéines virales HA, NA et M1. La formation du bourgeon nécessite l'induction préalable d'une courbure de la membrane. La courbure est induite par différents paramètres tels que le regroupement et l'accumulation de la protéine M1 sous la bicouche lipidique ainsi que la présence de nombreuses protéines HA et NA dans les « radeaux » lipidiques (Matsuoka et al., 2013). Les deux membranes opposées de l'enveloppe virale se rapprochent facilitant ainsi la scission de la membrane. Le bourgeonnement prend fin lorsque les vRNP sont englobées dans la particule virale néo-formée. Les interactions des HA virales avec les molécules d'acides sialiques permettent alors aux particules virales libérées de se lier à la surface cellulaire puis la NA clive les acides sialiques à la surface des cellules infectées permettant la libération de la particule virale et la fin du cycle de multiplication (Sakai et al., 2017).

3.3. Sous-type et évolution virale

La première description de la grippe équine date de 1956 suite à une épizootie respiratoire apparue chez les équidés en Europe de l'Est (Sovinova et al., 1958). Le premier sous-type isolé était H7N7, il a ensuite été retrouvé dans plusieurs pays d'Europe et d'Amérique. La dernière épizootie due au sous-type H7N7 a été enregistrée en 1979 en Italie (Webster, 1993). En 1963, les Etats-Unis (Floride) ont été le berceau d'une épizootie majeure d'EIV, le virus isolé était de sous-type H3N8 (Waddell et al., 1963). Bien que le sous -type H3N8 ait été isolé pour la première fois en Floride, il existe des arguments en faveur d'une origine sud-américaine. En effet, l'épizootie de Floride est apparue suite à l'importation de

chevaux en provenance d'Argentine (Perglione et al., 2016; Waddell et al., 1963). Au fil des années, l'augmentation des mouvements internationaux (compétitions sportives, commerce) a contribué à la propagation du virus sur l'ensemble des autres continents. Le sous-type H3N8 est désormais le seul sous-type circulant dans le monde et le virus continue à évoluer (Figure 4). L'EIV est considéré comme endémique dans le monde entier cependant aujourd'hui trois pays sont considérés comme indemnes par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA): l'Australie, la Nouvelle-Zélande et l'Islande. Cependant, en 2007, une épizootie d'EIV de grande ampleur a touché la population de chevaux sur le territoire australien, jusqu'alors déclaré indemne d'EIV ayant pour cause une mauvaise gestion de la quarantaine qui présentait des animaux infectés de manière sub-clinique. Cette épizootie a coûté 1 million de dollars australiens à l'industrie équine et au gouvernement australien et près de 75 000 équidés ont été infectés (Cullinane and Newton, 2013).

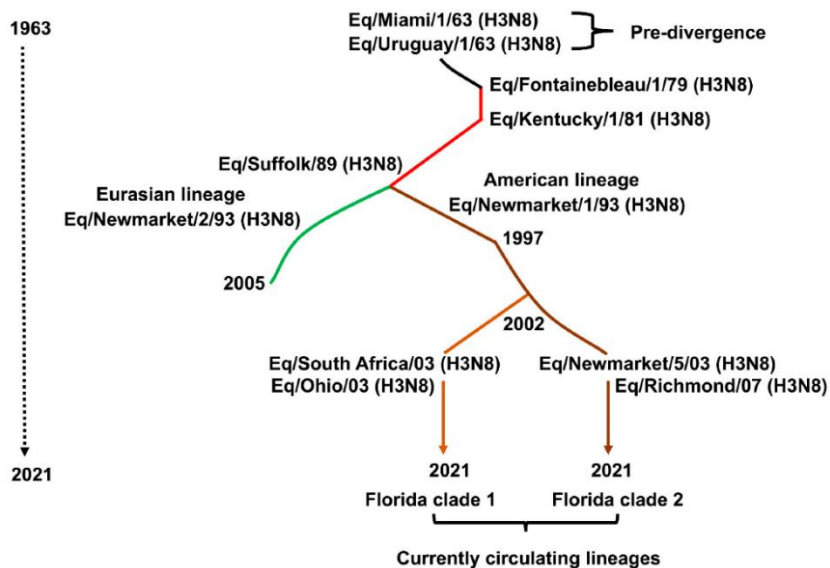


Figure 4 Évolution des virus influenza équins de 1963 à 2021. Les souches représentatives des différentes lignées : pré-divergente, eurasiennne et américaine sont détaillées ainsi que les sous-lignées américaines : Florida Clade 1 et Florida Clade 2. D'après Oladunni et al. (2021).

Les études phylogénétiques ont révélé que le sous-type H3N8 a évolué en une seule et même lignée pendant deux décennies puis le sous-type a divergé en 2 lignées, la lignée eurasiennne et la lignée américaine, durant les années 80. Ces dernières années, les épizooties recensées dans le monde sont causées par les deux clades de la sous lignée Florida, qui présentent des différences au niveau antigénique: Florida Clade 1 (FC1) et Florida Clade 2

(FC2). Depuis 2008, ces 2 Clades ont remplacé les lignées américaine et eurasienne d'origine. Il a d'abord été montré que le Clade 2 circulait principalement en Europe et en Asie alors que le Clade 1 circulait principalement sur le continent Américain. Bien que chaque Clade semble prédominer spécifiquement dans certaines régions du monde, des épizooties mettant en jeu les deux clades continuent d'être observée dans de nombreuses régions du monde. Ainsi, la co-circulation des Clades 1 et 2 a été observée dans différents pays (Figure 5). Le virus de Clade 1 a été responsable d'épizooties au Japon et en Australie en 2007-2008 (Bryant et al., 2009), ainsi que dans de nombreux pays d'Europe (Royaume-Uni, France, Belgique, Allemagne) en 2019 ; le virus de Clade 2 a provoqué des épizooties en Chine, en Inde et en Mongolie en 2008-2009 (Virmani et al., 2010). Le virus de Clade 2 a également été retrouvé en Amérique du Nord suite à l'introduction de chevaux en provenance d'Europe (Pusterla et al., 2014). Le suivi des souches circulantes, réalisé en France depuis les années 2000, est important afin de déterminer la composition des vaccins contre la grippe équine (Manuguerra et al., 2000). Entre le milieu des années 2000 et 2015, les souches circulent en France sont rattachées à la lignée Américaine sous lignée Floride Clade 2. Puis une épidémie de grande ampleur survenue en 2009 a mis en évidence une souche appartenant à la sous lignée Floride Clade 1 (Fougerolle et al., 2017).

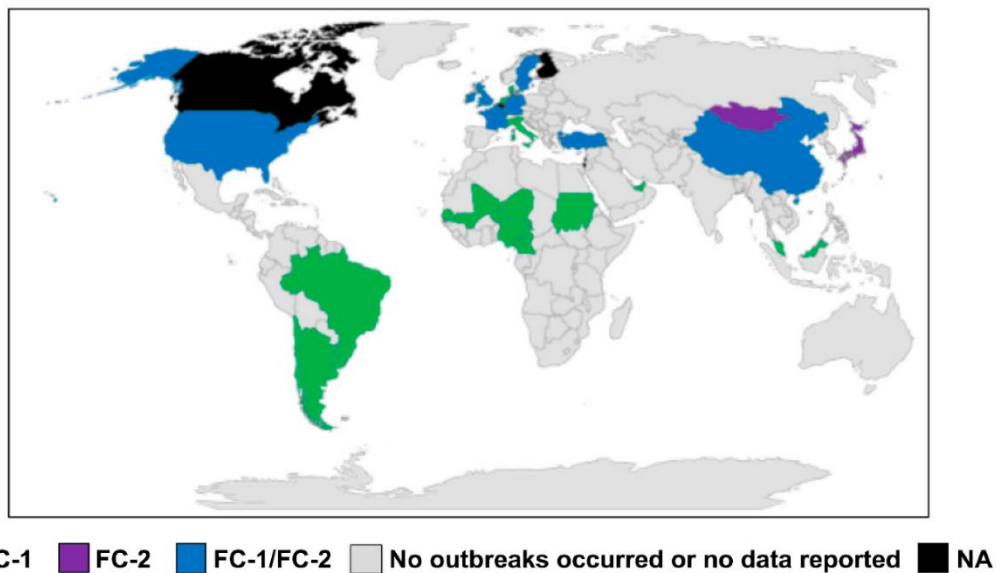


Figure 5 Incidence de l'EIV dans la population équine au cours de la dernière décennie, d'après les rapports de l'OIE (Expert Surveillance Panel - ESP) sur la composition du vaccin contre la grippe équine, 2010 à 2019. Les Clades responsables de ces foyers sont indiqués : Clade 1 en vert, Clade 2 en violet, circulation des deux Clades en bleu. Gris : pas d'épizootie ou non rapporté. NA, non disponible. D'après Oladunni et al., 2021.

3.4. Physiopathologie de la grippe équine

Après inhalation, les particules virales se déposent sur la muqueuse des voies respiratoires supérieures. Le virus infecte les cellules épithéliales ciliées du système respiratoire supérieur, et certaines particules virales peuvent pénétrer plus profondément atteignant la muqueuse des voies respiratoires inférieures. Lorsque la neuraminidase est présente en très grande quantité, elle est capable de détruire les muqueuses, permettant la fixation des particules virales notamment de l'hémagglutinine sur les récepteurs de l'acide N-acétylneuraminique des cellules épithéliales du tractus respiratoire. Les particules virales pénètrent alors par endocytose et les cycles réplicatifs sont initiés, libérant de grandes quantités de virus le long de la trachée et de l'arbre bronchique. L'infection des cellules entraîne une inflammation responsable d'œdème, de nécrose, de desquamation et de déciliation (Figure 6). Certains cas plus graves font état d'une exsudation de fluides riches en protéines dans les voies respiratoires et les alvéoles (Myers and Wilson, 2006).

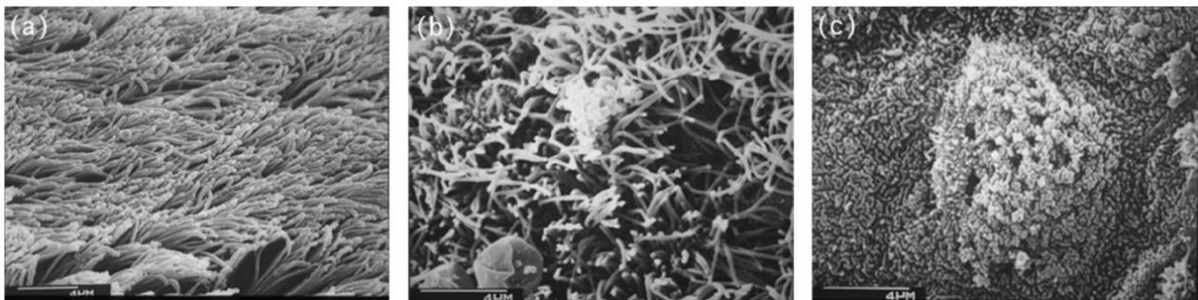


Figure 6 Image par microscopie électronique de l'épithélium respiratoire (a) non infecté, (b) 3 jours post infection par l'EIV et (c) 6 jours post infection par l'EIV présentant des zones de déciliation (Daly, 2013).

Après une infection virale, une protéine de phase aigüe, l'amyloïde sérique (SAA) est retrouvée en tant que marqueur de l'inflammation. Les concentrations de celle-ci augmentent pendant les 48 premières heures suivant l'apparition des signes cliniques liés à l'infection par l'EIV. Il faut ensuite 11 à 22 jours pour revenir à un niveau basal. La sévérité des signes cliniques est corrélée à la concentration de SAA ainsi qu'à la synthèse locale d'IL-6, d'IFN et/ou de cytokines pro-inflammatoires (Hultén et al., 1999). L'infection par l'EIV entraîne l'augmentation de la quantité d'immunoglobulines suivie du déclenchement de la réponse immunitaire (Chen et al., 2018; Gonzalez-Obando et al., 2022). Les différents mécanismes immunitaires mis en jeu seront détaillés dans les chapitres suivants.

3.5. Signes cliniques induits par l'EIV

Il est admis que la période d'incubation de la grippe équine est de 1 à 3 jours. Le premier signe de la maladie est l'apparition d'une forte fièvre pouvant atteindre entre 39,5°C et 41°C. Il est également observé une tuméfaction transitoire des nœuds lymphatiques pharyngés. S'en suit un abattement, de l'anorexie et une toux sèche favorisant la libération de particules virales infectieuses et donc une transmission rapide du virus. La toux est généralement associée à un écoulement nasal initialement séreux et pouvant devenir muco-purulent en 1 à 2 jours suite à une infection bactérienne secondaire (Myers and Wilson, 2006). Le degré de sévérité de la maladie dépend de plusieurs paramètres dont la virulence de la souche virale, le statut immunitaire du cheval et la sensibilité à une co-infection par d'autres agents pathogènes. Cependant ces signes cliniques peuvent être absents ou moindres chez les chevaux vaccinés. Les animaux affectés se rétablissent généralement en 7 à 10 jours mais il faut au moins 3 semaines pour une régénération de l'épithélium respiratoire. C'est pendant cette période que les bactéries opportunistes peuvent facilement envahir les voies respiratoires permettant aux particules virales de pénétrer davantage l'épithélium respiratoire ce qui entraîne des pathologies telles que la bronchopneumonie bactérienne, la bronchiolite et la bronchite allergique. A plus long terme, l'inflammation des voies respiratoires peut conduire à une hémorragie pulmonaire induite par l'exercice ou à l'obstruction récurrente des voies respiratoires. Plus rarement, les complications peuvent conduire à une hyperplasie péribronchique et péribronchiolaire avec infiltration de cellules mononucléaires, exsudation de neutrophiles et de macrophages dans les voies respiratoires, un œdème alvéolaire, des encéphalites et des myocardites (Landolt, 2014). La grippe équine a un taux de morbidité très élevé qui peut atteindre 100% dans des populations non immunisées. En revanche les cas de mortalité sont très rares et généralement associés à des surinfections bactériennes chez des individus immunodéprimés par exemple (Watson et al., 2011; Gonzalez-Obando et al., 2022).

3.6. Réponse immunitaire après infection par l'EIV

Lorsque le virus parvient à pénétrer l'épithélium respiratoire, l'immunité innée se déclenche afin de limiter la réplication du virus puis elle est rapidement suivie de la réponse immunitaire adaptative.

3.6.1. Réponse immunitaire innée

L'immunité innée a un rôle essentiel pour lutter contre les infections virales comme l'EIV. Elle a également un rôle majeur dans l'initiation de la réponse adaptative permettant ainsi de protéger les chevaux à plus long terme. Chez le cheval, l'immunité innée n'a pas fait l'objet d'études approfondies. La première ligne de défense est composée de la barrière physique que sont les voies respiratoires notamment la cavité nasale, les sinus, les poches gutturales et la trachée qui sont tapissées de cellules mucocillaires. Les cils des cellules épithéliales du système respiratoire permettent au mucus ainsi qu'aux enzymes aux propriétés antibactériennes d'être excrétés. Si cette première ligne de défense est franchie, les protéines sériques et des cellules de la réponse immunitaire innée prennent le relais après les premières heures de l'infection. La réponse immunitaire innée étant non spécifique, elle est immédiatement activée aux premiers signes d'intrusion d'agents pathogènes. Les cellules effectrices de l'immunité innée vont reconnaître les différents motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) *via* les différents récepteurs cellulaires (PRRs). Les influenza A sont reconnus *via* 3 principaux PRR : (i) RIG-I (gène I inductible par l'acide rétinolique et activé par les ARN 5'-triphosphate), (ii) les TLR : TLR3 (activé par les ARN double brins) et les TLR7 et 8 (activés par les ARN simple brin), et, (iii) les récepteurs de type NOD (nucleotide binding oligomerisation domain). La reconnaissance des PAMPs par ces PRRs entraîne différents processus d'activation et de sécrétion (Chen et al., 2018). La sécrétion d'IFN est au cœur de la lutte contre les virus influenza. Elle dépend du facteur de régulation de l'interféron : l'IRF (Interferon regulatory factor) 7 est activé par les signaux TLR7, l'IRF3 quant à lui est activé par les signaux de RIG-I. La production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I est induite principalement par les voies RIG-I et TLR7 (Aoshi et al., 2011). Les IFN- α , - β , - γ et - λ résultent de l'activation des différentes voies citées précédemment. Les IFN- α et - β , ou encore IFN de type I entraînent une cascade de signalisation antivirale dans les cellules. La présence d'IFN- α , - β a été retrouvée dans les sécrétions nasales de poneys infectés avec l'EIV (H3N8) mais il semble que leur détection ne soit pas systématique et dépende de la pathogénicité de la souche virale (Wattrang et al., 2003). L'IFN- γ , principal IFN de type II établit une réponse efficace dépendante des cellules T cytotoxiques adaptatives contre les virus influenza. Enfin, l'IFN- λ , de type III est principalement retrouvé dans les poumons pour lutter contre l'infection virale. L'activation des voies IFN a un effet sur diverses cellules de l'immunité innée : l'activation des neutrophiles, la maturation des cellules dendritiques ou encore le recrutement des macrophages. L'activation du facteur de transcription NF- κ B par les signaux en aval de

TLR7 et RIG-I ainsi que la mobilisation des macrophages alvéolaires et des monocytes vont entraîner une réponse cytokinique pro-inflammatoire avec l'induction des gènes codant pour l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . Par ailleurs, il a été montré un rôle important de l'inflammasome dans la reconnaissance des influenza virus (Ichinohe et al., 2009). L'inflammasome est un complexe cytoplasmique qui comprend le sous-ensemble NLR capable d'activer la caspase-1 et entraînant la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18. Parallèlement, l'infection par l'EIV a été associée à des sécrétions d'IL-6 détectées dans les sécrétions nasales (Quinlivan et al., 2007; Watrang et al., 2003). Les macrophages alvéolaires limitent la propagation virale en favorisant la phagocytose ou en régulant la réponse adaptative. Par ailleurs, les cellules NK jouent un rôle important dans l'élimination de l'infection et les cellules dendritiques ont le rôle de cellules présentatrices d'antigène (Hannant and Mumford, 1989). Ces dernières vont jouer un rôle de médiateur entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

3.6.2. Réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative joue un rôle majeur dans la défense de l'organisme contre les virus influenza. Les différents mécanismes mis en place par l'immunité innée orientent activement l'immunité adaptative qui en découle (Figure 7). L'immunité adaptative se décompose en deux mécanismes distincts : la réponse humorale et la réponse cellulaire. Tout comme l'immunité innée, l'immunité adaptative déclenchée par l'infection par l'EIV reste mal décrite chez le cheval et les données de la littérature se basent principalement sur les réponses immunitaires liées aux infections par les influenza A chez l'Homme.

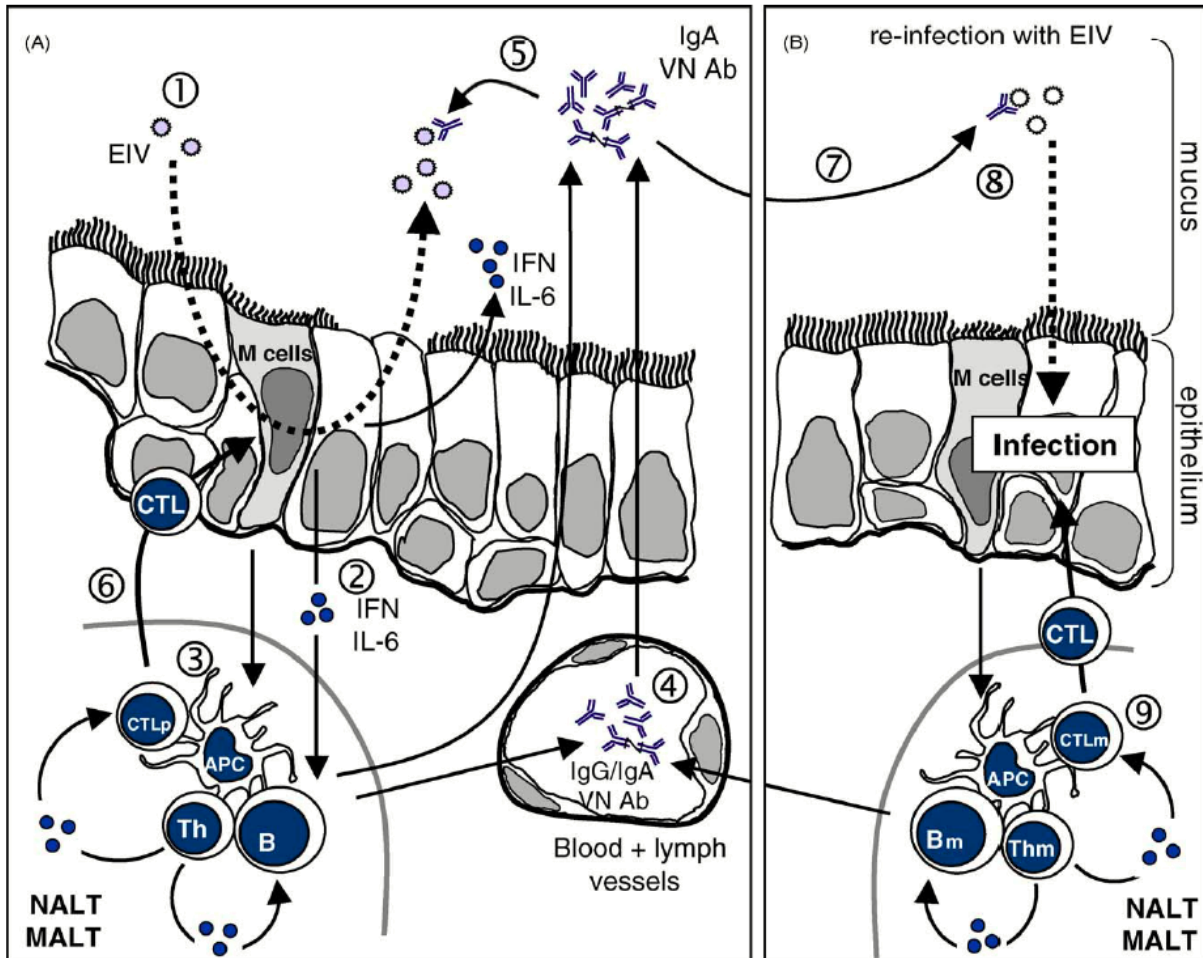


Figure 7 Réponse immunitaire induite par l'infection par l'EIV dans le tractus respiratoire supérieur (A) au cours d'une infection primaire et (B) au cours d'une infection secondaire. Les cellules épithéliales sont infectées (1) induisant la synthèse locale d'IFN et d'IL-6 (2). L'antigène viral est chargé sur les cellules présentatrices d'antigènes (APC) (3). Cette action permet l'activation des lymphocytes B entraînant la synthèse d'anticorps (Ab) neutralisants sériques (4) et muqueux (5). La présentation de l'antigène aux lymphocytes T permet de stimuler les cellules T cytotoxiques (CTL) (6). Les anticorps spécifiques de l'EIV sont remobilisés (7) et leur sécrétion est plus forte et plus rapide pour neutraliser l'EIV lors d'une réinfection (8). Si le taux d'anticorps neutralisants n'est pas suffisant, les cellules épithéliales sont à nouveau infectées déclenchant l'immunité adaptative (9). Schéma d'après Paillot et al. (2006a).

a) Réponse humorale

Le système immunitaire humoral produit des anticorps contre différents antigènes du virus grippal. Les protéines HA et NA sont les principales cibles de la réponse immunitaire humorale contre le virus de la grippe équine (Paillot et al., 2006a). Les anticorps dirigés contre l'HA sont les plus importants pour neutraliser le virus, ils se lient au niveau des têtes globulaires de la glycoprotéine et empêchent l'étape de fixation et/ ou d'endocytose au niveau de la cellule

hôte. Les anticorps spécifiques de la NA limitent ou bloquent la propagation du virus en inhibant l'activité enzymatique et en facilitant la cytotoxicité à médiation cellulaire. Les anticorps spécifiques de la protéine M2 sont produits en quantité moindre du fait de la faible concentration de cette protéine virale dans les cellules infectées. Les anticorps dirigés contre la NP peuvent également contribuer à lutter contre l'infection. Ces différents anticorps sont impliqués dans le mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) permettant d'accélérer la clairance des cellules infectées. Les IgA et les IgM sont les principales immunoglobulines présentes dans les muqueuses et permettent la neutralisation du virus au niveau des tissus muqueux. Les sécrétions nasales contiennent des IgA qui peuvent neutraliser les HA et NA des virus influenza (Mazanec et al., 1993; Nelson et al., 1998). Les IgM ont un double rôle : neutraliser le virus et activer le système du complément (Jayasekera et al., 2007). Il a été montré, lors d'une infection expérimentale, que la primo-infection par l'EIV induisait des titres élevés en IgA, IgGa et IgGb spécifiques du virus dans le sérum et les sécrétions nasales et que ces réponses en anticorps étaient associées à une protection pendant 100 jours post infection (Nelson et al., 1998).

b) Réponse cellulaire

La stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire après une infection par l'EIV n'a pas été étudiée en détail chez le cheval. Elle semble cependant proche des mécanismes observés chez l'Homme lors d'une infection par un virus influenza A. Les lymphocytes T et B jouent notamment un rôle clé dans l'immunité adaptative contre l'infection par les virus influenza (Chen et al., 2018). L'activation des lymphocytes T CD4+ spécifiques du virus a lieu dans les organes lymphoïdes à proximité du site de l'infection. Cette activation a lieu lorsque les lymphocytes T CD4+ reconnaissent *via* leur TCR les peptides viraux associés aux CMH-II sur les cellules présentatrices d'antigène. Les lymphocytes T CD4+ naïfs peuvent alors se différencier en deux sous-ensembles : les cellules de type Th1 ou de type Th2 en fonction des profils d'expression cytokinique. Les lymphocytes T CD4+ différenciés en cellules Th1 produisent de l'IFN- γ et de l'IL-2. Ces deux cytokines sont principalement impliquées dans la réponse immunitaire cellulaire et notamment dans l'induction de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ mémoires. Les lymphocytes T CD4+ différenciés en cellules Th2 induisent une production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 qui stimule les lymphocytes B, entraînant la production d'anticorps (Stark et al., 2019). Lors de l'infection par le virus de la grippe, les épitopes viraux qui sont associés aux molécules CMH-I activent les cellules T CD8+ naïves *via* leur TCR dans

les ganglions lymphatiques, entraînant leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques (Chen et al., 2018). L'activation des lymphocytes T cytotoxiques entraîne leur prolifération et leur migration vers le site de l'infection. Ces cellules vont alors inhiber la propagation virale *via* leur activité cytolytique (système perforine/granzyme) vis-à-vis des cellules infectées qu'elles reconnaissent via leur TCR et la reconnaissance des antigènes viraux présentés par le CMH-I. Les antigènes reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques sont surtout des antigènes provenant des protéines virales internes comme les protéines M1, NP, PA et PB2 plutôt que contre les protéines HA et NA. Les protéines internes étant plus conservées, une hypothèse émise est que l'immunité cellulaire a un spectre plus large vis-à-vis des différentes souches d'influenza (Grant et al., 2016). Par ailleurs, les protéines virales ciblées par l'immunité cellulaire semblent être en faveur d'une complémentarité d'action entre l'immunité humorale et cellulaire.

3.7. Méthode de mesure de la réponse en anticorps anti-EIV

3.7.1. Test d'hémolyse radiale simple

Le principe du test d'hémolyse radiale simple ou SRH (Single Radial Haemolysis) date de 1932 à la suite des travaux de Petri sur des micro-organismes en milieu gélosé. En 1965, une étude a montré que l'utilisation des érythrocytes de mouton dans la gélose permettait d'estimer l'activité hémolytique des anticorps (Weiler et al., 1965). Mancini et al. (1965) décrivent l'existence d'une relation linéaire entre la surface d'hémolyse et la concentration d'antigènes présents dans le sérum. Cette méthode semble alors avoir une valeur considérable lors d'études séro-épidémiologiques à grande échelle pour les virus Influenza humains ou équins (Schild et al., 1975; Gildea et al., 2011a; Cullinane and Newton, 2013). Le test SRH est recommandé par l'OMSA pour connaître le statut immunitaire d'un cheval vis-à-vis de la grippe équine (OIE - World Organisation for Animal Health, n.d.). Cette méthode nécessite de petites quantités d'antigènes viraux et sa rapidité ainsi que sa robustesse en ont rapidement fait une méthode de référence pour caractériser le statut immunitaire de l'hôte dans le cadre de la grippe équine. Cette technique mesure principalement les anticorps IgG (Schild et al., 1975). Le test SRH est basé sur la mesure du taux d'anticorps dirigés contre l'hémagglutinine, lesquels sont généralement neutralisants. Le principe repose sur la sensibilisation d'érythrocytes de mouton à l'EIV. Après fixation, les complexes EIV/hématies sont mélangés à de l'agarose et du complément de cobaye. La solution obtenue est alors coulée dans une plaque d'immunodiffusion afin d'y percer des puits pour y déposer les sérums équins à analyser. La

présence d'anticorps spécifique du virus va alors entraîner une lyse des hématies et la zone d'hémolyse observée (Figure 8) est proportionnelle au taux d'anticorps présents dans le sérum (Morley et al., 1995).

En 1994, une étude comparant l'efficacité de vaccins contre la grippe équine lors d'une infection expérimentale a permis de déterminer la corrélation entre le niveau d'anticorps détecté par le test SRH et la protection contre l'infection par l'EIV (Mumford et al., 1994a). Ainsi, les auteurs ont montré que les chevaux présentant un taux d'anticorps équivalent à des zones d'hémolyse supérieures ou égales à 150 mm² étaient protégés contre l'infection ce qui signifie qu'ils n'étaient pas excréteurs du virus, les auteurs parlaient alors de protection virologique. Tous les chevaux qui ont présenté des taux d'anticorps supérieurs ou équivalents à 85 mm² étaient protégés contre la maladie, ce qui signifie qu'ils ne présentaient pas de signe clinique, les auteurs parlaient alors de protection clinique. Les chevaux qui ont présenté un niveau inférieur à 85 mm² n'étaient pas protégés (Mumford et al., 1994a). Ce test, avec ces valeurs admises, a depuis été utilisé lors de nombreuses études sur le virus de la grippe équine dans le monde, en particulier pour mesurer l'efficacité des vaccins lors de challenges vaccinaux (Newton et al., 2000; Paillot et al., 2013; Gildea et al., 2013; Paillot et al., 2018) et le taux de protection de population de chevaux (Fougerolle et al., 2019).

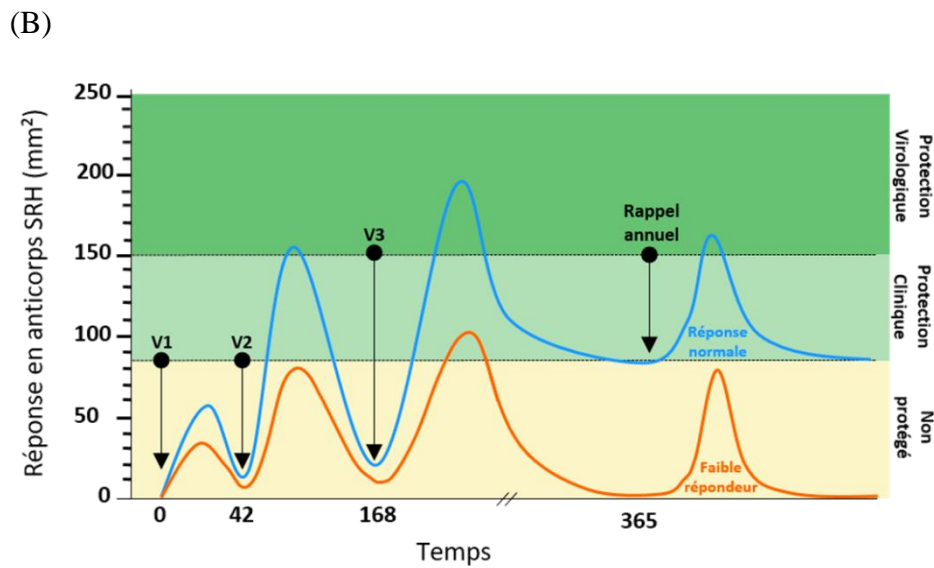
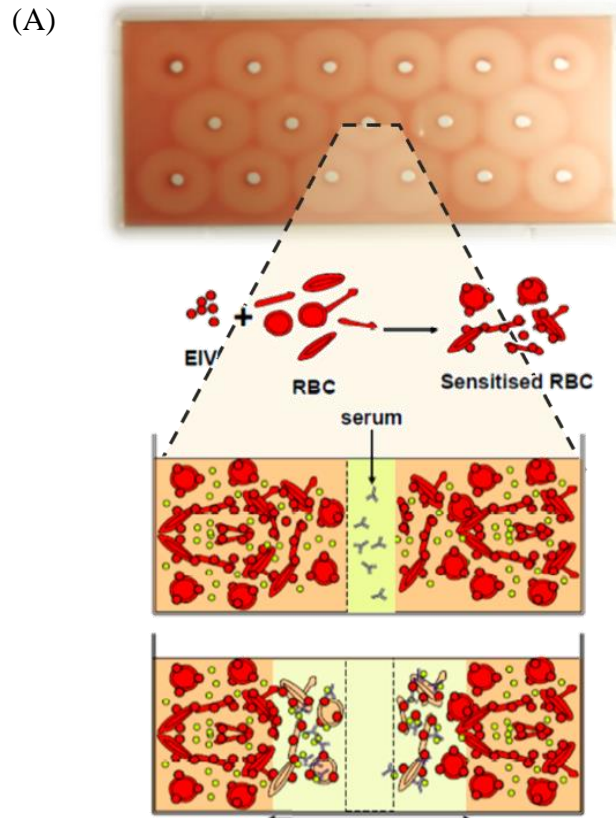


Schéma adapté de Romain Paillot

Figure 8 Principe du test d'hémolyse radiale simple (SRH). (A) Les érythrocytes de mouton (RBC) forment un complexe avec les particules virales d'Influenza équin (cercles rouges). Ce complexe est mélangé à du complément de cobaye (cercles jaunes) et l'ensemble est mélangé à un gel d'agarose coulé dans des plaques d'immunodiffusion. Des puits sont percés afin de déposer les sérums. Des zones d'hémolyse (plus claires) sont observées et leur mesure est proportionnelle à la concentration d'anticorps contenue dans le sérum. (B) Évolution du taux d'anticorps au cours d'une primo-vaccination (V1, V2 et V3) et au cours d'un rappel vaccinal annuel et les niveaux de protection qui leur sont associés. Exemple d'un répondeur normal (bleu) et d'un faible répondeur (orange) à la vaccination. D'après Romain Paillot (communication personnelle).

3.7.2. Test d'inhibition de l'hémagglutination

Le test d'inhibition de l'hémagglutination (HI) a initialement été mis au point par Hirst et Salk sur des virus influenza humains (Hirst, 1942; Salk, 1944). Le test HI transposé chez le cheval est basé sur le même principe (Chambers and Reedy, 2014) et est utilisé pour la détection des anticorps dirigés contre l'hémagglutinine de l'EIV. La propriété d'hémagglutination de l'HA lui permet de se lier aux hématies et plus particulièrement aux hématies de poules. La liaison s'effectue dans la même région que celle qui permet au virus de se lier aux récepteurs cellulaires lors d'une infection virale. Si des anticorps anti-EIV sont présents dans un sérum, ceux-ci vont pouvoir neutraliser les particules virales et empêcher la réaction d'hémagglutination. Ceci se traduit par la sédimentation des hématies au fond des puits. A l'inverse, en l'absence d'anticorps anti-EIV, la réaction d'hémagglutination a lieu normalement ce qui se traduit par la formation d'un réseau entre les hématies et conduit à l'absence de réaction de sédimentation. Le test HI est rapide et simple à réaliser cependant, il est maintenant admis qu'il peut être sujet à des problèmes de reproductibilité notamment lors d'essais inter-laboratoires (Chambers and Reedy, 2014).

3.7.3. Test ELISA

Les tests ELISA sont utilisés pour détecter les anticorps dans de nombreuses espèces notamment contre l'EIV. Les tests ELISA détectent les anticorps dirigés contre la nucléoprotéine virale de l'EIV. Bien que décrits comme moins sensibles que les tests HI et SRH (Galvin et al., 2013) ils constituent un outil simple et standardisé de détection des anticorps contre l'EIV. Suite à l'épizootie survenue en 2007 en Australie, une stratégie a pu être mise en place pour suivre l'infection au sein de la population équine naïve (Paillot and El-Hage, 2016). Une étude a permis de montrer la possibilité de différencier les anticorps contre la grippe équine des chevaux infectés de ceux produits par des chevaux vaccinés (Galvin et al., 2013). Cette stratégie nommée DIVA (Differentiation of Infected from Vaccinated Antibodies) est très intéressante pour la gestion de crise mais ne peut être appliquée qu'à la condition suivante : les chevaux doivent être vaccinés avec un vaccin recombinant à base de Canarypoxvirus. Celui-ci exprime chez l'hôte uniquement les gènes HA et NA de l'EIV. Comme le test ELISA est développé pour détecter la nucléoprotéine (NP), seuls les chevaux infectés présenteront un test positif (Galvin et al., 2013).

4. Herpesvirus équin 1 (EHV-1)

Les herpesvirus sont ubiquitaires et provoquent des maladies chez de nombreuses espèces vertébrés et chez quelques invertébrés. La famille des Herpesviridae est divisée en trois sous-familles : les Alphaherpesvirinae, les Betaherpesvirinae et les Gammaherpesvirinae. Neuf herpesvirus équins (Equid Herpesvirus – EHV) ont été décrits à ce jour. Il s'agit de Alphaherpesvirus EHV 1, 3, 4, 6, 8 et 9 et des Gammaherpesvirus EHV 2, 5 et 7. Les EHV 1, 2, 3, 4, 5, 8 infectent les chevaux et récemment un cas d'avortement dû à un EHV-8 a été décrit sur une ânesse en Chine (Wang et al., 2022), l'EHV-6 a été isolé chez l'âne et a été associé à l'Asinine alphaherpesvirus 1 (Jacob et al., 1988), l'EHV-9 est connu pour infecter la gazelle, le zèbre et l'onagre (Schrenzel et al., 2008). Parmi les nombreux herpesvirus équins, l'EHV-1 est l'un des plus pathogènes chez les chevaux. Ce virus, très contagieux, impacte fortement l'ensemble des secteurs de la filière équine à la fois par les signes cliniques qu'il entraîne et par les mesures préventives qui sont prises telles que l'arrêt des compétitions et des mouvements liés à l'élevage.

4.1. Structure de l'EHV-1

L'EHV-1 est un virus enveloppé à ADN linéaire double brin, mesurant environ 150 nm de diamètre (Figure 9). L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique sur laquelle sont ancrées 12 glycoprotéines. Le tégment correspond à l'espace entre la nucléocapside et l'enveloppe. Il est constitué d'une matrice comportant un grand nombre de protéines virales et d'enzymes qui jouent un rôle majeur dans le cycle de réplication viral. La majorité des protéines de l'EHV-1 partage une homologie avec celle des virus herpes simplex humains (HSV-1 et -2). La nucléocapside icosaédrique, constituée de 162 capsomères (12 pentons et 150 hexons) (Crabb and Studdert, 1995; Telford et al., 1992), contient le génome viral d'une taille d'environ 150 kb. Le génome est composé d'une région unique longue et d'une région unique courte, flanquées respectivement de séquences répétées internes et terminales (IRS et TR). Le génome comporte 80 cadres ouverts de lecture (ORF), codant un ensemble de protéines virales dont les principales sont présentées ci-après.

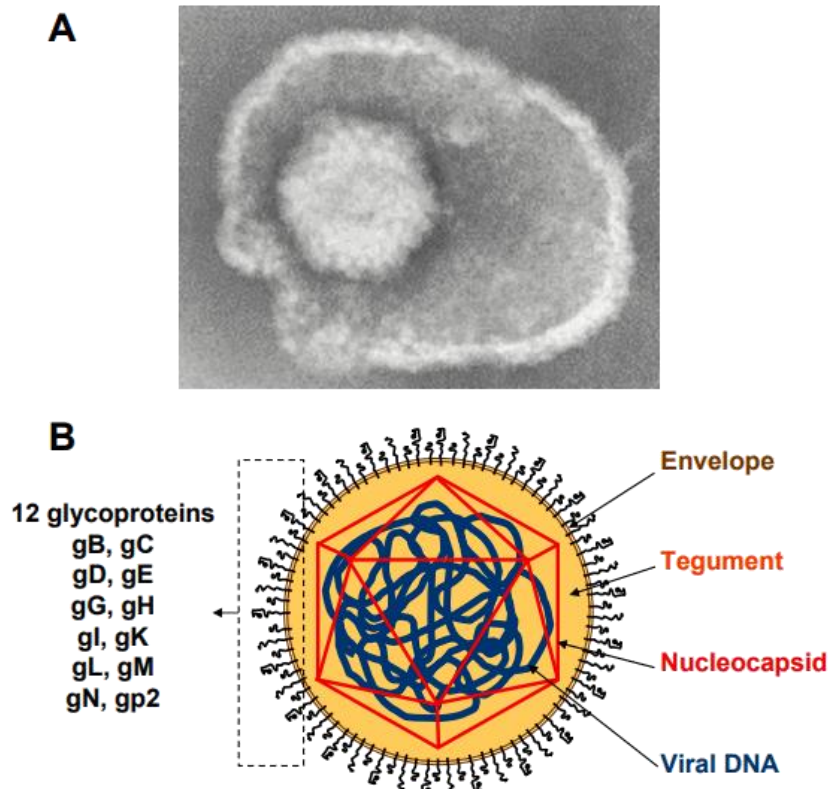


Figure 9 (A) Observation au microscope électronique à transmission de l'EHV-1 (Animal Health Trust) et (B) représentation schématique de l'EHV-1 (d'après la revue de Paillot et al., 2008).

Les glycoprotéines B (gB ou gp14), C (gC), D (gD), E (gE), G (gG), H (gH), I (gI), K (gK), L (gL), M (gM), N (gN) et la gp2 sont présentes à la surface de l'enveloppe virale. Contrairement aux 11 autres qui sont codées par des gènes conservés parmi les alphaherpèsvirus, la gp2 n'est à ce jour décrite que chez l'EHV-1, 4, 8 et 9 (Crabb and Studdert, 1990; Fukushi et al., 2012). Ces glycoprotéines sont impliquées dans différents stades du cycle de réplication virale. Les glycoprotéines gB et gD sont essentielles au cycle viral et permettent l'entrée du virus dans la cellule ainsi que la sortie des endosomes. Ces glycoprotéines sont donc impliquées dans la propagation du virus de cellule à cellule. La gC a la capacité de se lier à des héparanes sulfates cellulaires, favorisant ainsi l'attachement du virus à la cellule hôte. Il a été montré que la gE possédait une région fortement immunogénique et spécifique de l'EHV-1 (Andoh et al., 2013). La fonction de la gG est encore mal connue mais elle constitue une cible pour la réponse immunitaire (Crabb and Studdert, 1993). Les glycoprotéines gH et gL sont impliquées dans la réplication du virus. La glycoprotéine gK contribue à la propagation de cellule à cellule (Neubauer and Osterrieder, 2004). La glycoprotéine gN serait impliquée dans la maturation de la gM et pourrait contribuer à la pathogénicité du virus (Mahmoud et al., 2013). Enfin la gp2

semble avoir un rôle dans le processus d'entrée cellulaire, l'enveloppement secondaire, la sortie des virions et la transmission de cellule à cellule (Rudolph and Osterrieder, 2002).

4.2. Infection cellulaire et réplication virale de l'EHV-1

L'ensemble des étapes d'infection et de réplication est représenté sur la figure 10.

Attachement viral

Les EHV-1 sont capables d'infecter différents types cellulaires tels que des cellules des voies respiratoires, des cellules des organes lymphoïdes et des cellules du système nerveux (Allen et al, 1999). Deux grands modes d'infections sont possibles : par contact direct avec des particules virales ou par contact de cellule à cellule. La première étape du cycle de réplication virale de l'EHV-1 est l'attachement à la surface des cellules cibles. Cette étape commence par l'interaction entre 2 glycoprotéines : gC et gD avec des héparanes sulfates à la surface cellulaire (Osterrieder, 1999; Laval et al., 2016). Les particules virales sont alors concentrées à la surface cellulaire permettant à la gD de stabiliser le complexe et de permettre l'entrée du virus dans la cellule en se liant à un ou plusieurs récepteurs (Csellner et al., 2000). Une étude a montré que le récepteur d'entrée du virus dans les cellules équine est le CMH-I (Frampton et al., 2005). Plus récemment, le rôle du CMH-I dans l'entrée du virus dans les cellules endothéliales vasculaire cérébrales et dans les cellules équine dermiques a été démontré (Kurtz et al., 2010; Sasaki et al., 2011). Cependant, l'attachement des virus aux cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) fait appel à la gD et des récepteurs cellulaires telles que les intégrines (Azab and Osterrieder, 2012; Laval et al., 2016).

Fusion membranaire et internalisation virale

Il existe deux modes de pénétration virale décrits pour les alphaherpesvirus: par fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire ou par endocytose. Ces deux modes nécessitent au préalable l'activation de la protéine kinase 1 associée à Roh (ROCK 1) (Frampton et al., 2007). Différentes études se sont intéressées à l'étape d'entrée de l'EHV-1 dans les cellules équine, mettant en avant la complexité du mécanisme d'entrée du virus en fonction des différents types cellulaires. Tout d'abord, la gD se lie à son récepteur cellulaire entraînant son changement de conformation. Le complexe gH-gL est alors activé de même que la gB. Le tégment est libéré entraînant avec lui la libération des protéines virale et la nucléocapside dans le cytoplasme (Van de Walle et al., 2008). Ces différentes étapes entraînent l'entrée du virus

dans la cellule (Spear and Longnecker, 2003). Il a d'abord été suggéré que l'EHV-1 pénétrait dans les PBMCs par endocytose *via* la présence d'intégrines (Van de Walle et al., 2008) mais également par phagocytose (Laval et al., 2016). Il a été montré que l'EHV-1 pouvait avoir la capacité de pénétrer à la fois par endocytose et par fusion dans des expériences *in vitro* menées sur cellules Equines Dermiques (ED) (Azab et al., 2013; Frampton et al., 2007; Hasebe et al., 2009) et sur cellules endothéliales (Van de Walle et al., 2008). Les 2 mécanismes permettent au virus de s'adapter et d'avoir accès à divers types cellulaires. Cependant, les conditions décisives du mode d'entrée du virus ne sont pas encore connues. Une étude menée par Azab et al. (2013) a montré que l'EHV-1 dont la gH avait été modifiée pour être non fonctionnelle, avait modifiée sa voie d'entrée dans les cellules ED. En outre, une hypothèse a été émise selon laquelle la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique ne pouvait se produire que s'il existait une forte interaction entre la gH et les intégrines ($\alpha 4\beta 1$) et un ou plusieurs facteurs viraux supplémentaires inconnus à ce jour. Ainsi après la liaison de la gD à son récepteur, la gH se lie à l' $\alpha 4\beta 1$ -intégrine et induit des cascades de signalisation cellulaire responsables de la fusion du virus avec la membrane cellulaire (Azab et al., 2015). Plus récemment, une étude a montré que l'EHV-1 était capable d'induire une transduction du signal à l'intérieur de la cellule infectée conduisant à l'activation de la phospholipase C, à la libération d'inositol triphosphate et à la libération de Ca^{2+} depuis le réticulum endoplasmique (Azab et al., 2015). Il a été montré également que l'EHV-1 pouvait activer les petites GTPases et aider au transport des particules virales vers les cellules voisines *via* la fusion intercellulaire (Kolyvushko et al., 2020). Les mécanismes d'entrée du virus dans les différents modèles cellulaires restent encore à approfondir.

Transcription et réplication du génome viral

Après l'entrée du virus dans la cellule, la capside est relarguée dans le cytoplasme puis est transportée le long de microtubules grâce à la dynéine jusqu'au noyau cellulaire (Frampton et al., 2010). Les pores nucléaires permettent l'entrée de l'ADN viral dans le noyau ; la nucléocapside se désagrège dans le cytoplasme (Pasdeloup et al., 2009). L'ADN viral ainsi libéré dans le noyau se circularise et peut engager son cycle lytique (Garber et al., 1993; Su et al., 2002). Le cycle lytique commence par l'initiation de la transcription. La protéine du tégument α -trans-inducing factor (ETIF), entrée dans le noyau, active la transcription des gènes très précoces (immediate-early genes ; IE) (Smith et al., 1992; Elliott and O'Hare, 1995). Puis la transcription se fait de manière séquentielle. Dans un premier temps les gènes très précoces (IE) sont transcrits suivi des gènes précoces (55 early genes ; E) et enfin des gènes tardifs (20

late genes ; L) (Gray et al., 1987a; Smith et al., 1992). Une cascade de trans-activation permet aux différents gènes d'être transcrits. Les gènes E sont trans-activés par les protéines IE et les gènes L sont trans-activés par les protéines E. Les gènes IE codent des protéines impliquées dans la transcription. Les gènes E codent principalement les enzymes nécessaires à la réplication du génome : ADN polymérase et thymidine kinase virale. Les gènes L codent des protéines de structure : capsidite et glycoprotéines d'enveloppe (Caughman et al., 1985; W. L. Gray et al., 1987b).

Assemblage et libération des virions

Les protéines de la nucléocapside synthétisées dans le cytoplasme sont redirigées vers le noyau pour initier leur assemblage, permettant la formation d'une pro-capside sphérique (Newcomb et al., 1996). L'ADN viral est alors encapsidé et la libération des protéines structurales est enclenchée permettant à la pro-capside de changer de conformation pour former la nucléocapside polyhédrique finale. La formation de bourgeons au niveau de la membrane nucléaire interne permet la sortie de la nucléocapside. Dans un premier temps la nucléocapside se retrouve dans l'espace péri-nucléaire entourée d'une enveloppe primaire, puis, un processus de fusion entre l'enveloppe primaire et la membrane nucléaire externe permet la libération de la nucléocapside (Granzow et al., 2001). A ce stade l'enveloppement de la nucléocapside n'est pas finalisé. Cette étape nécessite le bourgeonnement de la nucléocapside dans les vésicules du réseau trans-golgien dans lesquelles se trouvent les glycoprotéines virales membranaires. Les virus entièrement constitués et matures sont transportés à la surface des cellules et sont libérés par un processus d'exocytose dans l'espace extracellulaire (Guo et al., 2010; Mettenleiter et al., 2009). À ce stade les particules virales nouvellement formées peuvent infecter d'autres cellules et se propager dans l'organisme du cheval.

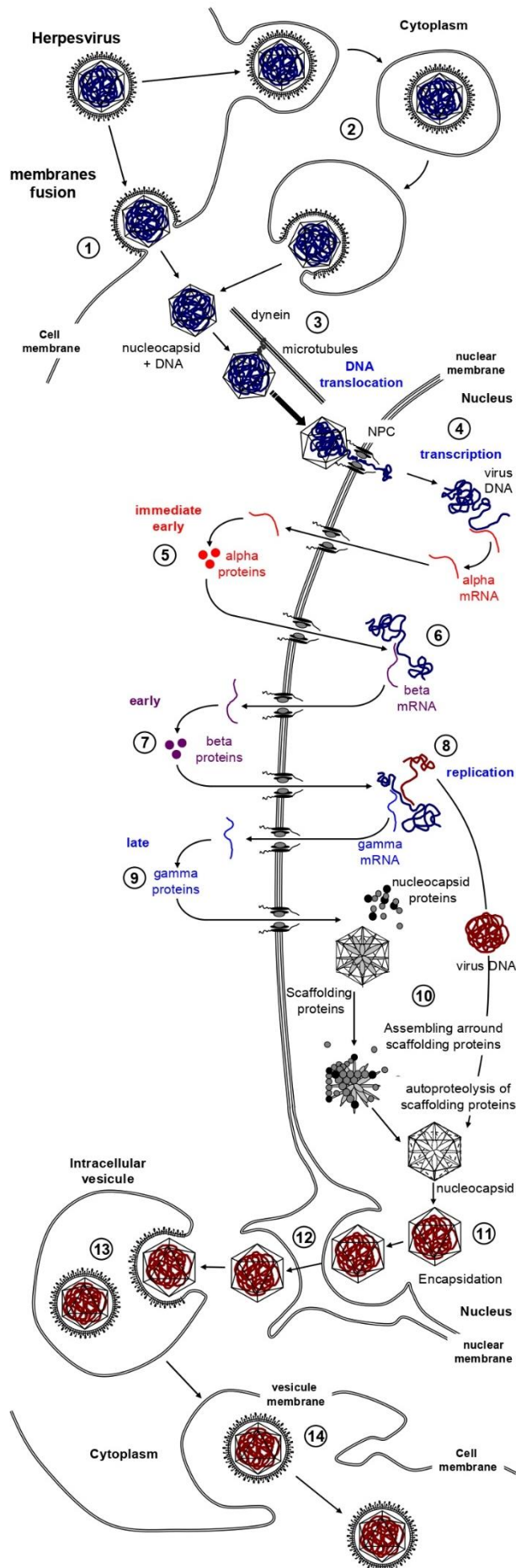


Figure 10 Schématisation du cycle de réplication de l'EHV-1. (1) Attachement viral sur la cellule. (2) internalisation du virus dans la cellule (2a) par fusion ou (2b) par endocytose. (3) Libération de la nucléocapside dans le cytoplasme (4). Transport de la nucléocapside jusqu'au noyau via les microtubules. (5) Libération du génome viral dans le noyau. (6) Circularisation du génome viral et activation de la transcription entraînant l'expression des immediate-early (IE ; 7a), early (E ; 7b) et late (L ; 7c) protéines. (8, 9, 10) réplication du génome viral et intégration dans une nouvelle capsid. (11) Transport de la nucléocapside à l'extérieur du noyau dans le cytoplasme par fusion (12). (13) formation de l'enveloppe virale dans le réseau trans-golgien. (14) Exocytose du nouveau virion mature dans le compartiment extracellulaire. (D'après Paillot et al., 2008).

4.3. Propagation virale et physiopathologie

L'EHV-1 est un pathogène très contagieux. Le virus est très présent au sein de la population équine mondiale. Si peu d'études ont été réalisées sur la séroprévalence, on estime que le pourcentage de chevaux infectés par un EHV (1 ou 4) avant l'âge de 2 ans est d'environ 80% dans la plupart des grandes nations d'élevage (Allen, 2002a; Lunn et al., 2009). L'EHV-1 est d'autant plus contagieux qu'il se transmet généralement par contact direct avec des sécrétions très chargées en particules infectieuses (salive, écoulement nasal) ou par inhalation d'aérosols infectieux (Patel et al., 1982). Les tissus fœtaux ou placentaires qui contiennent des charges virales élevées peuvent également constituer une source possible d'infection (Reed and Toribio, 2004).

4.3.1. Infection du tractus respiratoire

La propagation de l'EHV-1 dans l'organisme est un processus rapide qui nécessite au préalable l'infection du tractus respiratoire supérieur, véritable porte d'entrée du virus et lieu d'infection et de multiplication virale. En effet, après inhalation de particules virales d'EHV-1, celles-ci atteignent rapidement les muqueuses respiratoires (Awan et al., 1990). L'EHV-1 infecte les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur : la cloison nasale, le nasopharynx et la trachée (Laval et al., 2021 ; Figure 11). Une étude a montré l'érosion progressive de la muqueuse nasopharyngée et palatine, associée à la réplication virale lors des 7 premiers jours qui suivent l'infection (Kydd et al., 1994a). Ceci était accompagné d'une excrétion nasale entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour (Kydd et al., 1994b). Une autre étude a montré que

l'infection primaire par l'EHV-1 des différents tissus du tractus respiratoire supérieur entraînait une destruction de l'épithélium et une excrétion nasale jusqu'à 14 jours post infection (Gryspeerd et al., 2010). Cette destruction de cellules épithéliales respiratoires conduit à l'expression de divers signes cliniques caractéristiques de la rhinopneumonie pouvant varier avec l'âge. Les chevaux adultes présentent le plus souvent des signes cliniques modérés et parfois subcliniques. A l'inverse les jeunes chevaux peuvent avoir des signes cliniques plus marqués tels que de l'hyperthermie, du jetage nasal (parfois mucopurulent), de la toux et une lymphadénopathie des ganglions submandibulaires et rétropharyngés (Laval et al., 2021; R. Paillot et al., 2008; Sutton et al., 1998). D'autres signes cliniques ont été associés à une infection par l'EHV-1 : dépression, anorexie et jetage oculaire (Lunn et al., 2009; Patel and Heldens, 2005). Des complications dues à des infections secondaires bactériennes peuvent également être associées. Récemment, il a été démontré que le pollen des plantes favorisait les infections par l'EHV-1. En effet, des expériences *ex-vivo* ont montré que les protéases présentes dans le pollen altéraient les jonctions intracellulaires des cellules de l'épithélium respiratoire équin ce qui fragilise la barrière épithéliale facilitant ainsi l'invasion virale par l'EHV-1 (Van Cleemput et al., 2019). Enfin, dans le tractus respiratoire, il a été démontré que les cellules monocytaires CD172a+ servaient de cheval de Troie au virus pour se répandre dans l'organisme. Les cellules monocytaires CD172a+ infectées par le virus EHV-1 transportent le virus de la face apicale de l'épithélium à la *lamina propria* en direction de la circulation lymphatique et sanguine (Baghi et al., 2014). Il a été montré que les cellules CD172a+ migraient spécifiquement vers les régions infectées par l'EHV-1 et que les chimiokines CCL2 et CCL5 (sécrétées en réponse à des signaux tels que les cytokines pro-inflammatoires) étaient impliquées lors d'infections avec des souches responsables de signes cliniques neurologiques (Zhao et al., 2017).

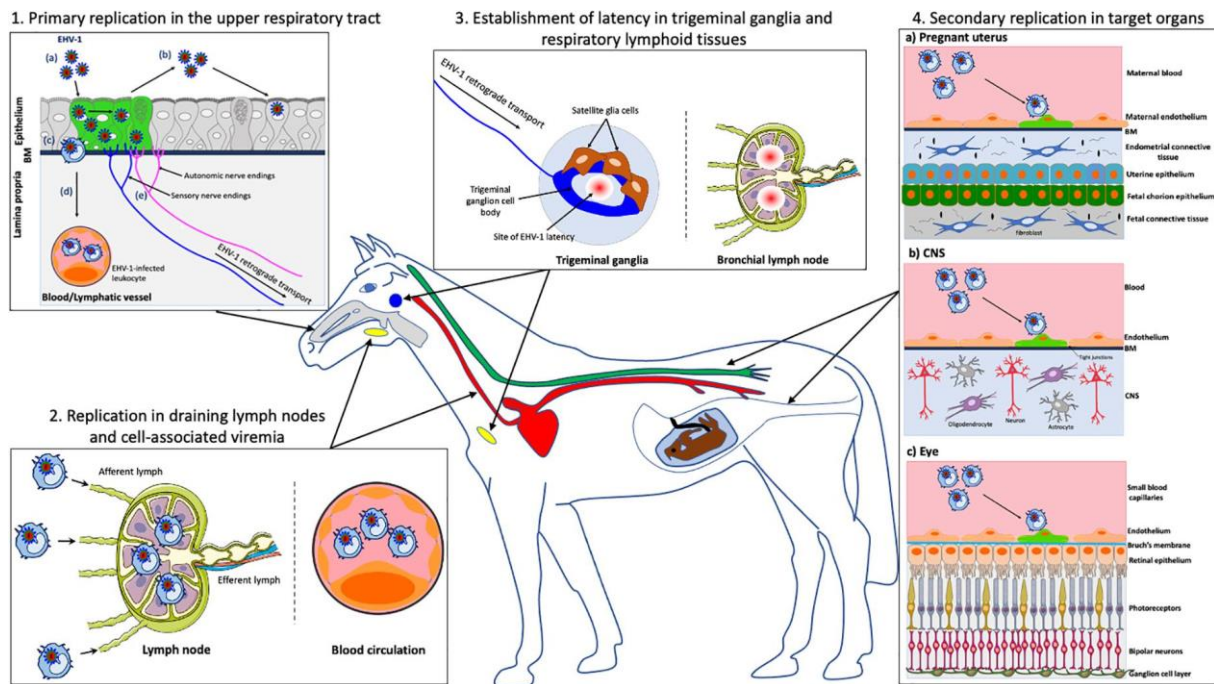


Figure 11 Les différentes stratégies d'infection de l'EHV-1. (1) Réplication primaire de l'EHV-1 dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur. (2) réplication de l'EHV-1 dans les ganglions lymphatiques drainants entraînant la mise en place de la virémie via l'infection des PBMCs. (3) Établissement de la latence dans les ganglions trigéminals et les nœud lymphatiques des voies respiratoires. (4) Mécanismes de réplication secondaire responsables des signes cliniques des différents organes cibles : (a) utérus, (b) système nerveux central (CNS) et (c) système oculaire. Les dessins sont partiellement basés sur les modèles d'art médical SMART servier. D'après Laval et al, 2021 Copyright © 2021 « *Frontiers in microbiology* vol. 12 662686 »

4.3.2. Virémie associée aux cellules et réplication dans les nœuds lymphatiques

Comme vu précédemment, après l'infection de l'épithélium respiratoire, l'EHV-1 traverse la membrane basale par l'intermédiaire de leucocytes infectés et plus particulièrement les cellules CD172a+ (Baghi et al., 2014). Récemment, des travaux ont établi l'hypothèse que la présence de particules virales au niveau de l'épithélium respiratoire entraînerait un recrutement local de monocytes et de lymphocytes T et contribuerait à l'établissement de la virémie (Poelaert et al., 2019). Une fois la membrane basale franchie, l'EHV-1 se retrouve dans la circulation sanguine et lymphatique (Vandekerckhove et al, 2010). Le virus opère une réplication virale secondaire dans les ganglions lymphatiques (Allen et al, 2004) entraînant l'infection de nombreux PBMC circulants tels que les lymphocytes CD4+, CD8+ et les lymphocytes B (Baghi and Nauwynck, 2014; Gryspeerdt et al., 2010; Wilsterman et al., 2011).

La présence d'EHV-1 infectieux et d'antigènes viraux dans les ganglions lymphatiques associés aux voies respiratoires a été observée 12 heures après l'infection. La rapidité avec laquelle EHV-1 infecte les cellules immunitaires et se retrouve dans les ganglions lymphatiques montre l'importance de l'immunité à médiation cellulaire en réponse à ce virus. Ainsi, les cellules infectées sont les lymphocytes, les monocytes, les macrophages et les plasmocytes et le virus se propage par contact entre ces cellules et les cellules endothéliales et lymphatiques ainsi que celles des organes cibles (Kydd et al., 1994a). Une étude *in vitro* sur l'infection des cellules endothéliales a révélé que l'infection des cellules CD172a+ par l'EHV-1 favorisait le phénomène d'adhésion cellulaire. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la présence du virus induisait des voies de signalisation cellulaire qui déclenchaient des changements fonctionnels dans les cellules CD172a+ infectées augmentant leur adhésion aux cellules endothéliales (Laval et al., 2015b). Dans la même étude, les auteurs mettent en avant le rôle probable des intégrines et de la l-selectine dans l'adhésion aux cellules endothéliales. En effet le blocage des intégrines sur les cellules CD172a+ infectées par l'EHV-1 entraîne une diminution de l'adhésion cellulaire mais ne l'abolit pas totalement, ce qui pourrait signifier qu'il y a plusieurs molécules impliquées dans l'adhésion aux cellules endothéliales ((Laval et al., 2015b); Figure 12).

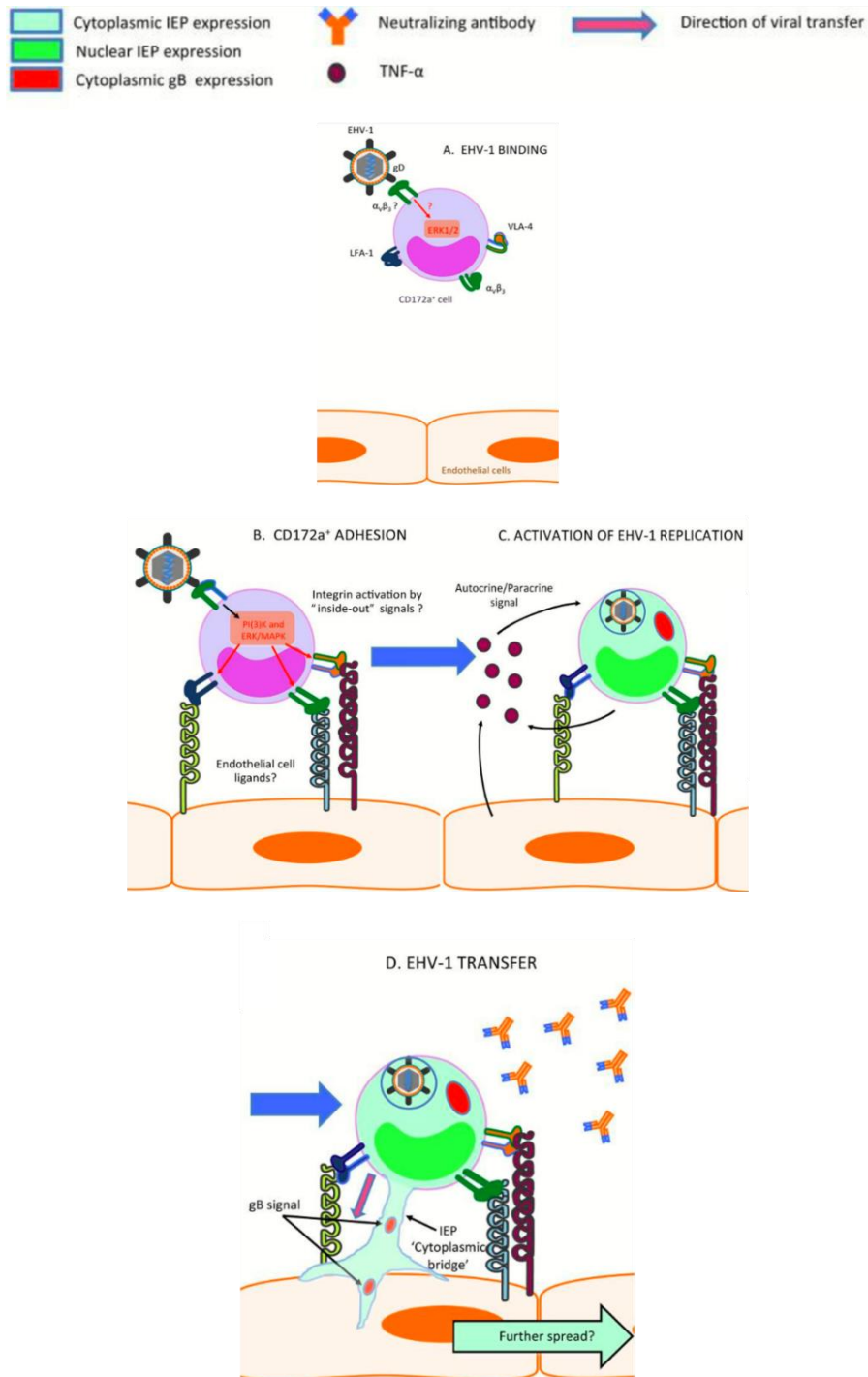


Figure 12 Mécanisme de transmission supposé de l'EHV-1 d'une cellule CD172a+ à une cellule endothéliale. (A) Activation des voies de signalisation PI3K et ERK/MAPK intracellulaires médiées par l'intégrine et par l'interaction de l'EHV-1 avec la gD à la surface d'une cellule CD172a+. (B) Régulation à la hausse de l'expression des différentes intégrines à la surface de la cellule CD172a+ infectée et adhésion à la surface des cellules endothéliales via des ligands. (C) activation de la réplication de l'EHV-1 dans les cellules CD172a+ via la sécrétion de facteurs solubles tels que le TNF-α. (D) Transfert du matériel cytoplasmique de l'EHV-1 vers les cellules endothéliales. Les dessins sont partiellement basés sur les modèles d'art médical SMART servier. D'après Laval et al, 2017 Copyright © 2017 « *Frontiers in microbiology* vol. 12 662686 »

4.4. Formes secondaires de la maladie

La propagation de l'EHV-1 dans les ganglions lymphatiques est responsable de l'apparition de fièvre et de lymphopénie (Laval et al., 2021). La dissémination de l'EHV-1 à l'échelle de l'organisme traduit la mise en place d'une virémie. De cette manière différents organes et tissus peuvent être infectés : l'endothélium vasculaire, les poumons, l'endomètre, le système nerveux central (SNC) ainsi que l'uvée. Une des principales formes cliniques secondaires qui en découle est la thrombose qui entraînerait notamment les avortements et les myéloencéphalopathies (MHE) (Wilson et al., 2019).

4.4.1. Système reproducteur

Lorsque les particules virales atteignent l'endothélium du système circulatoire, l'EHV-1 peut réaliser une réplication secondaire dans les cellules endothéliales de l'utérus gravide. L'atteinte de cet organe provoque une vascularite, une thrombose multifocale et une nécrose ischémique (Edington et al., 1991; Smith et al., 1996) qui donne lieu à des lésions au niveau des branches artériolaires dans la couche glandulaire de l'endomètre (Figure 13). Il s'en suit une nécrose avasculaire ainsi qu'un œdème de l'endomètre. Dans les cas les plus graves, lorsque l'infection des cellules endothéliales est généralisée, les membranes fœtales se décollent conduisant à la mort du fœtus par anoxie et à l'avortement. Dans ce cas, le fœtus n'est pas infecté par l'EHV-1 et l'avortement résulte de l'infection à EHV-1 chez la jument (Foote et al., 2012). Si l'infection des cellules endothéliales au niveau de l'utérus est plus éparse, l'EHV-1 peut traverser la barrière utéro-placentaire et conduire également à un avortement. Le fœtus cette fois est infecté par l'EHV-1 (Edington et al., 1991). Il a été montré que dans ce cas, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de l'allantochorion et du cordon ombilical étaient infectées par l'EHV-1 (Smith et al., 1996). Les avortons infectés par EHV-1 *in utero* présentent des lésions diverses tels qu'un œdème sous-cutané, un œdème pulmonaire, un épanchement pleural et une hypertrophie de la rate (Machida et al., 1997). Il arrive que les juments infectées par l'EHV-1 dont le poulain est également infecté aillent au bout de la gestation. Si l'infection a eu lieu à un stade avancé de la gestation le poulain infecté meurt dans les premiers jours qui suivent la naissance et on parle alors de poulain mort-né. La période d'incubation après une phase de virémie, résultant soit d'une infection primaire, soit d'une réactivation d'un virus latent, varie entre 9 jours et 4 mois (Allen, 2002b; Laval et al., 2021). Il est à noter que les avortements surviennent majoritairement durant les 4 derniers mois de gestation (Lunn et al., 2009), le plus

souvent sans prodrome (Allen, 2002b). Le virus est ensuite rapidement éliminé du système reproducteur et n'engendre pas de problème de reproduction futur (Schulman et al., 2013).

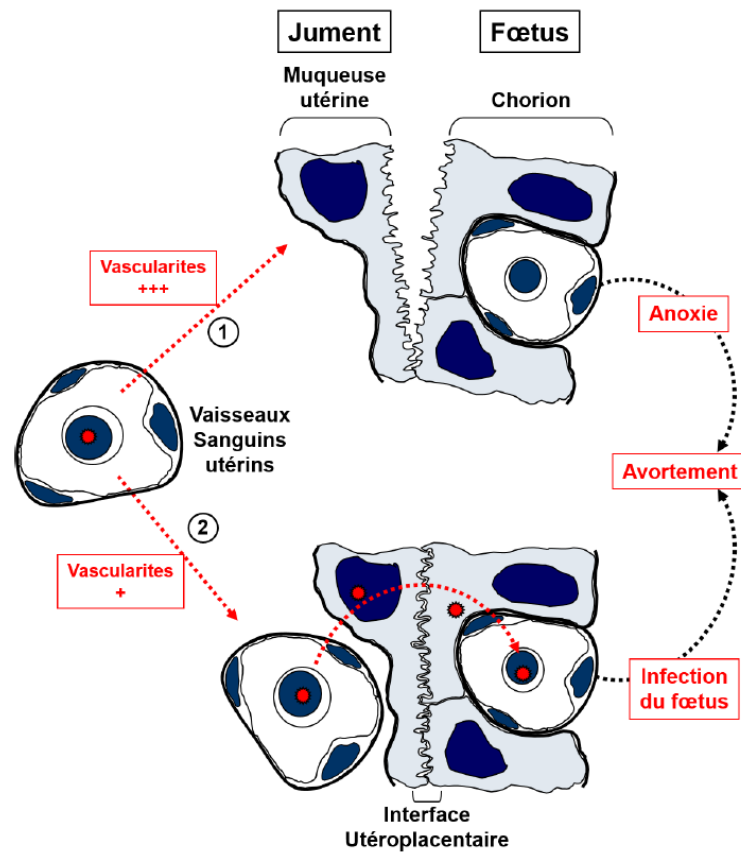


Figure 13 Représentation schématique de la survenue d'avortement causé par l'EHV-1. (1) l'infection des vaisseaux sanguins utérins provoque des vascularites responsables de la séparation du placenta entraînant la mort du fœtus par anoxie ou (2) la transmission de l'EHV-1 de la jument au fœtus via le franchissement de la membrane utéroplacentaire. Le virus infecte les lymphocytes du fœtus pouvant entraîner l'avortement. Schéma d'après Paillot et al, 2008.

4.4.2. Système nerveux central

La réplication secondaire dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins au niveau du SNC engendre des lésions importantes telles qu'une vascularite avec ou sans hémorragie locale, ou une nécrose thrombo-ischémique dans le cerveau et la moelle épinière (Edington et al., 1986). Les signes neurologiques apparaissent généralement entre le 6^{ème} et 8^{ème} jour après une infection naturelle ou expérimentale (Goehring et al., 2010). La survenue de signes cliniques d'ordre neurologique suite à une infection à EHV-1 est estimé à 10% (Lunn et al., 2009; Pusterla and Hussey, 2014). Les plus courants sont l'ataxie et la parésie des membres.

L'hypotonie de la queue et de l'anus, l'élévation de la queue et l'incontinence urinaire, un œdème distal des membres et des testicules et une cécité ont été décrits mais sont plus variables d'un individu à l'autre (Van Maanen, 2002). Les signes cliniques sont généralement distribués bilatéralement mais il arrive qu'ils soient distribués de manière asymétrique. Des hémiparésies et l'apparition d'une boiterie unilatérale évoluant vers une ataxie unilatérale ou plus généralisée, une parésie et un décubitus ont déjà été décrits (Little et al., 1974; Wilson, 1997). Des lésions des nerfs périphériques ainsi que de la moelle épinière ont également été observées (Wilson, 1997). L'ensemble des lésions engendrées entraînent des carences en nutriments et en oxygène qui peuvent conduire à une dégénérescence des tissus nerveux entraînant la MHE (Wilson, 1997). Le pronostic des chevaux qui se maintiennent debout est favorable cependant la convalescence peut être longue et la récupération complète peut nécessiter plusieurs mois. À l'inverse, les chevaux couchés ont un pronostic vital plus engagé et on rapporte des cas d'euthanasie dans 50% des cas suite à des complications. Il existe une corrélation positive entre la durée, l'ampleur de la virémie et l'incidence de la MHE (Allen, 2008). Il semblerait également que des facteurs liés à l'hôte et au virus jouent un rôle important dans la survenue ou non de la MHE (Pusterla et al., 2022). Quelques facteurs de l'hôte pouvant être associés à la protection contre la MHE ont été décrits telles qu'une réponse précoce et forte à l'IFN au niveau de l'épithélium respiratoire et dans les PBMC (Edington et al., 1989; Gryspeerdt et al., 2010; Holz et al., 2017; Hussey et al., 2011; Schnabel et al., 2019; Wimer et al., 2018), l'induction d'une immunité cellulaire (Th1), IFN- γ (Hussey and Giessler, 2022; Pusterla et al., 2006), les IgG4/7 (Perkins et al., 2019; Schnabel et al., 2019) et la régulation de l'IL-10 au niveau du SNC (Hussey and Giessler, 2022; Pusterla et al., 2006). D'autres facteurs prédisposant à la survenue de MHE ont fait l'objet de recherches. Le sexe et l'âge constituent des facteurs de risque et il est admis que les femelles et les chevaux âgés de plus de cinq ans semblent être davantage prédisposés à développer la forme nerveuse de la maladie (Allen, 2008; Goehring et al., 2006; Henninger et al., 2007; Pusterla et al., 2016; Van Galen et al., 2015). Une étude récente sur l'influence de la race décrit un risque accru de MHE pour certaines races d'équidés (Klouth et al., 2021). L'étude montre que les chevaux de race Fjord et Warmblood présentaient un risque accru de MHE par rapport aux poneys Shetland et Welsh. L'étude montre également que l'influence de l'âge au sein de ces races à risque semble être moins important, et que le facteur sexe n'a pas d'influence, cependant ces pistes doivent être approfondies. Récemment, une étude menée sur des cellules de souris a mis en évidence le rôle de la protéine Tau dans la contribution aux dommages neuronaux lors de l'infection par l'EHV-1 (Cymerys et al., 2020). L'étude démontre que l'infection par l'EHV-1 conduit à l'accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée dans des

neurones primaires murins. Les souches non-neuropathogènes et neuropathogènes d'EHV-1 ont induit spécifiquement l'hyperphosphorylation de tau-ser199/ser202, tau-ser404 et tau-thr205.

4.4.3. Système oculaire

L'EHV-1 peut également atteindre le système vasculaire de l'œil provoquant des lésions chorioretiniennes multifocales chez les chevaux telles que la chorioretinite et l'uvéite causées par des lésions ischémiques de la choroïdée (Slater et al., 1992). Les infections oculaires causées par l'EHV-1 sont généralement subcliniques mais des lésions diffuses peuvent entraîner une destruction rétinienne étendue allant jusqu'à la cécité. Les premiers cas décrits chez les chevaux remontent à 1992 sur une jument et un poulain (Whitwell and Blunden, 1992). Hussey et al, (2013) ont démontré que les lésions chorioretiniennes lors d'une infection expérimentale à EHV-1 étaient présentes chez 50 à 90% des chevaux (Hussey et al., 2013). Cependant peu de cas sont décrits sur le terrain à ce jour.

4.5. Latence

Afin d'assurer leur survie, certains virus peuvent mettre en place une stratégie de latence. L'EHV-1 comme les autres herpesvirus utilise cette stratégie de persistance. La latence s'établit suite à la circularisation du génome, l'ADN polymérase de l'EHV-1 est copié mais la transcription du génome viral est réprimée. Seule l'expression des transcrits associés à la latence (LATs) est permise (Baxi et al., 1995; Chesters et al., 1997; Vargas-Bermudez et al., 2018). Après la réplication primaire au niveau du tractus respiratoire du cheval, l'EHV-1 peut pénétrer dans les terminaisons nerveuses provenant des ganglions trigémiques et des neurones sympathiques et parasympathiques innervant l'épithélium mais également dans les lymphocytes T CD8+ (Baxi et al., 1995; Chesters et al., 1997; Giessler et al., 2020; Slater et al., 1994; Welch et al., 1992). L'infection latente s'installe de ce fait dans le système nerveux périphérique. L'hypothèse émise est que l'EHV-1 utilise la voie axonale rétrograde comme voie directe de l'épithélium des voies respiratoires supérieures vers les ganglions trigémiques, où la latence est établie dans le noyau du neurone après un court cycle de réplication (Giessler et al., 2020). La latence n'entraîne pas d'apparition de signes cliniques chez les chevaux et le virus n'est pas retrouvé dans la circulation sanguine (Allen, 2006). Une étude a montré la capacité de l'EHV-1 à établir une infection latente *in vivo*. En effet, l'application d'un stimulus

déclencheur : la dexaméthasone (un corticostéroïde entraînant la réactivation de l'EHV-1 latent) administré deux mois après une infection primaire a entraîné l'infection chez des poneys (Slater et al., 1994). L'ADN viral a été détecté dans les ganglions trigémiques et le virus infectieux a pu être à nouveau isolé (Slater et al., 1994). Un constat similaire a été fait dans les tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires : les ganglions lymphatiques mandibulaires et rétropharyngés (Allen, 2006; Kydd et al., 1994b; Slater et al., 1994; Welch et al., 1992). Ces résultats montrent la capacité de l'EHV-1 à entrer en latence dans le système nerveux périphérique et dans les tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires. Une étude *in vitro* menée par Smith et al. (1998) a montré la capacité de l'EHV-1 à se réactiver à partir des lymphocytes T CD8+ et des CD5+. Une étude s'intéressant à la latence de l'EHV-1 sur des chevaux 70 jours après une infection a montré la présence d'ADN génomique d'EHV-1 dépourvue d'activité transcriptionnelle dans les tissus neuronaux et lymphoïdes (Smith et al., 1998). Cependant les résultats de cette étude sont à confirmer car les prélèvements n'avaient été faits qu'à un seul temps (Samoilowa et al., 2021). A l'heure actuelle, plus de 60% des chevaux sont considérés comme infectés de manière latente (Lunn et al., 2009). Il est probable que la fréquence de l'infection par réactivation d'un état latent soit sous-estimé dans les études notamment à cause de la faible quantité de particules virales retrouvées (Bueno et al., 2020). La réactivation chez les chevaux infectés à l'état latent est un phénomène important dans l'épidémiologie de l'EHV-1. En effet, ces chevaux deviennent infectieux après la réplication de l'EHV-1 dans les voies respiratoires et constituent un risque pour les animaux sensibles au contact. Cependant, les facteurs déclenchants et les mécanismes exacts de la réactivation sont actuellement encore méconnus (Bueno et al., 2020).

4.6. Épidémiologie

Si les facteurs liés à l'hôte semblent jouer un rôle sur la sévérité de l'infection à l'EHV-1, le variant incriminé pourrait également jouer un rôle important. Les données concernant les différents variants ont fait l'objet de plusieurs études. Ces dernières années, le séquençage complet du génome de divers isolats (Bryant et al., 2018) a permis d'identifier des marqueurs de virulence permettant la distinction des souches provoquant les formes nerveuses ou abortives mais un seul marqueur génétique a pu être associé à la neuropathogénicité (Nugent et al., 2006). Il a été montré que la variation d'un seul nucléotide était significativement liée aux troubles nerveux provoqués par l'EHV-1. Cette variation, dans le gène de l'ADN polymérase (ORF30), provoque une substitution de guanine (G2254) en adénine (A2254) et conduit à un changement

d'acide aminé en position 752 (acide aspartique (D752) en asparagine (N752)). Ainsi, les souches A2254 (non neuropathogène) et G2254 (neuropathogène) ont été plus fréquemment associées à l'avortement et à la forme nerveuse, respectivement (Nugent et al., 2006; Gryspeerdt et al., 2011). Nugent et al. (2006), ont montré que plus de 95% des cas d'EHV-1 sans troubles nerveux étaient causés par ces souches non-neuropathogènes, tandis que plus de 86% des cas avec des chevaux présentant des troubles nerveux étaient causés par ces souches neuropathogènes. Une étude sur l'analyse des génotypes d'isolats provenant d'avortements, de maladies respiratoires et de maladies neurologiques survenus entre 1984 et 2007 a permis de montrer que 11% des formes abortives étaient de génotype D752. Le génotype N752 a été trouvé majoritairement dans des cas d'avortement ou de formes respiratoires et moins fréquemment dans des cas de MHE (24 %). Cette constatation suggère que d'autres facteurs peuvent également contribuer à l'apparition de la MHE et souligne la nécessité de mener d'autres études épidémiologiques (Perkins, 2016). Ainsi, le génotype N752 apparaît comme étant lié à des souches moins virulentes et principalement associé à des souches causant les formes respiratoires et abortives de la maladie. Le génotype D752 semble plus fréquemment associé à l'apparition de formes nerveuses (Pusterla et al., 2023). Plus récemment, une nouvelle variante génotypique, H752 (C2254), a été signalée chez des chevaux présentant de la fièvre, des signes respiratoires et des déficits neurologiques en Europe et aux États-Unis (Paillot et al., 2020; Pusterla et al., 2021; Sutton et al., 2020). Des données épidémiologiques supplémentaires sont nécessaires pour établir la prévalence de ce nouveau génotype H752 au sein de la population équine (Pusterla et al., 2023). Dans les années 80-90, de nombreux cas d'avortement dus à l'EHV-1 ont été signalés. Ces « tempêtes d'avortements » ont été décrites dans le monde entier (Dunowska, 2014). L'Australie et la Nouvelle-Zélande ont souvent été épargnées par les épizooties d'EHV-1. Ces dernières années, les cas d'avortement dus à l'EHV-1 ont diminué mais le nombre de foyers infectieux de MHE semble avoir augmenté (RESPE ; Kydd et al., 2012). Comme le montre la figure 14 des épizooties sont régulièrement recensées dans de nombreux pays. La dernière épizootie majeure de ces dernières décennies en Europe a été signalée en Espagne (Valence) en 2021 lors d'un concours hippique international. Sur les 850 chevaux réunis, 114 ont présenté des signes cliniques ou ont été testés positifs en PCR. Le transport des chevaux a ensuite contribué à la propagation rapide dans différents pays dont la Belgique, la France, l'Allemagne, l'Italie, le Danemark, le Qatar, la Slovaquie, la Suède et la Suisse. L'importance de l'épizootie était telle que certains chevaux infectés sont morts ou ont dû être euthanasiés. Cette situation a conduit la Fédération équestre internationale (FEI) et les organismes compétents à annuler des manifestations équestres sportives dans 12 pays

européens. Les études de la prévalence de l’EHV-1 en France reposent principalement sur le Réseau d’Épidémiologie-Surveillance en Pathologies Équines (RESPE). Le RESPE assure la collecte des données épidémiologiques relatives à l’EHV-1. Les infections par EHV-1 ne sont pas soumises à déclaration obligatoire, les vétérinaires sentinelles qui déclarent la survenue d’infection par EHV-1 renseignent donc ces épisodes infectieux sous les trois formes de la maladie : syndrome respiratoire aigu, syndrome nerveux et avortement (Legrand et al., 2013; Lecollinet et al., 2020).

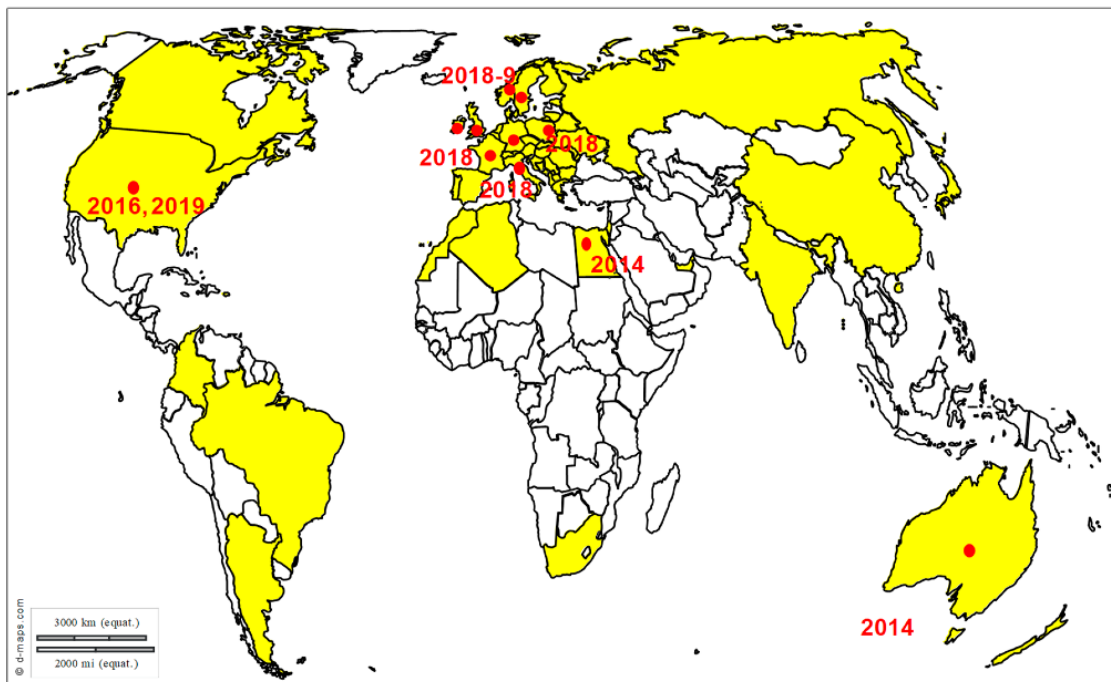


Figure 14 Répartition des foyers d’EHV-1 dans le monde. En jaune, les pays où des cas d’EHV-1 ont été recensés. Les dates des épizooties d’EHV-1 déclarées dans les rapports WAHIS (Système mondial d’information sur la santé animale) de l’OMSA, dans les alertes Promed (<http://www.promedmail.org>) et dans la littérature scientifique sont représentés par des points (2014-2019). D’après Lecollinet et al., 2020.

4.7. Réponse immunitaire après infection par l’EHV-1

Ce chapitre décrit les connaissances sur la mise en place de la réponse immunitaire chez le cheval suite à l’infection par l’EHV-1 (Figure 15).

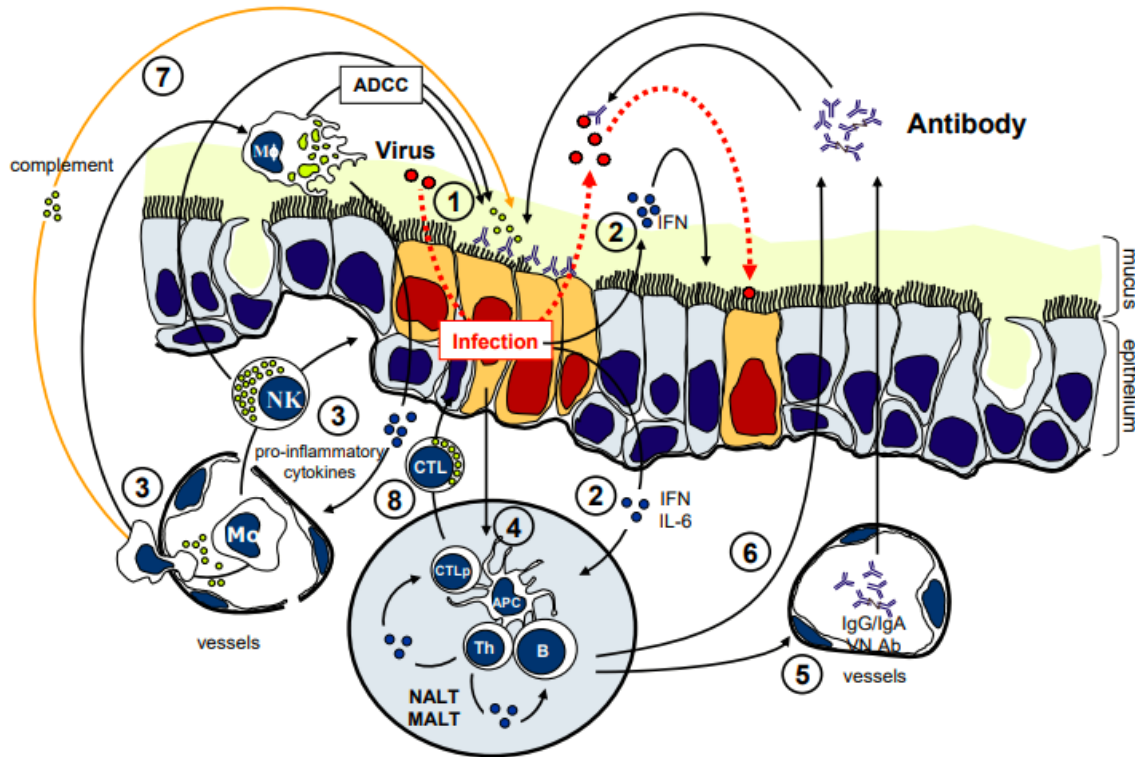


Figure 15 Réponse immunitaire induite par l'infection par l'EHV-1. (1) l'infection des cellules épithéliales du tractus respiratoire induit une réponse inflammatoire caractérisée par la synthèse locale d'IFN et d'IL-6 (2). (3) les macrophages alvéolaires et les neutrophiles libèrent des cytokines pro-inflammatoires induisant le recrutement de cellules phagocytaires et de NK. Les cellules NK exercent une activité cytotoxique sur les cellules infectées et synthétisent l'IFN- γ qui oriente la réponse adaptative. Les antigènes viraux présentés dans les tissus lymphoïdes (4) induisent la synthèse d'anticorps sériques (5) ou muqueux (6). La voie ADCC est activée par la réponse humorale (7). Enfin l'activation des lymphocytes T cytotoxiques lysent les cellules infectées (8) pour empêcher la propagation du virus. (D'après Paillot et al., 2008).

4.7.1. Réponse immunitaire innée : rôle du tractus respiratoire

La réponse immunitaire des muqueuses est rapidement engagée dans la protection de l'hôte contre l'infection par l'EHV-1. L'infection par l'EHV-1 dans le tractus respiratoire supérieur génère rapidement un état inflammatoire caractérisé par une augmentation d'IFN- α et - β (Edington et al., 1989). La production locale d'IFN- α est détectable dans les sécrétions nasales 24h après le début de l'infection et atteint un pic en moyenne 48h après le début de l'infection (Hussey et al., 2011; Schnabel et al., 2019; Wimer et al., 2018). Snabell et al. (2019) ont montré que l'apparition d'IFN- α était corrélée à l'excrétion virale qui atteint également un pic 48h après l'infection virale (Schnabel et al., 2019). Simultanément, les chimiokines (CCL2 et CCL3) et le CD14 soluble sont sécrétés au niveau de la muqueuse nasale et présentent des

pics de concentration entre le 2^e et le 4^e jour après le début de l'infection (Perkins et al., 2019; Wimer et al., 2018, 2018). L'augmentation des marqueurs inflammatoires, en particulier CD14, IFN- α et IFN- γ , bien qu'ils soient présents à des concentrations plus faibles, est également détectable dans le sang périphérique au cours des premiers jours suivant l'infection (Perkins et al., 2019; Schnabel et al., 2019, 2018; Wimer et al., 2018). Des lavages broncho-alvéolaires effectués avant une infection expérimentale ont montré que les macrophages et les lymphocytes étaient naturellement prédominants dans les poumons des chevaux en condition physiologique (Kydd et al., 1996). Cependant, l'infection par l'EHV-1 vient modifier l'environnement leucocytaire des poumons des chevaux. Au 2^e jour d'infection, le taux de neutrophiles augmente et parallèlement, le taux de macrophages et de lymphocytes CD4+, CD5+ et CD8+ diminue. Trois à quatre semaines après l'infection, le taux de lymphocytes T CD8+ augmente et le phénotype des lymphocytes B varie (Kydd et al., 1996). L'EHV-1 interagit avec le système immunitaire en infectant les sous-populations lymphocytaires. Diverses chimiokines subissent des variations notamment : les chimiokines pro-inflammatoires telles que CCL2, CCL3, CCL5, CD14, CXCL9, CXCL10, IL-10 ou encore l'IFN- γ (Perkins et al., 2019; Schnabel et al., 2019; Wimer et al., 2018). Mesquita et al. (2021) ont récemment étudié la réponse immunitaire innée lors de l'infection par une souche EHV-1 neuropathogène dans le modèle murin. Les souris infectées ont présenté une infiltration de monocytes et de cellules T CD8+ au niveau du cerveau entraînant la sécrétion plus ou moins importante des chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2, CXCL9 et CXCL10. Les cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-1 α et β , l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α ont été détectées dans le SNC (Mesquita et al., 2021). Lorsque la charge virale diminue dans les sécrétions nasales, les marqueurs inflammatoires précédemment décrits diminuent également. À la fin de la première semaine d'infection et généralement lorsque le virus ne peut plus être isolé, la plupart de ces marqueurs deviennent indétectables (Schnabel et al., 2019; Wimer et al., 2018).

4.7.2. Réponse immunitaire adaptative

a) Réponse humorale

La réponse immunitaire innée déclenchée au niveau des muqueuses permet l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. L'immunité humorale mise en place à la suite de l'infection par l'EHV-1 est de courte durée (Van der Meulen et al., 2006). Les chevaux sont donc susceptibles d'être réinfectés dès que la réponse humorale faiblit. Dans les deux semaines

suivant une infection, les chevaux développent deux types d'anticorps : les anticorps fixant le complément et les anticorps neutralisants (Hannant et al., 1993). Les anticorps neutralisants, spécifiques de l'EHV-1, permettent une protection entre 6 mois et un an mais les anticorps fixant le complément offrent seulement une protection pendant 3 mois. L'immunité humorale permet le développement d'anticorps qui vont reconnaître les épitopes des glycoprotéines de surface de l'EHV-1 (Perkins et al., 2019). Les chevaux expriment 5 classes d'immunoglobulines (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM) et sept sous-types d'IgG (IgG1 à IgG7) (Wagner, 2006). Chez les chevaux infectés, il a été montré que les sérotypes d'anticorps détectés étaient : les IgGa, IgGb, IgGc, IgGd, IgM et IgG(T) (R. Paillot et al., 2008; Wagner et al., 2015; Perkins et al., 2019). Le rôle des IgA dans la défense contre l'EHV-1 semble plus controversé. Breathnach et al. avaient initialement montré que les IgA sécrétées dans les muqueuses du tractus respiratoire supérieur et dans la muqueuse nasale permettaient une protection locale contre l'EHV-1 (Breathnach et al., 2001). Cependant, Schnabel et al., ont montré que les IgA sont en concentration plus faible et que cette concentration chute rapidement après l'infection et n'ont pas relié ces IgA à une protection significative contre l'infection par l'EHV-1 (Schnabel et al., 2019, 2018). Il est à noter que ces 3 études n'ont pas utilisé la même méthode d'analyse des IgA ce qui pourrait expliquer les différences observées. Le rôle des IgA dans la défense contre l'EHV-1 reste à éclaircir. Les anticorps IgG1 et IgG4/7 spécifiques de l'EHV-1 sont retrouvés à des niveaux élevés dans le tractus respiratoire supérieur et dans le sérum à partir de la première semaine suivant l'infection et leur concentration augmente jusqu'à atteindre un pic entre la 2^e et la 3^e semaine d'infection (Hussey et al., 2011; Schnabel et al., 2018; Wagner et al., 2017; Wimer et al., 2018). Les IgG1 semblent perdurer à un haut niveau jusqu'à 2 mois tandis que les IgG4/7 semblent se maintenir au moins pendant les quatre mois suivant l'infection (Schnabel et al., 2018). La réponse systémique IgG1 contre l'EHV-1 présente des similitudes avec la réponse IgM observée au cours d'une primo-infection suggérant ainsi que chez le cheval, les IgG1 ont la capacité de remplir plusieurs rôles (Larson and Wagner, 2021). Les IgG1 et les IgG4/7 sont les isotypes les plus efficaces pour activer la voie du complément et les récepteurs Fc lors d'une infection par l'EHV-1 (Lewis et al., 2008). Plusieurs études ont montré que les IgG3, IgG5 et IgG6 étaient retrouvées à une faible concentration après une infection par l'EHV-1 ce qui indique que leur rôle dans la protection contre l'infection est moindre (Hussey et al., 2011; Schnabel et al., 2018; Wagner et al., 2017; Wimer et al., 2018). Les IgM sériques spécifiques de l'EHV-1 sont également retrouvés en faible concentration et leur détection dans le sérum de chevaux infectés est de courte durée (Wagner et al., 2017; Wimer et al., 2018). Les anticorps limitent donc l'infection de l'EHV-1 au niveau du tractus

respiratoire cependant, ils ne sont pas toujours capables de fournir une immunité protectrice et ne sont plus en capacité de neutraliser le virus lorsque celui-ci établit une virémie, la réponse cellulaire doit donc prendre le relai.

b) Réponse cellulaire

La réponse cellulaire à l'EHV-1 se caractérise par la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T et l'augmentation des lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Ces derniers, véritables marqueurs de l'immunité cellulaire, jouent un rôle important dans le développement de la réponse Th1 et donc la destruction des cellules infectées par l'EHV-1 (Breathnach et al., 2005; Paillot et al., 2007; Schnabel et al., 2018; Wagner et al., 2017; Wimer et al., 2018). Paillot et al. (2008) ont montré que le pourcentage de cellules sécrétant l'IFN- γ augmentait dans les 2 semaines suivant l'infection puis redescendait à un niveau normal au bout de 3 à 4 semaines. Les cellules T CD8+ et CD4+ sont difficiles à détecter dans le sang périphérique car ces cellules sont induites en faible quantité (Schnabel et al., 2018; Wimer et al., 2018). Des travaux ont montré le rôle important des lymphocytes T CD8+ restreints aux molécules du CMH-I (Kydd et al., 2006, 2003). Une étude menée par Coombs et al., a montré l'importance de la sécrétion d'IFN- γ dans la protection contre l'EHV-1 (Coombs et al., 2006). En effet des poneys immunisés contre l'EHV-1 ont développé une réponse IFN- γ suite à une infection expérimentale ce qui leur a permis d'être protégés contre l'infection. Les poneys naïfs, quant à eux, ont présenté des réponses limitées en IFN- γ et ont présenté des signes cliniques après infection. Les cellules T cytotoxiques augmentent dans le sang périphérique (McCulloch et al., 1993) et sont également retrouvées dans les voies respiratoires et les tissus lymphoïdes associés pendant la phase aiguë après l'infection par l'EHV-1 (Breathnach et al., 2005; Kydd et al., 1996). Le début de la réponse des lymphocytes T périphériques est détectable seulement à partir de la 3^e semaine suivant l'infection (Perkins et al., 2019; Wagner et al., 2017; Wimer et al., 2018) alors que le pic de la virémie se produit généralement entre le 4^e et le 10^e jour suivant l'infection (Goehring et al., 2010; Goodman et al., 2006; Hussey et al., 2011; Schnabel et al., 2018). Le délai de déclenchement de la réponse des cellules T cytotoxiques pourrait expliquer le fait que la réponse cellulaire ne puisse pas toujours empêcher l'apparition de la MHE. Cependant, il est également possible que les méthodes actuelles pour mesurer la réponse cellulaire présentent des limites pour détecter les cellules impliquées dans cette réponse. L'immunité cellulaire représente un moyen de défense important notamment pour empêcher l'EHV-1 d'établir une virémie. Cependant, les formes abortives et neurologiques sont la preuve que le virus est capable

d'établir des stratégies afin de contrer le système immunitaire du cheval.

4.7.3. *Système d'évasion immunitaire*

Afin de déjouer le système immunitaire, l'EHV-1 possède des stratégies d'évasion (Figure 16). Ce sont de ces différents mécanismes que dépendent l'évolution de l'infection virale. Une des premières stratégies est d'éviter l'activation de la voie du complément. La gC se lie au composant C3b du complément (Huemer et al., 1995). Or, la protéine du complément C3b se lie à l'enveloppe virale ou à la membrane des cellules infectées favorisant la phagocytose de celles-ci et entraîne l'activation de la voie du complément. Ainsi, la gC de l'EHV-1 empêche les protéines du complément d'interagir avec la protéine C3b et bloque donc la voie alternative du complément (Huemer et al., 1995). D'autres mécanismes d'évasion permettent de tromper le système immunitaire adaptatif telle que la mise en place de la virémie associée aux cellules. Comme expliqué dans le chapitre précédent l'établissement de la virémie témoigne d'une inaptitude du système immunitaire à reconnaître les PBMC infectés par l'EHV-1 et ce malgré la présence d'anticorps neutralisants. Une étude de Van der Meulen et al. a montré que les PBMC infectés par l'EHV-1 ne possédaient pas de glycoprotéines virales à leur surface dans le cas d'une infection *in vitro* et *in vivo* (Van der Meulen et al., 2006). Cependant une autre étude a montré la détection d'antigènes de l'EHV-1 à la surface des PBMC pendant une phase de virémie (Slater et al., 1994). L'EHV-1 profite également des leucocytes isolés du tractus respiratoire supérieur pour franchir la membrane basale et pénétrer dans les tissus conjonctifs (Gryspeerd et al., 2010; Vandekerckhove et al., 2010). Dans les leucocytes circulants, l'expression des protéines tardives (gC et gD) est bloquée (Gryspeerd et al., 2012; Van der Meulen et al., 2006). Cette stratégie permet le blocage du cycle de réplication de l'EHV-1 et empêche la reconnaissance des leucocytes infectés. Les leucocytes infectés circulent alors librement dans la circulation sanguine. Il a été montré que les principales cellules impliquées dans le système d'évasion étaient les cellules CD172a⁺ et que la réplication de l'EHV-1 y est fortement restreinte (Laval et al., 2017, 2015a). Les particules virales pourraient pénétrer dans les cellules CD172a⁺ par un mécanisme de phagocytose ou d'une voie d'endocytose non classique (Laval et al., 2016). L'utilisation d'inhibiteurs des molécules impliquées dans les voies d'endocytose et des expériences de co-localisation, ont permis de montrer que l'EHV-1 pénétrait dans les cellules CD172a⁺ par une voie d'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles, mais dépendante du cholestérol, de la tyrosine kinase, de l'actine et de la dynamine, et que ce processus nécessitait une étape à faible pH. Laval et al. ont montré que

l'EHV-1 se lie à un nombre restreint de cellules CD172a+ et donc que le virus interagit avec des molécules réceptrices spécifiques. Les auteurs suggèrent que l'EHV-1 interagit avec un récepteur de surface cellulaire contenant de l'acide sialique sur les cellules CD172a+ et que l'intégrine $\alpha V\beta 3$ agisse en tant que co-récepteur, ce qui pourrait expliquer le tropisme restreint du virus pour des cellules CD172a+ particulières (Laval et al., 2016). Il a été montré que l'infection par l'EHV-1 entraînait une perte d'expression du CMH-I des cellules infectées (Rappocciolo et al., 2003; Ambagala et al., 2004). Cependant cette constatation n'a pas été faite dans toutes les études. Van der Meulen et al. n'ont pas observé de différence dans les expressions de CMH-I à la surface des PBMC entre les chevaux infectés ou non (Van der Meulen et al., 2006). Le CMH-I a été identifié comme étant un récepteur d'entrée fonctionnel de la gD dans des cellules endothéliales, dermiques et cérébrales équines (Kurtz et al., 2010; Sasaki et al., 2011). Cependant, il a été démontré que les anticorps du CMH-I ne bloquaient pas totalement l'entrée du virus dans les PBMC indiquant ainsi que différents récepteurs pourraient permettre l'entrée du virus dans les PBMC (Azab and Osterrieder, 2012). L'EHV-1 est également capable de moduler le recrutement des leucocytes circulants dans le tractus respiratoire supérieur permettant d'éviter le déclenchement d'une réponse immunitaire trop forte. La production d'IFN de type I a été associée à une infection auto-limitée de l'EHV-1 dans le tractus respiratoire supérieur (Gryspeerd et al., 2012). Pour cela, l'EHV-1 entraîne une régulation à la hausse de l'ARNm de l'IFN- α (Soboll Hussey et al., 2014; Poelaert et al., 2018). Il semblerait cependant que ce mécanisme soit souche dépendante. En utilisant un modèle *ex vivo* d'explant de muqueuse respiratoire, les auteurs ont enregistré de fortes réponses IFN- α lors de l'infection par des souches d'EHV-1 neurovirulentes et responsables d'avortements. Dans cette étude, les auteurs soutiennent que les souches d'EHV-1 responsables d'avortements pourraient avoir développé des mécanismes anti-IFN qui semblent absents ou moins prononcés chez les souches EHV-1 neurovirulentes (Poelaert et al., 2018).

Une autre stratégie d'évasion immunitaire est l'inhibition de la réponse des lymphocytes constatée lors d'une infection expérimentale de chevaux (Hannant et al., 1991). Un constat similaire a été fait en présence de PBMC isolés une semaine après une infection expérimentale par EHV-1. En effet, en présence de PBMC infectés, la fonction des lymphocytes T a été inhibée (Hannant et al., 1999). L'EHV-1 infecte principalement les lymphocytes T (CD4+), les souches non neurovirulentes de l'EHV-1 infectant deux fois plus de cellules que les souches neurovirulentes (Poelaert et al., 2019). Les auteurs montrent également une expression restreinte des protéines virales à la surface des lymphocytes T infectés, empêchant ainsi la reconnaissance immunitaire. La libération des nouveaux virions est bloquée, ce qui entraîne

l'accumulation de nucléocapsides dans le noyau du lymphocyte T. Lors de la mise en contact cellules à cellules, les protéines virales tardives mettent en place la formation de synapses virales et le transfert du virus vers la cellule non infectée. Ces résultats montrent que la propagation de cellule à cellule est un mécanisme qui permet à l'EHV-1 de se disséminer dans l'hôte et d'échapper à l'immunosurveillance (Poelaert et al., 2019). Charan et al. ont mis en contact des sérums dont les chevaux ont été exposés au virus EHV-1 vivant ou inactivé avec des PBMC (Charan et al., 1997). Les tests de prolifération lymphocytaires ont montré une inhibition de l'activité des lymphocytes T associé à un niveau accru de TGF- β 1. Il semble donc que l'EHV-1 entraîne une immunosuppression de l'activité des lymphocytes T associée à la sécrétion de TGF- β 1 soluble (Charan et al., 1997). Il a été montré que la présence de TGF- β empêchait les cellules T CD8⁺ activées d'acquies leur fonction de LTC et les cellules T CD4⁺ n'engagent pas leur orientation en cellules Th1 ou Th2. Le TGF- β empêche également la maturation des cellules dendritiques (Gorelik and Flavell, 2002). Afin de mettre en place des nouvelles stratégies de protection, de plus amples recherches sont nécessaires pour mieux comprendre les systèmes d'évasions immunitaires de l'EHV-1.

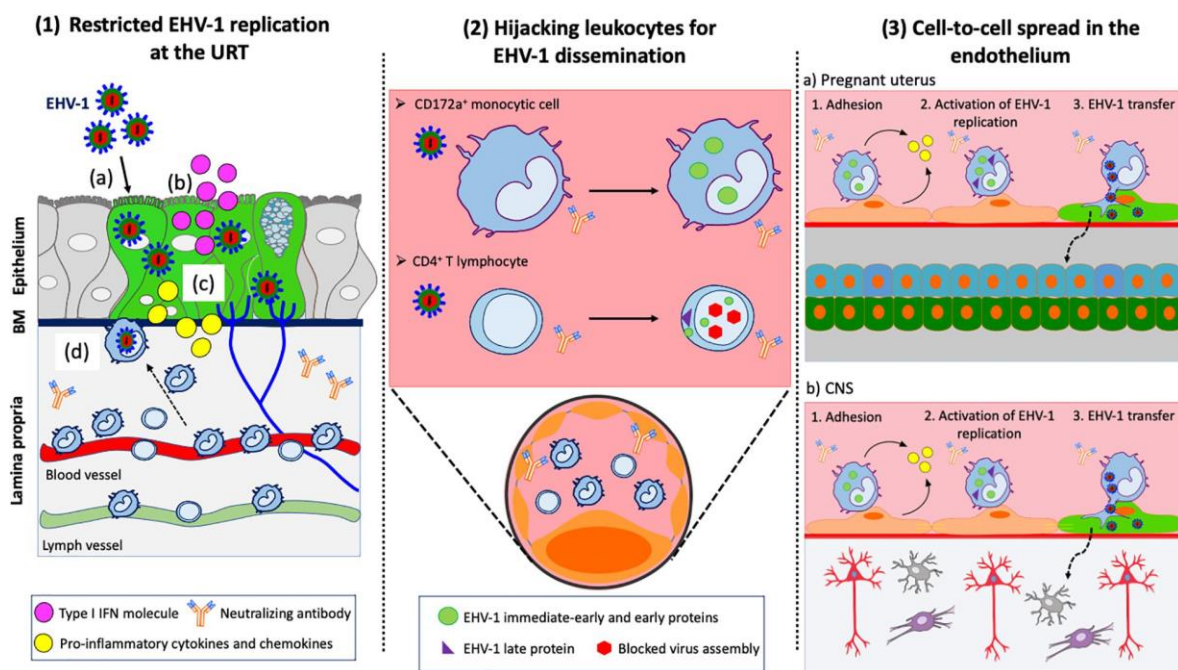


Figure 16 Stratégies d'évasion de l'EHV-1. (1) répllication limitée dans le tractus respiratoire supérieur. (B) Camouflage de l'EHV-1 dans les leucocytes via la réduction de la répllication virale. (3) propagation de cellule à cellule de l'endothélium aux organes cibles tels que : l'utérus et le système nerveux central. Les dessins sont partiellement basés sur les modèles d'art médical SMART servier. D'après Laval et al, 2021 Copyright © 2021 « Frontiers in microbiology vol. 12 662686 ».

4.8. Méthode de mesure de la réponse en anticorps anti-EHV

4.8.1. Test de séroneutralisation

La séroneutralisation est un test classique utilisé pour le diagnostic sérologique de l'infection pour différents virus. Ce test est utilisé pour l'EHV-1 pour le suivi de la réponse immunitaire humorale suite à une infection naturelle, ou suite à la vaccination. Il permet de doser l'intégralité des anticorps ayant la capacité de neutraliser l'EHV-1. Il existe deux variantes pour le test de séroneutralisation pour l'EHV-1. La première est la méthode utilisant le TCID50 (Tissue culture infectious dose 50%) qui quantifie la quantité de virus nécessaire pour infecter 50 % des cellules. Les sérums sont dilués (de 1:4 au 1 :256) et incubés en présence d'EHV-1. Après incubation, la solution sérum/EHV-1 est placée au contact des cellules. Cette méthode a été utilisée comme protocole standard de l'OMSA pour le diagnostic de l'infection par l'EHV-1 (International Committee of the OIE, 2008). L'avantage de cette méthode est qu'elle peut être appliquée à un grand nombre d'échantillons car elle est réalisée en plaque 96 puits. Cependant, il faut 4 à 5 jours de culture pour observer des effets cytopathiques clairs. La deuxième méthode est le test PRNT (Plaque Reduction Neutralization Tests) qui utilise des plaques 24 puits. Le test PRNT a montré une plus grande sensibilité que la méthode TCID50 dans les tests de neutralisation virale (VN) pour les virus de la rougeole et de la rubéole (Bannai et al, 2013) et demande 4 à 5 jours de culture également. La séroneutralisation ne permet pas de discriminer les différents anticorps EHV-1 et EHV4.

4.8.2. Test ELISA

Un test ELISA est disponible pour détecter les anticorps dirigés contre les EHV-1 et 4 dans le sérum équin (SVANOVIR[®] EHV-1/EHV4-Ab, SVANOVA). Cependant, les ELISA détectent la réponse IgG et non l'ensemble des anticorps produits à la suite d'une infection ou d'une vaccination. De plus, seuls certains anticorps dirigés contre l'EHV-4 cross réagissent avec les anticorps spécifiques de l'EHV-1 ce qui permet de discriminer les deux herpesvirus (Patel and Heldens, 2005). Des recherches sur le test ELISA EHV-1/4 ont montré que les glycoprotéines gG et gE sont celles présentant la meilleure discrimination (Andoh et al., 2013; Lang et al., 2013). De manière générale le test ELISA est simple, facile à réaliser et peut être utilisé pour dépister les anticorps anti-EHV-1 dans un grand nombre d'échantillons de sérum équin cependant ce test reste assez peu sensible car il ne cible qu'une petite catégorie d'anticorps.

4.8.3. Test de séroneutralisation en temps réel

Le test de neutralisation en temps réel (RTNA) repose sur la technique de l'analyse cellulaire en temps réel (RTCA) utilisant la technologie xCELLigence® (ACEA Biosciences, Can USA). Cette technologie qui allie les méthodes de biologie cellulaire et de mesure de microélectronique repose sur la mesure de l'impédance. Ce système permet en outre de suivre la croissance cellulaire au cours du temps et ainsi de suivre la viabilité cellulaire, l'étude des effets de substances telles que les antiviraux, la réalisation de tests de cytotoxicité ou encore plus récemment la réalisation de tests de neutralisation (Tian et al., 2012; Pan et al., 2013; Thieulent et al., 2019). Le principe repose sur l'enregistrement d'un signal électrique dans des plaques dont le fond des puits est recouvert d'électrodes en or permettant la circulation du courant (Figure 17). La circulation du courant peut être perturbée par le nombre de cellules au fond des puits ou encore les changements de forme des cellules et un signal arbitraire appelé le Cell Index (CI) est enregistré qui permet de suivre ces variations au cours du temps (Figure 18).

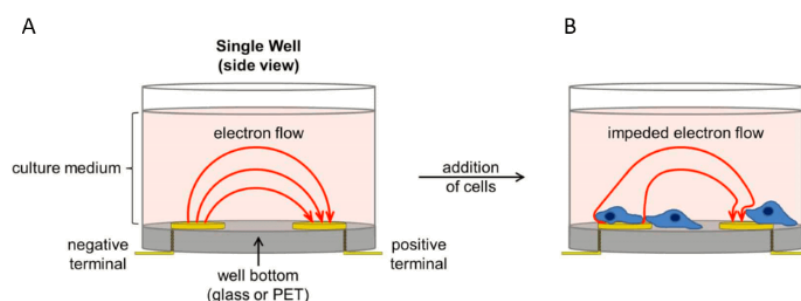


Figure 17 Circulation du courant électrique dans les puits de la E-plate® permettant la mesure de l'impédance. L'appareil xCELLigence® envoie un signal électrique qui circule du pôle négatif au pôle positif grâce au milieu de culture qui joue le rôle de conducteur électrique. (A) sans cellule, le flux d'électrons circulant n'est pas perturbé, (B) la présence de cellules perturbe le flux d'électrons et donc le signal électrique. Source : <https://www.ols-bio.de/products/live-cell-analysis-system-xcelligence>.

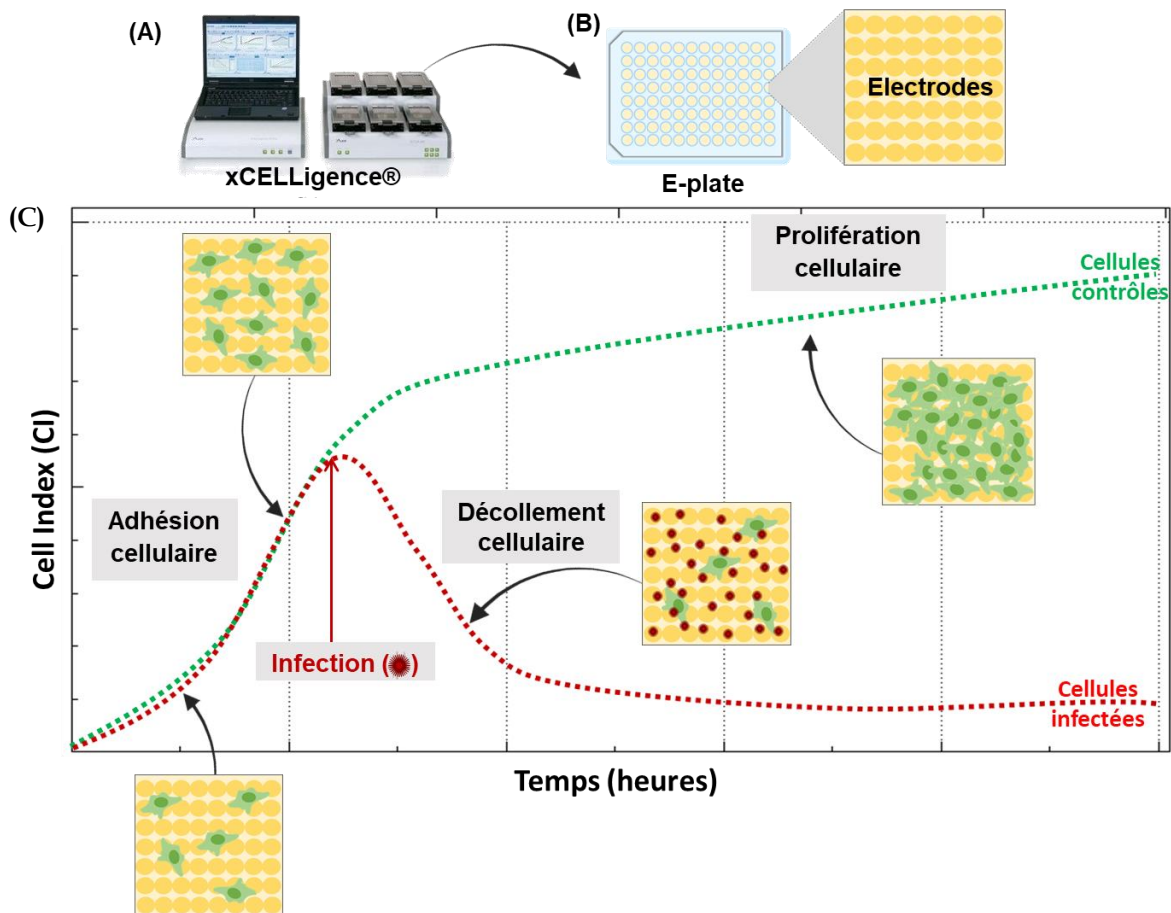


Figure 18 Représentation graphique de la technologie xCELLigence® et évolution du Cell Index au cours du temps. (A) appareil xCELLigence®, (B) E-plates 96 puits dont le fond des puits est tapissé d'électrodes en or, (C) évolution du CI en fonction de la prolifération cellulaire en absence de virus (courbe verte) ou en présence de virus (courbe rouge) au cours du temps (Inspiré de Thieulent, thèse, 2020).

La méthode de détermination du titre de séroneutralisation avec la technologie xCELLigence® s'appuie sur le principe décrit par Witkowsky et al., de calcul du titre induisant une neutralisation de 50 % de l'infection virale (NT50). Elle permet de déterminer le titre en anticorps dirigés contre l'EHV-1 dans un sérum équin (Figure 19). Cette méthode a été développée en utilisant des cellules équines dermiques. Les dilutions des sérums et l'incubation en présence du virus sont des étapes similaires à la séroneutralisation classique précédemment décrite. Les différentes courbes observées reflètent la présence ou l'absence d'infection cellulaire par EHV-1 selon que le taux d'anticorps est suffisant ou non pour neutraliser l'action du virus (Figure 19). La méthode de calcul utilisée est basée sur le calcul de la concentration de sérum induisant 50% d'inhibition de l'infection par l'EHV-1 (IC50). A chaque courbe est attribuée une valeur d'aire sous la courbe (AUC) après 140 heures de culture post-infection.

Puis à partir des AUC chaque pourcentage d'inhibition est calculé : pour les cellules infectées par le virus (témoin positif), pour les cellules non infectées (témoin négatif) et pour toutes les dilutions d'un sérum (1 :4 au 1 :256). Les pourcentages d'inhibition et les concentration sériques associées permettent de déterminer l'IC50 et la NT50. Cette méthode permet d'obtenir des résultats similaires au test de séroneutralisation (Thèse Gabrielle Sutton, 2021) mais avec une lecture automatisée par l'appareil xCELLigence® ce qui permet de cribler un grand nombre d'échantillons.

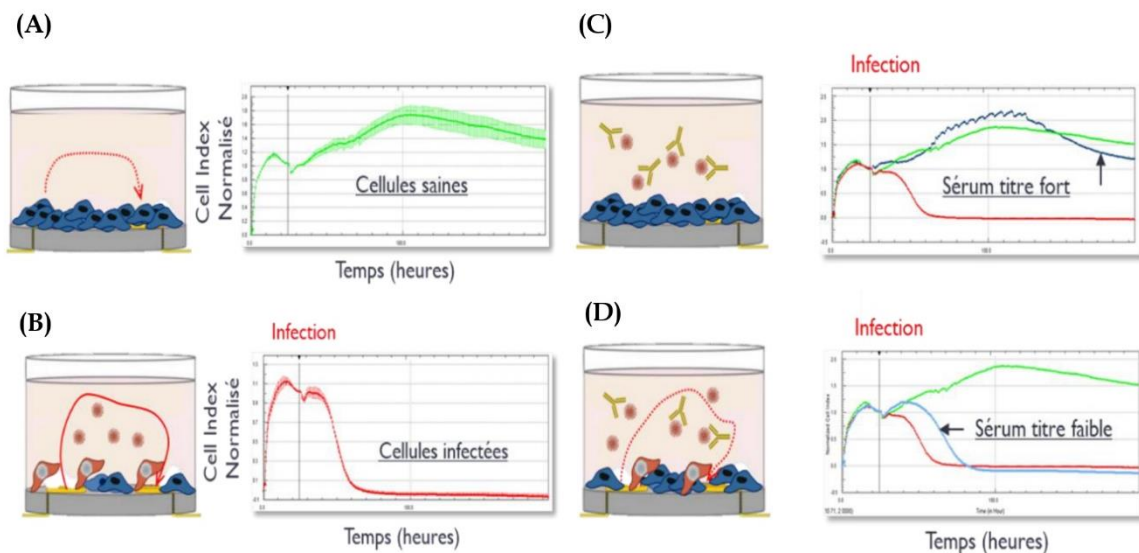


Figure 19 Représentation schématique de l'évolution du Cell Index et des puits de la E-plate au cours du temps lors d'une expérience RTNA pour les cellules non infectées (A), les cellules infectées (B), la neutralisation virale d'un sérum témoin avec un titre élevé (C) et l'absence ou la neutralisation insuffisante du virus d'un sérum témoin avec un titre faible (D).

5. Vaccination contre la grippe équine et contre la rhinopneumonie

5.1. Généralités

Les traitements thérapeutiques spécifiques sont très peu utilisés sur le terrain pour lutter contre les virus EIV et HVE-1 et la vaccination demeure le traitement prophylactique le plus efficace pour prévenir les infections par ces deux virus. Comme nous l'avons vu précédemment, ces deux virus respiratoires présentent de nombreuses différences au niveau de leur structure et physiopathologie cependant les approches vaccinales sont relativement similaires. Le but d'un vaccin est de protéger l'organisme vis-à-vis d'un pathogène en stimulant l'immunité. Les vaccins peuvent offrir une protection complète ou protéger des signes cliniques de la maladie, réduire le temps d'infection, réduire l'excrétion virale ou encore réduire la sévérité et l'apparition de complications graves. Un vaccin optimal protégera un individu contre la maladie et procurera une immunité efficace dans le temps. Cependant tous les vaccins n'atteignent pas cet optimum, du fait de la complexité de certains pathogènes ainsi que des différentes réponses individuelles de l'hôte. De nombreuses technologies vaccinales sont disponibles pour les vaccins contre la rhinopneumonie et la grippe équine. Deux grandes catégories de vaccins existent : les vaccins inertes et les vaccins vivants. En ce qui concerne la rhinopneumonie, moins de technologies vaccinales sont actuellement disponibles que contre la grippe équine. Ce chapitre détaille les différentes technologies vaccinales disponibles contre la grippe équine et contre la rhinopneumonie et les nouvelles approches vaccinales ainsi que les réglementations actuelles en France.

5.2. Vaccins inertes

5.2.1. Vaccins inertes contre la grippe équine

a) Vaccin à virus inactivé

Les vaccins contre la grippe équine à base de virus inactivés sont composés d'une ou plusieurs souches issues de culture sur cellules ou sur œufs de poule embryonnés. Le virus est ensuite inactivé par des moyens physiques : chaleur ou UV ou par des moyens chimiques tel le traitement au formol. Les particules virales sont alors non répliquatives mais les épitopes antigéniques des protéines virales sont intacts et reconnaissables par le système immunitaire du cheval. Les vaccins entiers inactivés sont capables d'entraîner une réponse adaptative cependant ils sont connus pour être moins immunogènes que leurs homologues, les vaccins vivants. Ils

stimulent principalement la réponse humorale (Figure 20). Ces vaccins nécessitent, en outre, l'ajout d'adjuvants pour obtenir une réponse immunitaire adéquate (Marrack et al., 2009). Le chapitre 7 sera consacré à la présentation des différents adjuvants utilisés dans la filière équine. Ces vaccins nécessitent également plusieurs injections pour qu'une réponse immunitaire protectrice stable se mette en place et des rappels annuels ou semi-annuels doivent être réalisés. Bien que la protection contre l'EIV repose essentiellement sur la neutralisation du virus par les anticorps (Holmes et al., 2006), les cellules infectées doivent être prises en charge par les cellules de l'immunité à médiation cellulaire. Une étude de Paillot et al. a montré l'induction de la réponse à médiation cellulaire avec un vaccin entier inactivé. Une augmentation significative du pourcentage de cellules synthétisant l'IFN- γ spécifique à l'EIV a été mesurée chez les poneys vaccinés 3 semaines après une première immunisation et 2 semaines après une seconde immunisation par rapport au niveau de pré-vaccination et aux poneys témoins (Paillot et al., 2013). Les auteurs soulignent que, dans cette étude, les effets observés sur la réponse IFN- γ sont probablement dus aux adjuvants présents dans le vaccin (hydroxyde d'aluminium et Carbopol 943P). Il a été mis en évidence un certain niveau de protection croisée vis-à-vis des différentes souches de l'EIV. En effet, les vaccins entiers inactivés contre l'EIV entraînent une réponse immunitaire contre des régions variables des glycoprotéines de surface HA et NA mais également contre des protéines plus conservées NP et M1 (Daly et al., 2004). Plus récemment, une étude menée par Palvuraj et al, (2021) a montré une stimulation de la réponse à médiation cellulaire après la vaccination de chevaux avec un vaccin entier inactivé multivalent (EIV/EHV-1) comprenant un adjuvant à base de carbomère. L'immunisation avec ce vaccin a entraîné une réponse à médiation cellulaire et humorale plus élevée et pendant une plus longue durée par rapport à un vaccin similaire adjuvanté avec une préparation sous forme d'émulsion (Pavulraj et al., 2021). Cependant l'étude comportait deux groupes de chevaux non homogènes en termes d'âge, le groupe ayant reçu le vaccin à base d'émulsion était constitué de 11 jeunes chevaux (< 6 mois) alors que le groupe ayant reçu le vaccin adjuvanté avec un carbomère comprenait 15 chevaux adultes de 4 à 12 ans. Or, plusieurs études ont montré les problèmes de l'interférence des anticorps maternels avec la vaccination des jeunes poulains par l'EIV en particulier avec les vaccins à virus inactivé (Fougerolle et al., 2016; Oladunni et al., 2021).

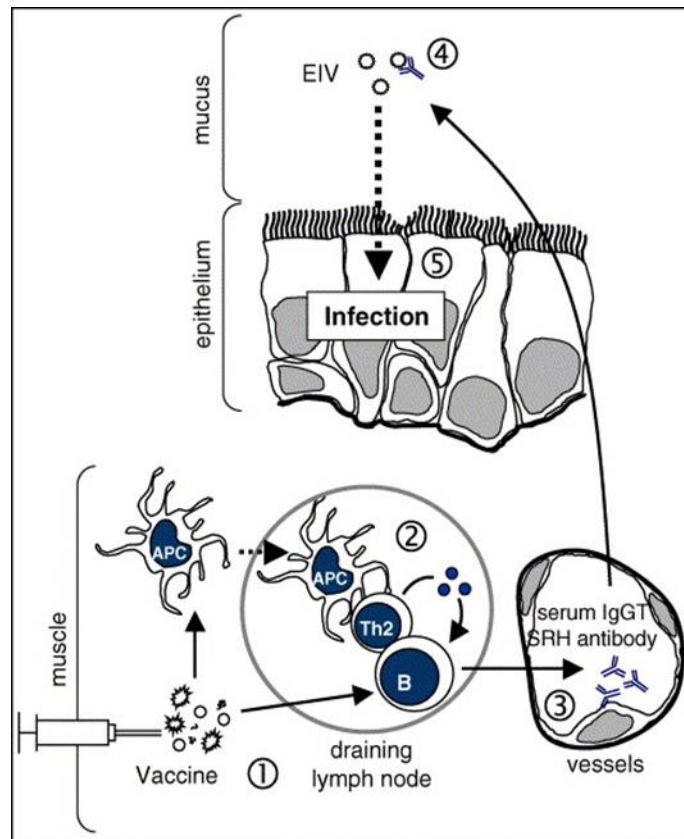


Figure 20 Réponse immunitaire induite par des vaccins inactivés à base d'EIV entiers ou de sous-unités. La vaccination par injection intramusculaire induit une réponse immunitaire humorale, produisant des anticorps sériques capables de neutraliser l'EIV entrant. En cas de faible niveau d'anticorps une infection peut survenir. Schéma adapté d'après Paillot et al., 2006a.

b) Vaccin sous-unitaire

Les vaccins sous-unitaires sont composés de fragments antigéniques de l'EIV (HA ou NA) purifiés et non du virus entier. Les vaccins sous-unitaires nécessitent également l'utilisation d'adjuvants tels que la saponine ou des complexes immunostimulants (ISCOM), afin d'augmenter leur pouvoir immunogène. Tout comme les vaccins entiers inactivés, les vaccins sous-unitaires sont généralement efficaces sur de courtes durées et nécessitent des rappels annuels ou semi-annuels chez le cheval. La réponse induite par ces vaccins est donc principalement basée sur la stimulation de la réponse humorale (Figure 21). Comme présenté sur la figure 21 les antigènes contenus dans les vaccins contre l'EIV adjuvantés avec ISCOM/ISCOM-Matrix sont traités par des voies endogènes et exogènes et présentés par l'intermédiaire des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), respectivement (Paillot, 2014).

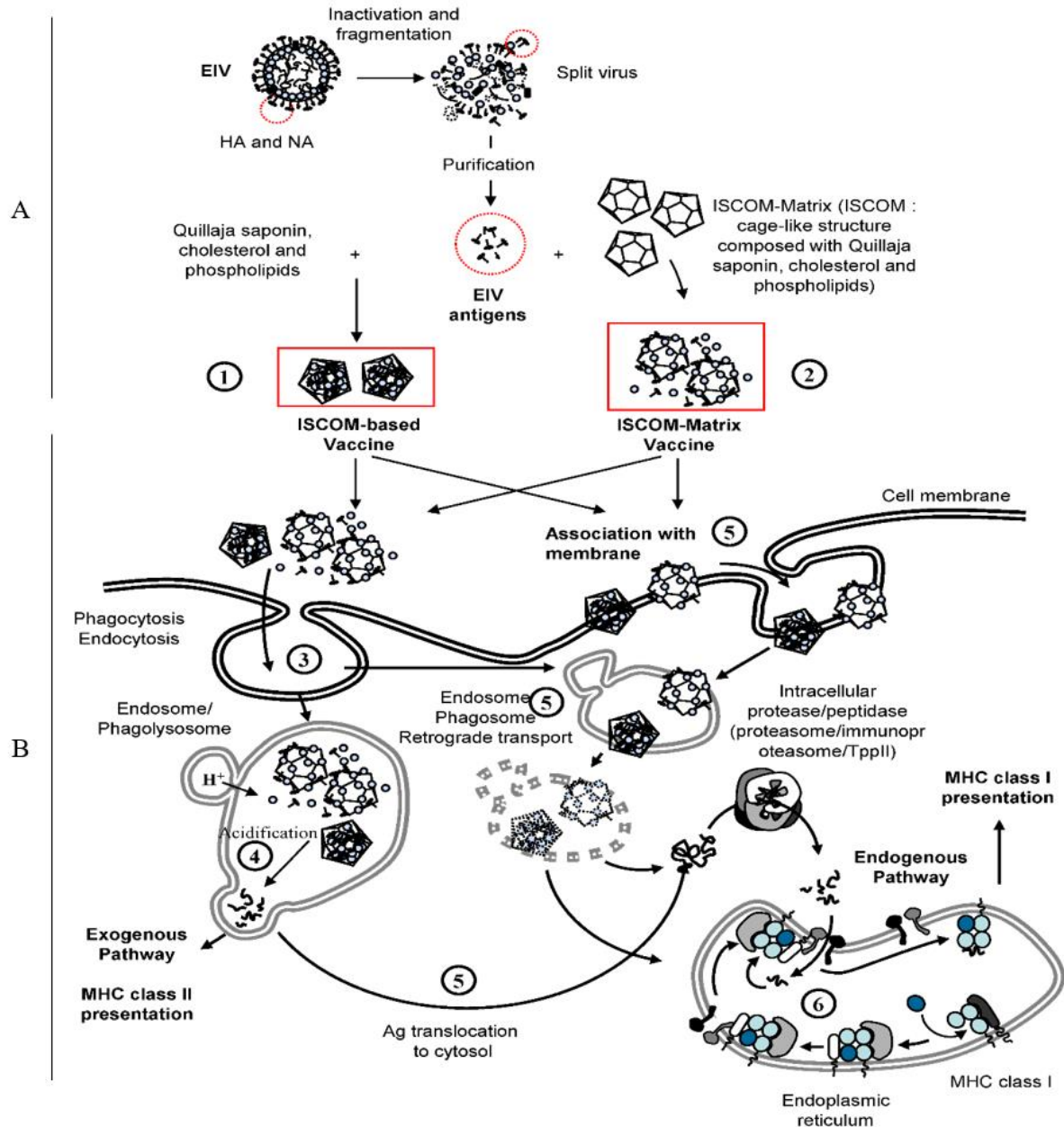


Figure 21 Constitution de vaccins EIV à base complexe d'ISCOM ou matrice d'ISCOM (A) et mécanismes d'absorption et de présentation du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) après la vaccination (B). Les antigènes EIV purifiés (HA et NA) sont directement mélangés à la saponine de Quillaja, au cholestérol et aux phospholipides dans les vaccins à base d'ISCOM (1) ou mélangés à un ISCOM préformé pour produire un vaccin à base d'ISCOM-matrice (2). Le complexe antigène/ISCOM ou ISCOM-Matrice est englouti dans les phagosomes (3) et entre dans la voie exogène de présentation de l'antigène après dégradation par les protéases en peptides courts dans les endosomes acidifiés (4). Le complexe CMH-II/peptide est reconnu par le récepteur des cellules T (TCR) des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de l'antigène. Le complexe antigène/ISCOM ou ISCOM-matrice peut pénétrer dans la cellule par interaction avec la membrane cellulaire, par phagocytose, par endocytose (5). Les antigènes sont transloqués dans le cytosol et atteignent la voie endogène de présentation des antigènes (6). Le peptide complexe du CMH-I est reconnu par le TCR des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène. D'après Paillot 2014.

C'est pourquoi de nombreuses études se sont intéressées principalement à la mesure du taux d'anticorps. Mumford et al. ont montré par mesure du taux d'anticorps par la méthode SRH que pour des quantités équivalentes d'antigènes HA, le vaccin sous-unitaire à base d'ISCOM était plus efficace qu'un vaccin à virus inactivé (Mumford et al., 1994a). Des vaccins à base d'ISCOM ont permis de protéger des poneys contre les signes cliniques de la maladie lorsqu'ils ont été soumis à une infection expérimentale (Crouch et al., 2004; Heldens et al., 2009, 2010; Paillot and Prowse, 2012; Paillot et al., 2015) et de réduire l'excrétion virale (Heldens et al., 2009, 2010; Paillot and Prowse, 2012; Paillot et al., 2015). Cependant Heldens et al. ont montré que 57% des chevaux impliqués dans leur étude ont excrété du virus les trois premiers jours suivant l'infection, ce qui indique que la protection n'est pas totale (Heldens et al., 2009). Des poneys ont présenté une augmentation du taux d'anticorps anti-EIV (IgGa et IgGb) mesuré par ELISA après une première injection et la réponse humorale a été renforcée après une deuxième injection (Crouch et al., 2004). Il a également été montré qu'une injection de ce vaccin par voie muqueuse pouvait induire une protection en réduisant les signes cliniques de la maladie et la durée d'excrétion du virus. Les auteurs suggèrent qu'une augmentation de l'induction d'IgA nasal serait à l'origine de cette protection (Crouch et al., 2005).

c) *Vaccin ADN*

La technologie des vaccins ADN a révolutionné la vaccination en santé animale. Ces vaccins sont basés sur l'injection d'ADN plasmidique codant pour des protéines antigéniques entraînant leur traduction et donc leur expression *in vivo* permettant la stimulation du système immunitaire et des réponses humorales et cellulaires (Figure 22). Contrairement aux vaccins entiers inactivés et sous-unitaires, les vaccins ADN permettent de mimer une infection naturelle par une synthèse de novo de l'immunogène sur une période plus ou moins longue assurant une présentation efficace de l'antigène dans sa conformation native et la stimulation des molécules du CMH-I et CMH-II (Oladunni et al., 2021). Chez le cheval, ce type de vaccin n'est pas autorisé dans tous les pays mais les recherches expérimentales continuent de progresser pour lever les zones d'ombres sur l'action de ces vaccins. Une première étude menée chez la souris en 1997 avait montré que l'injection d'ADN plasmidique codant pour la protéine HA du virus de la grippe équine permettait la production d'anticorps neutralisants, d'IgG et d'IgA sériques. Olsen et al. ont montré, lors d'une infection expérimentale sur modèle souris que la production d'anticorps était suffisante pour protéger les souris (Olsen et al., 1997). Ces travaux ont permis de poursuivre les recherches sur le modèle équin. En 1999, l'équipe de Lunn et al. a réalisé une

infection expérimentale sur des poneys. Les animaux immunisés avec un vaccin ADN codant la protéine HA, à raison de 3 immunisations à 60 jours d'intervalle, ont été soit partiellement soit totalement protégés des signes cliniques et de l'excrétion virale. La vaccination a entraîné la production d'IgGa et IgGb sériques spécifiques de l'EIV mais contrairement au modèle souris, aucune sécrétion d'IgA n'a été détectée au niveau des muqueuses (Lunn et al., 1999). Soboll et al. (2003) se sont intéressés aux réponses immunitaires locale et systémique entraînées par la vaccination avec un vaccin ADN. La vaccination et l'infection ont entraîné la sécrétion locale d'IgGa et d'IgGb et la production d'ARNm d'IFN- γ . Les auteurs ont également tenté une approche avec la modification du vaccin ADN visant à induire une réponse IgA au niveau des muqueuses chez le cheval par co-injection d'ADN codant l'IL-6. Cette modification n'a pas permis d'améliorer la synthèse d'IgA ni la protection contre l'infection, cependant la réponse Th2 a été stimulée *via* l'augmentation de la production d'IgG(T) au niveau systémique (Soboll et al., 2003). Une étude s'intéressant aux vaccins ADN contre la grippe équine ainsi qu'à leurs différentes voies d'administration confirme une immunogénicité et une protection comparable à celle des vaccins vivants modifiés ou des vaccins à base de vecteurs, bien que les effets du vaccin ADN soit légèrement retardés. Cette étude montre également la capacité d'un vaccin ADN dirigé contre l'EIV à conférer une protection similaire lorsque l'injection est réalisée par voie intra-dermique à l'aide d'une technologie de jet à ressort sans aiguille (Ault et al., 2012). Les vaccins à base d'ADN plasmidique contre l'EIV sont peu coûteux donc intéressants pour la filière équine. De plus ils sont stables et leur lyophilisation permet un stockage à long terme (Paillot et al., 2006a).

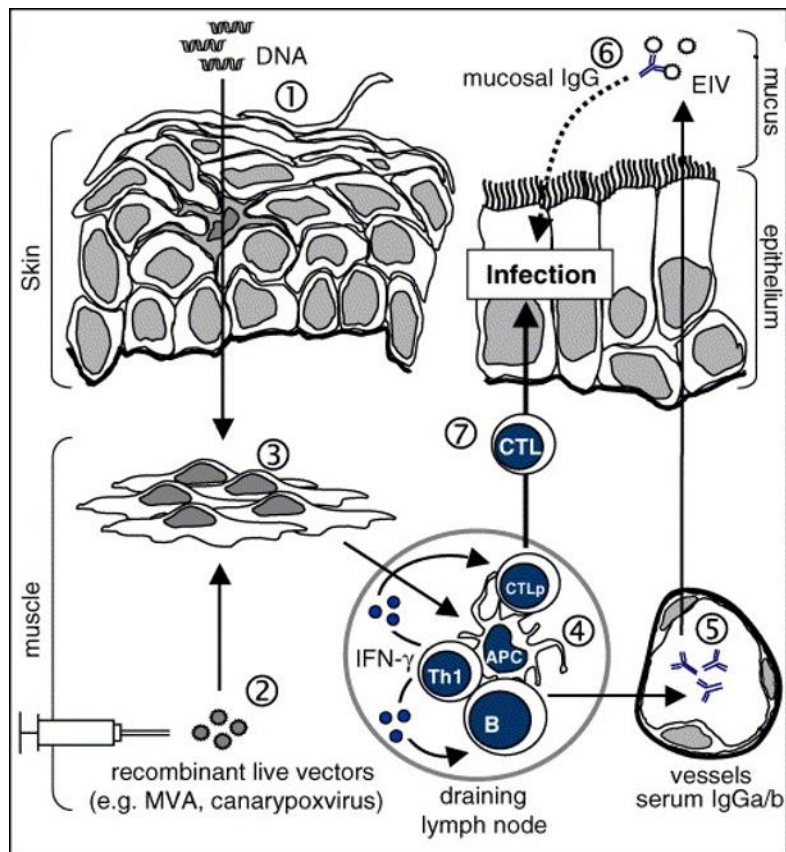


Figure 22 Réponse immunitaire induite par des vaccins à base d'ADN ou de vecteurs recombinants vivants. Une immunisation cutanée par l'ADN ou l'injection intramusculaire de vaccins à vecteur vivant induit l'expression d'antigènes EIV et stimule les réponses immunitaires humorale et cellulaire. Les anticorps sériques neutralisent les EIV infectieux et les CTL spécifiques des EIV lysent les cellules épithéliales infectées. Schéma adapté d'après Paillot et al., 2006a.

d) Vaccin à base de vecteur recombinant

Les vaccins vivants à vecteur recombinant sont constitués de virus génétiquement modifié pour coder des segments de gènes d'un autre virus. Leur conception diffère des autres types de vaccins car, si le virus ne possède que certaines parties du matériel génétique du pathogène ciblé, les antigènes viraux sont exprimés et synthétisés *de novo* dans les cellules infectées. Les antigènes sont donc présentés aux molécules du CMH-I et II stimulant ainsi une réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire importante et permettant la neutralisation virale et l'élimination des cellules infectées (Figure 22) (Ura et al., 2014). Les vaccins à base de vecteur recombinant sont très étudiés notamment chez le cheval, les vecteurs utilisés sont des poxvirus recombinant dérivés d'un avipoxvirus : les canarypoxvirus. Ainsi, les gènes d'intérêts codants pour les glycoprotéines HA et NA sont insérés dans le vecteur viral

canarypox (Plotkin et al., 1995; Minke et al., 2004). La voie d'administration privilégiée de ces vaccins est la voie systémique, chez le cheval la voie des muqueuses n'a pas été étudiée avec ce type de vaccin. Une première étude impliquant ce type de vaccin a montré son aptitude à induire une réponse en anticorps anti-EIV mesurée par SRH, HI et VN lorsque le vaccin recombinant exprimait les glycoprotéines HA et NA (Powell, 1988). Le premier vaccin recombinant avec le vecteur viral canarypox contre la grippe équine a été homologué en 2003 dans l'Union Européenne. Son efficacité a été étudiée et a montré sa capacité à établir une immunité protectrice robuste caractérisée par l'induction d'anticorps anti-EIV mesurée en SRH ou en HI ainsi que sa capacité à stimuler la réponse cellulaire *via* l'augmentation des cellules sécrétant l'IFN- γ (Paillot et al., 2006a; El-Hage et al., 2022). Les poneys infectés expérimentalement avec une souche terrain isolée au Royaume-Uni ont présenté des signes cliniques légers et l'excrétion virale a été très réduite lorsqu'ils étaient immunisés avec un protocole impliquant une dose unique ou deux doses du vaccin (Edlund Toulemonde et al., 2005). L'utilisation de ce premier vaccin homologué a présenté un avantage dans le suivi de l'épizootie de 2007 en Australie. En effet, ce vaccin codant seulement pour l'HA a permis l'utilisation du test DIVA afin de différencier les chevaux infectés naturellement (exprimant la NP) des chevaux vaccinés (n'exprimant pas la NP) (Paillot and El-Hage, 2016). Des résultats similaires avaient été observés dans une étude menée par Soboll et al. (2010). Cette étude démontrait la capacité des vaccins contenant le vecteur recombinant canarypox à stimuler des réponses élevées en IgGa lors d'une première injection et d'IgGa et IgGb avec deux injections à 35 jours d'intervalle. Les poneys étant ensuite soumis à une infection expérimentale ont montré une réduction ou une absence de signes cliniques ainsi qu'une réduction de l'excrétion virale 14 jours après une première injection et 6 mois après un protocole comprenant deux injections (Soboll et al., 2010). Ces résultats confirment la capacité de protection clinique et virologique d'un vaccin utilisant un vecteur viral canarypox sur la base de la mesure d'anticorps par le test SRH. Récemment, Entenfellner et al. (2020) ont comparé l'efficacité d'un vaccin recombinant avec le vecteur canarypox à des vaccins entiers inactivés et sous-unitaires chez des jeunes chevaux évoluant dans le domaine sportif. Un autre vecteur viral a été étudié chez le cheval, il s'agit du vecteur viral modifié de la vaccine Ankara (Modified vaccinia Ankara (MVA)). Une augmentation des titres d'anticorps sériques IgGa et IgGb spécifiques de l'EIV a été détectée après l'administration de rappels de ce vaccin exprimant les gènes de la glycoprotéine HA ou de la NP. Les réponses lymphoprolifératives spécifiques et la production d'ARNm de l'IFN- γ ont été induites (Breathnach et al., 2004). Les chevaux ont été protégés contre les signes cliniques de la maladie suite à une infection expérimentale, bien que le vaccin

exprimant la NP ait fourni une protection plus limitée que le vaccin exprimant l'HA (Breathnach et al., 2006). La réponse au vaccin recombinant a été retardée jusqu'à trois mois après la vaccination, les titres d'anticorps étaient inférieurs à ceux obtenus en réponse à la vaccination avec les deux autres vaccins. Les différences entre les vaccins ont disparu entre le 3^{ème} et le 6^{ème} mois après la vaccination (Entenfellner et al., 2020). Ces études ont démontré le potentiel de ce vecteur et ses propriétés immunogènes dans le cadre d'une vaccination contre la grippe équine chez le cheval. Cependant, les études sur ce vecteur viral ne semblent pas avoir été poursuivies.

La crainte soulevée par ce type de vaccin concerne la présence d'une immunité pré-existante contre le vecteur canarypox ce qui entraînerait une réduction de l'immunité lors des vaccinations suivantes avec le même vecteur. Deux études ont signalé la réduction de la réponse en anticorps spécifiques de l'antigène avec l'utilisation du vecteur poxvirus chez l'Homme dans un vaccin contre le virus de l'encéphalite japonaise et chez la souris dans un vaccin contre l'herpes simplex virus (Rooney et al., 1988; Kanesa-thasan et al., 2000). Cette observation ne semble pas avoir été constatée chez les chevaux lors de l'utilisation du vecteur viral canarypox (Paillot et al., 2006a).

5.2.2. Vaccins inertes contre la rhinopneumonie

Depuis les premières vaccinations contre l'EHV-1 dans les années 1960, la majorité des vaccins commercialisés sont des vaccins à virus inactivés ou sous-unitaires.

a) Vaccin à virus inactivé

La majorité des vaccins EHV-1 commercialisés sont des vaccins inactivés. L'inactivation des virus EHV se fait par contact avec du formaldéhyde ou de la β -propiolactone. Les vaccins inactivés et adjuvantés ont fait l'objet de nombreuses recherches et les résultats expérimentaux obtenus chez des hamsters et des chevaux sont à la base de nombreux vaccins commercialisés en Europe (Patel and Heldens, 2005).

Après avoir réalisé que l'EHV-1 et l'EHV-4 étaient des virus distincts (Sabine et al., 1981; Telford et al., 1992; Roizmann et al., 1992), les nouveaux vaccins inactivés ont inclus les 2 types de virus pour lutter contre la rhinopneumonie. Des juments gestantes et des poulains ont été vaccinés avec Duvaxyn® EHV-1/4, vaccin bivalent inactivé et adjuvanté (Heldens et

al., 2001a). Deux semaines après la première immunisation, une augmentation du taux d'anticorps neutralisants et des anticorps fixant le complément a été mesuré, le niveau d'anticorps a également été augmenté à la suite d'une deuxième injection. Cependant, les niveaux d'anticorps n'ont jamais atteint le niveau induit après une infection naturelle. Les animaux vaccinés de cette même étude ont montré une réduction des signes cliniques ainsi que de l'excrétion virale en comparaison des animaux non vaccinés. L'incidence des avortements dû à EHV-1 chez les juments vaccinées au 5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} mois de gestation a été réduit par rapport aux juments non vaccinées (Heldens et al., 2001a). Les juments vaccinées ont présenté des titres en anticorps anti-EHV-1 plus élevés dans le sérum et dans le colostrum comparés aux juments non vaccinées (Di Francesco et al., 2020). Une autre étude a montré que le schéma de vaccination avec un vaccin EHV-1 inactivé impliquant 4 doses au 1^{er}, 4^{ème}, 6^{ème} mois et 1 semaine avant le poulinage donnait des titres en anticorps anti-EHV-1 plus élevés que le protocole classique (Attili et al., 2020). Cependant cette étude n'a pas apporté d'élément pour mesurer les effets de protection d'un tel protocole contre les avortements dus à l'EHV-1.

La vaccination à base d'un vaccin inactivé EHV-1/4 a permis aux chevaux de développer une réponse immunitaire induisant une protection partielle contre les signes cliniques respiratoires et une réduction de la virémie pendant 6 mois (Heldens et al., 2001b). Une étude menée sur la séroconversion de 159 juments et 101 poulains a montré que moins de 30% des juments et moins de 50% des poulains présentaient une séroconversion (suivi par ELISA). De plus, seulement 17% des juments ont maintenu leur niveau d'anticorps dans le temps (Foote et al., 2003). Les résultats de cette étude mettent en lumière les différences au niveau individuel avec les réponses immunitaires vis-à-vis d'un vaccin inactivé à EHV-1 et révèlent les limites de ce type de vaccins à engendrer une séroconversion avec une majorité d'individus.

Ainsi, bien que ce type de vaccins limite l'excrétion virale, l'EHV-1 et 4 continuent d'être excrétés dans les populations de juments vaccinées pouvant entraîner l'infection subséquente de leurs poulains non sevrés au cours des cinq premières semaines suivant leur naissance ce qui peut entretenir le cycle infectieux au sein d'une population de chevaux (Foote et al., 2004, 2006). La plupart des vaccins inactivés actuels ne revendiquent qu'une protection contre les maladies respiratoires dues à EHV-1 et 4 (Patel and Heldens, 2005). Malgré une utilisation dans le monde entier des vaccins entiers inactivés, des cas d'EHV et notamment d'avortements dus à EHV-1 sont fréquemment signalés (Sutton et al., 2019; Moore et al., 2019; Tong et al., 2022).

b) Vaccin sous-unitaire

Les vaccins sous unitaires sont obtenus de 2 manières : la fragmentation des virions généralement par traitement chimique ou par expression à partir de baculovirus recombinants ou de *E. coli* (Ruitenberget al., 2001) ; ils sont constitués d'un ou plusieurs antigènes viraux et notamment les protéines virales immunogènes gB, gC ou gD. L'immunisation avec la glycoprotéine gC a permis de produire des anticorps neutralisants, de stimuler les réponses immunitaires à médiation cellulaire et d'augmenter la clairance de l'EHV-1 dans les voies respiratoires des souris après une infection expérimentale (Tewari et al., 1994). Une étude s'est intéressée à l'efficacité d'un vaccin sous-unitaire contenant la gD de l'EHV-1 en fonction de la voie d'administration. Chez la souris, il a été montré qu'une vaccination avec la gD provoque une augmentation des titres en anticorps neutralisants et des réponses des LT CD4+ après une immunisation par voie sous-cutanée et intranasale. La vaccination par voie sous-cutanée a permis de protéger les souris contre l'infection des voies respiratoires par l'EHV-1 (Zhang et al., 1998; Ruitenberget al., 2001). Plusieurs immunisations répétées avec les gB, gC et gD (seules ou en combinaison) à intervalles de 2 semaines ont induit une protection contre la forme respiratoire chez la souris. Cette protection survient 2 semaines après la dernière immunisation (Stokes et al., 1996; Packiarajah et al., 1998), et entraîne la production d'anticorps fixant le complément (Hannant et al., 1993). Ruitenberget al. ont montré que trois doses de vaccins à base de gD seule, injectés à 1 mois puis 3 mois d'intervalle, permettait d'entraîner une augmentation du niveau d'anticorps neutralisants plus élevée qu'avec une seule injection, chez une majorité de chevaux (Ruitenberget al., 1999a; Foote et al., 2005). L'analyse des isotypes a montré une augmentation des IgG chez les chevaux vaccinés. Les poulains issus de juments gestantes vaccinées avec la gD ont présenté des niveaux significativement plus élevés d'anticorps anti-gD (Foote et al., 2005). Il a également été montré que les vaccins EHV sous-unitaires permettaient de réduire l'excrétion virale et la quantité de virus isolé dans les PBMC (Hannant et al., 1993). Les réponses immunitaires humorales et cellulaires engendrées par les vaccins sous-unitaires contenant la gC ou la gD et les vaccins inactivés ont finalement montré des résultats similaires (Tewari et al., 1994; Foote et al., 2005).

Les vaccins sous-unitaires contre les herpesvirus ont fait l'objet d'études chez d'autres espèces telles que : les bovins, les éléphants et l'Homme (Hou et al., 2022; Spencer Clinton et al., 2022; Chentoufi et al., 2022). Une étude chez le bovin a établi la preuve de concept d'un vaccin sous-unitaire contenant la gB de l'herpesvirus bovin de type 1. Les cobayes testés avec ce vaccin ont produit des niveaux élevés d'anticorps anti-gB et d'anticorps neutralisants et une

réduction de l'excrétion virale et des lésions des tissus pulmonaires a été observée (Hou et al., 2022). Un constat similaire a été fait chez des souris immunisées avec un vaccin contenant la gB de l'herpesvirus endothélotrope de l'éléphant de type 1, et une augmentation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ a été constatée (Spencer Clinton et al., 2022). Chez l'Homme, le vaccin sous-unitaire contre l'herpes simplex virus de type 2 à base de gD recombinante a été le vaccin sous-unitaire le plus prometteur (Chentoufi et al., 2022). Cet antigène a été testé en combinaison avec la gB et avec différents adjuvants tels que les sels d'aluminium et le MF59 mais n'a montré qu'une faible protection clinique malgré une forte réponse en anticorps neutralisants et en lymphocytes T CD4+, CD8+ (Chentoufi et al., 2022). L'ensemble des études semble montrer l'efficacité des vaccins sous-unitaires à stimuler des cellules immunitaires humorales et cellulaires, cependant, ces études s'accordent à dire que la protection qu'ils confèrent doit être améliorée.

c) *Vaccin ADN*

Les vaccins ADN sont reconnus pour avoir une bonne stabilité ce qui facilite leur stockage à long terme une fois lyophilisés. Des études d'efficacité de la vaccination par la technologie ADN contre l'EHV-1 ont été menées chez la souris et le cheval. Un vaccin ADN codant pour la gD a entraîné des réponses immunitaires à médiation humorale et cellulaire après deux immunisations intramusculaires chez la souris. Des réductions de lésions respiratoires, de la quantité et durée de l'excrétion virale ont été observées *in vivo* (Ruitenbergh et al., 1999a, 1999b) ainsi que la diminution de la fréquence des avortements après une infection expérimentale chez la souris (Walker et al., 2000). Par la suite des études portant sur les protocoles de vaccination avec des vaccins à ADN ont montré une amélioration de la protection contre la maladie en modifiant le schéma de vaccination avec immunisation de rappel avec la gD, 4 semaines après une première immunisation (Ruitenbergh et al., 2000). Ce nouveau protocole de vaccination a permis l'augmentation du niveau d'anticorps gD chez les chevaux vaccinés par voie intramusculaire (Ruitenbergh et al., 2000). Cependant, une étude similaire n'a pas mis en évidence l'induction significative d'anticorps chez des chevaux ayant reçu une ou deux injections d'une préparation à base d'ADN de la gD (Foote et al., 2005). Un autre vaccin ADN codant les gB, gC et gD de l'EHV-1 a fait l'objet d'études. Les différents modèles ont été testés seuls ou en combinaison avec des adjuvants : le phosphate d'aluminium, le carbopol, ou complexé avec un lipide cationique DMRIE-DOPE associé à un plasmide ADN codant pour le GM-CSF. Cette dernière formulation a permis l'augmentation significative du niveau

d'anticorps neutralisants, la réduction de l'excrétion virale et de sa durée (Minke et al., 2006). Une étude a montré que des chevaux vaccinés avec un schéma à 4 doses de vaccins ADN codant pour la gB, gC et gD présentaient des réponses en anticorps gC et gD mais pas d'augmentation des CTL spécifiques de l'EHV-1 (Soboll et al., 2006). L'ensemble des études montre la capacité des vaccins ADN à stimuler la réponse humorale. En outre, l'étude d'un vaccin ADN codant pour une flagelline de *Salmonella abortus equi* et la gD de l'EHV-1 a montré la capacité de ce vaccin à augmenter de manière significative ce taux d'anticorps spécifiques de la gD mais également les niveaux d'IFN γ et d'IL-4 chez les chevaux, témoignant d'une amélioration quant à la stimulation de la réponse immunitaire cellulaire. Les charges virales et la morbidité ont été nettement réduites chez les souris ayant reçues le vaccin après exposition à l'EHV-1 (Zhao et al., 2019). Il semble plus difficile de conclure sur l'efficacité de ces vaccins à stimuler la réponse cellulaire car celle-ci reste très peu étudiée et les rares études montrent que les réponses immunitaires cellulaires sont à améliorer.

d) Vaccin à base de vecteur recombinant

La préparation des vaccins vecteurs recombinants EHV-1 requière généralement l'utilisation de poxvirus recombinants (Moss, 1996; Paoletti, 1996). Ceux-ci sont génétiquement stables et sont conditionnés pour permettre l'insertion d'un segment d'ADN de grande taille codant des protéines de l'agent pathogène. Les vaccins équins recombinants à base de poxvirus ont été régulièrement utilisés (Minke et al., 2006) (Figure 23). Un vaccin à base de « modified vaccina Ankara » contenant le gène codant pour la glycoprotéine gC de l'EHV-1 a été évalué chez le hamster. L'utilisation de ce vaccin en combinaison avec une vaccination de rappel avec un vaccin ADN codant pour la gC a permis l'induction de réponses immunitaires humorales et cellulaires (Huemer et al., 2000). Un vecteur poxvirus recombinant (souche NYVAC) codant pour une protéine cible connue des lymphocytes T cytotoxiques a fait l'objet d'une étude en tant que vaccin équin. La vaccination des chevaux a permis d'augmenter l'activité des lymphocytes T cytotoxiques et la synthèse d'IFN- γ spécifique de l'EHV-1 notamment lorsque les chevaux ont reçu plusieurs injections (Paillot et al., 2006b). Cependant bien que l'immunité, notamment l'immunité à médiation cellulaire, des chevaux ait été stimulée de manière efficace, ceux-ci n'ont pas été protégés lors de l'infection expérimentale par EHV-1. Le peu d'études disponibles sur les vaccins recombinants à base de poxvirus ne permet pas de conclure définitivement sur les effets protecteurs de ces vaccins, et les vaccins EHV-1 à vecteurs recombinants poxvirus ne sont actuellement pas commercialisés.

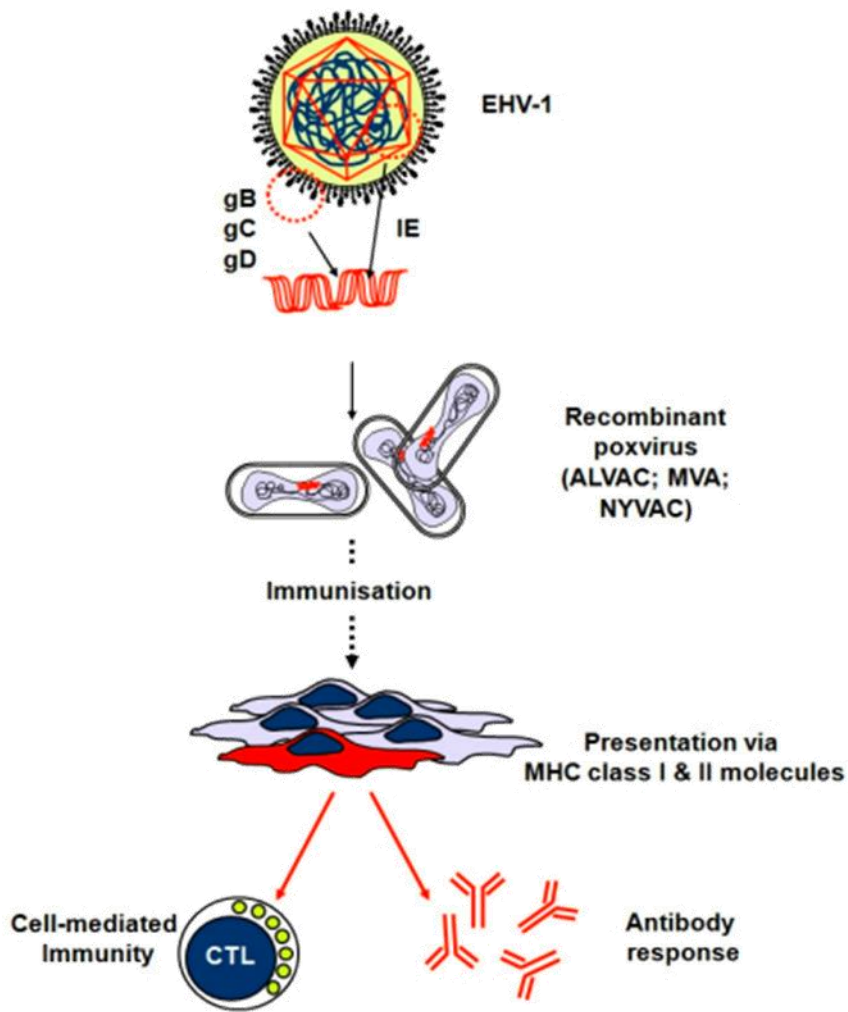


Figure 23 Vaccin contre l'EHV-1 à base de poxvirus recombinant. Sélection des protéines virales d'intérêt et insertion des gènes codant pour ces protéines dans le génome du poxvirus. Le poxvirus recombinant utilisé pour l'immunisation stimule les réponses immunitaires humorales et cellulaires. D'après Paillot et al., 2008.

e) L-particules

La réplication des alphaherpesvirus dans les cellules entraîne la formation de nouveaux virions infectieux (H-particules) ainsi que de particules légères également appelées L-particules. Les L-particules diffèrent des H-particules car elles sont seulement composées de protéines d'enveloppe et de tégument, elles ne contiennent pas de nucléocapside et ne présentent pas de caractère infectieux (Dargan et al., 1995). Les informations sur leur rôle biologique sont rares mais il semble qu'elles aient un rôle de leurre immunitaire en permettant le recrutement des anticorps et en préparant les cellules non infectées à une future infection

(Dargan and Subak-Sharpe, 1997). Une étude réalisée par spectrométrie de masse sur la caractérisation des L-particules d'HSV-1 des cellules dendritiques dérivées des monocytes a montré une quantité élevée de gD, deux fois supérieure à celle retrouvée dans les H-particules (Birzer et al., 2020a). La gD ayant pour rôle la pénétration dans les cellules et la propagation de cellule à cellule, la présence d'une quantité plus élevée de gD dans des particules non infectieuses semble être en faveur de la capacité de leurre des L-particules. De plus, la présence élevée de gD avec les L-particules provoque une interférence compétitive avec les H-particules infectieuses ce qui montre un puissant potentiel de mécanisme d'évasion immunitaire de la part des L-particules. Au vu de leurs propriétés, les L-particules ont été suggérées comme des bons candidats pour les vaccins. Leur rendement et facilité de production, comme il a été montré pour les L-particules de l'Herpèsvirus bovin 1 en font de bons candidats (Russell et al., 2018). Concernant l'EHV-1, une étude menée chez des souris immunisées avec des L-particules non répliquatives a montré le potentiel à induire une réponse en anticorps (Mohd-Azmi et al., 2002a). Une étude similaire a été conduite sur des poulains exempts de pathogène. Les L-particules d'EHV ont induit une réponse en anticorps fixant le complément. Un challenge expérimental réalisé sur ces mêmes poulains a montré une réduction des signes cliniques, de l'excrétion virale et de la virémie associée aux cellules (Mohd-Azmi et al., 2002b). Plus récemment, il a été montré que les L-particules produites par les cellules dendritiques dérivées de monocytes infectées par l'HSV-1 régulent à la baisse l'expression de la protéine co-stimulatrice CD83 et du récepteur de l'IL6. Cette constatation a été faite sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes venant d'être infectées et sur les cellules à proximité infectées par la suite (Birzer et al., 2020b). Entre autres, les L-particules semblent avoir un effet immunomodulateur sur les cellules dendritiques et suppriment leur capacité à stimuler les lymphocytes T (Birzer et al., 2020a). L'ensemble de ces données est en faveur d'un potentiel des L-particules en tant que vaccin, cependant aucun vaccin équin utilisant cette technologie n'est à ce jour commercialisé.

5.3. Vaccins vivants

5.3.1. Vaccins vivants contre la grippe équine

a) Vaccin vivant atténué

Les vaccins vivants atténués contre la grippe équine sont composés de l'EIV modifié afin qu'il perde son pouvoir infectieux tout en gardant sa capacité à induire une réponse immunitaire et donc une protection chez le cheval vacciné. En conséquence, l'antigène vaccinal

doit être incapable de se propager dans l'organisme du cheval ou d'être transmis aux chevaux contacts (Chambers et al., 2001). Le premier vaccin vivant atténué a été homologué en 2000 et est disponible aux États-Unis (Flu Avert® I.N.). Ce vaccin a été produit par passages successifs d'une souche d'EIV dans des œufs embryonnés en réduisant progressivement la température d'incubation à 26°C (Youngner et al., 2001). Les virus inclus dans ce type de vaccin sont modifiés de sorte qu'ils sont sensibles à la température. Ainsi, le virus atténué se réplique dans les voies respiratoires supérieures et non dans les voies respiratoires inférieures où la température est trop élevée (Paillot et al., 2006a). Une étude a montré l'absence d'effets secondaires lorsque le vaccin est administré par voie intranasale (vaccination seule ou vaccination et dose de rappel) chez des jeunes chevaux de moins de 2 ans. Ces chevaux n'ont présenté aucun signe de la maladie (Tabynov et al., 2014). Cependant, Il a été montré qu'un cheval récemment vacciné (jusqu'à 72h) avec un vaccin vivant atténué administré par voie intranasale et présentant des symptômes respiratoires pouvait être positif à l'EIV en qPCR (Harms, 2014). Les auteurs ont également montré la capacité de ce vaccin à générer une protection clinique et virologique à la suite d'une infection expérimentale chez les jeunes chevaux ayant reçu une dose unique (Tabynov et al., 2014). Alors que l'étude de Whitaker-Dowling, Youngner et Chambers (2001) montrait une protection d'une durée de 6 mois, Tabynov et al (2014) ont montré que les jeunes chevaux étaient protégés jusqu'à 1 an. De plus une vaccination avec deux doses à intervalle de 42 jours a permis d'empêcher l'excrétion virale pendant les 3 mois suivant l'immunisation de rappel (Whitaker-Dowling et al., 2001; Tabynov et al., 2014). Récemment, il a été montré qu'une dose unique d'un vaccin vivant atténué contre l'EIV inoculé 7 jours avant le sevrage des poulains a permis une bonne protection clinique contre l'infection naturelle par l'EHV-4. Les améliorations cliniques observées peuvent être associées à la protection croisée des vaccins vivants atténués contre l'EIV contre des agents respiratoires équin (Salco et al., 2020). Cependant cette étude possède plusieurs limites notamment les résultats dépendaient d'une infection naturelle plutôt que d'une infection expérimentale et bien que l'EHV-4 ait circulé il est possible que certains poulains n'aient pas été en contact avec l'EHV-4. Enfin, les vaccins à base de virus vivants atténués sont l'objet de nombreuses controverses en raison de leur taux de mutation élevée et du réassortiment potentiel du virus. En effet, un réassortiment avec une souche de terrain circulante est envisageable en raison de la nature segmentée du génome de l'EIV et ceci pourrait entraîner une perte de l'atténuation du virus modifié. La crainte de l'émergence d'un nouveau virus de la grippe hautement pathogène fait également partie des craintes actuelles. Cependant, chez l'Homme un vaccin vivant atténué contre la grippe est utilisé aux États-Unis, au Canada, en Russie, en Inde

et en Chine notamment (Rodriguez et al., 2019), et aucun réassortant n'a été rapporté malgré une vaccination à grande échelle.

b) Vaccin généré par génétique inverse

La génétique inverse permet de générer des virus recombinants artificiels à partir de plasmides d'ADN clonés. La technique la plus utilisée est celle utilisant des plasmides ambisens permettant l'expression de l'ARN viral à brin négatif et de l'ARNm à brin positif à partir du même plasmide dans des cellules transfectées. Une copie d'ADN complémentaire de tous les segments d'ARN viral est alors clonée puis les plasmides sont co-transfectés dans des co-cultures de cellules humaines 293 T et canines MDCK. Les plasmides recombinants générés sont ensuite amplifiés sur cellules MDCK ou sur cultures d'œufs de poules embryonnés (Oladunni et al., 2021). Il a été vu dans un chapitre précédant que la protéine NS1 jouait un rôle important au cours de la réplication virale. La NS1 de l'EIV est notamment capable de neutraliser la réponse IFN. Les vaccins générés par génétique inverse avec des EIV recombinants avec une modification de NS1 empêchent donc la réplication virale dans l'hôte. Une telle construction a été évaluée chez la souris (Quinlivan et al., 2005). Contrairement à ce qui a pu être observé dans d'autres espèces, notamment pour la grippe humaine, la longueur de la protéine NS1 n'est pas corrélée avec le niveau d'atténuation du virus. L'étude montre que les virus recombinants générés sont altérés dans leur capacité à inhiber la production d'IFN *in vitro* sur cellules MDCK et *in vivo* chez la souris (Quinlivan et al., 2005). Un autre modèle récemment mis au point est celui de la génération d'un vaccin vivant atténué contre l'EIV sensible à la température obtenu par reverse génétique (Rodriguez et al., 2018). Les auteurs ont montré la capacité de cette construction à induire une protection contre la grippe équine chez le cheval par une administration unique par voie intranasale. Hormis l'apparition d'un gonflement des ganglions lymphatiques sous-mandibulaires, les chevaux ont été protégés de l'apparition des signes cliniques lors d'une infection expérimentale. Le vaccin n'a pas empêché la sécrétion du virus mais le taux d'excrétion virale était inférieur chez les chevaux vaccinés. Plus récemment, un vaccin vivant atténué bivalent contre la grippe équine contenant 2 souches d'EIV (une souche Clade 1 et une souche Clade 2) a donné des résultats prometteurs quant à sa capacité à stimuler la réponse humorale (Blanco-Lobo et al., 2019). Les chevaux vaccinés ont présenté des scores cliniques, un taux et une durée d'excrétion plus faibles que les chevaux non vaccinés. Bien que l'immunité stérilisante n'ait pas été atteinte, les résultats de cette étude semblent prometteurs et il serait intéressant de poursuivre notamment pour connaître les doses

et les schémas de vaccination avec un tel vaccin. Le principal avantage de ce type de vaccins est la facilité de mise à jour des souches vaccinales (Rodriguez et al., 2018), ce qui est actuellement plus complexe avec les autres technologies vaccinales.

5.3.2. Vaccins vivants contre la rhinopneumonie

a) Vaccin vivant atténué

L'immunisation avec un virus EHV-1 vivant atténué ou modifié est très similaire à une infection naturelle. Deux voies d'administration semblent offrir une approche intéressante : la voie intranasale et la voie intramusculaire. Cependant, il reste une préoccupation quant au risque de retour à la virulence. On distingue deux principaux mutants : le mutant pour la thymidine kinase négative (TK-) et le mutant sensible à la température (Ts). La virulence et la capacité de ces mutants à établir une latence sont réduites (R. Paillot et al., 2008). Lors d'une infection expérimentale par l'EHV-1, avec le mutant TK-, des chevaux vaccinés ont présenté une réduction des signes cliniques et de l'excrétion virale (Cornick et al., 1990; Slater et al., 1993). L'immunisation intranasale de juments gestantes a permis de réduire les risques d'avortement lors d'une infection par l'EHV-1, 4 à 6 mois après immunisation avec le mutant Ts (Patel et al., 2003). Une étude similaire, chez des jeunes poulains immunisés avec le mutant Ts, a permis une protection partielle des animaux (i.e. réduction des signes cliniques, de l'excrétion du virus et de la virémie associée aux cellules) (Patel et al., 2004). Une observation similaire a été faite dans une étude utilisant un vaccin vivant atténué contenant une souche EHV-1 responsable d'avortement pour immuniser les chevaux (Van de Walle et al., 2010). L'infection expérimentale avec une souche EHV-1 hautement virulente et neuropathogène n'a causé aucun signe clinique neurologiques et aucune virémie n'a été détectée chez les chevaux vaccinés avec le vaccin à virus vivant atténué. Cependant dans le groupe de chevaux non vaccinés un seul cheval sur les quatre a présenté des signes cliniques neurologiques. Ces observations montrent les difficultés à reproduire l'EHM lors d'une expérimentation et de ce fait les conclusions de l'effet protecteur d'un vaccin vivant atténué dans le cas d'infection par une souche EHV-1 neuropathogène sont plus difficiles à établir. Toutes les études ne sont pas d'accord concernant les effets de ces vaccins sur les anticorps des muqueuses. Une étude sur ce sujet a d'abord montré que l'immunisation des chevaux avec des vaccins vivants atténués contre l'EHV-1 par voie intranasale ne stimulait pas des anticorps muqueux et donc ne permettait pas de prévenir l'excrétion virale (Breathnach et al., 2001). Il a été supposé que l'atténuation du

virus EHV-1 pouvait réduire l'immunogénicité du virus au niveau des muqueuses (Breathnach et al., 2001). Au contraire, plus récemment, il a été montré que les deux voies d'administration des vaccins vivant atténués intranasale et intramusculaire, permettaient d'augmenter les titres sériques en anticorps neutralisants. Plus précisément, l'administration intranasale permettrait une production d'anticorps IgA plus élevée dans les sécrétions nasales tandis que l'administration intramusculaire permettrait une sécrétion plus élevée des anticorps IgG_a et IgG_b (Bannai et al., 2023). Il a été montré que les deux voies d'administration permettaient de réduire la pyrexie et l'excrétion virale de manière similaire (Bannai et al., 2018). L'immunisation par l'alternance des voies intranasale et intramusculaire n'a pas montré de différence significative. En outre, la protection conférée par ce protocole vaccinal était similaire aux programmes conventionnels recommandés pour chacun des vaccins (Bannai et al., 2023). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les chevaux des deux études citées n'avaient pas le même âge (i.e. 5 à 7 mois pour l'étude de Breathnach et al, 2001 et 16 à 21 mois dans l'étude de Bannai et al, 2018) ou encore que les souches des deux études étaient différentes. La comparaison entre les vaccins vivants atténués et inactivés contre l'EHV-1 présente également des divergences selon les études. Les vaccins vivants atténués induisent généralement moins ou autant d'anticorps neutralisants que les vaccins inactivés. Les excrétions virales au niveau du nasopharynx étaient plus faibles ou équivalentes d'une technologie vaccinale à l'autre (Goodman et al., 2006; Goehring et al., 2010; Spann et al., 2023). Plus récemment il a été montré qu'un vaccin vivant atténué fournissait des réponses en anticorps neutralisants plus importantes qu'un vaccin inactivé et une meilleure prévention des épizooties sur une période de 3 ans (Bannai et al., 2019). Une étude a montré que 3 injections de vaccin vivant atténué à 27 et 70 jours d'intervalle permettait une réduction des signes cliniques lorsque les chevaux sont infectés 24 jours après la dernière injection (Goodman et al., 2006; Goehring et al., 2010; Spann et al., 2023). Dans le cas des juments gestantes, il semble que deux injections de vaccin vivant atténué au 5^{ème} et 8^{ème} mois de gestation permettent d'obtenir des réponses humorales similaires à un vaccin inactivé tant en termes d'ampleur que de durée et le nombre d'avortements dû à EHV-1 a été réduit chez les juments vaccinées avec le vaccin à virus vivant atténué (Bresgen et al., 2012). Enfin, l'EHV-1 issu d'un vaccin vivant atténué a été détecté par PCR dans les sécrétions nasales chez la majorité des chevaux immunisés par voie intranasale pendant les 4 jours suivant l'injection (Spann et al., 2023). Cette caractéristique est importante à prendre en compte dans le cas de l'interprétation diagnostique de l'EHV-1 en cas d'épizootie, il est impératif dans ce cas de prendre en compte le calendrier vaccinal des chevaux.

5.4. Nouvelles approches vaccinales

Depuis la mise au point du premier vaccin par Edward Jenner en 1796, la vaccinologie n'a eu de cesse d'évoluer et offre actuellement un large panel de technologies. L'éventail de pathogènes contre lesquels il existe un vaccin s'accroît au cours du temps, cependant, l'apparition régulière de pathogènes émergents pousse les chercheurs à développer de nouvelles technologies vaccinales plus adaptées. L'étape la plus importante de ces dernières années en termes d'approche vaccinale est celle du développement et de la mise sur le marché des vaccins à ARNm suite à la survenue du SARS-Cov2 responsable de la pandémie COVID-19. La recherche sur les vaccins à ARNm ne date pas d'hier, en effet les recherches sur le potentiel thérapeutique de l'ARN remontent aux années 90. Une avancée qui a ouvert la voie au développement des vaccins ARNm est l'autorisation de mise sur le marché, dans l'espèce équine, d'un vaccin ADN contre le virus du Nil occidental également appelé West Nile Virus (WNV) (Barakat, 2020). Les vaccins ARNm ont un processus similaire mais la traduction en protéine se fait plus tôt suite à l'injection du vaccin car celui-ci est déjà prêt à être traduit (Gote et al., 2023). Les protéines antigéniques sont ensuite libérées à l'extérieur des cellules où elles déclencheront une puissante réponse immunitaire cellulaire et également humorale. La recherche pour la mise au point de vaccins ARNm dans le domaine vétérinaire est actuellement moins développée. Il n'existe que deux vaccins ARN autorisés : un vaccin porcin contre le coronavirus de la diarrhée épidermique porcine et chez la volaille contre l'influenza aviaire hautement pathogène (Dory and Jestin, 2021). Bien que cette technologie ne soit pas encore utilisée dans des vaccins équins, il serait intéressant de mener des recherches pour tester son efficacité.

Les vaccins vivants atténués à base d'iADN[®] ont été développés ces dernières années. Cette nouvelle technologie se distingue des vaccins ADN par le fait que les vaccins iADN[®] transcrivent l'ARN génomique complet du virus vaccinal vivant atténué et plus seulement celui d'une seule sous-unité antigénique (Pushko et al., 2016). L'ARN viral complet déclenche une répllication limitée du virus vivant atténué ce qui permet le déclenchement d'une réponse immunitaire proche d'une infection naturelle. Les vaccins iADN[®] ont la particularité de combiner une stabilité chimique et génétique ainsi que l'efficacité d'induction de réponse immunitaire engendrée par les vaccins vivants atténués (Pushko et al., 2016). Des études prometteuses ont été réalisées sur des vaccins contre le WNV ou le Virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV) utilisant la technologie iADN[®] (Pushko et al., 2016; Tretyakova et al., 2013).

Un vaccin inactivé contre l'EHV-1 a été étudié dans une formulation en poudre épidermique. La technique par poudre épidermique permet de délivrer des antigènes inactivés ou de l'ADN en utilisant un système d'administration sans aiguille directement dans l'épiderme. Une étude s'est intéressée à comparer l'effet d'un vaccin EHV-1 délivré sous forme de poudre épidermique à celui des vaccins classiques inactivés ou à ADN délivrés par injection intra-musculaire ou intra-nasale chez des souris. La protection contre l'EHV-1 conférée par le vaccin en poudre épidermique était similaire à celle induite par les autres vaccins (Kondo et al., 2004). Cependant au vu de la littérature la recherche sur ce type de vaccin chez le cheval ne semble pas avoir été poursuivie.

5.5. Problématique des faibles répondeurs et facteurs d'influences de la réponse vaccinale

Le type de vaccin est un facteur primordial dans la réussite de la mise en place d'une protection suite à la vaccination. Cependant, d'autres facteurs plus individuels entrent en jeu.

5.5.1. Faibles répondeurs

Certains chevaux ne sont pas aptes à développer une réponse immunitaire optimale à la suite d'une vaccination. Ces chevaux sont appelés faibles répondeurs, et bien que ce phénomène soit désormais admis il reste mal caractérisé. Les faibles répondeurs peuvent se caractériser par l'absence de réponse immunitaire suffisante pour développer une protection contre la maladie ou l'incapacité à maintenir une protection dans le temps. Au sein d'un troupeau, ces chevaux représentent un risque car leur faible ou absente protection peut être à l'origine d'épizooties. Les chevaux faibles répondeurs peuvent développer une forme sub-clinique de la maladie et passer inaperçus, l'excrétion virale participera alors à la propagation du virus. Une étude menée sur 66 poulains sevrés non vaccinés a permis de comparer leurs réponses en anticorps après une primo-vaccination avec cinq vaccins différents contre la grippe équine. Cette étude a montré que 43 poulains n'ont pas séroconverti après une primo-injection. Des faibles répondeurs ont été retrouvés dans tous les groupes de poulains vaccinés sauf dans le groupe ayant reçu le Duvaxyn IET Plus, la 2^{ème} injection a permis de réduire les faibles répondeurs de 7% et une 3^{ème} injection a permis la séroconversion de tous les poulains (Gildea et al., 2011b). En 2007, l'épizootie survenue en Australie a fait l'objet d'un rapport dans lequel l'hypothèse des faibles

répondeurs est avancée comme la cause possible du départ de la propagation rapide du virus aux sein de la population équine (Callinan, 2008). Une étude menée par Cullinane et al. (2014) sur l'efficacité de différents protocoles de primovaccinations a mis en évidence la présence de faibles répondeurs suite à la première injection dans différents groupes d'âges de 1 à 3 ans. En outre, le plus grand nombre de faibles répondeurs se trouvait chez les pur-sang âgés d'un an (Cullinane et al., 2014). Plus récemment, une étude visant à comprendre les faibles réponses à la primo vaccination contre l'EI a montré que l'âge et la présence d'anticorps d'origine maternelle avaient un rôle important dans l'établissement des niveaux d'anticorps lors d'une première immunisation avec un vaccin contre la grippe équine (Fougerolle et al., 2016). Ces différentes études soulignent l'importance des facteurs individuels ainsi que l'intérêt de surveiller les réponses immunitaires au sein des populations équines.

5.5.2. Facteurs liés à l'âge

Les mécanismes immunitaires chez les chevaux adultes et les poulains sont similaires, mais la réaction du système immunitaire des jeunes poulains face à une infection virale ou à la vaccination diffère de celle du cheval adulte. Le système immunitaire du poulain est immature, ses capacités sont donc plus faibles que celles d'un cheval adulte. A la naissance les poulains ne possèdent donc pas d'immunité adaptative et par conséquent ils sont très sensibles aux pathogènes respiratoires. Les poulains présentent des réponses en anticorps et en cellules T réduites par rapport aux chevaux adultes (Perkins and Wagner, 2015). Les poulains répondent mal aux préparations vaccinales qui sont formulées pour des chevaux adultes. Dès les premières heures de vie, le poulain qui ingère le colostrum bénéficie du transfert d'anticorps maternels. Le colostrum, riche en IgG4/7, ayant un rôle essentiel dans la protection contre les infections virales, les IgG1, 3, 5 et les IgA contribuent à protéger le poulain contre les pathogènes (Perkins and Wagner, 2015). L'évolution théorique des IgG chez le poulain au cours de sa première année de vie est présentée en figure 24. Des études se sont intéressées à la possibilité d'interférences des anticorps des poulains avec les anticorps maternels. Des poulains, dont les mères avaient été vaccinées contre la grippe, ont été vaccinés à leur tour avec 3 injections, et les résultats ont montré que 4 mois après la dernière injection les poulains n'avaient pas développé d'anticorps contre les souches H7N7 et H3N8 de l'EIV présentes dans le vaccin utilisé (Van Oirschot et al., 1991; Van Maanen et al., 1992; Wilson et al., 2001). Les niveaux d'anticorps des poulains étaient similaires à ceux de leur mère au moment de la naissance et les titres se sont maintenus pendant plusieurs mois (Van Oirschot et al., 1991). Après la disparition

des anticorps maternels certains poulains ont réagi au protocole de vaccination contre l'EIV. Les auteurs ont conclu que les poulains ne doivent être vaccinés contre la grippe équine que lorsque les anticorps maternels ont disparu (Van Maanen et al., 1992; Wilson et al., 2001). Wilson et al. (2001) ont montré qu'une vaccination des poulains à 6 mois engendrait une augmentation de la réponse en anticorps contre l'EIV (mesurée par test ELISA) mais qu'une vaccination plus précoce à 3 mois nécessitait plusieurs rappels avant d'observer une augmentation en anticorps (Wilson et al., 2001). Ces travaux ont été confirmés par l'étude de Fougerolle et al. (2019). Des poulains âgés de 1 à 3 mois vaccinés avec un vaccin vivant contre l'EHV-1 administré par voie intranasale ont été partiellement protégés lorsqu'ils ont été soumis à une infection expérimentale et ont présenté des excréctions virales et une virémie réduites malgré la présence d'anticorps maternels (Patel et al., 2004). Les anticorps maternels jouent un rôle important dans les premiers mois de vie du poulain. Les interférences qu'ils engendrent rendent cependant la protection du poulain par une vaccination trop précoce très compliquée. Cependant, l'interférence des anticorps maternels n'explique pas à elle seule les faibles réactivités des poulains au vaccin. Il est probable que les faibles réponses à la vaccination réalisée tôt dans la vie du poulain puissent être liées au développement encore immature du système immunitaire du poulain lui-même (Perkins and Wagner, 2015). La faible réactivité du système immunitaire du poulain à la vaccination est un élément important qui doit faire l'objet d'études plus approfondies.

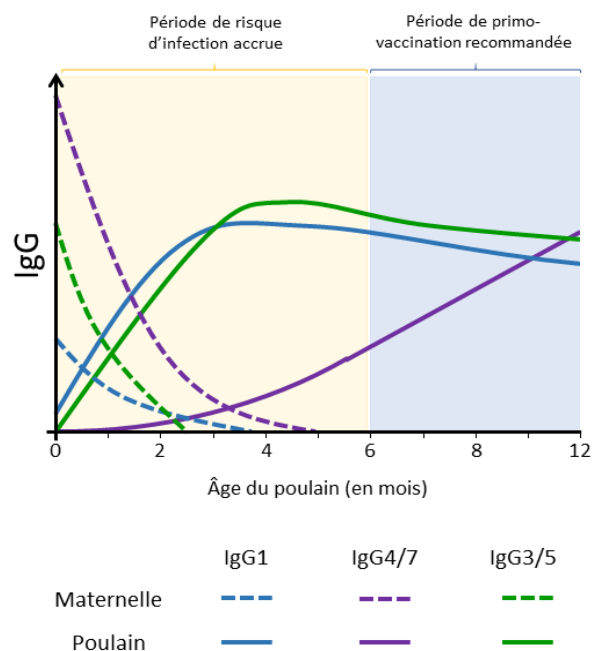


Figure 24 Évolution dans le sérum des IgGa, IgG(T), IgGb depuis la naissance à un an chez le poulain. (Schéma inspiré de Perkins and Wagner, 2015).

Les chevaux âgés de plus de 15 ans peuvent également présenter un système immunitaire sous-optimal. Un processus connu chez l'Homme et les animaux est l'immunosénescence. C'est un processus de dysfonctionnement de l'immunité au cours du vieillissement. Ce processus entraîne une sensibilité plus ou moins accrue aux agents pathogènes et diminue l'efficacité de la vaccination. Chez les chevaux, de manière générale, l'immunosénescence semble plus légère que chez d'autres espèces. Il a été montré que le nombre de lymphocytes CD4+, CD8+, Treg et B diminuait chez les chevaux âgés (McFarlane et al., 2001; Horohov et al., 2002; Adams et al., 2008; DeNotta and McFarlane, 2023). A l'inverse, le rapport CD4/CD8, un marqueur pro-inflammatoire, augmente chez les équidés âgés (McFarlane et al., 2001). Les chevaux âgés présentent des profils cytokiniques responsables d'inflammation, avec une augmentation de l'expression du TNF- α , de l'IL-6, de l'IL-1 β , de l'IL-8, de l'IFN- γ , de l'IL-15 et de l'IL-18 ((McFarlane et al., 2001; Horohov et al., 2002; Adams et al., 2008). Newton et al. ont montré que les chevaux âgés présentaient un risque plus élevé d'être infectés par l'EIV (Newton et al., 2006). Concernant l'EHV-1, Allen (2008) a montré qu'il existait une forte association entre l'évolution de signes cliniques lors d'infection à EHV-1 et l'âge des chevaux (>20 ans) (Allen, 2008). Des études ont montré que les chevaux âgés avaient tendance à moins bien répondre (Muirhead et al., 2008, 2010; Adams et al., 2011) et présentaient des titres en anticorps (IgG) plus faibles que des jeunes chevaux suite au processus de vaccination contre la grippe équine (Horohov et al., 1999). Cependant ces études ont été réalisées avec des vaccins inactivés. Une étude menée par Adams et al. a montré que les chevaux âgés vaccinés avec un vaccin contre l'EIV recombinant avec le virus canarypox déclenchait des réponses immunitaires permettant de protéger les chevaux contre les signes cliniques de la maladie suite à une infection expérimentale (Adams et al., 2011). Les chevaux âgés semblent répondre davantage avec un vaccin recombinant qu'avec un vaccin inactivé (Horohov et al., 1999 ; Adams et al., 2011). Les facteurs responsables de ce déclin n'ont pas encore été documentés et les études sur l'impact de l'âge des chevaux sur la réponse immunitaire aux infections et à la vaccination doivent être poursuivies.

5.6. Calendrier vaccinal et réglementation

L'État français ne rend, à ce jour, aucun vaccin équin obligatoire (en dehors des étalons utilisés en insémination artificielle) et la vaccination est l'affaire de la filière et des différents stud-books. La vaccination contre le tétanos, qui n'est pas une maladie contagieuse, n'est pas obligatoire cependant elle est vivement conseillée du fait de la gravité de la maladie. Les vaccins

contre la grippe équine et la rhinopneumonie sont soumis à obligation seulement dans certains cas de figure tels que toute participation à des manifestations équestres ou la reproduction (Figure 25).

Ainsi, pour les chevaux de course au galop, le règlement à suivre est celui du Code des courses au galop de France Galop (France Galop, 2023). La primo-vaccination avec des vaccins contre la grippe équine et la rhinopneumonie doit avoir lieu dès l'âge de 6 mois et avant la fin de l'année de naissance du poulain. Cette primo-vaccination est composée de trois injections : avant le 5 mai 2021, un intervalle de 21 à 92 jours devait être respecté entre les deux premières injections et la troisième injection devait être réalisée entre le 150 et 215 jours pour les deux vaccins (EIV et EHV-1-4) ; pour les primo-vaccinations réalisées après le 5 mai 2021, les délais ont été raccourcis (21 à 60 jours, et 120 à 180 jours). Puis les chevaux doivent recevoir obligatoirement un rappel tous les 6 mois et pas d'injection dans les 4 jours précédant la course.

Pour les trotteurs, le règlement à suivre est celui du Code des courses au trot. La primo-vaccination doit être effectuée dans les 12 mois suivant la naissance du poulain avec un protocole harmonisé avec celui des galopeurs à l'exception du rappel tous les 6 mois qui est recommandé et au maximum annuel.

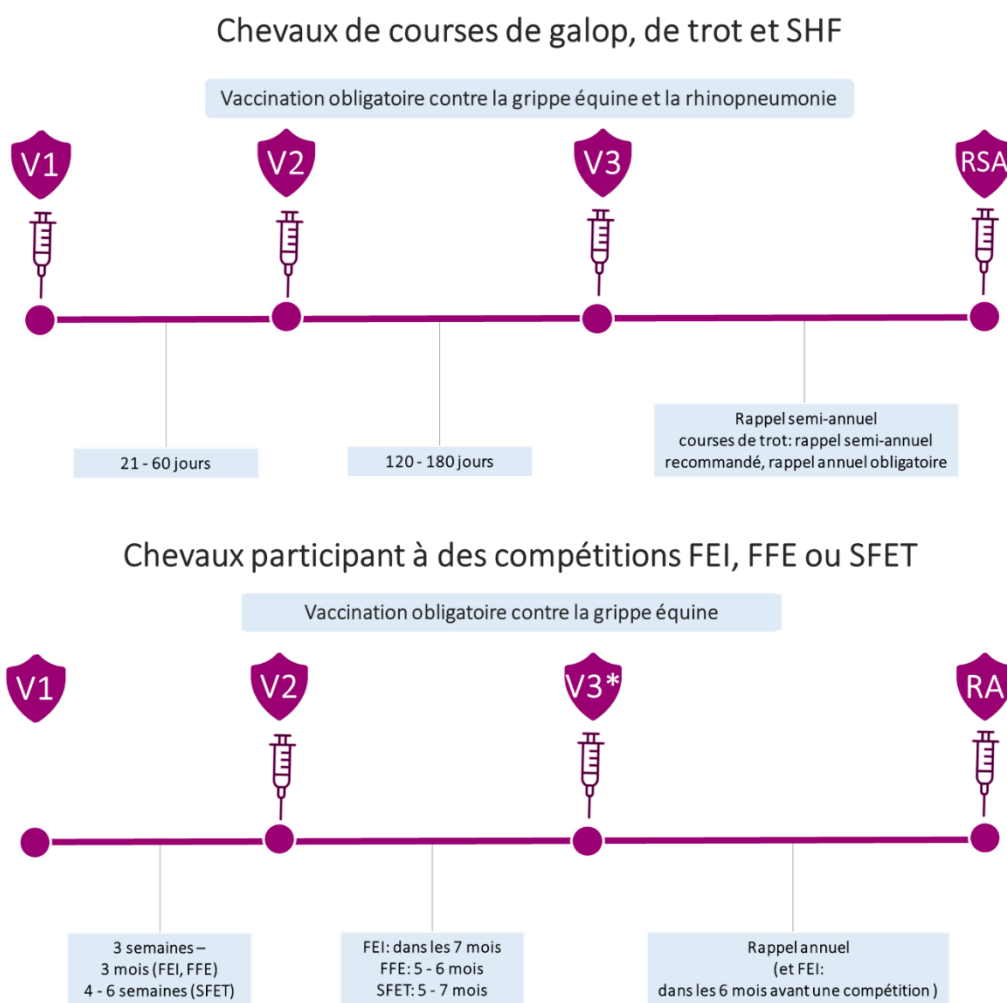
Les chevaux participant à des compétitions équestres internationales sous l'égide de la Fédération Équestre Internationale (FEI) ou nationales sous l'égide de la Fédération Française d'Équitation (FFE) sont soumis à l'obligation vaccinale contre la grippe équine uniquement. Pour les compétitions FEI, les chevaux doivent avoir reçu leur rappel annuel et doivent avoir été vaccinés au moins 7 jours avant la compétition et dans la période des 6 derniers mois qui précède celle-ci avec une tolérance de 21 jours. Pour les compétitions FFE, le rappel annuel est obligatoire, et, seule l'obligation de respecter un délai de 7 jours sans injection avant la compétition est exigée.

Les jeunes chevaux de sport qui participent aux épreuves d'élevage et de valorisation organisées par la Société Hippique Française (SHF) sont soumis à l'obligation de vaccination contre la Rhinopneumonie en plus de la Grippe. Depuis le 1er janvier 2022, la primo vaccination doit être réalisée par 3 injections espacées de 21 à 60 jours (vs 21 à 92 jours avant cette date) puis une 3^{ème} injection de primo-vaccination après 4 à 6 mois, puis un rappel tous les 6 mois est recommandé (avec un maximum d'un an).

Certains équidés reproducteurs sont concernés par l'obligation de vaccination contre la grippe et/ou la rhinopneumonie. Les étalons utilisés en insémination artificielle sont soumis à une obligation ministérielle de vaccination contre la grippe (AM 4 novembre 2010). Pour les autres étalons utilisés en monte naturelle et pour les juments les règles de vaccination sont fixées

par les règlements des Stud-books de chaque race.

Afin d'être conforme, les vaccinations doivent avoir été réalisées par un vétérinaire et faire l'objet d'un enregistrement sur le document d'identification du cheval avec apposition des vignettes, de la date, du cachet et de la signature du vétérinaire. Bien que la vaccination contre la rhinopneumonie ne soit pas obligatoire pour toutes les compétitions, les instances de référence telles que l'OMSA recommandent maintenant des rappels semi-annuels.



**V3 non obligatoire pour les chevaux sans rupture ultérieure du calendrier vaccinal et avec une primo-vaccination survenue avant 2005 (FEI), avant 2013 (FFE) ou avant 2019 (SFET).*

Figure 25 Différents protocoles de vaccination contre la grippe équine et la rhinopneumonie en fonction des différentes situations : courses de galop (France Galop), de trot (Le Trot), les compétitions organisées par la société hippique française (SHF), par la fédération internationale d'équitation (FEI), par la fédération française d'équitation (FFE) et les chevaux de la société française des équidés de travail (SFET). V1, V2 et V3 : première, deuxième et troisième injection du cycle de primo-vaccination, respectivement ; RA : rappel annuel ; RSA : rappel semi-annuel. (Selon la réglementation en Mai 2023).

6. Adjuvants et immunostimulants

6.1. Les adjuvants utilisés dans les vaccins équins : Review (Veterinary Research)

La vaccination étant l'une des stratégies les plus utilisées pour protéger les chevaux contre les agents pathogènes les vaccins doivent toujours faire l'objet d'un suivi de leur efficacité sur le terrain. Toutefois, les vaccins équins disponibles présentent parfois des limites, car ils n'offrent pas toujours une protection efficace à long terme et des injections de rappel sont souvent nécessaires. Les recherches doivent se poursuivre pour développer des vaccins efficaces contre les pathogènes équins émergents. Dans ce chapitre, présenté sous forme de revue, un inventaire des adjuvants approuvés pour les vaccins équins dans le monde entier a été dressé, et leur composition ainsi que leur mode d'action lorsqu'ils sont disponibles a été discuté. Une large gamme d'adjuvants est utilisée dans les vaccins commercialisés pour les chevaux, les principales familles étant les sels d'aluminium, les émulsions, les polymères, les saponines et les ISCOM. Les adjuvants vétérinaires déjà utilisés pour la vaccination chez d'autres espèces et qui sont actuellement évalués chez les chevaux afin d'améliorer la vaccination et de répondre au niveau de protection attendu contre les agents pathogènes dans l'industrie équine sont présentés. Enfin, les nouveaux adjuvants tels que les liposomes, les polymères d'acide polylactique, l'inuline, les nanoparticules de poly- ϵ -caprolactone et les co-polymères qui sont en cours de développement sont décrits dans ce chapitre. Dans un contexte de défiance vis-à-vis des vaccins, l'objectif de cette revue était d'aider les acteurs et chercheurs de la filière équine à comprendre la composition des vaccins équins commercialisés. Par ailleurs, cette revue fournit une liste d'adjuvants, approuvés ou au moins évalués chez le cheval, qui pourraient être utilisés seuls ou en combinaison pour développer de nouveaux vaccins.

REVIEW

Open Access

An inventory of adjuvants used for vaccination in horses: the past, the present and the future



Flora Carnet^{1,2}, Laure Perrin-Cocon³, Romain Paillot⁴, Vincent Lotteau³, Stéphane Pronost^{1,2*†} and Pierre-Olivier Vidalain^{3*†} 

Abstract

Vaccination is one of the most widely used strategies to protect horses against pathogens. However, available equine vaccines often have limitations, as they do not always provide effective, long-term protection and booster injections are often required. In addition, research efforts are needed to develop effective vaccines against emerging equine pathogens. In this review, we provide an inventory of approved adjuvants for equine vaccines worldwide, and discuss their composition and mode of action when available. A wide range of adjuvants are used in marketed vaccines for horses, the main families being aluminium salts, emulsions, polymers, saponins and ISCOMs. We also present veterinary adjuvants that are already used for vaccination in other species and are currently evaluated in horses to improve equine vaccination and to meet the expected level of protection against pathogens in the equine industry. Finally, we discuss new adjuvants such as liposomes, polylactic acid polymers, inulin, poly-ε-caprolactone nanoparticles and co-polymers that are in development. Our objective is to help professionals in the horse industry understand the composition of marketed equine vaccines in a context of mistrust towards vaccines. Besides, this review provides researchers with a list of adjuvants, either approved or at least evaluated in horses, that could be used either alone or in combination to develop new vaccines.

Keywords Adjuvants, vaccines, equine, horse, aluminium salt, emulsion, saponin, ISCOM, carbomer, immunostimulant

[†]Stéphane Pronost and Pierre-Olivier Vidalain have contributed equally to this work

Handling editor: Marie Galloux

*Correspondence:

Stéphane Pronost

stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr

Pierre-Olivier Vidalain

pierre-olivier.vidalain@inserm.fr

¹ LABÉO, 14280 Saint-Contest, France

² BIOTARGEN, Normandie University, UNICAEN, 14280 Saint-Contest, France

³ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 21 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France

⁴ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, UK

Table of Contents

- 1 Introduction
 - 2 Role of vaccine adjuvants in the induction of the immune response
 - 3 Families of adjuvants in equine vaccine
 - 3.1 Mineral salts
 - 3.2 Emulsions
 - 3.3 Polymers
 - 3.4 Saponins
 - 3.5 Immunostimulating complexes (ISCOMs)
 - 4 Adjuvants under study and perspectives
 - 5 Conclusion
- References



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

1 Introduction

In both humans and animals, vaccines have greatly reduced the morbidity and mortality associated to infectious diseases. Horses are no exception and vaccination is widely used to prevent the spread of equine pathogens. In line with the One Health initiative, the proper vaccination of horse populations also aims at preventing zoonotic events and the potential spread of horse pathogens to humans. The equine industry (sport, leisure and breeding) is constantly growing. In recent decades, the ability to move horses from one country or continent to another has been facilitated [1]. These movements, often driven by international events involving horses from different countries, favour the transmission of infectious diseases and regularly lead to major epidemics. For example, in 2007, an epizootic of viral arteritis occurred in France [2] and outbreaks of equine influenza (EI) have affected Australia in 2007, Europe in 2019 and also Asia and America [3–5]. In 2021, a major epizootic of rhinopneumonitis started in a major equestrian event in Valencia, Spain. The occurrence of these outbreaks reflects major defects in the protection of horses that were not, or not effectively, vaccinated. Reinforcements in vaccination policy and compliance with equine vaccine recommendations can improve vaccination coverage and horse protection. However, vaccination protocols differ from country to country and are not always properly validated. To ensure that equine vaccination remains effective and safe, it is important to regularly monitor vaccine efficacy and safety in order to adjust vaccine frequency, dosage and composition [6]. Several organisations, including the World Organisation for Animal Health and the Fédération Internationale Équestre, are now evaluating, and improving vaccination protocols to reduce the risk of epizootics. The development of new vaccines that are more effective or that protect against yet untargeted pathogens should also provide leverage for a better protection of horse populations against known and (re) emerging pathogens.

Currently, a large panel of equine vaccines have been approved and are commercially available. These vaccines rely on conventional technologies, i.e. inactivated or live-attenuated pathogens and subunit vaccines [7]. The latter are composed of purified antigenic parts of the infectious agent, especially proteins or peptides, that need to be combined with adjuvants to induce an effective adaptive immune response against this antigen. Indeed, in contrast to complete pathogens, purified antigens do not deliver efficient activation signals to antigen presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DCs) that are central actors of the immune system to prime naive T cells and orient the adaptive immune response. By definition, adjuvants are substances that aim at increasing the amplitude,

the efficacy and the persistence of the immune response induced by a vaccine to achieve long-lasting protection against all forms of an infectious disease [8]. There are different ways of classifying adjuvants based on their origin and chemical composition, their mode of action and the type of immune response they induce. This can be challenging because adjuvants are often composed of several molecules with different properties that are assembled into complexes playing multiple functions.

In a context of mistrust towards vaccines, it is important to help professionals of the equine industry understand the composition of marketed equine vaccines and the role played by adjuvants. It is also important to provide researchers with a list of adjuvants validated in horses that could be used to develop new vaccines. Indeed, adjuvants must be validated in the target species because of intrinsic specificities of the immune system. In other words, results obtained in mice or humans are not necessarily transposable to horses [8, 9]. Many reviews have been published on adjuvants used for vaccination of humans and other species but to our knowledge, there is no specific review on adjuvants found in equine vaccines. Here, we first give basic knowledge on the role of adjuvants in vaccines. We then provide an inventory of adjuvants that are used in approved equine vaccines or are under investigations. We classified these adjuvants according to their chemical composition. We also describe how they stimulate the immune system of horses when the information is available or, when data are missing, describe what is known in other species. This will provide professionals of the equine industry with sound information on adjuvants. This should also guide research to improve the performance of current equine vaccines and contribute to the development of vaccines against pathogens for which vaccines do not exist yet.

2 Role of vaccine adjuvants in the induction of the immune response

The concept of “adjuvant” was introduced in the 1920s by Gaston Ramon, a veterinarian at the Institut Pasteur, who first observed higher titers of specific antibodies in horses with abscesses at the injection site [10]. Later on, he demonstrated that substances causing a local inflammation also improved the production of antisera. The concept of adjuvant was born and few years later, Glenny and collaborators discovered the immunostimulatory effect of aluminium salts [11]. However, the mode of action of adjuvants remained obscure for decades and was qualified by Charles Janeway in 1989 as the “immunologist’s dirty little secret” [12]. This quote reflected the lack of knowledge about the mechanism of action of many known adjuvants. Huge progresses have been made since [13–15]. Even if grey zones persist, we now understand

much better the molecular mechanisms underneath the adjuvant effect. There are many equine vaccines available to combat various viruses and bacteria [16]. The vaccine strategy in place is generally effective but the occurrence of outbreaks sometimes highlights the limitations of vaccines and demonstrates the importance of research and development in this field. The effectiveness of vaccines depends on several factors. Among them, the choice of the adjuvant is one of the most important. Adjuvants are essential components of modern vaccines such as subunit vaccines and the properties needed differ depending on the antigen and the vaccine composition [17, 18].

Vaccines are first composed of one or more antigens, i.e. molecules that are specific to the pathogen against which a protection is sought. To be effective, vaccines have to stimulate the adaptive arm of the immune response, promoting the amplification and long-term survival of antigen-specific T lymphocytes, including both CD8+ cytotoxic T cells and CD4+ helper T cells (or Th cells), and B lymphocytes which secrete antigen-specific antibodies after differentiation into plasma cells. These antigen-specific cells can survive for months or years in the blood and lymphoid organs, which is the basis of immunological memory. It is primarily this process of adaptive immunity that vaccination seeks to induce [16]. The induction of an antigen-specific immune response requires the antigen and an immunostimulatory signal that is provided by the adjuvant. Its function is to activate the innate immune response which is a prerequisite to trigger the adaptive immune response. Stimulation of the innate immune response is mediated by a limited set of conserved molecular patterns that are shared across a large panel of microbes such as bacterial lipopolysaccharide (LPS) or are associated to cellular damages such as free DNA in the extracellular environment. These pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) are recognized by cellular receptors called pattern recognition receptors (PRRs) [15]. This includes but is not limited to Toll-like receptors (TLRs), RIG-like receptors (RLRs) and NOD-like receptors (NLRs). This explains that vaccines based on live-attenuated pathogens usually do not require the addition of an adjuvant because they intrinsically contain PAMPs that will activate the innate immune response.

Although all cells contribute to the innate immune response, a prominent role is played by immune cells which express a larger panel of PRRs such as neutrophils, Natural Killer cells, macrophages and DCs [15]. Once activated, all these cells produce membrane ligands and pro-inflammatory cytokines and chemokines that contribute to induce the adaptive immune response. Among these different populations, DCs play a specific role

as they are the only APCs capable of activating naïve T lymphocytes that never met their matching antigen. Furthermore, they are able to present peptides from internalized antigens not only on Major Histocompatibility Complex of class II (MHC-II) molecules for the activation of CD4+ Th cells but also on Major Histocompatibility Complex of class I (MHC-I) molecules, which is necessary to activate CD8+ cytotoxic T cells. Therefore, they are key to initiate adaptive immunity. A major role of adjuvants is to induce antigen presentation and functional maturation of DCs. To this goal, the nature of the adjuvant has a very important role in the type of adaptive response that is induced [15]. Depending on the innate immune response that is triggered by the adjuvant, vaccine can stimulate a Th1-oriented immune response inducing a cellular immunity and/or a Th2-oriented response mainly inducing a humoral response. A Th2-oriented immune response results in the production of antibodies opsonizing extracellular pathogens preventing entry into the cells and favouring their elimination. The Th1-oriented immune response promotes the elimination of infected cells by stimulating cytotoxic cells, especially CD8+ T lymphocytes. Specific populations of CD4+ T lymphocytes are associated to the Th1 vs Th2 profiles of the immune response, and can be distinguished by the secretion of specific cytokines such as Interferon gamma (IFN- γ)/Interleukin (IL-) 12 for the Th1 and IL-4/IL-5/IL-13 for the Th2.

Besides the induction of innate immunity to trigger and orient the adaptive immune response, other functions have been attributed to adjuvants [17]. This includes the protection and stabilization of the antigen at the injection site to ensure its persistence for a longer time. Adjuvants can also increase the uptake of antigens by APCs through the engagement of endocytosis receptors and therefore, facilitate antigen presentation and transport up to the lymphoid organs. Resident DCs at the injection site play an important role in the capture and transport of antigens to the draining lymph node. For example, mice deficient for NLRP10, a NLR protein expressed by DCs, have a profound defect in the induction of the adaptive immune response after Alum-adjuvanted immunization. In the absence of NLRP10, DCs are unable to transport antigens from the injection site to the draining lymph node whereas their other functions are maintained in the experimental autoimmune encephalomyelitis model [19]. Most importantly, adjuvants can reduce the amount of antigen required per vaccine dose as well as the frequency of injections to acquire and maintain protection [20]. Thus, adjuvants often play multiple roles in parallel [15, 17, 20], and the main mechanism responsible for their activity is sometimes controversial. Based on observations in different species, the roles that adjuvants

can play in equine vaccines are summarised in Figure 1. Since their discovery, research in adjuvant compounds has made considerable progress. However, only few molecules have been authorized for humans and veterinary medicine. Indeed, vaccines are usually delivered to healthy individuals as prophylaxis. As such, safety requirements are very high for vaccines and the adjuvants they contain. This makes the development of new adjuvant substances extremely costly when vaccines must be relatively cheap to reach the market, especially in veterinary medicine. In the field of equine vaccination, most of the adjuvants used are old molecules but newcomers have been recently approved and might change the current situation.

3 Families of adjuvants in equine vaccine

Five major families of adjuvants have been widely studied for equine vaccines: aluminium salts, emulsions, polymers, saponins and ImmunoStimulating COMplexes (ISCOMs). The different adjuvants found in commercially available equine vaccines and the targeted pathogens are listed in Additional file 1. These vaccines are mostly administered intramuscularly or sub-cutaneously, usually in the neck, rump or possibly the chest. Specific vaccines can be also administered by the sub-mucosal route or intranasally but these commercially available vaccines do not have an adjuvant and are therefore not discussed in this review (Equilis[®] Strep E, Flu Avert I.N.[®] and Pinnacle[®] I.N.).

3.1 Mineral salts

Aluminium salts were among the first adjuvants used and are still very common in vaccine preparations, especially

in human vaccines. They have demonstrated good efficacy in the history of vaccination to be used on a very large scale but this adjuvant has limitations (see below) and the toxicity of aluminium is now raising safety concerns [14]. Initially used in vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids, aluminium salts were later added to other vaccine preparations (pertussis, meningococcal, etc.). There are two forms of aluminium salts that can be found in vaccines: aluminium hydroxide and aluminium phosphate. Although similar, these two adjuvants have different physical and chemical properties and the choice of the aluminium adjuvant will have consequences on the effect of the vaccine [17]. Aluminium hydroxide, also known as aluminium oxyhydroxide, is the most common aluminium salt used in vaccines. It dissolves slowly at the injection site [21]. Aluminium phosphate or aluminium hydroxiphosphate dissolves much more rapidly in the interstitial tissues after injection. In order to operate and act as an adjuvant, the vaccine antigen must be adsorbed to aluminium salts. There are different physicochemical parameters that can be modulated to achieve the desired adsorption: the particle size profile, steric hindrance and surface charge that is adapted to match the size and the surface charge of the antigen [22, 23]. Antigenic adsorption can be achieved on the surface or within the aluminium salt aggregates. The parameters of adsorption are very important because the greater the adsorption capacity of the adjuvant, the more effective will be the vaccine and its response.

Immunologists have long considered that the adjuvant property of aluminium salts was linked to the progressive release of the antigen at the injection site [24]. This theory has since been the subject of controversy and it

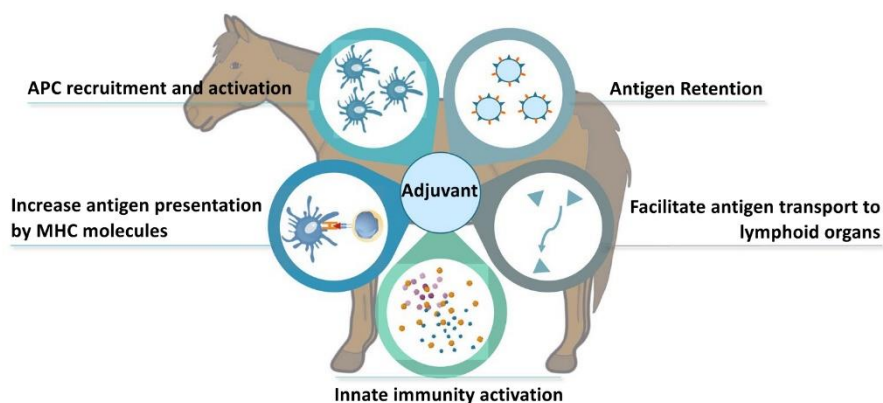


Figure 1 Role of adjuvants in the immune response of horses. Summary of the different functions of vaccine adjuvants. APC, Antigen Presenting Cells. MHC, Major Histocompatibility Complex. The figure was partially generated from Servier Medical Art, provided by Servier, under a Creative Commons Attribution 3.0 unported License.

has been found that excision of the injection site only few hours after vaccine administration does not interfere with the adjuvant effects of aluminium salts [24, 25]. This demonstrates that the transport of antigenic complexes to the draining lymph nodes where the adaptive immune response is triggered, is a rapid process [25]. Since the depot theory has been challenged, it has been shown that aluminium salts induce a local inflammation associated to the recruitment and activation of monocytes, macrophages and DCs that are competent for antigen capture, processing and T-cell presentation [25–27]. Endocytosis or phagocytosis of the aluminium particles in these APCs allow antigen to enter the endolysosomal vesicular network containing hydrolytic enzymes. Internalized antigens, first delivered to early endosomes, then move into late endosomes and finally into lysosomes. These endocytic compartments have increasing acidity facilitating the degradation of the endocytosed material [27] since it activates hydrolytic protease enzymes that cleave the protein antigen into small peptides. The fusion of phagosomes with endosomes first and then lysosomes leads to the formation of phagolysosomes, containing hydrolytic enzymes and acidified via vacuolar proton pumps [27]. To be presented by MHC-II molecules, antigens have thus to be processed in peptides of 13 to 18 amino acid residues long, mainly in endosomes, without being completely degraded. It is suspected that by stimulating reactive oxygen species (ROS) production and by inhibiting the acidification and maturation of phagosomes, aluminium salts could modulate the degradation of internalized material and thus favour antigen presentation [27]. After internalization, phagocytes and especially DCs ensure the transport of antigens to the draining lymph node [19]. It should be noted that thanks to its physico-chemical properties, aluminium cannot be degraded. It is this property that leads to the persistence of aluminium aggregates both at the injection site and in the draining lymph nodes [28]. This raised the question of the potential long-term toxicity of aluminium salts.

The mechanisms responsible for the inflammatory properties of aluminium salts and their ability to activate APCs are complex and controversial [24]. In 2008, the NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome was assigned a critical role to the inflammatory property of aluminium salts [29–31]. Upon activation, NLRP3 multimerization allows the recruitment of the Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (ASC) which in turn recruits and activates Caspase-1 [29]. This protease cleaves the pro-peptides of IL-1 β and IL-18 into mature pro-inflammatory cytokines that are secreted. Besides, the NLRP3 inflammasome can induce a lytic, proinflammatory cell death known as pyroptosis via the activation of

Gasdermin D [32]. How aluminium salts activate NLRP3 is still a matter of debate. Aluminium salts were reported to destabilize the membrane of phagolysosomes in macrophages, thus releasing their content into the cell cytosol and in particular cathepsin B that has been involved in inflammasome activation [33]. They also induce K⁺ efflux, Ca²⁺ release in the cytosol and ROS production by the mitochondria that all were found to be essential in NLRP3 activation [34–36]. However, the sequence and the specific contribution of these events in the inflammatory properties of aluminium salts is still debated. Furthermore, the actual contribution of the NLRP3 inflammasome in the adjuvant effect of aluminium salts has been challenged by several groups [37, 38]. Although there is a consensus on the role of NLRP3 and Caspase-1 in the induction of IL-1 β and IL-18 by aluminium salts, this mechanism does not seem essential to the induction of the adaptive, antigen-specific immune response [38]. Aside NLRP3 activation, it has been shown by atomic force microscopy that aluminium salts can bind the cellular membrane of DCs. This leads to lipid sorting and receptor aggregation that can activate these APCs [39]. A simpler theory is that aluminium salts induce necrotic cell death by non-specific binding and destabilization of cellular membranes considering that the local concentration at the injection site is very high (in the 60 mM range; [23]). This could lead to the leakage of cytosolic factors and extracellular release of DAMPs including Heat-Shock Protein 70 (HSP-70) and HMGB1 but also intracellular DNA [40–43]. These factors activate TLR2/4 and 9, respectively, stimulating innate immunity. However, the role of these receptors in the adjuvant properties of aluminium salts was excluded by several studies [42–44]. Necrotic cell death also releases adenosine triphosphate (ATP) that engages the purinoreceptor P2RX7 [45]. This induces K⁺ efflux and activates the NLRP3 inflammasome [34]. However, despite its implication in the secretion of inflammatory cytokines, extracellular ATP does not seem to play a key role in the adjuvant effect of aluminium salts [46]. Finally, the degradation of purine nucleotides in the extracellular compartment leads to the accumulation of uric acid at the injection site [47]. Crystalline uric acid activates the inflammasome, and this was involved in the adjuvant effect of aluminium salts *in vivo* [47]. All these factors could probably combine to activate APCs and prime the adaptive immune response. A recent study showed that the NLRP3 inflammasome is functional in the equine model and is activated by aluminium crystals and other well-characterized inducers in horse monocytes. However, results suggest that the potassium efflux pathway may be less important in horse cells than in other species for NLRP3 activation [48].

It has long been recognised that aluminium salts are very good inducers of the humoral response [49]. Indeed, this adjuvant promotes the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into effector lymphocytes with a Th2 profile supporting the production of antibodies and differentiation of memory B lymphocytes. In mice, this induces the production of immunoglobulins of isotypes G1 (IgG1) and E (IgE), but not efficiently the IgG2a subclass [50]. This was shown to be an issue in first generations of conventional inactivated EI vaccines adjuvanted with alum [51]. Therefore, aluminium salts are mostly used for vaccines that aim at inducing high levels of antibodies, which is an efficient response against extracellular pathogens or toxins (Additional file 1). In contrast, they do not efficiently stimulate the cytotoxic T cell response that is usually necessary to control intracellular pathogens [26, 49]. Thus, aluminium-based adjuvants supplemented with Glucopyranosyl Lipid A (GLA; a.k.a. MonoPhosphoryl Lipid A or MPL) have been developed (adjuvant AS04 from GSK) in order to bias the immune response towards a Th1 profile. Aluminium salts are not the most commonly used adjuvants in equine vaccines, unlike human vaccines. They represent less than 10% of the adjuvants present in equine vaccines. These adjuvants are mainly found in equine vaccines against tetanus [52], EI [7], rabies [53] and strangles, particularly in monovalent vaccines (Additional file 1).

3.2 Emulsions

An emulsion is a process in which two normally immiscible phases are dispersed in each other and stabilized by the addition of surfactants such as Span 85[®] or Tween 80[®]. Surfactants are either more lipophilic or hydrophilic depending on the type of emulsion, i.e. whether the dispersed droplets are water- or lipid-based [54]. There are three main types of emulsions: water-in-oil (W/O), oil-in-water (O/W) and water-in-oil-in-water (W/O/W). W/O adjuvants allow the gradual and sustained release of antigen at the injection site, the so-called depot effect, whereas O/W emulsions do not form a depot but quickly activate APCs [55, 56]. Emulsion adjuvants are frequently found in veterinary vaccines. In W/O emulsions, the antigen is found within droplets in aqueous solution and entrapped in a lipophilic phase [54]. The most studied adjuvants of this type are the complete and incomplete Freund's adjuvants. These emulsions contain paraffin oil and use mannide monooleate as an emulsifier. They are supplemented (complete) or not (incomplete) with desiccated mycobacteria to stimulate innate immunity. Complete Freund's adjuvant was rapidly abandoned (except in highly-regulated experimental settings) because of its high toxicity and painful reactions induced at the injection site, but incomplete Freund's adjuvant has been used

for a longer time. It induces a strong antibody response associated to a moderate CTL response. However, the induction of significant inflammatory reactions has prevented its further use in humans and pets [13, 14, 17]. Besides, this first generation of emulsion adjuvants is based on non-metabolizable mineral oils which are known to be carcinogenic [49]. Over the years, research was continued on W/O emulsions and new generations are based on purified mineral oils but also vegetable or animal oils such as squalene [57]. These metabolizable substances are safer and only induce a moderate local inflammation. Some Montanide-based Incomplete SEPPIC Adjuvants (ISA) are good example in this class. W/O adjuvants from the ISA family such as ISA 61 are used in veterinary vaccines such as foot and mouth disease (cattle, pigs), avian influenza, Newcastle disease (poultry) or for some farmed fish vaccines. They improve vaccine efficacy by increasing the strength and duration of immunity [15] by inducing local inflammation leading to the recruitment and activation of APCs [17]. Oil-based adjuvants are mainly known to stimulate antibody responses but some W/O type emulsions are also able to activate cytotoxic T lymphocytes [58]. ISA 50, another W/O adjuvant of the ISA family, has been tested for the experimental vaccination of horses but with moderate success [59]. These W/O adjuvants are not yet used in marketed equine vaccines.

Among oil-in-water (O/W) emulsions, the most representatives are MF59, AS03, AF03 and ISA 35 that were developed by Novartis, GSK, Sanofi Pasteur and SEPPIC, respectively [49]. These emulsions are microdroplets of oils such as squalene or α -tocopherol in water stabilised by surfactants such as Tween 80. The release of antigen occurs more rapidly than with W/O emulsions. The oil droplets will allow the antigen to be transported to the lymph nodes where antigen deposits will be presented by APCs [54]. These adjuvants have been used in human influenza vaccines against seasonal and pandemic viruses. MF59 induces cell-mediated responses with a Th2-biased profile [60]. Studies are conducted to supplement emulsion adjuvants with synthetic TLR4 agonists in order to bias the immune response towards a Th1 profile. After antigen release, a mild local inflammatory reaction leads to the secretion of TNF- α and IL-1 β cytokines as well as the differentiation of monocytes into DCs and the recruitment of various immune cells such as monocytes and neutrophils [54, 57]. An experiment revealed a significant increase in ATP release within minutes after MF59 injection. When coinjected with MF59, apyrase eliminates extracellular ATP and the adaptive immune response is blunted. These results provide evidence that the extracellular release of ATP is a key step in the adjuvant activity of MF59 [46]. As aforementioned, ATP can

activate the purinergic receptors P2RX7 which leads to K^+ efflux and NLRP3 activation. However, the adjuvant effect of MF59 does not rely on NLRP3 and Caspase-1, but rather requires the MyD88 adaptor that is shared by all TLRs (except TLR3) and IL-1R as well as the ASC adaptor that is involved in different types of inflammasomes [61, 62]. The adjuvant effect of AS03 was documented by Morel et al., and correlated to the stimulation of the innate immune system [63]. It was shown that AS03 transiently activates NF- κ B in the injected muscle and in the draining lymph nodes. The authors also observed an increase in cytokines and chemokines in the muscle and the draining lymph node between 6 and 48 h post-injection. Moreover, AS03 showed its capacity to induce the migration of DCs and monocytes [63, 64]. However, the signalling events accounting for its adjuvant effect have not been characterized yet. MF59, AS03 and AF03 are not used in horses. One such O/W adjuvant found in equine vaccines is MetaStim[®], a squalane-based emulsion including Pluronic poloxamer and Tween 80 as surfactants, which is commercialized by Zoetis. It is notably found in vaccines against equine influenza virus (EIV) and West Nile Virus (WNV) (Fluva Innovator and West-Nile Innovator, respectively). A study demonstrated that MetaStim[®] stimulated IFN γ and IL-12 expression that are characteristic of a Th1 immune response more potently than aluminium salts [65]. The O/W adjuvant ISA 35 is found in equine vaccines against EIV and equine herpesvirus (EHV), and showed a positive antibody response in a vaccination trial against African horse sickness [66].

W/O/W emulsions have been investigated but production remains more difficult and these emulsions are often unstable. Only a few adjuvants of this type are used in particular in bovine and avian vaccines [54]. ISA 206, a W/O/W adjuvant, has been tested in experimental horse vaccination with relative success and performed better than ISA 35 but side effects were reported [67].

Montanide[™] IMS is a series of adjuvants containing a mixture of microemulsions of varying sizes (10–500 nm; with or without an immunostimulant compound). Adjuvants tested in vaccine formulations against equine pathogens are IMS 3012, 2211 and 1313. These adjuvants have mainly been studied for vaccines against *Rhodococcus equi*. IMS 3012 is a water-based microemulsion [68]. Two studies show mild or no local reactions when IMS 3012 was used as an adjuvant for vaccination against *Rhodococcus equi* or to produce a polyvalent snake antivenom [67, 69, 70]. It has been shown that horses vaccinated against *Rhodococcus equi* adjuvanted with IMS 3012 showed an increase in opsonising capacity [68] and an increase in IgGa and IgGb indicative of Th1 responses, and an increase in IgGT indicative of Th2 responses

in adult horses [68–70]. IMS was able to significantly increase the expression of IFN γ , IL-2 and IL-10 mRNA in peripheral blood lymphocytes [69]. In the same study, the effects of three adjuvants (IMS 3012, IMS 2211 and ISA 35) were compared, showing that the highest production of both IgGa and IgGb against *Rhodococcus equi* was obtained with IMS 3012. Furthermore, it was shown that vaccination against *Rhodococcus equi* with IMS 3012 and administration of anti-*Rhodococcus equi* hyperimmune plasma to foals of pregnant mares protected the foals from infection in a contaminated environment [71]. In contrast, poor results were obtained with IMS 3012 in a vaccination trial against African horse sickness [66]. IMS 1313 has recently been studied for an autogenous vaccine against equine *Salmonella enterica* causing abortion attacks in mares. The vaccine adjuvanted with IMS 1313 was used in an equine *Salmonella enterica* abortion crisis in Italy as an emergency tool. Mares developed a high humoral response after the 2nd immunisation [72]. Finally, studies using IMS 3012 and 1313 adjuvants in vaccines against *Rhodococcus equi* and *Salmonella enterica*, respectively, suggested that vaccination has an ability to provide passive immunity to new-born foals [68, 72]. In order to confirm these results further studies are needed on the effects of maternal antibody interference and passive protection in foals [6]. In addition, further research into the mechanisms of action of these adjuvants would be helpful.

3.3 Polymers

Carbomers are hydrophilic acrylic acid polymers that are used to stabilize nano-emulsions. They have been used since the 1970s in veterinary vaccines, notably in vaccines against EIV [73, 74], EHV [75–77] and WNV. They are now found in a large number of commercialized equine vaccines (Additional file 1). Despite its widespread use in veterinary medicine and the presence of carbomer adjuvants in many veterinary vaccines, the number of studies on this adjuvant is surprisingly small. Its mode of action has not been elucidated yet, but it is known that carbomers are able to stimulate the innate immune response and improve antigen delivery. It has been shown that carbomer adjuvant enhance antibody production in vaccinated horses [73, 74]. A study also demonstrated the effect of carbomer-based adjuvants on the adaptive immune response to influenza vaccination in mice [78]. Analysis of the T-cell response showed elevated levels of both Th1 and Th2 cytokines [78]. It has been established that carbomer adjuvants enhance the immune responses to subunit and to inactivated but also to live-attenuated vaccines [79]. Carbomer activity is accompanied by a high secretion of pro-inflammatory cytokines and the early recruitment of leukocytes. A study showed that a

carbomer-based adjuvant could stimulate CD8⁺ T cells via the cross-presentation mechanism, i.e. the presentation on MHC-I molecules of peptides derived from internalized antigens [80]. Surprisingly, metabolic analyses revealed that carbomer-stimulated DCs did not exhibit the typical metabolism of activated DCs characterized by an induction of aerobic glycolysis, but showed a basal glycolytic activity combined to a low mitochondrial respiration. Although the carbomer-based adjuvant used in this study activated IL-1 β and IL-18 production, an experiment using DCs deficient in Caspase-1, NLRP3 and ASC showed that the cross-presentation ability of DCs was not impaired suggesting that inflammasome activation by the carbomer used is not necessary to enhance cross-presentation [80]. In contrast, the results indicate that by increasing lipid peroxidation and ROS production, this carbomer-based adjuvant facilitated antigen escape from endosomes to the cytosol allowing antigen degradation into peptides by the proteasome for MHC-I loading. Carbomers have also been shown to affect phagocytosis. A study conducted on carbopol showed that particles of this carbomer are mainly found in phagocytic cell populations. After phagocytosis, carbopol undergoes a conformational change in lysosomes triggering the production of ROS and thus inflammatory mechanisms [81]. Early induction of IFN γ is important in the adjuvant effect of carbomer and the induction of the cellular immune response. In addition, *in vitro* and *in vivo* analyses showed that carbomer adjuvants do not engage directly TLRs or other PRRs such as NOD1, NOD2 or RIG-I [81]. Due to their composition, carbomers have been studied in combination with other emulsion-type adjuvants such as MF59 (described previously). Strong but complementary immune responses were observed. A study analysed the efficacy of a combination of a carbomer (Carbopol 971P) and an emulsion (MF59) on the humoral responses to HIV-1 envelope glycoprotein (gp140) in the animal [82]. ELISAs performed on rabbit sera two weeks after the 2nd injection and up to 15 weeks after the 4th injection of the Carbopol 971P/MF59 combination showed higher antibody titers and higher avidity than sera from rabbits immunized with either MF59 or Carbopol 971P alone. Although the mechanism of action of this combination has not yet been investigated, the authors speculate that the ability of MF59 to enhance antigen presentation and APC recruitment combines with the ability of Carbopol 971P to activate B cells to induce efficient vaccination [82].

The EI vaccine was one of the first vaccines studied with carbomer adjuvant. In the 1994 study by Mumford et al., a comparison of two EI vaccines, one adjuvanted with aluminium salts and the other with carbomers, revealed higher antibody stimulation with the carbomers

and longer protection over time [73]. Overall, carbomers appear to be effective adjuvants, particularly in the veterinary field, but the mechanisms of action of this adjuvant remain to be elucidated. Havlogen[®] is a preparation of Carbopol 934P cross-linked with polyallylsucrose and an emulsifier, as described in U.S. Patent No. 3,919,411, 1975 [83]. Some equine vaccines use an adjuvant called Carbimmune[®]. This proprietary adjuvant is a carboxy-polymer-based substance, but we did not get additional information (personal communication).

Another adjuvant polymer is based on a highly stable gel of sodium polyacrylate microparticles [84]. A specific grade commercialized as PET GEL A has been tested with encouraging results for vaccination against *Rhodococcus equi* in foals and African horse sickness in adult horses [66, 70]. This adjuvant was also used in combination with vaccine grade Poly(I:C) (VacciGrade[™]; Invivo-gen) for experimental contraceptive vaccination in mares [85, 86].

3.4 Saponins

Saponins are complex mixtures of triterpenoids extracted from the bark of the South American tree *Quillaja saponaria*. It is an immunostimulant and is also found in vaccine adjuvants. Saponins have emulsifying properties and can be used as surfactants but is not the main component to stabilize emulsions because of its inflammatory properties and toxic effects. The active adjuvant compound is the crude plant extract called Quil A [14]. The adjuvant capabilities of Quil A in veterinary vaccines have been proven for different diseases: feline leukaemia vaccine, foot and mouth disease vaccine, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine [54]. This is the most studied of all saponins, but although it has powerful adjuvant properties, crude Quil A is too toxic to be used because of haemolytic activity and the induction of site reactions [87]. To avoid toxicity, Quil A has been fractionated, and the most studied fraction is QS-21 [88]. In recent years, research has heavily focused on saponins as adjuvants and less toxic forms are now widely used in veterinary vaccines [55]. Quil A-derived saponins, for example QS-21 combined with MPL and liposomes (adjuvant AS01, GSK) [89] or with emulsions (AS02) [49], or Quil A combined with cholesterol and phospholipids to form immunostimulating complexes (ISCOMs) have reduced toxicity and adjuvant properties (the ISCOM system will be described in detail in the next chapter). These adjuvants induce strong Th1 and Th2 immune responses via cytokine stimulation. It also activates CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and improves antigen presentation by APCs [90]. It has been hypothesised that saponins are able to interact with cholesterol to form pores in cell membranes, particularly in DCs, and thus release antigens in

cells cytosol. This allows the loading of antigenic peptides on MHC-I molecules and the priming of CTLs [90].

Warda et al. showed that an EI vaccine containing a saponin adjuvant maintained a protective antibody titer for up to 8 months post-vaccination [91]. A study by Hellman and colleagues showed the effect of a proprietary adjuvant: G3 (a combination of Quil A and cholesterol) on equine peripheral blood mononuclear cells. The G3 adjuvant appears to stimulate a Th1-oriented immune response by inducing pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10). This profile is sought for vaccines against pathogens where immune protection is predominantly dependent on cell-mediated immunity [92]. Encouraging results were obtained with G3 in a vaccination trial against African horse sickness [66]. How saponins stimulate the immune system is still poorly understood despite their widespread use. The induction of NLRP3 inflammasome has been well documented but the mechanisms involved remain to be elucidated [32].

3.5 Immunostimulating complexes (ISCOMs)

The properties of saponins are at the origin of the development of ISCOMs. This adjuvant first appeared in 1984 following a vaccination study using Quil A-based ISCOMs incorporating viral membrane proteins of parainfluenza virus 3, measles virus and rabies virus in the mouse model [93]. Saponins like Quil A have the ability to interact with membrane lipids. In the presence of cholesterol, phosphatidylcholine and Quil A at the right ratio, "open cage" structures specific to ISCOMs will form, allowing the incorporation of amphipathic antigens. Two types of ISCOMs can be distinguished: classic ISCOMs and ISCOM-Matrix whether the antigen is included during ISCOM assembly or added to preformed ISCOMs, respectively [7, 93, 94]. With these two systems, antigenic peptides are loaded with the same efficiency on both MHC-I and MHC-II molecules [95]. ISCOMs induce high antibody production over a long period. It also induces Th1 and Th2 responses as well as a potent CTL response and the synthesis of pro-inflammatory cytokines [7, 94]. Finally, they improve antigen presentation by APCs [94, 95].

ISCOMs induce efficiently the production of neutralising antibodies in sheep and cattle models against bovine viral diarrhoea [96]. A 2008 study by Paillot et al. on ponies vaccinated with an EI vaccine adjuvanted with ISCOMs showed the induction of a Th1-type immune response, with elevated levels of specific antibodies and increased percentage of specific T lymphocytes producing IFN γ [97]. A significant reduction in the severity of clinical signs and a decrease in viral shedding was observed in vaccinated horses after viral challenge [97–100]. In horses, ISCOMs are mainly found in monovalent

EI and *Streptococcus equi* vaccines, and EI-tetanus combined vaccines (Additional file 1). The EI ISCOM vaccine combined with tetanus toxoid has been shown to be protective in the long term (15 months) [101]. A study by Cullinane compared the immune responses elicited by three EIV-containing vaccines in young horses: an inactivated whole virus vaccine with ISCOMs; an inactivated whole virus vaccine with aluminium hydroxide; and a multivalent vaccine also containing EHV1-4 and reovirus types 1 and 3. The monovalent vaccine with aluminium hydroxide provided better haemagglutinin antibody titers against EIV than either the ISCOM-based vaccine or the multivalent vaccine in young horses tested after primary and first booster vaccination [102]. Another study compared three EI vaccines: a whole virus vaccine, a subunit vaccine with ISCOM Matrix and a recombinant canarypox vaccine. The whole virus vaccine showed the best antibody response. In contrast, the ISCOM-based vaccine showed the best increase in IL-4 induction [103]. All 3 vaccines similarly stimulated IFN- γ expression [103]. A significantly higher acute phase response (Serum Amyloid A), fibrinogen and white blood cell response was also observed with an inactivated whole virus vaccine adjuvanted with ISCOM compared to a recombinant vaccine [104]. Furthermore, it has been shown that an ISCOM-adjuvanted EI vaccine can be administered simultaneously with a Carbopol[®]-adjuvanted EHV without interfering with the antibody response [77]. ISCOM adjuvants have been studied in an EHV1 vaccine. High levels of neutralising antibodies were measured. Although it did not prevent infection upon challenge, there was a reduction in clinical signs, nasal excretion and cell associated viremia compared to the non-vaccinated control group [105]. ISCOMs were also tested in a vaccine against *Streptococcus equi* containing a mixture of *Streptococcus equi* antigens with an ISCOM-Matrix adjuvant, AbISCO. Although the adjuvant effect was not directly addressed, the study shows that the vaccine provided some level of protection against strangles in ponies as assessed by reduced clinical symptoms and bacterial shedding [106]. Two types of AbISCO-adjuvanted vaccines were combined in this study: an intramuscular vaccine containing AbiSCO-200[®] adjuvant and an intranasal vaccine containing AbiSCO-300[®] adjuvant. Finally, a safety study tested a vaccine formulation of an ISCOM-based EI vaccine. The study was conducted in 2 populations of horses considered susceptible: foals and pregnant mares. The authors did not observe significant local and systemic reactions, the few local reactions observed being considered as mild [98].

ISCOMs are used in commercial vaccines against EI, *Streptococcus equi* and *Clostridium tetani* (Additional file 1). We previously mentioned a study showing that

ISCOM-based EI vaccines induce lower antibody titers than those adjuvanted with aluminium hydroxide [102], but whether there is a significant difference in term of protection needs to be further investigated. It would be also interesting to conduct future research on the use of ISCOMs as an adjuvant for vaccination against other equine pathogens. Besides, further comparison studies of these vaccines are needed to test immune responses with different antigens and over a longer period of 6 months to 1 year. Vaccination trials are usually performed following primary or first and second booster vaccinations. It is necessary to conduct comparisons of vaccines on booster doses further away from the primary vaccination and after yearly boost to confirm the benefits of these adjuvants. Finally, research should focus on the combination of ISCOMs with other adjuvants as in the Equip FT vaccine against EIV and *Clostridium tetani* since such combinations have not been extensively explored.

4 Adjuvants under study and perspectives

Adjuvants have the important role of increasing the immunogenicity of antigens and improving the efficacy of vaccines. Advances in the understanding of the mechanisms of action of adjuvants allow the improvement of vaccines which includes the induction of an immune response adapted to the type of pathogen for which protection is sought. Several adjuvants are available in equine vaccines and new adjuvants are currently being studied in horses. Among the adjuvants under study, liposomes seem interesting for equine vaccination. Many parameters of liposomes offer a wide range of possibilities for their use as adjuvants. Size, lipid composition, surface charge and structure are all parameters that influence the adjuvant properties of liposomes [107]. Their adjuvant effect is largely related to the formation of deposits at the injection site facilitating antigen transport via APCs. Indeed, liposomes can deliver antigens to APCs for presentation on MHC-I and MHC-II molecules and also attract phagocytes to the injection site, which then migrate to the lymph nodes to finally interact with T cells. Liposomes have been shown to induce both Th1 and Th2 responses [107]. This dual capacity is a necessary and increasingly sought-after requirement for combating emerging diseases. Liposome-nucleic acid complexes are being studied for the development of equine vaccines against western equine encephalitis virus as they showed promising results in a mouse model. Mice that received the liposome-adjuvanted vaccine produced protective antibodies and survived to viral challenge [108]. Another type of adjuvant that is also being studied in horses is based on polymer particles of polylactic acid (PLA) or poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) [109–111]. These injectable biodegradable polymer particles represent an

interesting approach to control the release of vaccine antigens. PLAs have been shown to have the ability to stimulate humoral and cellular responses in a strangles vaccine mouse model. Mice vaccinated with a PLA-based vaccine containing an antigen of the strangles pathogen showed an increase in antigen-specific IgG, and IL-2 and IFN γ secretion by splenocytes [109, 110]. A protective response to a lethal challenge with Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) was demonstrated in mice immunized with a PLGA-encapsulated VEE vaccine [111].

In the field of equine vaccination, the development of new adjuvants should facilitate the development of vaccines against emerging horse diseases. A study compared 3 adjuvants coupled to the African Horse Sickness Virus (AHSV) rVP2 protein: saponin, Aluminium phosphate and ISA 50 (W/O) [59]. Saponin-adjuvanted antigen induced excellent protection against experimental infection with a lethal strain of AHSV, in comparison to immunisation with Alum and ISA 50 that induced only partial immunity [59]. This study confirms that the choice of adjuvant for a given antigen is a determining factor for the immunogenicity of a vaccine. A vaccine preparation of inactivated Japanese Encephalitis Virus (JEV) with an inulin-based adjuvant called ADVAX™, a natural polysaccharide of plant origin, has been studied in vivo, conferring increased neutralising antibodies in mice and horses and complete protection of mice against experimental JEV infection [112]. In a pre-clinical study in pregnant mares and young foals, this vaccine formulation induced a strong neutralising antibody response [113]. Further studies are needed to optimise JEV vaccine preparations and confirm the immunogenicity of the vaccine in a larger equine population and the resulting protection. The use of nanoparticulate adjuvant systems based on poly- ϵ -caprolactone encapsulating *Streptococcus equi* antigens were able to induce strong humoral (increased IgG), mucosal and Th1 immune responses in mice vaccinated intranasally [114]. This adjuvant holds promises for the control of strangles and it would be interesting to test it in the target species. Finally, polyanhydride nanoparticles and pentablock copolymer hydrogels are being developed as adjuvants against EIV. They were shown to preserve the structure of recombinant EIV hemagglutinin trimers and to provide sustained release of the antigen [115].

A summary of adjuvant classes available in equine vaccines or under investigation is presented in Figure 2. Interestingly, this highlights the fact that for several equine diseases only a fraction of available adjuvants has been tested for vaccination. Moreover, in most cases, adjuvant combinations (or “multiplexing”) to form more elaborated adjuvant complexes have not been tested yet.

	Equine Influenza virus	<i>Clostridium tetani</i>	<i>Streptococcus equi equi</i>	Equine herpesvirus	West Nile virus	Rabies virus	Equine Encephalitis	Equine arteritis virus	Rotavirus	African horse sickness	<i>Rhodococcus equi</i>
Polymers (including Carbomers)			[114]							[66]	[70]
Emulsions										[59, 66]	[68-71]
Mineral salt										[59]	
ISCOM				[105]							
Saponin (not ISCOM)	[91]									[59, 66]	

Figure 2 Matrix of adjuvants used in vaccines against equine pathogens. Lines indicate adjuvants that are used in available vaccines or tested in experimental trials. Columns correspond to major pathogens in horses. Combinations used in approved vaccines are highlighted in blue and experimental vaccines are in green.

5 Conclusion

The present review has established an inventory of the different adjuvants marketed or under study in equine vaccines. The results show that (i) a relatively large panel of adjuvants is used in marketed equine vaccines, (ii) several innovative adjuvants as well as adjuvants/antigens combinations are being studied in the equine model, (iii) the mode of action of vaccine adjuvants is insufficiently characterized in horses, leaving some grey areas in the understanding of their potential for protection. Besides, while the benefits of vaccines in the protection against serious diseases are undeniable, their long-term safety is the subject of controversies. As new vaccines and adjuvants are developed, it is important to continuously monitor side effects to ensure the safety of vaccines even after their authorization. The current challenge for vaccines, including adjuvants, is to provide protection against emerging diseases while ensuring optimal safety. To reach this goal, equine health research must constantly improve its performance, facilitate the recording of side effects in the field, and increase studies on the mechanisms of action of adjuvants in the equine model, as information obtained from other models are not always transposable. The regular occurrence of epizootics in the equine field is an argument in favour of continuous improvement of vaccines and adjuvants in order to increase animal protection and also to be able to develop new vaccines against emerging equine diseases.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01151-3>.

Additional file 1: List of commercial equine vaccines available on the world market and associated adjuvants. A first search was performed using Pubmed and Google Scholar with "equine", "commercial" and "vaccine" as keywords. In a second step, the list of companies commercializing equine vaccines was compiled using the vaccines listed in the publications found. Finally, the information on the commercialized vaccines was directly searched on the websites of the veterinary pharmaceutical companies in the available safety data sheet. The routes of administration are specified when they are intranasal (IN) or sub-mucosal. Vaccines for which the routes of administration are not specified are considered intramuscular or sub-cutaneous. This list may not be exhaustive.

Authors' contributions

All authors discussed the topics. FC, SP and POV wrote the paper. FC and POV produced an extensive bibliographic review on the work dedicated to adjuvants. LPC, VL and RP contributed to the revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) grant number 2022- 015 (VACADÉq Project). CEN-TAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational program 2014–2020.

Declarations

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 July 2022 Accepted: 27 January 2023

Published online: 02 March 2023

References

- Protecting the eu equine industry (2020). The European Task force for Brexit and EU Animal Health Law, a collaboration of the Key European Sport Horse and Thoroughbred horse racing and breeding industries, and formed by The International Sport Horse Confederation (IHSC)-constituted jointly by the Fédération Equestre Internationale (FEI) and the International Federation of Horse racing Authorities (IFHA). <https://inside.fei.org/system/files/PROTECTING%20THE%20EU%20EQUINE%20INDUSTRY.pdf>
- Pronost S, Pitel PH, Myszczak F, Legrand L, Marcillaud-Pitel C, Hamon M, Tapprest J, Balasuriya UBR, Freymuth F, Fortier G (2010) Description of the first recorded major occurrence of equine viral arteritis in France. *Equine Vet J* 42:713–720. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00109.x>
- Australia. Commission of Inquiry into the August 2007 Outbreak of Equine Influenza in Australia. & Callinan, Ian D. F. (2008). Equine influenza: the August 2007 outbreak in Australia. [Canberra]: Commonwealth of Australia, <https://nla.gov.au/nla.obj-961843962/view?partId=nla.obj-962289245#page/n3/mode/1up>
- Fougerolle S, Fortier C, Legrand L, Jourdan M, Marcillaud-Pitel C, Pronost S, Paillot R (2019) Success and limitation of Equine Influenza vaccination: the first incursion in a decade of a Florida Clade 1 Equine Influenza Virus that Shakes Protection Despite High Vaccine Coverage. *Vaccines* 7:174. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040174>
- Oladunni FS, Oseni SO, Martinez-Sobrido L, Chambers TM (2021) Equine influenza virus and vaccines. *Viruses* 13:1657. <https://doi.org/10.3390/v13081657>
- Desanti-Consoli H, Bouillon J, Chapuis RJJ (2022) Equids' Core vaccines guidelines in North America: considerations and prospective. *Vaccines* 10:398. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030398>
- Paillot R (2014) A systematic review of recent advances in equine influenza vaccination. *Vaccines (Basel)* 2:797–831. <https://doi.org/10.3390/vaccines2040797>
- Bordin AI, Cohen ND (2016) Types of vaccines. In: equine clinical immunology. Wiley, Hoboken, pp 279–288
- Karagianni AE, Lisowski ZM, Hume DA, Scott Pirie R (2021) The equine mononuclear phagocyte system: the relevance of the horse as a model for understanding human innate immunity. *Equine Vet J* 53:231–249. <https://doi.org/10.1111/evj.13341>
- Ramon G (1926) Procèdes pour accroître la production des antitoxins. *Ann Inst Pasteur* 40:1–10
- Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U (1926) Immunological notes. XVII–XXIV. *J Pathol Bacteriol* 29:31–40. <https://doi.org/10.1002/path.1700290106>
- Janeway CA (1989) Approaching the asymptote? evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54:1–13. <https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003>
- Spickler AR, Roth JA (2003) Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med* 17:273–281. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02448.x>
- Petrovsky N, Aguilar JC (2004) Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 82:488–496. <https://doi.org/10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x>
- Awate S, Babiuk L, Mutwiri G (2013) Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 4:114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00114>
- Barquero N, Gilkerson JR, Newton JR (2007) Evidence-based immunization in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 23:481–508. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2007.04.003>
- Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo JE, Choi J, Oh Y, Cho Y, Lee S (2017) Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch Pharm Res* 40:1238–1248. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0969-z>
- Vermout S, Denis M, Lossos B, Mignon B (2003) Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann Med Vet* 147:393–401 (in French)
- Eisenbarth SC, Williams A, Colegio OR, Signori E, Fazio VM (2012) NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. *Nature* 484:510–513. <https://doi.org/10.1038/nature11012>
- Lee S, Nguyen MT (2015) Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw* 15:51. <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>
- Hem SL (2002) Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine* 20:S40–43. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00170-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00170-6)
- Badran G, Angrand L, Masson J-D, Crépeaux G, David MO (2022) Physico-chemical properties of aluminum adjuvants in vaccines: Implications for toxicological evaluation. *Vaccine* 40:4881–4888. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.064>
- Shardlow E, Mold M, Exley C (2018) Unraveling the enigma: elucidating the relationship between the physicochemical properties of aluminium-based adjuvants and their immunological mechanisms of action. *Allergy Asthma Clin Immunol* 14:80. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0305-2>
- Wen Y, Shi Y (2016) Alum: an old dog with new tricks. *Emerg Microbes Infect* 5:e25. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.40>
- Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM (2012) Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J* 26:1272–1279. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184556>
- Schijns VEJC, Lavelle EC (2011) Trends in vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 10:539–550. <https://doi.org/10.1586/erv.11.21>
- Danielsson R, Eriksson H (2021) Aluminium adjuvants in vaccines – A way to modulate the immune response. *Semin Cell Dev Biol* 115:3–9. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.12.008>
- Crépeaux G, Eidi H, David M-O, Tzavara E, Giros B, Exley C, Curmi PA, Shaw CA, Gherardi RK, Cadusseau J (2015) Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections. *J Inorg Biochem* 152:199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.07.004>
- Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453:1122–1126. <https://doi.org/10.1038/nature06939>
- Li H, Willingham SB, Ting JP-Y, Re F (2008) Cutting Edge: Inflammasome activation by Alum and Alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 181:17–21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.17>
- Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J (2008) Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 181:3755–3759. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3755>
- Reinke S, Thakur A, Gartlan C, Bezbradica JS, Milicic A (2020) Inflammasome-mediated immunogenicity of clinical and experimental vaccine adjuvants. *Vaccines (Basel)* 8:554. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030554>
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Amstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9:847–856. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>
- Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G (2013) K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38:1142–1153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>
- Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, Hornig T (2012) Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:11282–11287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109>
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221–225. <https://doi.org/10.1038/nature09663>
- Franchi L, Núñez G (2008) The NLRP3 inflammasome is critical for alum-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 38:2085–2089. <https://doi.org/10.1002/eji.200838549>
- McKee AS, Munks MW, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, Marrack P (2009) Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol* 183:4403–4414. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900164>
- Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, Seamone ME, Vilaysane A, Mucsi AD, Fong Y, Prenner E, Ling CC, Tschopp J, Muruve DA, Amrein MW, Shi Y (2011) Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* 17:479–487. <https://doi.org/10.1038/nm.2306>

40. Wang Y, Rahman D, Lehner T (2012) A comparative study of stress-mediated immunological functions with the adjuvanticity of alum. *J Biol Chem* 287:17152–17160. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.347179>
41. Svensson A, Sandberg T, Siesjö P, Eriksson H (2017) Sequestering of damage-associated molecular patterns (DAMPs): a possible mechanism affecting the immune-stimulating properties of aluminium adjuvants. *Immunol Res* 65:1164–1175. <https://doi.org/10.1007/s12026-017-8972-5>
42. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ (2011) DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 17:996–1002. <https://doi.org/10.1038/nm.2403>
43. McKee AS, Burchill MA, Munks MW, Jin L, Kappler JW, Friedman RS, Jacobelli J, Marrack P (2013) Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E1122–1131. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300392110>
44. Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B, Nemazee D (2006) Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 314:1936–1938. <https://doi.org/10.1126/science.1135299>
45. Riteau N, Baron L, Villeret B, Guillou N, Savigny F, Ryffel B, Rassendren F, Le Bert M, Gombault A, Couillin I (2012) ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis* 3:e403. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.144>
46. Vono M, Taccone M, Caccin P, Gallotta M, Donvito G, Falzoni S, Palmieri E, Pallaoro M, Rappuoli R, Di Virgilio F, De Gregorio E, Montecucco C, Seubert A (2013) The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:21095–21100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319784110>
47. Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H, Lambrecht BN (2008) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205:869–882. <https://doi.org/10.1084/jem.20071087>
48. Ahn H, Kim J, Lee H, Lee GS (2020) Characterization of equine inflammasomes and their regulation. *Vet Res Commun* 44:51–59. <https://doi.org/10.1007/s11259-020-09772-1>
49. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM (2018) Correlates of adjuvanticity: a review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol* 39:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
50. Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Guillou N, Savigny F, Ryffel B, Rassendren F, Le Bert M, Gombault A, Couillin I (1996) In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 26:2062–2066. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260915>
51. Nelson KM, Schram BR, McGregor MW, Sheoran AS, Olsen CW, Lunn DP (1998) Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 16:1306–1313. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00009-7)
52. Liefman CE (1981) Active immunisation of horses against tetanus including the booster dose and its application. *Aust Vet J* 57:57–60. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1981.tb00444.x>
53. Harvey AM, Watson JL, Brault SA, Edman JM, Moore SM, Kass PH, Wilson WD (2016) Duration of serum antibody response to rabies vaccination in horses. *J Am Vet Med Assoc* 249:411–418. <https://doi.org/10.2460/javma.249.4.411>
54. Tizard IR (2021) Adjuvants and adjuvanticity. *Vaccines Vet* 75–86.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-68299-2.00016-2>
55. Bhat BA, Aadil S (2021) Adjuvants used in animal vaccines-their formulations and modes of action: an overview. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 4:492–506. <https://doi.org/10.47495/okufbed.852809>
56. Pedersen GK, Wörzner K, Andersen P, Christensen D (2020) Vaccine adjuvants differentially affect kinetics of antibody and germinal center responses. *Front Immunol* 11:579761. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579761>
57. Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR, Shi J (2018) Adjuvants for animal vaccines. *Viral Immunol* 31:11–22. <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0049>
58. Şahar EA, Can H, İz SG, Döşkaya AD, Kalantari-Dehaghi M, Devenci R, Gürüz AY, Döşkaya M (2020) Development of a hexavalent recombinant protein vaccine adjuvanted with Montanide ISA 50 V and determination of its protective efficacy against acute toxoplasmosis. *BMC Infect Dis* 20:493. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05220-2>
59. Scanlen M, Paweska JT, Verschoor JA, van Dijk AA (2002) The protective efficacy of a recombinant VP2-based African horsesickness subunit vaccine candidate is determined by adjuvant. *Vaccine* 20:1079–1088. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00445-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00445-5)
60. Knudsen NPH, Olsen A, Buonsanti C, Follmann F, Zhang Y, Coler RN, Fox CB, Meinke A, D'Oro U, Casini D, Bonci A, Billeskov R, De Gregorio E, Rappuoli R, Harandi AM, Andersen P, Agger EM (2016) Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Sci Rep* 6:19570. <https://doi.org/10.1038/srep19570>
61. Seubert A, Calabro S, Santini L, Galli B, Genovese A, Valentini S, Aprea S, Colaprico A, D'Oro U, Giuliani MM, Pallaoro M, Pizzo M, O'Hagan DT, Wack A, Rappuoli R, De Gregorio E (2011) Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11169–11174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107941108>
62. Ellebedy AH, Lupfer C, Ghoneim HE, DeBeauchamp J, Kanneganti TD, Webby RJ (2011) Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) in the adjuvant effect of MF59. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2927–2932. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012455108>
63. Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhaye S, Baras B, Jacob V, Planty C, Elouahabi A, Harvengt P, Carlsen H, Kielland A, Chomez P, Garçon N, Van Mechelen M (2011) Adjuvant system AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* 29:2461–2473. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.011>
64. Garçon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM (2012) Development and evaluation of AS03, an adjuvant system containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Exp Rev Vaccines* 11:349–366. <https://doi.org/10.1586/erv.11.192>
65. Horohov DW, Dunham J, Liu C, Betancourt A, Stewart JC, Page AE, Chambers TM (2015) Characterization of the in situ immunological responses to vaccine adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 164:24–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.12.015>
66. van Rijn PA, Maris-Veldhuis MA, Grobler M, Wright IM, Erasmus BJ, Maartens LH, Potgieter CA (2020) Safety and efficacy of inactivated African horse sickness (AHS) vaccine formulated with different adjuvants. *Vaccine* 38:7108–7117. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.08.072>
67. Waghmare A, Deopurkar RL, Salvi N, Khadilkar M, Kalollikar M, Gade SK (2009) Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (Emulsion based) along with incomplete Freund's adjuvant for hyperimmunization of equines used for production of polyvalent snake antivenom. *Vaccine* 27:1067–1072. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.103>
68. Cauchard J, Sevin C, Ballet J-J, Taouji S (2004) Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Vet Microbiol* 104:73–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.006>
69. Taouji S, Nomura I, Giguère S, Tomomitsu S, Kakuda T, Ganne V, Takai S (2004) Immunogenicity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*. *Vaccine* 22:1114–1123. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.006>
70. Cauchard S, Bertrand F, Barrier-Battut I, Jacquet S, Laurentie M, Barbey C, Laugier C, Deville S, Cauchard J (2014) Assessment of the safety and immunogenicity of *Rhodococcus equi*-secreted proteins combined with either a liquid nanoparticle (IMS 3012) or a polymeric (PET GEL A) water-based adjuvant in adult horses and foals—identification of promising new candidate antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 157:164–174. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.12.003>
71. Erganis O, Sayin Z, Hadimli HH, Sakmanoglu A, Pinarkaya Y, Ozdemir O, Maden M (2014) The effectiveness of anti-*R. equi* hyperimmune plasma against *R. equi* challenge in thoroughbred Arabian foals of mares

- vaccinated with *R. equi* vaccine. *Scie World J.* <https://doi.org/10.1155/2014/480732>
72. Stazi M, Pellegrini M, Rampacci E, Sforna M, Passamonti F, Di Paolo A, Severi G (2022) A new Montanide™ Seppic IMS1313-adjuvanted autogenous vaccine as a useful emergency tool to resolve a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar abortus equi abortion outbreak in mares. *Open Vet J* 12:303–307. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2022.v12i2.19>
 73. Mumford JA, Wilson H, Hannant D, Jessett DM (1994) Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. *Epidemiol Infect* 112:421–437. <https://doi.org/10.1017/s0950268800057848>
 74. Reemers S, Sonnemans D, Horspool L, van Bommel S, Cao Q, van de Zande S (2020) Determining equine influenza virus vaccine efficacy—the specific contribution of strain versus other vaccine attributes. *Vaccines* 8:501. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030501>
 75. Minke JM, Fischer L, Baudu P, Guigal PM, Sindle T, Mumford JA, Audonnet JC (2006) Use of DNA and recombinant canarypox viral (ALVAC) vectors for equine herpes virus vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 111:47–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.008>
 76. Gildea S, Sanchez Higgins MJ, Johnson G, Walsh C, Cullinane A (2016) Concurrent vaccination against equine influenza and equine herpesvirus – a practical approach. *Influenza Other Respir Viruses* 10:433–437. <https://doi.org/10.1111/irv.12396>
 77. Allkofer A, Garvey M, Ryan E, Lyons R, Ryan M, Lukaseviciute G, Walsh C, Venner M, Cullinane A (2021) Primary vaccination in foals: a comparison of the serological response to equine influenza and equine herpesvirus vaccines administered concurrently or 2 weeks apart. *Arch Virol* 166:571–579. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04846-6>
 78. Krashias G, Simon A-K, Wegmann F, Kok WL, Ho LP, Stevens D, Skehel J, Heeney JL, Moghaddam AE, Sattentau QJ (2010) Potent adaptive immune responses induced against HIV-1 gp140 and influenza virus HA by a polyanionic carbomer. *Vaccine* 28:2482–2489. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.046>
 79. Mair KH, Koinig H, Gerner W, Höhne A, Brettthauer J, Kroll JJ, Roof MB, Saalmüller A, Stadler K, Libanova R (2015) Carbopol improves the early cellular immune responses induced by the modified-live vaccine Ingelvac PRRS® MLV. *Vet Microbiol* 176:352–357. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.001>
 80. Lee W, Kingstad-Bakke B, Paulson B, Larsen A, Overmyer K, Marinaik CB, Dulli K, Toy R, Vogel G, Mueller KP, Tweed K, Walsh AJ, Russell J, Saha K, Reyes L, Skala MC, Sauer JD, Shayakhmetov DM, Coon J, Roy K, Suresh M (2021) Carbomer-based adjuvant elicits CD8 T-cell immunity by inducing a distinct metabolic state in cross-presenting dendritic cells. *PLoS Pathog* 17:e1009168. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009168>
 81. Gartlan KH, Krashias G, Wegmann F, Hillson WR, Scherer EM, Greenberg PD, Eisenbarth SC, Moghaddam AE, Sattentau QJ (2016) Sterile inflammation induced by Carbopol elicits robust adaptive immune responses in the absence of pathogen-associated molecular patterns. *Vaccine* 34:2188–2196. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.025>
 82. Dey AK, Burke B, Sun Y, Hartog K, Heeney JL, Montefiori D, Srivastava IK, Barnett SW (2012) Use of a polyanionic carbomer, Carbopol971P, in combination with MF59, improves antibody responses to HIV-1 envelope glycoprotein. *Vaccine* 30:2749–2759. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.027>
 83. Glass ME, Donahue SF (1975) Injectable adjuvant and compositions including such adjuvant. U.S. Patent 3, 919, 411.
 84. Parker R, Deville S, Dupuis L, Bertrand F, Aucouturier J (2009) Adjuvant formulation for veterinary vaccines: Montanide™ Gel safety profile. *Proc Vaccinol* 1:140–147. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2009.07.026>
 85. Nolan MB, Bertschinger HJ, Roth R, Crampton M, Martins IS, Fosgate GT, Stout TA, Schulman ML (2018) Ovarian function following immunonon-contraceptive vaccination of mares using native porcine and recombinant zona pellucida vaccines formulated with a non-Freund's adjuvant and anti-GnRH vaccines. *Theriogenology* 120:111–116. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.044>
 86. Nolan MB, Schulman ML, Botha AE, Human AM, Roth R, Crampton MC, Bertschinger HJ (2019) Serum antibody immunoreactivity and safety of native porcine and recombinant zona pellucida vaccines formulated with a non-Freund's adjuvant in horses. *Vaccine* 37:1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.053>
 87. Waite DC, Jacobson EW, Ennis FA, Edelman R, White B, Kammer R, Anderson C, Kensil CR (2001) Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. *Vaccine* 19:3957–3967. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00142-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00142-6)
 88. Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol* 146:431–437
 89. Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, Hergli N, Collignon C, Garçon N (2017) Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines* 16:55–63. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1213632>
 90. Wang P (2021) Natural and synthetic saponins as vaccine adjuvants. *Vaccines* 9:222. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030222>
 91. Warda F, Shosha E, Abdelraouf A, Anes Kalad M (2021) Immunogenicity of inactivated Equine Influenza (H3N8) virus vaccine with different adjuvants in equine. *Benha Vet Med J* 40:5–11. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2021.66190.1350>
 92. Hellman S, Hjertner B, Morein B, Fossum C (2018) The adjuvant G3 promotes a Th1 polarizing innate immune response in equine PBMC. *Vet Res* 49:108. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0602-2>
 93. Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A (1984) Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* 308:457–460. <https://doi.org/10.1038/308457a0>
 94. Sjölander A, Cox JC, Barr IG (1998) ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol* 64:713–723. <https://doi.org/10.1002/jlb.64.6.713>
 95. Villacres MC, Behboudi S, Nikkila T, Lovgren-Bengtsson K, Morein B (1998) Internalization of iscom-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction. *Cell Immunol* 185:30–38. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1278>
 96. Carlsson U, Alenius S, Sundquist B (1991) Protective effect of an ISCOM bovine virus diarrhoea virus (BVDV) vaccine against an experimental BVDV infection in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes. *Vaccine* 9:577–580. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90245-2](https://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90245-2)
 97. Paillot R, Grimmett H, Elton D, Daly JM (2008) Protection, systemic IFNγ, and antibody responses induced by an ISCOM-based vaccine against a recent equine influenza virus in its natural host. *Vet Res* 39:21. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007062>
 98. Crouch CF, Daly J, Hannant D, Wilkins J, Francis MJ (2004) Immune responses and protective efficacy in ponies immunised with an equine influenza ISCOM vaccine containing an 'American lineage' H3N8 virus. *Vaccine* 23:418–425. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.074>
 99. Crouch CF, Daly J, Henley W, Hannant D, Wilkins J, Francis MJ (2005) The use of a systemic prime/mucosal boost strategy with an equine influenza ISCOM vaccine to induce protective immunity in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 108:345–355. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.06.009>
 100. Heldens JGM, Pouwels HGW, Derks CGG, Van de Zande SM, Hoejmakers MJ (2009) The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine* 27:5530–5537. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.085>
 101. Mumford JA, Jessett DM, Rollinson EA, Hannant D, Draper ME (1994) Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Vet Rec* 134:158–162. <https://doi.org/10.1136/vr.134.7.158>
 102. Cullinane A, Weld J, Osborne M, Nelly M, McBride C, Walsh C (2001) Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *Vet J* 161:174–185. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0546>
 103. Gildea S, Quinlivan M, Murphy BA, Cullinane A (2013) Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings—A blinded comparison of commercially available vaccines. *Vaccine* 31:5216–5222. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.083>
 104. Andersen SA, Petersen HH, Ersbøll AK, Falk-Rønne J, Jacobsen S (2012) Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *Vet J* 191:199–202. <https://doi.org/10.1016/j.tvj.2011.01.019>

105. Hannant D, Jessett DM, O'Neill T, Dolby CA, Cook RF, Mumford JA (1993) Responses of ponies to equid herpesvirus-1 Iscom vaccination and challenge with virus of the homologous strain. *Res Vet Sci* 54:299–305. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90126-Z](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90126-Z)
106. Waller A, Flock M, Smith K, Robinson C, Mitchell Z, Karlström A, Lannergård J, Bergman R, Guss B, Flock JI (2007) Vaccination of horses against strangles using recombinant antigens from *Streptococcus equi*. *Vaccine* 25:3629–3635. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.060>
107. Wang N, Chen M, Wang T (2019) Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: from basics to clinical immunization. *J Control Release* 303:130–150. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.025>
108. Phillips AT, Schountz T, Toth AM, Rico AB, Jarvis DL, Powers AM, Olson KE (2014) Liposome-antigen-nucleic acid complexes protect mice from lethal challenge with western and eastern equine encephalitis viruses. *J Virol* 88:1771–1780. <https://doi.org/10.1128/JVI.02297-13>
109. Florindo HF, Pandit S, Gonçalves LMD, Alpar HO, Almeida AJ (2009) New approach on the development of a mucosal vaccine against strangles: systemic and mucosal immune responses in a mouse model. *Vaccine* 27:1230–1241. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.12.004>
110. Florindo HF, Pandit S, Gonçalves LMD, Videira M, Alpar O, Almeida AJ (2009) Antibody and cytokine-associated immune responses to *S. equi* antigens entrapped in PLA nanospheres. *Biomaterials* 30:5161–5169. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.045>
111. Greenway TE, Eldridge JH, Ludwig G, Staas JK, Smith JF, Gilley RM, Michalek SM (1998) Induction of protective immune responses against Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus aerosol challenge with microencapsulated VEE virus vaccine. *Vaccine* 16:1314–1323. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00008-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00008-5)
112. Lobigs M, Pavy M, Hall RA, Lobigs P, Cooper P, Komiya T, Toriniwa H, Petrovsky N (2010) An inactivated Vero cell-grown Japanese encephalitis vaccine formulated with Advax, a novel inulin-based adjuvant, induces protective neutralizing antibody against homologous and heterologous flaviviruses. *J Gen Virol* 91:1407–1417. <https://doi.org/10.1099/vir.0.019190-0>
113. Bielefeldt-Ohmann H, Prow NA, Wang W, Tan CS, Coyle M, Douma A, Hobson-Peters J, Kidd L, Hall RA, Petrovsky N (2014) Safety and immunogenicity of a delta inulin-adjuvanted inactivated Japanese encephalitis virus vaccine in pregnant mares and foals. *Vet Res* 45:130. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0130-7>
114. Florindo HF, Pandit S, Lacerda L, Gonçalves LM, Alpar HO, Almeida AJ (2009) The enhancement of the immune response against *S. equi* antigens through the intranasal administration of poly- ϵ -caprolactone-based nanoparticles. *Biomaterials* 30:879–891. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.035>
115. Siddoway AC, Verhoeven D, Ross KA, Wannemuehler MJ, Mallapragada SK, Narasimhan B (2022) Structural stability and antigenicity of universal equine H3N8 hemagglutinin trimer upon release from polyanhydride nanoparticles and pentablock copolymer hydrogels. *ACS Biomater Sci Eng* 8:2500–2507. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.2c00219>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Additional file 1. List of commercial equine vaccines available on the world market and associated adjuvants. A first search was performed using Pubmed and Google Scholar with "equine", "commercial" and "vaccine" as keywords. In a second step, the list of companies commercializing equine vaccines was compiled using the vaccines listed in the publications found. Finally, the information on the commercialized vaccines was directly searched on the websites of the veterinary pharmaceutical companies in the available safety data sheet. The routes of administration are specified when they are intranasal (I.N.) or sub-mucosal. Vaccines for which the routes of administration are not specified are considered intramuscular or sub-cutaneous. This list may not be exhaustive.

Commercial Vaccines	Company	Pathogens	Type of vaccine	Adjuvants
Monovalent vaccines				
CLOTEID 4®	Bioveta	<i>Clostridium tetani</i> (Tetanus)	Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide
Equilis® Te	Merck MSD animal health		Inactivated vaccine	ISCOM (Saponin, Cholesterol and Phosphatidylcholine)
Equip® T	Zoetis		Inactivated vaccine	Aluminium phosphate
Prestige® Tetanus	Merck MSD animal health		Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen®#
Tetanus Toxoid Vaccine®	Nisseiken Co. Ltd		Inactivated vaccine	Aluminium potassium sulfate
Tetanus Toxoid®	Zoetis		Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim®§
TETAPUR®	Merial**		Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide
BioEquin F®	Bioveta		Inactivated vaccine	Emulsion O/W: Montanide ISA 35 VG
CALVENZA® -03 EIV	Boehringer Ingelheim		Inactivated vaccine	Carbimmune®
Equilis® Prequenza	Merck MSD animal health		Inactivated vaccine	ISCOM (Saponin, Cholesterol and Phosphatidylcholine)
Equine Influenza Bivalent Vaccine	Nisseiken Co. Ltd	Equine influenza virus (EIV)	Inactivated vaccine	None
Equip® F	Zoetis		Inactivated vaccine	ISCOM (Quil A, Cholesterol, and Phosphatidylcholine)
Flu Avert I.N.®	Merck MSD animal health		Modified live viral vaccine	None
FLUEQUIN®	Bioveta		Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide

Fluvac Innovator [®]	Zoetis	Equine Herpesvirus (EHV)	Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim [®] §
PROTEQ-FLU [®]	Merial**		Vector based Canarypox vaccine	Carbomer
Vetera [®] EIV ^{XP}	Boehringer Ingelheim		Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
BioEquin H [®]	Bioveta		Inactivated vaccine	Emulsion O/W: Montanide ISA 35 VG
CALVENZA [®] EHV	Boehringer Ingelheim		Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Vetera EHV ^{XP} [®] 1/4	Boehringer Ingelheim		Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Equine Rhinopneumonitis Vaccine	Nisseiken Co. Ltd		Live virus vaccine	None
Equip [®] EHV1,4	Zoetis		Inactivated vaccine	Carbopol 934P
Pneumabort-K [®] + 1b *	Zoetis		Inactivated vaccine	Not documented
PNEUMEQUINE [®]	Merial**		Inactivated vaccine	Light paraffin oil Polyoxyethylene fatty acids Polyol fatty acid ether Oily excipient
Prestige [®] EHV 1&4	Merck MSD animal health		Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen [®] #
Prestige [®] Prodigy	Merck MSD animal health		Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen [®] #
Rhinomunc [®]	Boehringer Ingelheim		Modified Live Virus	None
Biocan R [®]	Bioveta		Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide
NOBIVAC [®] RAGE	Merck MSD animal health		Inactivated vaccine	Aluminium phosphate
Prestige [®] EquiRab	Merck MSD animal health		Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen [®] #
RABIGEN [®] Mono	VIRBAC	Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide	
RABISIN [®]	Merial**	Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide	
Rabvac [®] 3 *	Elanco Animal Health	Inactivated vaccine	Trade secret	
VERSIGUARD [®] Rabies	Zoetis	Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide	
Equip WNV	Zoetis	Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim [®] §	
Prestige [®] WNV	Merck MSD animal health	Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen [®] #	
PROTEQ [®] West Nile	Merial**	Vector based Canarypox vaccine	Carbomer	
Vetera [®] WNV	Boehringer Ingelheim	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]	
		West Nile Virus (WNV)		

West Nile Innovator [®]	Zoetis		Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim [®] §
Equip Artervac [®]	Zoetis		Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim [®] §
ARVAC [®]	Zoetis	Equine arteritis virus	Live-attenuated vaccine	None
Equilis [®] Strep E (sub-mucosal)	Merck MSD animal health		Live-attenuated vaccine	None
Pinnacle [®] I.N.	Zoetis		Live-attenuated vaccine	None
Strangvac [®]	Intervacc	<i>Streptococcus equi equi</i> (Strangles)	Recombinant vaccine	ISCOM (QS-21, cholesterol and Phosphatidylcholine)
Strepvax [®] II	Boehringer Ingelheim		killed bacteria	Aluminum hydroxide
Equine Rotavirus Disease Vaccine	Nisseiken Co. LtD		Inactivated vaccine	Aluminium chloride hexahydrate
Equip Rotavirus	Zoetis	Rotavirus	Inactivated vaccine	Emulsion: Squalane, Pluronic L-121, Tween 80
TRICHOEQUEN *	Bioveta	Equine trichophytosis	Inactivated vaccine	Not documented
Multivalent vaccines				
BioEquin FH [®]	Bioveta	EIV and EHV-1	Inactivated vaccine	Emulsion O/W: Montanide ISA 35 VG
BioEquin FT [®]	Bioveta	EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide
Calvenza [®] -03 EIV/EHV	Boehringer Ingelheim	EIV and EHV1-4	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Duvaxyn IE Plus T [®]	Elanco Animal Health	EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide Carbomer 934 P
Equi-Jec 6 *	Boehringer Ingelheim	WNV, Equine encephalomyelitis viruses (EEE ¹ , WEE ²), EIV, EHV1-4 and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Not documented
Equi-Jec 7 *	Boehringer Ingelheim	WNV, Equine encephalomyelitis viruses EEV (EEE, WEE, VEE ³), EIV, EHV1-4 and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Not documented

Equi-Jec WNV + EWT *	Boehringer Ingelheim	WNV, EEV (EEE, WEE), and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Not documented
Equilis® Prequenza Te	Merck MSD animal health	EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	ISCOM (Saponin, Cholesterol and Phosphatidylcholine)
Equiloid Innovator®	Zoetis	Equine EEV (EEE, WEE) and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Squalene
Equine Japanese Encephalitis, Equine Influenza (Bivalent), and Tetanus Vaccine	Nisseiken Co. Ltd	Japanese encephalitis virus, EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Aluminium potassium sulfate
Equip FT	Zoetis	EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	ISCOM Also contains the adjuvants Quil A and aluminium phosphate
Fluquin T	Bioveta	EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Aluminium hydroxide
Fluvac Innovator® 4	Zoetis	EIV, EEV (EEE and WEE) and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim®§
Fluvac Innovator® 5	Zoetis	EIV and EEV (EEE and WEE) Also protects against Equine EHV-1/4 and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim®§
Fluvac Innovator® 6	Zoetis	EIV, EEV (EEE, WEE and VEE) Also protects against EHV-1/4 and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim®§
Fluvac Innovator® EHV-4/1	Zoetis	EIV and EHV-1/4	Inactivated vaccine	Emulsion O/W: MetaStim®§
Japanese Encephalitis and Equine Getah Vaccine	Nisseiken Co. Ltd	Equine Japanese encephalitis virus and Getah virus	Inactivated vaccine	None
Prestige® 2	Merck MSD animal health	EIV and EVH1-4	Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen®#
Prestige® 3	Merck MSD animal health	EEV (EEE, WEE), and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen®#
Prestige® 3 + WNV	Merck MSD animal health	EEV (EEE, WEE), <i>Clostridium tetani</i> and WNV	Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen®#
Prestige® 4	Merck MSD animal health	EEV (EEE and WEE), EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen®#

Prestige [®] 5	Merck MSD animal health	EEV (EEE, WEE), EIV, EHV-1/4 and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen [®] #
Prestige [®] 5 + WNV	Merck MSD animal health	EIV and EEV (EEE, WEE) Also protects against EHV-1/4, <i>Clostridium tetani</i> and WNV	Inactivated vaccine	Carbomer Havlogen [®] #
PROTEQ-FLU [®] Tc	Merial**	EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Vector based Canarypox vaccine	Carbomer
Vetera [®] 2XP	Boehringer Ingelheim)	EHV1,4 and EIV	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Vetera [®] 4 XP + WNV	Boehringer Ingelheim	EEV (EEE and WEE), EIV, WNV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Vetera [®] 5 XP	Boehringer Ingelheim	EEV (EEE and WEE), EHV1,4, EIV and <i>Clostridium tetani</i>	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Vetera [®] EWT + WNV	Boehringer Ingelheim	EEV (EEE and WEE) Also protects against <i>Clostridium tetani</i> and WNV	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Vetera [®] Gold XP	Boehringer Ingelheim	EIV and EEV (EEE and WEE) Also protects against EHV-1/4, <i>Clostridium tetani</i> and WNV	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Vetera [®] Gold XP + VEE	Boehringer Ingelheim	EIV and EEV (EEE, WEE and VEE) Also protects against EHV-1/4, <i>Clostridium tetani</i> and WNV	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]
Vetera [®] VEWT + WNV	Boehringer Ingelheim	EEV (EEE, WEE and VEE) Also protects against <i>Clostridium tetani</i> and WNV	Inactivated vaccine	Carbimmune [®]

*No information relative to the adjuvant available in open access

**Boehringer Ingelheim group since 2017

¹EEE- Eastern Equine Encephalitis

²WEE- Western Equine Encephalitis

³VEE- Venezuelan Equine Encephalitis.

⁴O/W- Oil/Water

[#]Havlogen is a lipid emulsion stabilized using Carbopol 934P cross-linked with polyallylsucrose.

[§]Metastim includes squalane, Pluronic poloxamer and Tween 80

6.2. Molécule immunostimulante : l'iPPVO

6.2.1. Généralités

Le parapoxvirus ovis (PPVO) est un virus à ADN responsable de zoonoses qui affectent souvent les chèvres et moutons domestiques. Ce pathogène est connu pour être responsable de la production d'une variété de facteurs modulateurs qui sont maintenus même lorsque le virus subit un processus d'inactivation (Mayr and Mayr, 1999). Une souche du PPVO inactivée (iPPVO) : D1701 a d'abord été commercialisée sous le nom Baypamun® dans les années 90 par Bayer Animals Health, DE, puis plus récemment sous le nom de Zylexis® par Zoetis®. L'iPPVO est recommandé dans le traitement prophylactique et métaphylactique de maladies infectieuses chez plusieurs espèces animales. Il a en outre été montré que l'iPPVO active les cellules présentatrices d'antigènes permettant une régulation à la hausse de cytokines pro-inflammatoires. Ce composé est un bon candidat pour renforcer l'immunité avant des épisodes de stress tels que le sevrage ou le transport des animaux ou pendant une infection par un pathogène. Les effets immunostimulants de l'iPPVO sont étudiés depuis une trentaine d'années. L'effet immunostimulant de ce composé a fait l'objet de recherches *in vitro* et *in vivo* chez plusieurs espèces notamment les animaux d'élevage, les animaux de compagnie, les poissons ou encore *in vitro* sur cellules humaines. Quelques études sont également rapportées dans l'espèce équine.

6.2.2. Activités immunostimulantes dans différentes espèces

a) Chez le bovin

C'est en 1989, que la première étude sur l'iPPVO, Baypamun® au moment de l'étude, a démontré les premiers effets de cet immunostimulant chez le bovin (Strube et al., 1989). Le Baypamun® s'est révélé capable de prévenir les signes cliniques de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) chez 88% des bovins soumis à une infection expérimentale par le BHV-1 3 à 7 jours après le traitement (Strube et al., 1989). Quelques années plus tard Castrucci et al. (1995) ont réalisé une étude similaire incluant une infection expérimentale sur des veaux ayant été traités au Baypamun®. Il a été montré que si le Baypamun® est administré au moment de l'infection, celui-ci entraîne une réduction de la gravité des symptômes. Ce composé influence également le taux de réplication virale et le titre viral obtenu par seroneutralisation a été réduit de 2,5 à 4,5 log. Le Baypamun® a été à ce stade qualifié par les auteurs de Non Immune

Defense Mecanism (NIDM) (Castrucci et al., 1995). Ces études s'accordent à conclure que l'iPPVO permet principalement d'empêcher l'apparition des signes cliniques, de réduire l'excrétion virale, le taux de réplication virale et enfin la mortalité des veaux due à l'infection par l'herpèsvirus bovin de type 1 (Castrucci et al., 2000, 1995; Strube et al., 1989).

Enfin il a été démontré très récemment que l'iPPVO pouvait être utilisé en traitement prophylactique et thérapeutique pour lutter contre les mammites chez les vaches laitières (Demirlek et al., 2021). Dans cette étude, le lait de vache a été analysé afin de caractériser les bactéries présentes lors de mammites et des tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés. Les espèces bactériennes les plus retrouvées dans l'étude étaient *Staphylococcus spp.* et *E. coli*. L'iPPVO s'est montré capable de protéger les animaux contre l'apparition de mammite.

Si plusieurs expériences apportent des preuves d'effets immunostimulants contre plusieurs maladies infectieuses chez les bovins, en revanche le mécanisme d'action de l'iPPVO reste à élucider.

b) Chez les poissons

Deux études ont testé le potentiel immunostimulant de l'iPPVO chez les poissons. La première menée par Ortega et al. (1996) a montré que le Bayparmun® permettait une réduction significative de la furonculose chez la truite arc-en-ciel, une infection due à des bactéries du genre *Pseudomonas* et *Aeromonas* qui affectent fréquemment la peau des poissons. L'iPPVO pourrait être associé à une réduction significative du taux de mortalité, à la réduction des signes cliniques et de la présence de la bactérie dans le sang et les organes des poissons (Ortega et al., 1996). Une seconde étude chez le poisson chat argenté a montré que l'iPPVO pouvait réduire le taux de monocytes circulants, augmenter celui des hétérophiles, des granulocytes et des thrombocytes qui sont dans cette espèce les principales cellules de l'immunité innée assurant la liaison avec l'immunité acquise. L'iPPVO a donc un potentiel immunostimulant chez les poissons. C'est la première fois que l'iPPVO est associé au terme adjuvant dans la littérature (Pavan et al., 2016). L'utilisation de l'iPPVO chez les poissons pourrait donc constituer une méthode intéressante pour prévenir mais également traiter certaines infections.

c) Chez le porc

Les facteurs de stress sont connus pour provoquer des changements immunitaires

pouvant impacter de manière plus ou moins importante les organismes vivants. C'est le cas notamment chez le porc lors du sevrage du porcelet. Ce facteur de stress est à l'origine du syndrome diarrhéique post-sevrage et du syndrome de dépérissement du porc. Des complications dues à des pathogènes opportunistes peuvent alors survenir compromettant ainsi la survie du porcelet. L'iPPVO a été étudié *in vivo* chez le porcelet pour son rôle dans la lutte contre le syndrome diarrhéique post-sevrage et le syndrome de dépérissement du porc (Kyriakis et al., 1998). Il a été démontré que l'iPPVO avait amélioré les performances post-sevrages des porcelets traités comparativement à celles des porcelets non traités. Ce constat a été fait lorsque les porcelets avaient reçu une dose d'iPPVO en intramusculaire 2 jours avant le sevrage suivi d'une seconde dose le jour du sevrage soit à un âge d'environ 25 jours. Une étude *in vivo* sur des PBMC porcins a montré les capacités de l'iPPVO à activer et augmenter la prolifération des cellules T auxiliaires ainsi que la production et la libération d'IL2, d'IFN α et γ (Fachinger et al., 2000b, 2000a). Fachinger et al. ont montré que les souches de poxvirus de 3 genres différents (Orthopoxvirus, Avipoxvirus et Parapoxvirus) possédaient des capacités similaires à activer les cellules du système immunitaire inné et spécifique chez le porc *in vitro* et *in vivo* (Fachinger et al., 2000a). Cette même étude a permis d'identifier la principale cible des poxvirus inactivés chez le porc : les cellules T helper. Ces cellules présentaient un phénotype CD4+, CD25+ et CMHII+, et étaient la principale source de cytokines sécrétées. L'iPPVO a également démontré un effet contre la maladie d'Aujeszky qui est une maladie hautement contagieuse de type herpesvirus chez les porcs et sangliers. Les effets observés sont principalement la réduction ou la prévention des signes cliniques de la maladie tels que la réduction de la température, de l'incidence de la diarrhée et de la perte de poids (Biuk-Rudan et al., 2004). Cependant, des porcelets ayant reçu un traitement par iPPVO 4 jours avant un vaccin inactivé contre la maladie d'Aujeszky n'ont pas présenté une augmentation significative dans la proportion des cellules T CD4+ et CD8+ (Andrišić et al., 2022). Chez le porc ces différentes études s'accordent à dire que l'iPPVO est capable d'activer le système immunitaire inné chez les porcs *in vivo* et *in vitro* (Biuk-Rudan et al., 2004; Fachinger et al., 2000b, 2000a; Kyriakis et al., 1998).

d) Chez le chat

Les effets de l'iPPVO chez le chat sont plus controversés. Dans les années 90, le Baypamun® était le traitement le plus utilisé en Allemagne et dans divers pays européens pour traiter les infections des chats par le virus de la leucémie féline (feline leukemia virus-FeLV)

(Hartmann et al., 1998). Une étude menée par Hörber et Mayr en 1991 rapporte la guérison de 80 à 100 % des chats atteints de FeLV (Hörber and Mayr, 1991). Cependant une seconde étude indique que le Baypamun® n'a pas eu d'influence détectable sur l'infection par le FeLV et les résultats précédents n'ont pas pu être reproduits, laissant penser que l'iPPVO ne peut être recommandé pour le traitement d'une telle infection (Hartmann et al., 1998).

e) Chez les ovidés

De manière assez surprenante, l'iPPVO a fait l'objet de très peu d'étude chez les ovins. Une étude menée en 2000 par Winnicka et al. s'est intéressée à l'effet du Baypamun® sur les leucocytes de chèvre (Winnicka et al., 2000). L'iPPVO a renforcé la réponse immunitaire non spécifique chez la chèvre en particulier lors de cas d'immunosuppression. L'immunosuppression avait été provoquée volontairement par l'injection de Dexafort (principalement composé de dexaméthasone ayant des propriétés anti-inflammatoires). En phase initiale d'immunosuppression, l'iPPVO n'a pas montré d'efficacité. Cependant 10 jours après la prise du traitement il a permis d'augmenter significativement le nombre de cellules immunocompétentes : CD2+, CD4+ et CD8+.

f) Chez le chien

Chez le chien, 2 études présentent des données similaires et complémentaires sur l'effet de l'iPPVO sur la réponse immunitaire. La capacité immunostimulante sur le système immunitaire inné a fait l'objet d'une étude *in vitro* dans laquelle l'évaluation du burst oxydatif, la modulation de la phagocytose par les leucocytes, l'activation des lymphocytes T ainsi que la production d'anticorps spécifiques de l'iPPVO ont été étudiées. L'iPPVO a été capable de stimuler les mécanismes immunitaires phagocytaires et d'activation des lymphocytes T dans les leucocytes sanguins chez le chien (Schütze et al., 2009). L'augmentation de la production des anticorps spécifiques de l'iPPVO en réponse aux injections de l'immunostimulant chez le chien a eu un impact sur le burst oxydatif en permettant son augmentation (Schütze et al., 2010, 2009). L'étude va même plus loin dans le temps et présente des résultats collectés 4 ans après un traitement par le Zylexis®, montrant que le burst oxydatif était maintenu (Schütze et al., 2010).

g) *Chez la souris*

Le modèle murin représente un modèle d'étude *in vitro* et *in vivo* courant. Les recherches sur l'iPPVO ne font pas exception. Les réponses immunitaires liées à l'injection de l'iPPVO ont été étudiées chez la souris dans des modèles physiologiques et dans le cadre de recherche de traitements contre les cancers épithéliaux. Chez la souris, il semble que l'iPPVO soit un excellent stimulant des réponses interféron type I (IFN- α et - β) (Siegemund et al., 2009; Anziliero et al., 2014a; Von Buttlar et al., 2014), type II (IFN- γ) (Anziliero et al., 2014b, 2014a) et type III (Von Buttlar et al., 2014). Il a également pu être constaté que l'iPPVO augmentait significativement le niveau des cytokines pro-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* dans les 48 premières heures post-injection (Anziliero et al., 2014b, 2014a; Avci et al., 2016; Siegемund et al., 2009; von Buttlar et al., 2014). Les CMH I et II sont régulés à la hausse par les cellules dendritiques plasmacytoïdes dérivées de la moelle osseuse mais pas par les cellules dendritiques conventionnelles, suite à un traitement par iPPVO (Siegемund et al., 2009). Il a également été montré que l'iPPVO se retrouvait dans le compartiment endosomal et dans le cytosol des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse. Une étude de Siegемund et al. (2009) a montré que l'iPPVO provoquait, dans ces cellules, la libération d'IFN- α et - β par des voies indépendantes des TLR. En effet, la libération d'IFN a été constatée en absence du gène MyD88 ou de la protéine adaptatrice contenant le domaine TIR qui induit l'interféron (TRIF). Il semblerait que l'induction d'IFN soit dépendante du facteur de régulation de l'IFN 7 (IRF7) mais pas de l'IRF3. En revanche et contrairement aux IFNs, la libération du TNF- α induite par l'iPPVO et l'augmentation de l'expression du CMH-I et du CD86 nécessite la présence de MyD88, suggérant des mécanismes dépendants et indépendants des TLR (Siegемund et al., 2009). Von Buttlar et al. ont identifié le TLR9 endosomal comme principal récepteur de reconnaissance de l'iPPVO dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (von Buttlar et al., 2014). Un traitement par cet immunostimulant entraînerait également une activité bactéricide. En effet les sérums de souris traitées par iPPVO ont montré une activité bactéricide sur *Escherichia coli* dans les 1 à 3 jours qui suivent le traitement (Anziliero et al., 2014b). Une étude de Fiebig et al. a pu montrer pour la première fois dans des modèles de tumeurs transplantables, qu'un virus inactivé était capable d'induire *in vivo* des réponses biologiques entraînant une activité anti-tumorale *via* les cellules NK (Fiebig et al., 2011). L'effet est également visible lorsque l'individu est en condition d'immunodéficience sévère. Cette étude ne permet cependant pas de conclure sur les mécanismes d'action de l'iPPVO en tant que traitement anti-tumoral. Dans un modèle d'infection du foie par le virus de l'herpes simplex 1,

les injections d'iPPVO ont permis de protéger les souris contre une infection létale (Weber et al., 2003). De manière générale les études sur modèle murin s'accordent à dire, et ce comme pour de nombreuses autres espèces, que l'iPPVO est lié à l'activation d'un mécanisme immunitaire inné contribuant à un effet antiviral et antibactérien *in vivo* (Siegemund et al., 2009; Fiebig et al., 2011; Anziliero et al., 2014a, 2014b). Les cytokines liées au Th1, autorégulatrices et Th2 sont, entre autres, des facteurs importants de l'activité de l'iPPVO et sont en grande partie responsables de son effet immunostimulant (Anziliero et al., 2014a; Avci et al., 2016).

h) Chez l'Homme

L'effet de l'iPPVO a également été étudié chez l'Homme et des études ont montré un potentiel antiviral et immunostimulant. Une étude de Weber et al., a montré l'effet stimulateur de l'iPPVO sur les leucocytes du sang périphérique dans leur capacité à induire la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-1, IL-18, TNF- α , IL-6, IL-8) mais aussi d'IL-12, IL-4, IL-10 et de l'IFN- γ (Weber et al., 2003; Friebe et al., 2004). Il semble que l'iPPVO entraîne une cascade de cytokines favorisant la lutte contre certaines infections virales. Friebe et al. ont montré que l'activation des monocytes et CPA se faisait *via* la signalisation sur CD14 et un TLR, sans doute TLR4, lorsque l'iPPVO se retrouve au contact des cellules immunitaires (Friebe et al., 2004). S'en suit une cascade de réactions pro-inflammatoires puis anti-inflammatoires permettant une auto-régulation de la réponse. Paulsen et al. ont montré une approche thérapeutique avec l'iPPVO contre 2 pathogènes infectant le foie humain : le virus de l'hépatite B et celui de l'hépatite C (VHB et le VHC) (Paulsen et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont fait la démonstration de l'activité antivirale de l'iPPVO sur les virus VHB et VHC et également d'une activité anti-fibrotique dans un modèle de fibrose hépatique. L'incubation de cellules répliquatives du VHC avec des cellules immunitaires humaines traitées avec deux souches d'iPPVO (D1701 et NZ2) pendant 3 jours a permis une inhibition significative de la réplication du VHC *in vitro*. De même, des souris infectées par le VHB et traitées avec l'iPPVO (D1701 ou NZ2) ont présenté une réduction significative de l'infection virale (Paulsen et al., 2013). Récemment une étude s'est intéressée au potentiel anti-leucémique de l'iPPVO chez l'homme. Bien que des analyses plus approfondies soient nécessaires, l'iPPVO a pu induire une activation précoce (après 24 h d'incubation en présence d'iPPVO) des cellules T (CD8+) et altérer la différenciation des cellules T effectrices et de ce fait avoir des effets prometteurs en tant que thérapie potentielle contre la leucémie myéloïde chez l'homme (Ansprenger et al., 2018).

Depuis fin 2019 le SARS-CoV-2 a fait son apparition avec la pandémie de Covid-19.

La recherche de traitements et de vaccins pour stopper ce virus a conduit à tester de nombreuses molécules. Parmi les différents composés testés, une équipe s'est intéressée à l'effet de l'iPPVO (souche OV-SY17) sur la transmission aérienne du SARS-CoV-2. En effet, les petites particules ($< 5 \mu\text{m}$) restent plus longtemps dans l'air facilitant la propagation des particules virales et donc la transmission du virus (Morawska et al., 2009; Ehsanifar, 2021). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'iPPVO avait la capacité de modifier la distribution des tailles des particules aérosols excrétées chez des hamsters (modèle petit animal recommandé pour étudier le SARS-CoV-2). La modification de la taille des particules aérosols a bloqué la transmission virale par voie aérienne et a également accéléré la clairance virale à la suite d'une infection expérimentale avec une souche SARS-CoV-2 dans ce modèle (Cui et al., 2022).

6.2.3. Activités immunostimulantes chez le cheval

Du fait de sa commercialisation en tant qu'immunomodulateur chez différentes espèces animales dont les chevaux, l'iPPVO a fait l'objet de quelques études chez les équidés sur modèle cellulaire équin et sur animal.

In vitro, la caractérisation du profil cytokinique a mis en évidence la capacité de l'iPPVO à augmenter l'expression de l'IFN- γ et de l'IFN- β à des niveaux supérieurs à ceux observés avec la Concanavaleine A sur des cultures de PBMC équins (Horohov et al., 2008). Le traitement par l'iPPVO a montré sa capacité à entraîner une expression élevée et transitoire d'IFN- α et IFN- β et de manière plus modérée d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL10 dans les premières 48h post-traitement sur PBMC équins (Horohov et al., 2008; Hue et al., 2017). En revanche, l'expression de cytokines comme l'IL1- β et l'IL6 n'a pas été observée (Hue et al., 2017).

L'effet de l'iPPVO a été étudié sur des herpèsvirus de diverses espèces dont le cheval (Figure 26). Les différents effets de l'iPPVO lors d'une infection par les herpesvirus ont également fait l'objet d'une étude *in vitro*. Comparativement à la condition sans traitement, l'expression des cytokines IFN- α et IFN- β était plus précoce et plus forte lorsque les PBMC infectés par l'EHV-1 avaient été traités par l'iPPVO. L'expression des IFN- γ , TNF- α , IL-6 et IL-10 était plus modérée mais également supérieures en présence d'iPPVO (Hue et al., 2017). Sur un modèle de culture de PBMC équins, l'iPPVO n'a pas démontré d'effet sur la réplication virale d'EHV-1. Il est à noter que les réponses cytokiniques ne sont pas toujours homogènes et qu'il faut prendre en compte les effets liés à l'hôte qui peuvent entraîner des différences dans les réponses enregistrées. Mais les différents résultats montrent que l'iPPVO stimule globalement la production de certaines cytokines également dans le modèle équin. De manière

générale l'iPPVO est associé à une stimulation de la réponse inflammatoire. L'augmentation d'IFN- γ montre également la capacité de l'iPPVO à stimuler la réponse innée (Figure 27). Il y a cependant peu d'études et aucune récente n'a été réalisée avec l'iPPVO chez le cheval. *In vivo*, le traitement par l'iPPVO a induit l'augmentation de l'ARNm de l'IL-15 et l'IL-18 24h après une première injection (Horohov et al., 2008).

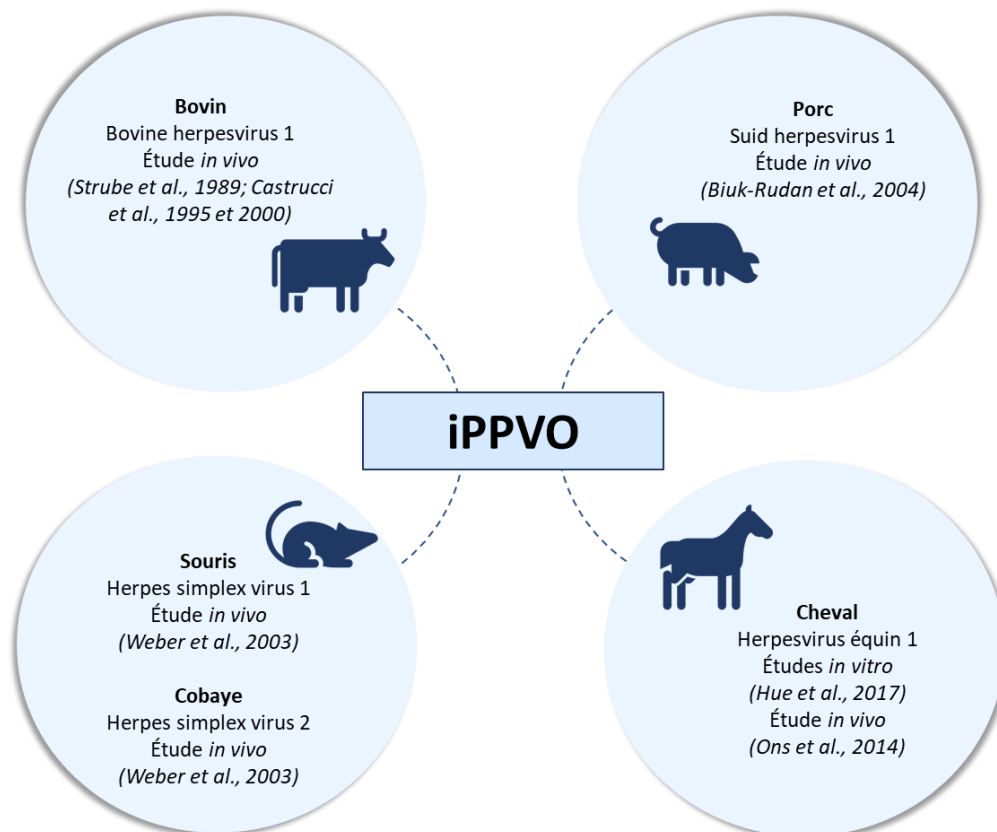


Figure 26 Etude de l'effet de l'iPPVO sur des herpesvirus de diverses espèces (*in vitro* et *in vivo*).

L'étude de l'effet de l'iPPVO sur des poulains infectés par *Rhodococcus equi*, bactérie intracellulaire responsable de pneumonies chez les jeunes poulains, a montré une augmentation des cellules sécrétant l'IFN- γ chez des poulains âgés de 7 à 14 jours mais cette capacité n'a pas été observée chez les poulains plus jeunes (Sturgill et al., 2011). Il est à noter que l'iPPVO n'a pas eu la capacité de réduire le développement des signes cliniques. Ryan et al. ont montré que l'iPPVO était capable d'augmenter la capacité des neutrophiles à phagocyter *Rhodococcus equi* et le burst oxydatif de 12 jours à 24 jours suivant les injections d'iPPVO (Ryan et al., 2010). Comme lors des études précédentes, une augmentation de l'expression de l'ARNm du TNF- α dans les macrophages a été observée. L'iPPVO a également permis d'augmenter l'expression de l'IL-1 p40 dans les macrophages du liquide broncho-alvéolaire infecté par *Rhodococcus equi* au 12^{ème} jour suivant l'injection.

Une étude menée par Ziebell et al. sur des jeunes chevaux a montré la capacité de l'iPPVO à réduire les signes cliniques dûs à l'EHV-1 et -4 (Ziebell et al., 1997). Les scores cliniques des chevaux traités avec l'iPPVO ont été réduits de 40% et 50% des chevaux (n=13) n'ont pas présenté d'écoulement nasal purulent. Une autre étude a montré la réduction des signes cliniques (écoulement nasal, hypertrophie des ganglions lymphatiques, température rectale) suite au traitement à l'iPPVO. Lors de cette étude l'excrétion virale a été réduite chez les chevaux du groupe traité par rapport au groupe témoin, en particulier sur la période du 11^{ème} au 16^{ème} jour (Ons et al., 2014). Dans cette dernière étude, l'effet de l'iPPVO sur *Streptococcus equi* a pu être mesuré suite à une infection naturelle. Les auteurs ont montré que le traitement par l'iPPVO n'empêchait pas l'excrétion de la bactérie chez les chevaux infectés. En revanche l'excrétion de *Streptococcus equi* a été réduite au bout de 14 jours dans la population traitée contrairement à la population témoin.

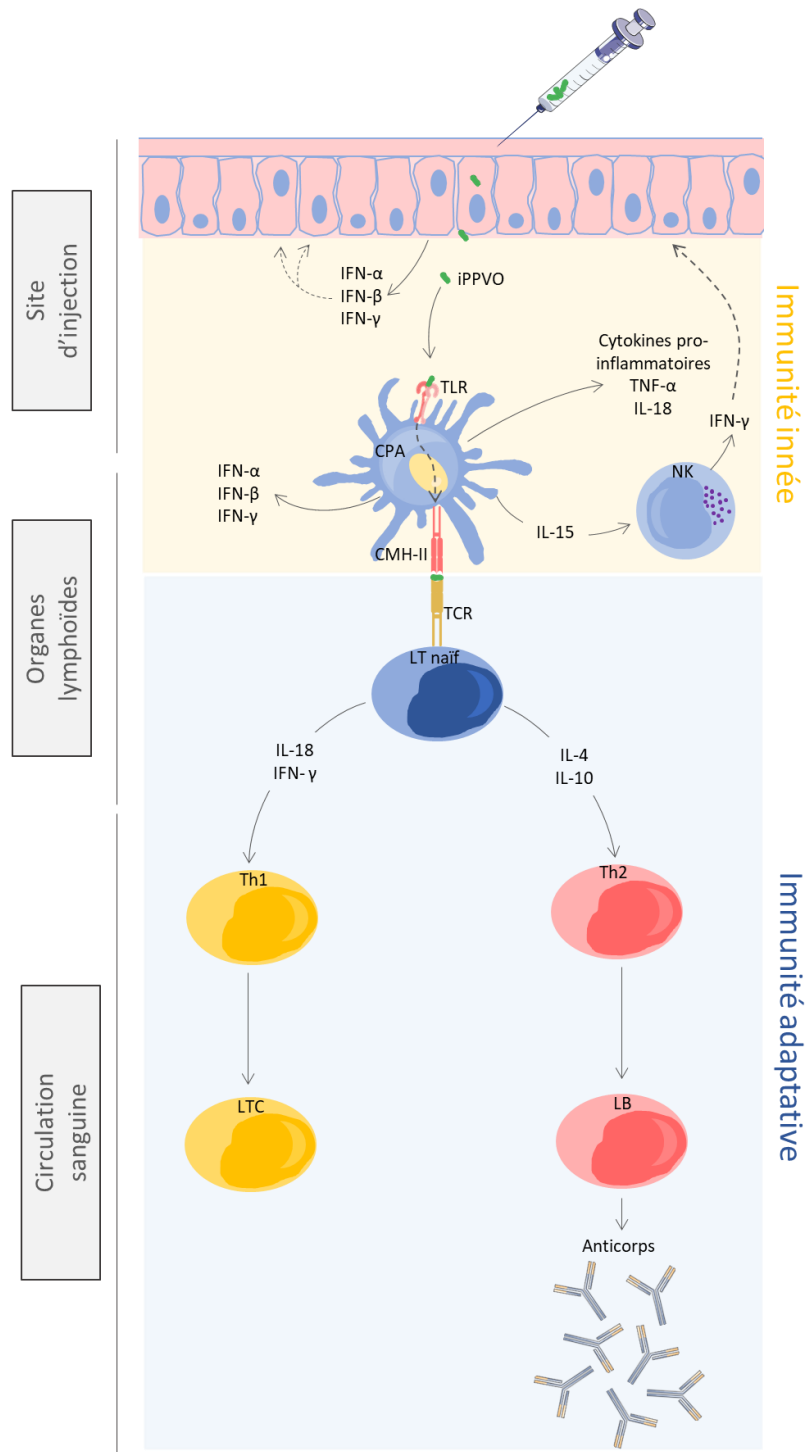


Figure 27 Mécanisme d'action supposé de l'iPPVO. L'iPPVO déclenche les mécanismes de la réponse immunitaire innée. L'iPPVO est pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette action entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-18 et déclenche également la réponse interféron (IFN- α , - β et - γ). La sécrétion d'IL-15 par les CPA permet d'activer les cellules tueuses (NK), lesquelles sécrètent en retour de l'IFN- γ . Les CPA présentent également l'antigène (iPPVO) aux lymphocytes T (LT) naïfs via le CMH-II ce qui entraîne le déclenchement de la réponse adaptative. Les LT naïfs activent la voie Th2 grâce à l'IL-4 et à l'IL-10 ce qui permet aux lymphocytes B (LB) de produire des anticorps spécifiques. Ils peuvent également activer la voie Th1 grâce à l'IL-18 et à l'IFN- γ ce qui permet l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (LTC).

Chapitre 2 :
Objectifs des travaux de thèse

Ce travail de thèse a pour objectif de tester une nouvelle approche vaccinale chez le cheval afin de favoriser une réponse plus importante en amplitude et dans la durée, pour répondre à des problématiques actuelles de limites d'efficacité de certains vaccins mais également de rupture d'approvisionnement. Ce projet concerne deux maladies d'importance pour la filière équine, la grippe équine et la rhinopneumonie. Si des vaccins sont disponibles pour lutter contre ces deux maladies, l'efficacité du vaccin contre la rhinopneumonie est parfois remise en cause contrairement à celle du vaccin contre la grippe.

Nous avons donc choisi de tester l'effet d'un composé aux propriétés adjuvantes, l'iPPVO, sur la réponse humorale induite par différents vaccins. La grippe équine présentant l'avantage de permettre un suivi de la réponse en anticorps par la méthode SRH associée à des corrélats de protection bien définis, nous avons choisi de réaliser la mise au point du protocole avec ce vaccin et ainsi de faire la preuve de concept sur ce modèle. Ceci nous a donné l'opportunité de tester une nouvelle méthode de quantification des anticorps par mesure d'impédance, grâce à l'appareil xCELLigence[®], qui présente l'avantage d'être automatisée et à haut débit. L'effet de l'iPPVO a été étudié, l'année suivante, en co-administration avec un vaccin contre la rhinopneumonie par deux méthodes de séroneutralisation, l'une classique recommandée par l'OMSA et l'autre basée sur une technologie xCELLigence[®].

Les deux premières parties de cette thèse concerneront l'ensemble des résultats obtenus dans l'espèce cible lors d'expériences *in vivo*. Un premier article, publié dans *Vaccines*, présente l'effet de l'iPPVO sur la vaccination contre la grippe équine. Un second article présente le développement d'une méthode de mesure des anticorps contre l'EIV par impédancemétrie. Un troisième article présentera les effets de l'iPPVO dans un protocole de vaccination contre la rhinopneumonie. Une dernière partie, sera consacrée à un travail préliminaire *in vitro* portant sur l'expression des cytokines et des différentes voies de signalisation potentiellement impliquées dans la réponse à l'iPPVO.

Chapitre 3 :
Description des travaux de recherche

Les travaux de recherche ont nécessité de travailler sur des échantillons sanguins prélevés sur des chevaux. Pour la réalisation du projet, il a fallu identifier une population de chevaux accessible sur une période définie pour l'étude. Nous avons travaillé en partenariat avec l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) et en particulier avec la Jumenterie du Pin. Ce travail a nécessité d'instruire des dossiers de demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques auprès d'un Comité d'Éthique et du Ministère de la Recherche. De plus, ce projet de thèse impliquait l'utilisation du Zylexis[®], un immunostimulant ne possédant pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France. L'importation du Zylexis[®] a dû faire l'objet d'une demande d'importation auprès de l'Agence du médicament de l'Anses. Dans le cadre de ma thèse, j'ai été en charge de la gestion et du suivi des relations avec ces différentes instances. Les différentes étapes sont schématisées sur la figure 28.

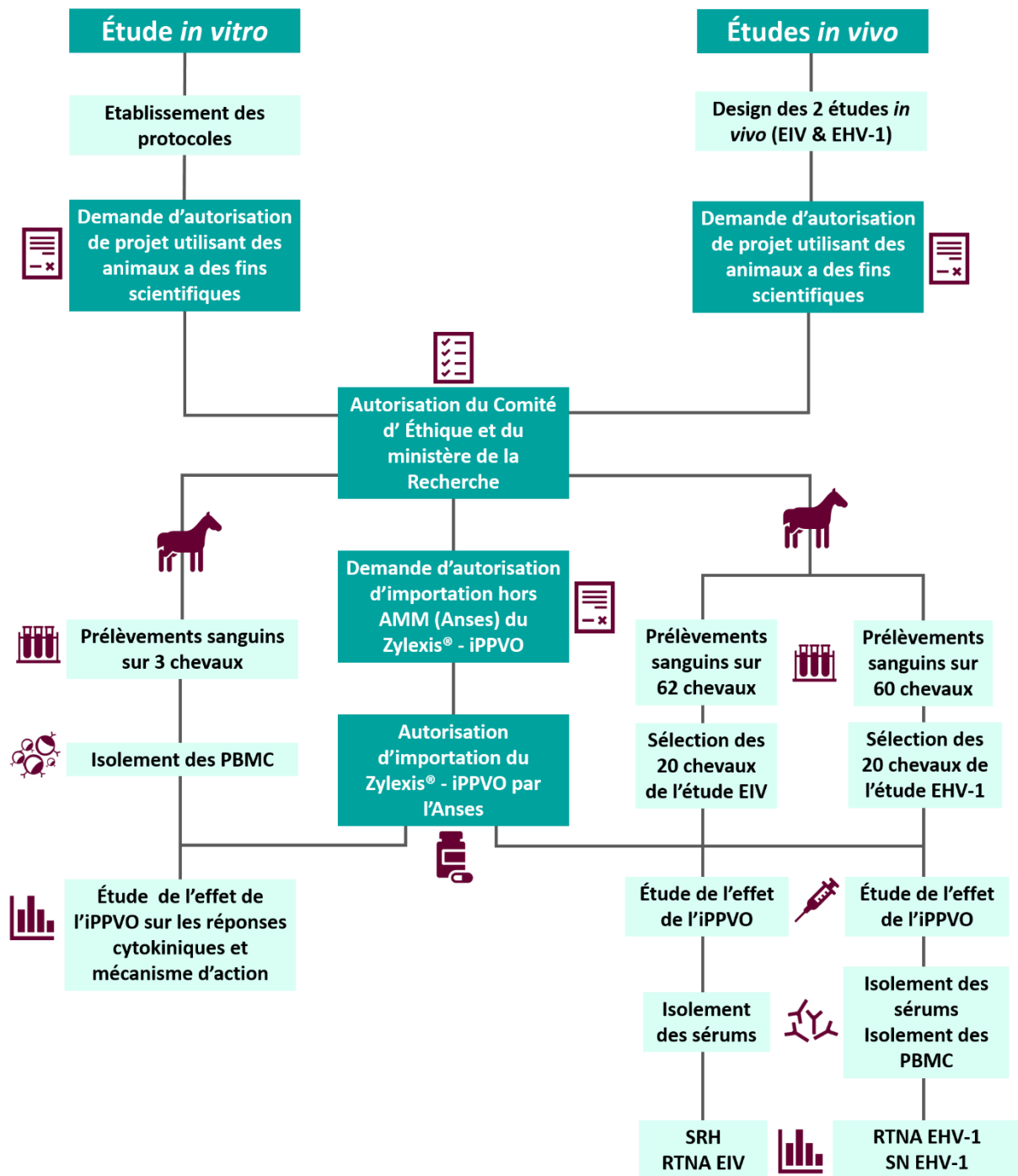


Figure 28 Schématisation des différentes démarches pour la réalisation des études *in vitro* et *in vivo* (i.e. étude de l'effet de l'iPPVO en co-injection avec un vaccin contre la grippe équine et avec un vaccin contre la rhinopneumonie) du projet de thèse.

1. Preuve de concept de l'efficacité de l'iPPVO en co-administration avec un vaccin EIV et développement d'une nouvelle méthode de séroneutralisation en temps réel de l'EIV

1.1. Effet adjuvant de l'iPPVO en co-administration avec le vaccin Equilis Prequenza[®] Te

1.1.1. Introduction

Depuis le premier isolement du virus de la grippe équine en 1956, le virus a évolué et est aujourd'hui endémique dans de nombreux pays. L'EIV est à l'origine d'importantes épidémies dans le monde, malgré des mesures de surveillance et de prévention. En 2019, l'Europe a été confrontée à une importante circulation d'EIV, avec de multiples foyers en France, en Belgique et en Allemagne. Le Royaume-Uni a signalé à lui seul plus de 200 foyers de grippe équine, provoquant l'arrêt des courses de chevaux pendant 6 jours et des pertes économiques considérables (Fougerolle et al., 2019). Au cours des 10 dernières années, le nombre de foyers a considérablement augmenté en Amérique du Nord et du Sud, en Europe, en Asie et en Afrique (Oladunni et al., 2021). La lutte contre ce virus repose principalement sur un moyen de prévention qu'est la vaccination. Les premiers vaccins contre la grippe équine ont été développés dans les années 1960 (Daly et al., 2004) et n'ont cessé d'être améliorés pour faire face à l'évolution du virus et limiter la survenue d'épizooties. L'évolution de l'EIV a conduit l'OMSA à émettre des recommandations, sur la base des rapports de surveillance des différents pays et d'études réalisées par les laboratoires experts, auprès des fabricants de vaccins pour effectuer des mises à jour afin de maintenir leur efficacité (OIE, ESP, 2019). Malgré cela, à cette date, tous les vaccins ne contiennent pas les souches recommandées par l'OMSA (Clade 1 : A/eq/South Africa/04/2003-like ou A/eq/Ohio/2003-like et Clade 2 : A/eq/Richmond/1/2007) (Oladunni et al., 2021). La mesure du taux d'anticorps présent dans les sérums équins et le suivi de ce taux, notamment lors de la vaccination, fournissent des données importantes sur l'efficacité d'un vaccin. Chez le cheval, la méthode SRH est utilisée pour mesurer les taux d'anticorps anti-EIV. Cette méthode, pour laquelle des corrélats de protection ont pu être déterminés, a permis de caractériser différents niveaux de protection chez le cheval contre le virus de la grippe équine : la protection clinique et la protection virologique (Mumford et al., 1994b; Newton et al., 2000). Ainsi, ces données bien caractérisées permettent d'envisager des protocoles afin d'améliorer le niveau et la durée de protection. Le Parapoxvirus ovis inactivé ou iPPVO est un immunostimulant commercialisé sous le nom de Zylexis par

Zoetis®. L'injection d'iPPVO entraîne notamment une stimulation non spécifique de la réponse immunitaire innée (Rush and Flaminio, 2000).

Cette première étude vise à améliorer le protocole lors de la vaccination contre la grippe équine par l'ajout du Zylexis en tant que potentiel adjuvant. L'étude a été réalisée à la Jumenterie du Pin (61) sur le plateau technique de l'IFCE. La première étape a consisté à sélectionner une population de chevaux présentant des réponses en anticorps mesurées par SRH relativement homogènes suite à un rappel vaccinal annuel pour permettre d'objectiver une hausse des valeurs après traitement. Puis l'effet de l'iPPVO lors d'un rappel 6 mois après la vaccination a été mesuré. Il s'agissait d'établir une preuve de concept qui visait à démontrer le potentiel adjuvant de l'iPPVO pour augmenter le niveau d'anticorps et de ce fait maintenir un bon niveau de protection des chevaux lors de la vaccination contre la grippe équine.

1.1.2. Article 1

Article accepté en Décembre 2022 dans le journal « Vaccines » (Impact factor : 4,961).

Article

Immunostimulating Effect of Inactivated Parapoxvirus Ovis on the Serological Response to Equine Influenza Booster Vaccination

Flora Carnet ^{1,2} , Romain Paillot ^{1,2,3} , Christine Fortier ^{1,2}, Erika S. Hue ^{1,2} , Laurie Briot ⁴, Frédéric de Geoffroy ⁴, Pierre-Olivier Vidalain ^{5,†}  and Stéphane Pronost ^{1,2,*,†} 

- ¹ LABÉO, 14280 Saint-Contest, France
² BIOTARGEN, Normandie University, UNICAEN, 14280 Saint-Contest, France
³ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, UK
⁴ Institut Français du Cheval et de l'Équitation, Plateau Technique du Pin-au-Haras, 61310 Gouffern en Auge, France
⁵ CIRI Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ. Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 69007 Lyon, France
* Correspondence: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr
† These authors contributed equally to this study.

Abstract: Equine influenza virus (EIV) is responsible for recurring outbreaks that are detrimental to the equine industry. Vaccination is key for prevention, but the effectiveness and duration of protection provided by existing vaccines is often insufficient. In order to improve vaccine efficacy, we evaluated the benefit of immune stimulation with inactivated Parapoxvirus ovis (iPPVO) on the antibody response induced by a vaccine boost against EIV. A whole inactivated ISCOMatrix-adjuvanted equine influenza vaccine was administered alone ($n = 10$) or combined with iPPVO injections at D0, D2 and D4 post vaccination ($n = 10$) to adult horses that required a vaccine boost 6 months after the last immunization, as now recommended by the WOA. Antibody levels were measured with the single radial haemolysis (SRH) assay at 1, 3 and 6 months post-vaccination. Results revealed that horses that received iPPVO had higher antibody levels than the control group injected with the EI vaccine alone. Although the vaccine used contains only a clade 1 and European lineage strain, the increase in protective antibodies was also observed against a clade 2 strain. Thus, immune stimulation with iPPVO, a substance already marketed as an immunostimulant, could be used to improve vaccination protocols in horses and potentially other species.

Keywords: horse; equine influenza viruses; vaccine; immunomodulator; inactivated Parapoxvirus ovis



Citation: Carnet, F.; Paillot, R.; Fortier, C.; Hue, E.S.; Briot, L.; de Geoffroy, F.; Vidalain, P.-O.; Pronost, S. Immunostimulating Effect of Inactivated Parapoxvirus Ovis on the Serological Response to Equine Influenza Booster Vaccination. *Vaccines* **2022**, *10*, 2139. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122139>

Academic Editor: Hsian-Yu Wang

Received: 17 November 2022

Accepted: 12 December 2022

Published: 14 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Equine influenza virus (EIV) is an Alphainfluenzavirus of the Orthomyxoviridae family. It is the etiological agent of horse flu or equine influenza (EI), a highly contagious disease of the respiratory tract that is transmitted from equine to equine mainly by contaminated aerosols. The main clinical signs are fever, nasal discharge, coughing, loss of appetite and general weakness. Complications include pulmonary oedema, asthma and secondary bacterial infection. In rare cases, EI eventually leads to the death of the animal [1,2]. EIV still causes major outbreaks worldwide despite surveillance and prevention measures [3]. In 2007, Australia faced an outbreak of EI in a naïve horse population that cost over AUS 1 billion to the equine industry and the government [4–6]. In 2019, Europe was confronted by a major circulation of EIV, with multiple outbreaks in France, Belgium and Germany. The UK alone reported over 200 outbreaks of EI, causing the shutdown of horse racing for 6 days with considerable economic losses [4]. Over the 2010–2021 period, the number of outbreaks substantially increased in North and South America, Europe, Asia and Africa [7].

The most widely used prophylactic method to limit the spread of the disease is vaccination. Vaccination has two major aims: to reduce the duration and intensity of clinical signs of disease and to limit the transmission of the virus within a population of horses. Many vaccines are commercially available worldwide and are capable of inducing protective immunity [2]. The surface hemagglutinin (H) and neuraminidase (N) are among the main immunodominant antigens of influenza viruses. EIV strains responsible for current outbreaks belong to the H3N8 subtype (subtype A2), whereas the H7N7 subtype of EIV (subtype A1) has not been isolated since 1979 [3,8]. Like all influenza viruses, EIV mutates over time and thus escapes host immunity. Since the 1980s, this virus has evolved into two lineages: the European lineage and the American lineage. The American lineage has itself evolved into sub-lineages and clades, resulting in a clade 1 and a clade 2 in the Florida sub-lineage (FC1 and FC2). Clade 2 viruses of the Florida sub-lineage were responsible for most outbreaks in Europe from 2005 to 2018 [3]. The evolution of EIV has led the WOA to recommend vaccine updates to remain effective. Despite this, a large majority of vaccines do not contain the recommended strains to protect against circulating EIV strains [7]. In addition to this genetic drift that tends to decrease the efficacy of vaccines, protective antibody levels are rarely achieved after a single shot of vaccine, and three injections are usually necessary. Furthermore, because antibody levels tend to wane with time, booster injections are recommended every 6 months or yearly depending of the activity and/or risk of infection. Vaccination is, therefore, important to prevent the spread of the virus [2], but it is critical to keep vaccines up-to-date and to maintain high levels of antibodies in equine populations.

One option to improve the level and duration of protection is to stimulate the innate immune response during vaccination, as it will determine the quality of the adaptive immune response that is induced. Inactivated Parapoxvirus ovis or iPPVO is an immunostimulant marketed as Zylexis by Zoetis® and is composed of the inactivated Parapoxvirus ovis strain D1701 (iPPVO). This compound is recommended for prophylactic and metaphylactic treatment of infectious diseases in horses, cattle, pigs, dogs and cats [9–13]. Previous studies suggested that iPPVO reduces secondary viral or bacterial shedding in horses; however, the numbers of horses involved were small [9,14]. Injection of iPPVO results in a non-specific stimulation of the innate immune response [15]. The activity of iPPVO has been mainly associated with the synthesis of the early pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, TNF alpha, IL-2, and IFN and the Th1 cytokines IL-12, IL-18 and IFN gamma [16,17]. Hue et al., showed the efficacy of iPPVO in vitro as assessed by rapid and strong IFN type I and II responses in the context of equine PBMC infection with EHV1 and EHV4 [18]. iPPVO has been shown to have immunomodulatory activity (increased innate immune cells and neutralising antibodies) in several diseases: genital herpes in guinea pigs, human hepatitis B virus infection in transgenic mice, pseudorabies virus infection in mice, Aujeszky's disease in pigs and infectious bovine rhinotracheitis [10,16,19,20]. Because iPPVO is an approved immunostimulant in veterinary medicines, we studied the potential beneficial effect of iPPVO injections on the immunological response of horses to a booster vaccination against EI. It should be noted that in our experimental design, iPPVO was not mixed and co-administered with the vaccine, but separately injected within a 15 cm radius of the vaccine injection site.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval/Animal Welfare

This study was authorised by the CENOMEXA n°54 ethics committee (N° APAFIS#29210-2020113009246927 v3) and the Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

2.2. Horses and Screening Process

The study was carried out at the Jumenterie du Pin in Orne, France between November 2020 and November 2021. A group of 62 horses were screened by single radial haemolysis

assay (SRH). Equine influenza SRH antibody titres were measured immediately before as well as 1 and 3 months after the annual EI booster vaccination (Equilis prequenza[®] Te[®]). The sample size was determined using three methods: the “resource equation method” [21], the Within-factor repeated measures [22] and a method using the Cohen coefficient [23], taking into account the different criteria of this study: two groups and a desired difference of at least 25% between the two groups. Based on these three methods, the optimal number was set to 10 individuals per group. Of the 62 animals, a group of 20 horses with a comparable serological status was assembled according to the following criteria: an SRH titre less than or equal to 200 mm² 3 months after the annual EI booster vaccination and an increase between 10 to 70 mm² in SRH titre between pre-vaccination and 1 month post-vaccination levels. Twenty healthy mares, breed selle-français, anglo-arabian, trotter and draft horses between 11 and 25 years of age were enrolled in the study. Finally, the horses were stratified into three different age groups (i.e., 11–14, 15–18 and 19–25 years) and then randomly allocated to the “control group” that would receive the semi-annual EI booster (SAB) vaccination or the “iPPVO group” that would receive the SAB vaccination plus iPPVO injections.

2.3. Study Design

Mares in the control group received only the EI vaccine (Equilis prequenza[®] Te[®], MSD Animal Health) according to the manufacturer’s recommendations (i.e., 1 mL of suspension injected intramuscularly into the neck). The commercially available Equilis prequenza[®] Te[®] inactivated vaccine (MSD Animal Health) contains a virus of the older Eurasian sub-lineage (A/Equi-2/Newmarket/2/93), Florida clade 1 sub-lineage virus (A/equine-2/South Africa/4/03), and the tetanus toxoid adjuvanted with ISCOMatrix. Mares in the vaccine with iPPVO group received one dose of the same EI vaccine and three doses of iPPVO (Zylexis[®], Zoetis). A batch of Zylexis[®] produced under commercial conditions was used. The Zylexis[®] consisted of the lyophilised iPPVO strain D1701. The lyophilised pellet was resuspended in 1 mL of water for injection prior to administration by intramuscular injection (1 mL of solution injected intramuscularly into the neck according to the manufacturer’s recommendations, followed by two new injections of iPPVO at 48 h intervals (i.e., D0, D + 2 and D + 4) (Figure 1). The label information provided with Zylexis[®] mentioned the use of different volumes depending of the targeted species. As this product had no marketing authorization in France at the time of this study, and this study represents the first use of Zylexis[®] in combination with another active product (i.e., vaccine), it was decided to use the minimal recommended volume. The injection of iPPVO was performed within a 15 cm radius of the vaccine injection site. After injection, the horses were carefully monitored for side effects for 1 week. Temperature, general condition and local reaction at the injection site were monitored 48 h after the injections. Fever was reported for rectal temperatures > 38.8 °C. No significant side effects from iPPVO injection were observed in relation to the frequency of swelling (Table S1).

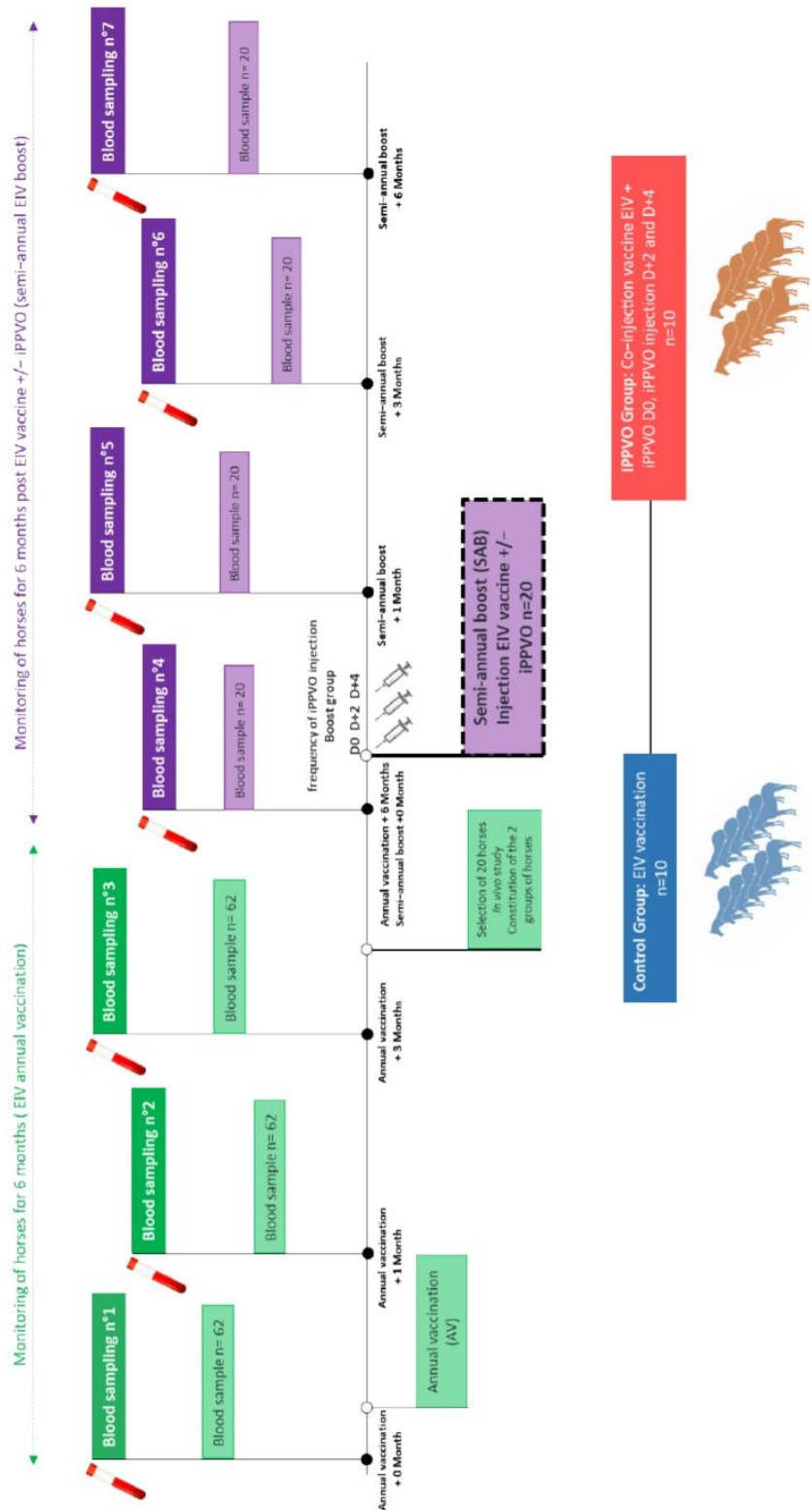


Figure 1. Horse selection and EIV vaccination protocol with or without iPPVO®.

2.4. Blood Samples

All blood samples (screening and study phases) were taken from the jugular vein (1 dry tube of 10 mL per horse). During the study phase and for both groups, one blood sample was taken immediately prior to boost EI immunisation. Other blood samples were collected 1, 3 and 6 months after the semi-annual boost (SAB) vaccination. All of the samples were stored for a maximum of 4 h at +4 °C before the serum was collected. The collected sera were stored at −20 °C.

2.5. Serological Analysis: Single Radial Haemolysis

The SRH assay measures EIV-specific serum antibody levels in horses and was performed according to the WOAHA recommendations, 2019 [3]. Briefly, two EIV strains (A/equine/Jouars/4/06 (H3N8; Florida Clade 2) and A/equine/Paris2018 (H3N8; Florida Clade 1)) were used as SRH antigens. Sheep red blood cells were coated with EIV antigens, then incubated at +4 °C for 10 min. Next, a solution of CrCl₃ (1:400 dilution from dilution stock solution (2.25 M)) was added to the mixture and incubated for 10 min at room temperature. After centrifugation (20 min, 3000 g, +4 °C), the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in buffered saline. Then, the solution was mixed with an agarose solution and guinea pig complement. The agarose gel was then stamped to make wells into which 10 µL of test and control sera were placed. Sera were previously decomplexed at 56 °C for 30 min. The plates were incubated for 24 h at 42 °C before reading. A clear haemolytic zone appeared around the well when anti-influenza antibodies coupled to complement lyse the antigen-coated red blood cells. The size of the zone was directly proportional to the level of strain-specific antibodies in the serum. A haemolysis area of less than 85 mm² indicates a non-immune horse; between 85 mm² and 150 mm², the horse is clinically protected; above 150 mm², the horse is virologically protected [24,25]. Control antiserum from the European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM) was included on each plate (A/equine/South Africa/4/03 Horse antiserum BRP reference Y0000712 for antigen A/equine/Jouars/4/06; a pool of sera positive for strain A/equine/Paris2018). The reading of the SRH results was checked by two readers in order to minimise reading errors. Thirty randomly selected samples were retested by another experimenter. The retested samples showed a difference of less than 7% in the means.

2.6. Statistical Data Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad PRISM[®] 7.04 (San Diego, CA, USA). Normally distributed group samples were analyzed using two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons post-test to test significant differences between groups. The frequency of horses reaching the protection threshold in each group was compared at equivalent time points post immunisation (i.e., post-AV time points compared with post-SAB time points) using an χ^2 test. The frequency of horses with local swelling after injection was also compared using an χ^2 test. The significance level was set at a *p*-value of <0.05.

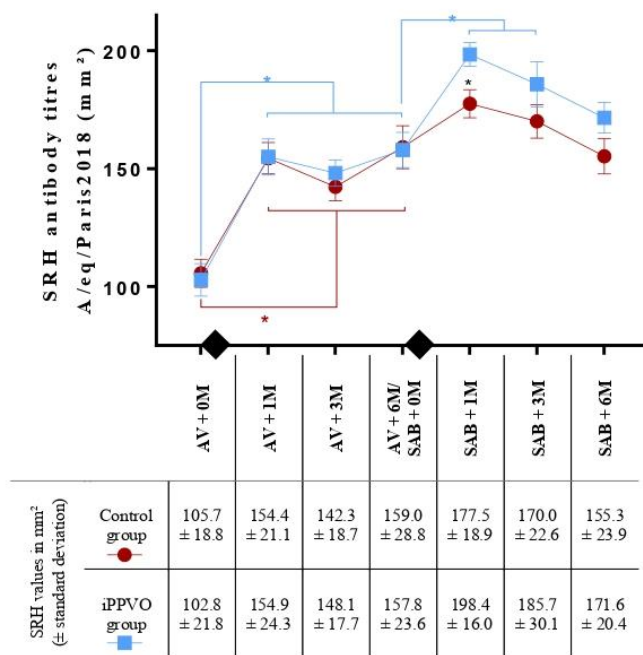
3. Results

3.1. Antibody Response to Annual EIV Vaccination (Pre-iPPVO Treatment)

Our objective with the study was to evaluate the effect of iPPVO injections on the serological response of horses to a semi-annual EI booster (SAB) vaccination. First of all, however, two groups of 10 horses with a similar serological response to the annual EI vaccination (AV) had to be assembled (Figure 1). The SRH assay was used to measure the level of EIV-specific antibodies. As the first group would receive the SAB vaccination alone 6 months after AV, it was designated as the "control group", and as the second group would receive the SAB vaccination plus iPPVO injections, it was referred to as the "iPPVO group". At the time of AV (Figure 2a,b), horses in both groups showed protective antibody levels against the two EIV strains (EIV A/equine/Paris/1/2018 and A/equine/Jouars/4/06 strains) used in the assay, with values > 85 mm² (105.7 ± 18.8 mm² and 141.9 ± 24.3 mm²,

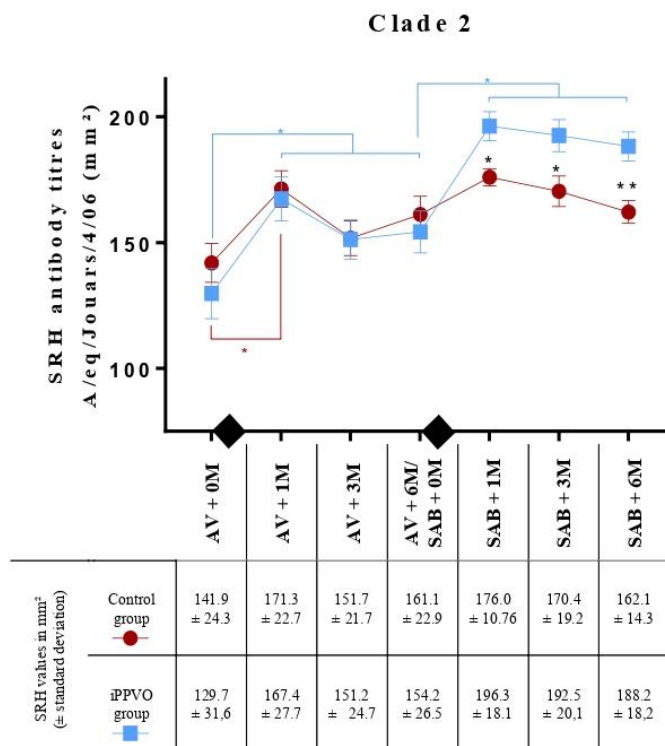
respectively, for the control group; $102.9 \pm 21.8 \text{ mm}^2$ and $129.7 \pm 31.6 \text{ mm}^2$, respectively, for the iPPVO group). No significant differences in SRH antibody titres were measured between groups when tested against the two EIV strains (p -value > 0.05). One month after the annual vaccination (AV + 1M), horses in both groups showed a significant increase in SRH antibody levels when compared with AV + 0M ($154.4 \pm 21.1 \text{ mm}^2$ (p -value < 0.0001) and $171.3 \pm 22.7 \text{ mm}^2$ (p -value = 0.037), respectively, for the control group; $154.9 \pm 24.3 \text{ mm}^2$ (p -value < 0.0001) and $167.4 \pm 27.7 \text{ mm}^2$ (p -value = 0.0002), respectively, for the iPPVO group). SRH antibody titres were not significantly different between groups (p -value > 0.05). Three months after the annual vaccination (AV + 3M), the horses maintained a mean SRH value of $142.3 \pm 18.7 \text{ mm}^2$ and $151.7 \pm 21.7 \text{ mm}^2$ respectively, for the control group and $148.1 \pm 17.7 \text{ mm}^2$ and $151.2 \pm 24.8 \text{ mm}^2$ respectively, for the iPPVO group. No significant difference was measured when compared with AV + 1M or between groups (p -value > 0.05). At 6 months post annual vaccination (AV + 6M), all horses of the two groups maintained a protective level of SRH antibody when tested against the two EIV strains (A/equine/Paris/1/2018 EIV and A/equine/Jouars/4/06 strains). SRH antibody titres were $159.0 \pm 28.8 \text{ mm}^2$ and $161.1 \pm 22.9 \text{ mm}^2$, respectively, for the control group and $157.8 \pm 23.6 \text{ mm}^2$ and $154.2 \pm 26.5 \text{ mm}^2$, respectively, for the iPPVO group (Figure 2a,b). The differences between the two groups were not significant (p -value > 0.05). A two-way ANOVA using treatment (\pm iPPVO) and timing (from AV to AV + 6M) showed no significant difference between the two groups (p -value > 0.05 for SRH antibody titres tested against A/equine/Paris/1/2018 and A/equine/Jouars/4/06, respectively). Therefore, animals of the two groups showed a similar SRH response to the annual EI vaccination.

Clade 1



(a)

Figure 2. Cont.



(b)

Figure 2. Mean H3N8 single radial haemolysis (SRH) antibody response measured before and after booster vaccination. The values correspond to sera isolated from blood samples that were collected in the control and iPPVO groups before the annual vaccination (AV), 1 and 3 months after the AV and before the semi-annual boost (SAB), and 1, 3 months and 6 months after the SAB. The red circles correspond to the mean SRH values in the control group ($n = 10$), and the blue squares correspond to the mean SRH values in the iPPVO group ($n = 10$) for (a) A/equine/Paris/1/2018 strain clade 1 strain and (b) A/equine/Jouars/4/06 EIV clade 2 strain. The diamonds represent the time of the AV injection and the 6 months SAB injections with or without iPPVO. Error bars represent standard error of the mean. Black stars correspond to a significant increase in the haemolysis area for the iPPVO group compared to the control group (two-factor ANOVA test; * and ** for $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively). A red star represents the significant increase in the haemolysis area for the control group over time, and the blue stars represent the significant increase in the haemolysis area for the iPPVO group over time.

3.2. Antibody Response to EIV Vaccination with or without iPPVO as Immunostimulant

Horses received the SAB vaccination alone (control group) or together with iPPVO injections (iPPVO group). One month later (SAB + 1M), SRH antibody titres against A/equine/Paris/1/2018 were determined (Figure 2a) and did not significantly increase when compared with titres at the time of SAB in the control group ($177.5 \pm 18.9 \text{ mm}^2$; p -value > 0.05). On the contrary, a significant increase was observed in the iPPVO group when comparing titres at the time of SAB vaccination and 1 month later ($198.4 \pm 16 \text{ mm}^2$; p -value < 0.0001). Additionally, horses in the iPPVO group showed SRH antibody titres significantly higher than those in the control group (p -value = 0.0375). Three months after the booster vaccination (SAB + 3M), mean SRH titres were $170 \pm 22.6 \text{ mm}^2$ and $185.7 \pm 30.1 \text{ mm}^2$ for the control and iPPVO groups, respectively. The difference between SAB + 1M and SAB + 3M were not significant, irrespective of the group (p -value > 0.05).

Six months after the booster vaccination (SAB + 6M), the mean SRH value of the iPPVO group was $171.6 \pm 20.4 \text{ mm}^2$, while that of the control group was $155.3 \pm 23.9 \text{ mm}^2$, but the difference between the two groups was not significant (p -value > 0.05). A two-way ANOVA using treatment (\pm iPPVO) and timing (from SAB + 1M to SAB + 6M) showed a significant difference between the two groups (p -value = 0.004) for SRH antibody titres tested against A/equine/Paris/1/2018.

One month after the booster vaccination (SAB + 1M), SRH antibody titres against A/equine/Jouars/4/06 were also determined (Figure 2b). No significant increase was observed in the control group when comparing titres at the time of SAB and 1 month later ($176.0 \pm 10.8 \text{ mm}^2$; p -value > 0.05). Titres significantly increased in the iPPVO group ($196.3 \pm 18.1 \text{ mm}^2$; p -value < 0.0001). In addition, SRH antibody titres in the iPPVO group were also significantly higher than in the control group (p -value = 0.0439). Three months after the booster vaccination (SAB + 3M), mean SRH titres were $170.4 \pm 19.15 \text{ mm}^2$ and $192.5 \pm 20.10 \text{ mm}^2$ for the control and iPPVO groups, respectively. In addition, the difference between the two groups was significant (p -value = 0.0279). Between SAB + 1M and SAB + 3M, SRH titres did not significantly change, irrespective of the group (p -value > 0.05). Six months after the boost immunisation (SAB + 6M), the mean SRH value of the iPPVO group was $188.2 \pm 18.2 \text{ mm}^2$ while that of the control group was $162.1 \pm 14.26 \text{ mm}^2$, and the difference between the two groups was significant (p -value > 0.0099). A two-way ANOVA using treatment (\pm iPPVO) and timing (from SAB + 1M to SAB + 6M) showed a significant difference between the two groups (p -value < 0.0001) for SRH antibody titres tested against A/equine/Jouars/4/06. Therefore, iPPVO injections increased the serological response of horses to EI booster vaccination.

3.3. Individual Antibody Response to EIV Vaccination and iPPVO and Level of Protection

Individual results for SRH titres determined with the A/equine/Paris/1/2018 strain are presented in Figure 3a–d. Before annual booster vaccination (AV), eight horses were above the clinical protection threshold (between 85 and 150 mm^2), and two were below the protection threshold in the control group ($< 85 \text{ mm}^2$) (Figure 3a,c). In the iPPVO group, seven horses were above the clinical protection threshold and three below the protection threshold (Figure 3b,d). After AV and before the semi-annual boost immunisation (SAB), no horse was below the clinical protection threshold in either group, and the number of horses above the virological protection threshold ($> 150 \text{ mm}^2$) varied between three and six in the control group (Figure 3a,c) and between four and six in the iPPVO group (Figure 3b,d). After the semi-annual boost immunisation (SAB + 1M, 3M and 6M time point), no horse was below the clinical protection threshold in either group. In the control group (Figure 3a,c), the number of horses above the virological protection threshold decreased from nine to seven at the end of the study. In the iPPVO group (Figure 3b,d), the number of horses above the virological protection threshold decreased from ten to eight at the end of the study. When looking at the frequency of horses that reached the criteria for clinical or virological protection, no significant difference was observed between the two groups. However, for two time points (SAB + 1M and +3M), all horses in the iPPVO group had SRH antibody titres above the virological threshold, suggesting that all horses in this group were fully protected for at least 3 months. From an association point of view, there was a significant difference in the frequency of horses based on the protection threshold between the points AV + 3M and SAB + 3M (p -value = 0.025) for the control group (Figure 3a), which shows that significantly more horses passed the virological protection threshold 3 months after a semi-annual boost than at 3 months post annual booster. There was a significant difference in the frequency of horses based on the protection threshold between the points AV + 1M and SAB + 1M (p -value = 0.003), and AV + 3M and SAB + 3M (p -value = 0.003) for the iPPVO group (Figure 3b). These results show that significantly more horses passed the virological protection threshold at 1 and 3 months after a semi-annual boost than at 1 and 3 months post annual booster.

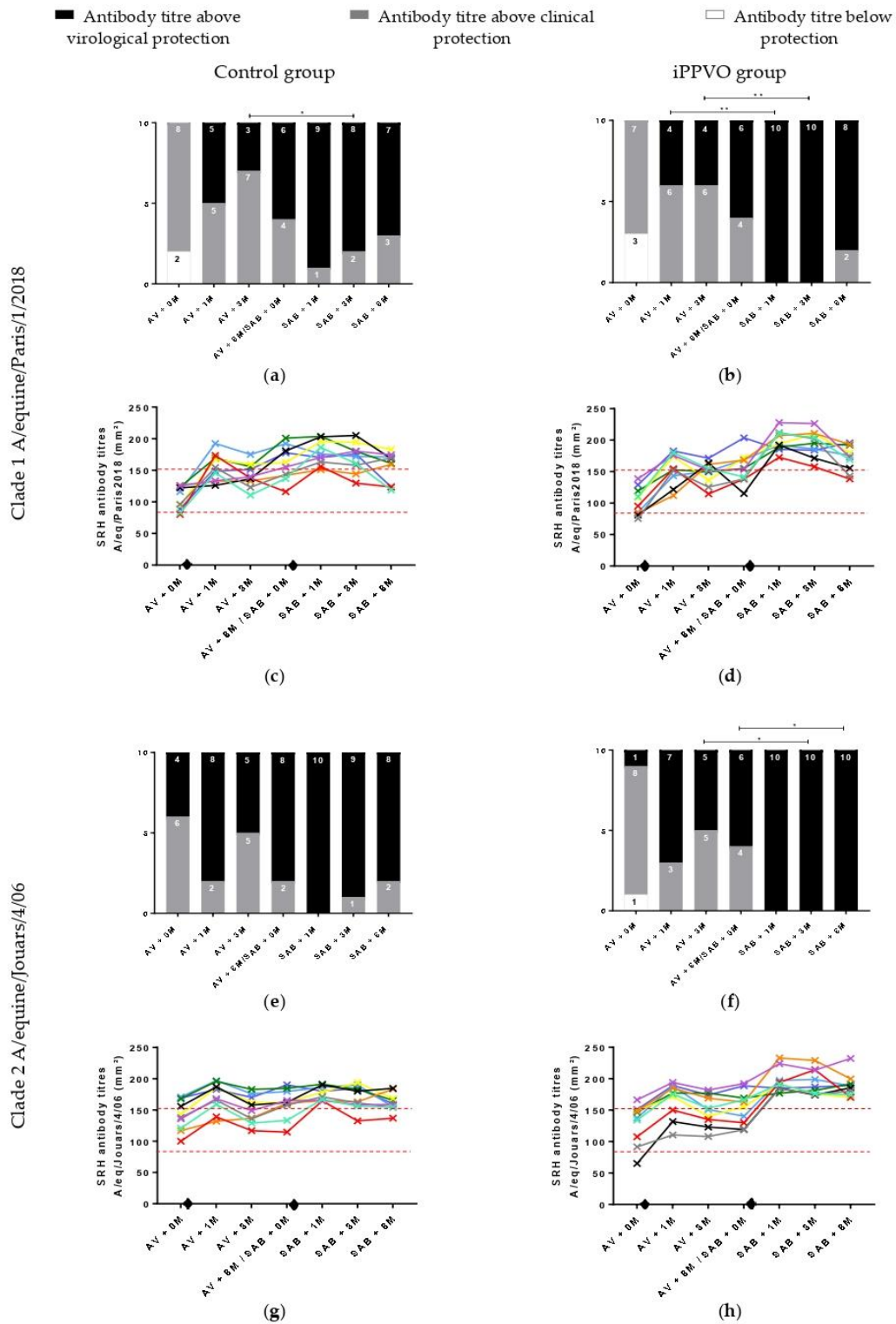


Figure 3. Evolution of H3N8 antibody response to simple radial haemolysis (SRH) measured before and after annual vaccination (AV) and semi-annual vaccination (SAB) with or without iPPVO. Values

are for sera isolated from blood samples that were collected for 1 year from AV to 6 months after SAB. Values correspond to sera isolated from blood samples collected in the control and iPPVO groups before AV, 1 and 3 months after AV; before the booster, 1, 3 and 6 months after the semi-annual booster (SAB). Cumulative histograms represent the distribution of the number of horses according to the different levels of protection (white: unprotected; grey: clinical protection and black: virological protection) for the different sampling points for horses in the control group (a) and horses in the iPPVO group (b) for A/equine/Paris/1/2018 strain and in the control group (e) and horses in the iPPVO group (f) for A/equine/Jouars/4/06 EIV strain. Each horse is represented with a specific colour in the different graphs (c, d, g and h). The different colours correspond to the SRH values of the horses in the control group ($n = 10$) (c) and iPPVO group ($n = 10$) (d) for A/equine/Paris/1/2018 strain and the SRH values of the horses in the control group ($n = 10$) (g) and iPPVO group ($n = 10$) (h) for A/equine/Jouars/4/06 EIV strain. The diamond represents the timing of the AV injection and the 6 month SAB injections with or without iPPVO. * and ** indicate significant difference (χ^2 tests; $p < 0.05$ and 0.005 , respectively) in the frequency of horses reaching the protection threshold between the control group and the iPPVO group. Only similar time points post immunisation were compared.

Individual results concerning the A/equine/Jouars/4/06 strain are presented in Figure 3e–h. Before AV, six horses were above the clinical protection threshold, and four were above the virological protection threshold in the control group (Figure 3e,g). In the iPPVO group (Figure 3f,h) only one horse was below the clinical protection threshold, eight horses were above the clinical protection threshold, and only one was above the virological protection threshold. After AV and before the SAB immunisation, no horse was below the clinical protection threshold in either group, and the number of horses above the virological protection threshold varied between five and eight in the control group and between five and seven in the iPPVO group (Figure 3e,g). After the SAB immunisation, no horse was below the clinical protection threshold in either group. In the control group, the number of horses above the virological protection threshold decreased from ten to eight at the end of the study (Figure 3e,g). In the iPPVO group, all horses were above the virological protection threshold (Figure 3f,h). As above, when looking at the frequency of horses that reached the criteria for clinical or virological protection, no significant difference was observed between the two groups. However, for three time points (SAB + 1M, +3M and +6M), all horses in the iPPVO group were above the virological threshold. From an association point of view, there was no significant difference in the frequency of horses based on the protection threshold for the control group (Figure 3e). In contrast, there were significant differences in the iPPVO group between the AV + 3M and SAB + 3M (p -value = 0.010) and AV + 6M and SAB + 6M time points (p -value = 0.025) (Figure 3f). These results show that significantly more horses passed the virological protection threshold at 3 and 6 months after a semi-annual boost than at 3 and 6 months post annual booster.

4. Discussion

EIV vaccines are the most effective prophylactic treatments for controlling EI and preventing large-scale outbreaks. In order to maintain a good level of protection in the equine population, it is essential that a strong and sustained immune response is induced in all vaccinated individuals. Although current EI vaccines are still effective, there has been a delay in updating viral strains used in their composition, which presents an increasing risk of vaccine failure over time. In 2019, EIV infected a large number of horses in Europe, some unvaccinated and some vaccinated, but the clade 1 strain responsible for this outbreak [4] is believed to be more virulent, which may explain the scale of the crisis. Although this strain did not warrant an update of the vaccine following the WOAHA recommendations [26], increasing protection by improving the vaccination protocol may provide an advantage over the virus and its dissemination. The current study showed that injections of iPPVO improved the humoral immune response of horses to booster vaccination against EI. This was assessed by quantification of antibody levels as determined by SRH assay. Several studies have demonstrated the correlation between the level of protection of horses and

antibody levels measured by SRH. This method, using relevant EIV strains, allows for the accurate characterisation of the expected protection of the horse against EI. Results presented in this report suggest that iPPVO injection during EI vaccination could improve the level of protection of horses by increasing the level of SRH antibody induced by EI vaccination.

In this study, the choice of the equine participants was an important element of consideration. In the absence of information on the effect of iPPVO on influenza antibodies measured with the SRH assay and for greater robustness, a group of horses with homogeneous and similar SRH antibody responses to EI vaccination were chosen. A selection process based on the SRH antibody response to the standard annual EI vaccination allowed the constitution of small homogenous groups where the detection of the positive effects of iPPVO injections would be possible with a limited number of individuals.

Some studies have already shown the immunomodulation effect of iPPVO *in vitro* and *in vivo* on various infections in horses, cattle and pigs. To our knowledge, only one *in vivo* study using iPPVO as an immunostimulant has been conducted on horses in the context of EIV infection. The study by Lunn et al., in which horses were experimentally infected with EIV and treated or not with Baypamune® (former trade name of iPPVO) showed that although the immunostimulant did not significantly reduce clinical signs, it significantly increased the antibody response to EIV infection of the treated horses when compared with control horses [27]. In the same study, the antibodies of 2 groups of horses were measured before, during and after 2 days of transport. It was shown that iPPVO improves the immune responses by SRH assay in immunosuppressed horses during transport. To date, no studies have been conducted on the use of iPPVO to improve EI vaccination. Results presented here showed for the first time that iPPVO co-injected with Equilis prequenza® Te vaccine significantly increased the level of EIV-specific SRH antibodies when measured 1 and 3 months after vaccination.

The Equilis prequenza® Te vaccine used in this study did not contain an FC2 strain but induced similar SRH antibody levels when tested against FC1 and FC2 EIV strains. This observation had already been made in studies by Reemers et al. and Paillot et al., in which the Equilis prequenza® Te vaccine conferred good clinical protection against recent field strains of EIV (FC2) [28,29].

In this study, a horse that did not show antibody levels sufficient for clinical protection prior to annual vaccination was considered a poor responder to vaccination. This study included three poor responders in the iPPVO group and two in the control group for FC1 and only one poor responder in the iPPVO group for FC2. Results show a potential ability of iPPVO to increase the immune response in a low responder horse, as defined above. If confirmed, this capacity would be interesting in order to boost the immune responses of horses, to limit the risk when horses are introduced into a horse population. The introduction of a sub-clinically infected horses could be the cause of epizootics such as the 2007 epizootic in Australia [6,30]. This observation further supports the use of iPPVO as an immunostimulant in the context of vaccination against EI.

Two main limitations of this study have been identified: (i) the horses were all females from the same stud farm for reasons of availability and convenience in conducting the experimental study; (ii) the study included five low responders to FC1 stain and one low responder to FC2 strain. It will be interesting in a future study to replicate this work on a population of low responders in order to measure the potential of iPPVO when combined with an EI vaccine and its ability to mitigate the poor response to immunisation. Such characteristics would allow one to improve herd immunity and reduce the associated risks of an EI epizootic. It would also be interesting to test iPPVO in a population with high antibody levels to see if horses have individual or species-related limitations in their response to EI vaccination (i.e., is there a ceiling to the SRH antibody response induced by vaccination, is it frequently achieved). However, the SRH assay has its own limitations in measuring areas of haemolysis that may bias the quantification of high antibody titres. This study was only able to measure SRH responses 6 months post SAB. It would be interesting

to follow the horses over a year to measure the iPPVO effect on the duration of immunity beyond 6 months. As this study was conducted with an inactivated EI vaccine, it would be interesting to define the effects of iPPVO when combined with EI vaccine using different technologies, for example, a canarypox vector vaccine, subunit vaccines or modified live attenuated viruses. Finally, it would be interesting to conduct a similar study with other equine vaccines such as the ones against equine herpesviruses (EHV1-4), pathogens that regularly cause epizootics in the equine populations.

Vaccines are composed of several components: one or more antigens specific to the infection against which protection is sought and adjuvants. One critical function of the adjuvants is to trigger the innate immune response that will prime the adaptive response against the antigen. At present, only a few compounds are authorised for use in human and veterinary medicine. Equine vaccines contain adjuvants that have been used for a long time, but some compounds are more recent and diversify the vaccine [31]. The EI vaccines available on the market mainly rely on the following adjuvants: aluminium salts, emulsions, carbomers, saponins and ISCOMs [2,7,31]. This study unravelled interesting properties of iPPVO, a substance approved in several countries as an immunostimulant but not as a vaccine adjuvant. It should be noticed that in this experimental protocol, iPPVO was not mixed and co-injected with the vaccine, but administered near the injection site of the vaccine. The near effect is probably due to the fact that both iPPVO and components of the vaccine converge on the same draining lymph node. In order to increase the panel of adjuvant substances available on the market and to maintain effective vaccines, it is warranted to study the effects of iPPVO when directly incorporated in a vaccine preparation, either alone or in addition to other adjuvants. In this study, Zylexis[®] was used at half the dose recommended by the manufacturer for large animals. It is possible that the antibody response measured by SRH could be further enhanced at the dose that is actually recommended. However, co-injection with an adjuvanted vaccine is not documented, and it is not excluded that side effects may occur when combining the vaccine with a higher dose of Zylexis[®]. Future studies should address this point. Since iPPVO is derived from a virus (PPVO) that has undergone inactivation and is, therefore, not a chemically synthesised compound, this is an advantage over synthetic adjuvants, which are subject to controversy. This represents interesting perspectives for future studies. However, and most importantly, the current results show that iPPVO can be used in its commercialized form to boost the immunogenicity of existing EI vaccines without the need to reformulate either of them.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vaccines10122139/s1>, Table S1: Rectal temperature (°C) and injection site effects before injection and 6 days after the first injection of iPPVO.

Author Contributions: Study design: F.C., R.P., L.B., F.d.G. and S.P.; data collection, analysis, and interpretation: L.B., F.d.G., F.C., C.F., R.P., P.-O.V. and S.P.; manuscript preparation: F.C., R.P., P.-O.V. and S.P.; critically reviewed by R.P., S.P., E.S.H. and P.-O.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Equitation) grant number Rech-CS-2022-2023-019-VacAdEq_HVE. CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational program 2014–2020.

Institutional Review Board Statement: The animal study was reviewed and approved by the CENOMEXA n°54 ethics committee (N° APAFIS#29210-2020113009246927 v3) and the Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank the team at the Jumenterie du Pin (IFCE) for providing the animals and collecting the samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Wilson, W.D. Equine Influenza. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **1993**, *9*, 257–282. [CrossRef] [PubMed]
- Paillet, R. A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination. *Vaccines* **2014**, *2*, 797–831. [CrossRef] [PubMed]
- Cullinane, A. Equine influenza (infection with equine influenza virus). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*; OIE—World Organisation for Animal Health: Paris, France, 2022; Available online: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.07_EQ_INF.pdf (accessed on 8 December 2022).
- Fougerolle, S.; Fortier, C.; Legrand, L.; Jourdan, M.; Pitel, C.M.; Pronost, S.; Paillet, R. Success and Limitation of Equine Influenza Vaccination: The First Incursion in a Decade of a Florida Clade 1 Equine Influenza Virus That Shakes Protection Despite High Vaccine Coverage. *Vaccines* **2019**, *7*, 174. [CrossRef] [PubMed]
- Paillet, R.; El-Hage, C.M. The Use of a Recombinant Canarypox-Based Equine Influenza Vaccine during the 2007 Australian Outbreak: A Systematic Review and Summary. *Pathogens* **2016**, *5*, 42. [CrossRef] [PubMed]
- The Parliament of the Commonwealth of Australia. *Equine Influenza: The August 2007 Outbreak in Australia*; Callinan, I.D.F., Ed.; Parliamentary Paper; The Parliament of the Commonwealth of Australia: Canberra, Australia, 2008.
- Oladunni, F.S.; Oseni, S.O.; Martinez-Sobrido, L.; Chambers, T.M. Equine Influenza Virus and Vaccines. *Viruses* **2021**, *13*, 1657. [CrossRef]
- Daly, J.M.; Lai, A.C.; Binns, M.M.; Chambers, T.M.; Barrandeguy, M.; Mumford, J.A. Antigenic and Genetic Evolution of Equine H3N8 Influenza A Viruses. *J. Gen. Virol.* **1996**, *77*, 661–671. [CrossRef]
- Ziebell, K.-L.; Steinmann, H.; Kretzdorn, D.; Schlapp, T.; Failing, K.; Schmeer, N. The Use of Baypamun N in Crowding Associated Infectious Respiratory Disease: Efficacy of Baypamun N (Freeze Dried Product) in 4–10 Month Old Horses. *J. Vet. Med. Ser. B* **1997**, *44*, 529–536. [CrossRef]
- Castrucci, G.; Osburn, B.I.; Frigeri, F.; Ferrari, M.; Salvatori, D.; Lo Dico, M.; Barreca, F. The Use of Immunomodulators in the Control of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2000**, *23*, 163–173. [CrossRef]
- Hartmann, K.; Block, A.; Ferk, G.; Vollmar, A.; Goldberg, M.; Lutz, H. Treatment of Feline Leukemia Virus-Infected Cats with Paramunity Inducer. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **1998**, *65*, 267–275. [CrossRef]
- Kyriakis, S.C.; Tzika, E.D.; Lyras, D.N.; Tsinas, A.C.; Saoulidis, K.; Sarris, K. Effect of an Inactivated Parapoxvirus Based Immunomodulator (Baypamun) on Post Weaning Diarrhoea Syndrome and Wasting Pig Syndrome of Piglets. *Res. Vet. Sci.* **1998**, *64*, 187–190. [CrossRef]
- Paillet, R. A Systematic Review of the Immune-Modulators Parapoxvirus Ovis and Propionibacterium Acnes for the Prevention of Respiratory Disease and Other Infections in the Horse. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2013**, *153*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
- Ons, E.; Van Brussel, L.; Lane, S.; King, V.; Cullinane, A.; Kenna, R.; Lyons, P.; Hammond, T.-A.; Salt, J.; Raue, R. Efficacy of a Parapoxvirus Ovis-Based Immunomodulator against Equine Herpesvirus Type 1 and Streptococcus Equi Equi Infections in Horses. *Vet. Microbiol.* **2014**, *173*, 232–240. [CrossRef] [PubMed]
- Rush, B.R.; Flaminio, M.J. Immunomodulation in Horses. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2000**, *16*, 183–197. [CrossRef] [PubMed]
- Weber, O.; Siegling, A.; Friebe, A.; Limmer, A.; Schlapp, T.; Knolle, P.; Mercer, A.; Schaller, H.; Volk, H.-D. Inactivated Parapoxvirus Ovis (Orf Virus) Has Antiviral Activity against Hepatitis B Virus and Herpes Simplex Virus. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 1843–1852. [CrossRef] [PubMed]
- Horohov, D.W.; Breathnach, C.C.; Sturgill, T.L.; Rashid, C.; Stiltner, J.L.; Strong, D.; Nieman, N.; Holland, R.E. In Vitro and in Vivo Modulation of the Equine Immune Response by Parapoxvirus Ovis. *Equine Vet. J.* **2008**, *40*, 468–472. [CrossRef]
- Hue, E.S.; Richard, E.A.; Fortier, C.I.; Fortier, G.D.; Paillet, R.; Raue, R.; Pronost, S.L. Equine PBMC Cytokines Profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines* **2017**, *5*, 28. [CrossRef]
- Biuk-Rudan, N.; Šver, L.; Valpotić, I.; Vrbanac, I.; Madić, J.; Župančić, Ž.; Vijić, N.; Pavičić, Ž. Effect of Baypamun Treatment on Aujeszky's Disease Virus (ADV) Transmission in Pigs. *Acta Vet. Brno* **2004**, *73*, 59–68. [CrossRef]
- Friebe, A.; Siegling, A.; Friederichs, S.; Volk, H.-D.; Weber, O. Immunomodulatory Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis (ORF Virus) on Human Peripheral Immune Cells: Induction of Cytokine Secretion in Monocytes and Th1-like Cells. *J. Virol.* **2004**, *78*, 9400–9411. [CrossRef]
- Arifin, W.N.; Zahiruddin, W.M. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays. J. Med. Sci.* **2017**, *24*, 101–105. [CrossRef]
- Charan, J.; Kantharia, N.D. How to Calculate Sample Size in Animal Studies? *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2013**, *4*, 303–306. [CrossRef]
- AI-Therapy, Statistics for Psychologists, Sample Size Calculator. Available online: <https://www.ai-therapy.com/psychology-statistics/sample-size-calculator> (accessed on 8 December 2022).
- Morley, P.S.; Hanson, L.K.; Bogdan, J.R.; Townsend, H.G.G.; Appleton, J.A.; Haines, D.M. The Relationship between Single Radial Hemolysis, Hemagglutination Inhibition, and Virus Neutralization Assays Used to Detect Antibodies Specific for Equine Influenza Viruses. *Vet. Microbiol.* **1995**, *45*, 81–92. [CrossRef] [PubMed]
- Mumford, J.A.; Wood, J. Establishing an Acceptability Threshold for Equine Influenza Vaccines. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *79*, 137–146. [PubMed]

26. OIE. *OIE Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition*; OIE—World Organisation for Animal Health: Paris, France, 2019.
27. Lunn, D.P.; Rush, B.R. *Immunomodulation: Principles and Mechanisms*; IVIS: Denver, CO, USA, 2004.
28. Paillot, R.; Garrett, D.; Lopez-Alvarez, M.R.; Birand, I.; Montesso, F.; Horspool, L. The Immunity Gap Challenge: Protection against a Recent Florida Clade 2 Equine Influenza Strain. *Vaccines* **2018**, *6*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Reemers, S.; Sonnemans, D.; Horspool, L.; van Bommel, S.; Cao, Q.; van de Zande, S. Determining Equine Influenza Virus Vaccine Efficacy—The Specific Contribution of Strain Versus Other Vaccine Attributes. *Vaccines* **2020**, *8*, 501. [[CrossRef](#)]
30. Reeve-Johnson, L. Equine Influenza in Australia. *Vet. Rec.* **2007**, *161*, 635. [[CrossRef](#)]
31. Holmes, M.A.; Townsend, H.G.G.; Kohler, A.K.; Hussey, S.; Breathnach, C.; Barnett, C.; Holland, R.; Lunn, D.P. Immune Responses to Commercial Equine Vaccines against Equine Herpesvirus-1, Equine Influenza Virus, Eastern Equine Encephalomyelitis, and Tetanus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *111*, 67–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Table S1. Rectal temperature (°C) and injection site effects before injection and 6 days after the first injection of iPPVO.

Horse n°	Injection -1D		Injection D		Injection +1D		Injection +2D		Injection +3D		Injection +4D		Injection +5D		Injection +6D		
	Evening	morning**	Evening	morning**	Evening	morning	Evening	morning*	Evening	morning	Evening	morning*	Evening	morning	Evening	morning	
1	37.5	37.5	37.8	37.8	37.5	37.7	37.8	37.8	37.7	37.8	37.7	37.3	37.6	38	37.8	38	37.8
2	38	37.6	38	37.8	38	37.6	37.9	37.6	37.9	38	37.7	37.7	37.9	38	37.7	38	37.7
3	37.3	38	37.7	38	38	37.8	37.4	37.8	37.4	37.9	37.7	38.1	37.9	37.7	37.7	37.6	37.7
4	36.7	37.3	38	37.1	37.9	37.4	37.2	37.4	37.4	37.4	37.4	37.3	37.4	37.4	37.6	37.3	37.6
5	37.1	37.4	37.7	37.6	37.6	37.4	37.2	37.3	37.2	37.3	37.2	37.3	37.5	37.2	37.4	37.2	37.6
6	37.1	37.3	37.7	37.4	37.7	37.4	37.7	37.4	37.7	37.8	37.7	37.7	37.7	37.7	37.4	37.4	37.5
7	36.6	37.7	37.9	37.7	38	37.8	37.7	37.8	37.2	37.5	37.4	37.4	37.6	37.3	37.6	37.7	37.7
8	37.1	37.4	37.9	37.8	37.7	37.7	37.4	37.4	37.4	37.4	37.7	37	37.6	37.2	37.3	37.4	37.7
9	37	37.3	38.1	37.6	37.9	37.5	37.5	37.5	37.6	37.6	37.6	37.3	36.9	37.4	37.7	37.4	37.7
10	37.1	37.4	38	37.3	37.4	37.9	37.7	37.5	37.5	37.5	37.7	37.1	37.1	37.1	37.4	37.4	37.7
11	36.9	37.3	38	36.9	37.4	37.7	37.6	37.7	37.7	37.7	37.7	37.5	37.4	37.7	37.4	37.8	37.7
12	36.9	37.4	swelling 7 cm	swelling 10 cm	swelling 10 cm	37.6	37.9	37.3	37.7	37.4	37.8	37	36.6	37.7	37.1	37.2	36.4
13	37.3	37.9	38.4	37.9	38.5	37.9	38	38.2	37.8	38.2	37.8	37.5	37.8	37.8	38.2	37.8	38
14	36.7	36.7	37.6	37.3	37.7	37.6	36.9	37	37.5	37	37.5	37.2	37.8	37.2	37.5	37.5	37.5
15	38	37.8	38.1	37.3	38.1	37.9	37.8	37.7	37.8	37.7	37.8	37.4	37.7	37.4	37.9	37.9	38.2
16	37.3	37.3	37.9	37.4	37.9	37.4	37.4	37.4	37.5	37.5	37.4	37.4	37.4	37.7	37.8	37.5	37.8
17	36.7	37.7	37.8	37.8	37.9	37.8	37	swelling < 5 cm	37.8	37.6	37.4	37.4	37.2	nc	37.3	37.6	37.8
18	37.3	37.6	37.6	37.7	38.1	37.4	37.6	37.4	37.5	37.6	37.7	37.6	37.6	37.8	37.3	37.1	37.7
19	37.6	38	38.4	37.7	38.1	38	38	38	38	38.1	38.1	38	38	38	38.2	37.9	38
20	37.3	37.4	38	37.7	37.9	37.3	37.5	37.8	37.8	37.7	37.1	37.1	37.9	37.7	37.7	37.7	38

*iPPVO injection
 **co-injection of iPPVO and EI vaccination

1.1.3. Résultats et discussion

Au cours de cette étude, la réponse en anticorps mesurée par SRH a été suivie lors de rappels semi-annuels avec le vaccin EQUILIS® Prequenza Te en présence et en absence d'iPPVO.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné, sur la base des taux obtenus par SRH, une population de 20 chevaux parmi les 62 chevaux présents sur le plateau technique de l'IFCE. En effet, en l'absence d'information sur l'effet de l'iPPVO sur les anticorps dirigés contre le virus de la grippe équine, nous avons choisi de sélectionner 20 chevaux présentant des réponses homogènes suite à un rappel vaccinal annuel. Ainsi, les niveaux d'anticorps anti-EIV mesurés étaient similaires dans les 2 groupes sur les mesures des 6 mois précédant le démarrage de l'étude.

Dans un deuxième temps, l'effet de l'iPPVO en tant qu'adjuvant du vaccin contre la grippe équine a été mesuré lorsque celui-ci est administré au moment d'un rappel vaccinal semi-annuel à proximité de la zone d'injection du vaccin. Nous avons mesuré la capacité de l'iPPVO à augmenter la réponse en anticorps grâce à deux tests SRH utilisant des souches d'EIV de Clade 1 et de Clade 2. Nous avons constaté la capacité de l'iPPVO à maintenir les niveaux d'anticorps jusqu'à 6 mois après les injections pour la souche EIV de clade 2. Une étude réalisée par Lunn et al. (2004) avait montré la capacité immunostimulante de l'iPPVO chez des chevaux lors d'une infection expérimentale en mesurant par SRH une augmentation du taux d'anticorps anti-EIV. L'effet de l'iPPVO sur la production d'anticorps contre la grippe équine a pu être observé. Les corrélats de protection associés à la méthode SRH ont permis d'établir que l'iPPVO était capable d'augmenter le niveau de protection des chevaux lors d'une vaccination semi-annuelle pour les souches EIV de Clade 1 et 2. Un cheval qui ne présente pas un niveau d'anticorps suffisant pour assurer une protection clinique après la vaccination annuelle peut être considéré comme un faible répondeur à la vaccination. Cette étude comprenait trois faibles répondeurs dans le groupe iPPVO et deux dans le groupe de contrôle pour la souche EIV Clade 1 et un mauvais répondeur dans le groupe iPPVO vis-à-vis de la souche EIV Clade 2. Les résultats montrent le potentiel de l'iPPVO à augmenter la réponse immunitaire chez un cheval faible répondeur. Si cette capacité était confirmée, l'iPPVO pourrait être intéressant pour renforcer la réponse immunitaire des chevaux faibles répondeurs. Ceci permettrait de limiter les risques à l'introduction de chevaux dans les haras. L'intérêt de ce travail réside également

dans la facilité d'utilisation car l'iPPVO est administré au même moment qu'un vaccin inactivé contenant un adjuvant de type ISCOMatrix, mais sur un autre site d'injection. Les vaccins inactivés et adjuvantés avec des ISCOMatrix ont entraîné dans de précédentes études une forte production d'anticorps (Hannant et al., 1993; Paillot et al., 2008). Les ISCOM ont également été associés à une bonne stimulation des réponses Th1 et Th2 (Paillot, 2014) et à une capacité à améliorer la présentation des antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (Sjölander et al., 1998; Villacres et al., 1998). De ce fait, l'iPPVO pourrait renforcer la capacité des ISCOM à potentialiser la réponse en anticorps contre l'EIV lorsqu'ils sont utilisés en combinaison. Des études *in vitro* menées sur des PBMC équins ont montré que le traitement par l'iPPVO entraînait une expression élevée d'IFN- α et IFN- β et de manière plus modérée d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL10 dans les premières 48h suivant le traitement (Horohov et al., 2008; Hue et al., 2017). De manière générale l'iPPVO est associé à une stimulation de la réponse inflammatoire. L'augmentation d'IFN- γ montre également la capacité de l'iPPVO à stimuler la réponse innée. Les effets immunostimulants de l'iPPVO combinés à ceux d'un vaccin inactivé contre la grippe équine contenant un adjuvant ISCOMatrix, pourraient expliquer l'augmentation et le maintien des anticorps chez les chevaux ayant reçu l'iPPVO. Une étude sur différentes combinaisons d'adjuvant dans un vaccin contre la fièvre aphteuse a montré qu'une combinaison de protéines recombinantes ISCOM et d'émulsion (Montanide ISA 206) était le meilleur choix pour obtenir des titres protecteurs précoces et une immunité plus durable (Bayry et al., 1999). Les combinaisons d'adjuvants comprenant les ISCOM sont peu étudiées à ce jour mais les résultats de notre étude montrent qu'il serait intéressant d'explorer davantage cette piste.

Cette étude a permis d'établir la preuve de concept de l'utilisation de l'iPPVO, sous sa forme commerciale, en tant qu'immunostimulant au cours du processus de vaccination des chevaux contre la grippe équine pour i) augmenter le niveau d'anticorps et ii) par conséquence le niveau de protection des chevaux et iii) maintenir ce niveau plus longtemps. De plus, cette étude a confirmé qu'un vaccin ne contenant pas de souche de Clade 2 était capable d'augmenter les niveaux d'anticorps anti-EIV contre une souche de Clade 1 et de Clade 2.

1.2. Preuve de concept de l'utilisation de l'impédancemétrie pour l'analyse de la réponse en anticorps neutralisant l'EIV

1.2.1. Introduction

Les anticorps neutralisants, produits en réponse à l'infection ou après l'immunisation, représentent la ligne de défense la plus importante contre l'infection par l'EIV. Ces anticorps ciblent l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) du virus et perturbent le cycle de la réplication virale en empêchant le virus de se fixer à la surface des cellules cibles (anticorps spécifique HA) ou d'être libérés (anticorps spécifique NA). Afin de déterminer le statut immunitaire des chevaux et de suivre l'évolution du taux d'anticorps faisant suite à une vaccination ou une infection, il est nécessaire d'avoir à disposition des outils spécifiques, sensibles et si possible faciles à mettre en œuvre.

Un indicateur pertinent de la stimulation de la réponse humorale est l'augmentation des anticorps neutralisants. Les principaux outils permettant de mesurer la réponse humorale chez le cheval sont aujourd'hui : le test d'hémolyse radiale simple (SRH) qui permet de mesurer le niveau d'anticorps fixant le complément, le test d'inhibition de l'hémagglutination qui permet de mesurer les anticorps dirigés contre l'hémagglutinine et des tests ELISA qui détectent les anticorps dirigés contre les nucléoprotéines virales du virus de la grippe équine. Le test de séroneutralisation actuel repose sur l'utilisation d'œufs de poules embryonnés (Yamanaka et al., 2015). Cette méthode nécessite un grand nombre d'œufs et la mise en œuvre ne peut être réalisée que dans des laboratoires spécialisés. Une nouvelle approche de la séroneutralisation basée sur le suivi en temps réel de la neutralisation du virus a été développée sur le système xCELLigence® (ACEA, Biosciences, CA, USA) et permet le suivi de la croissance cellulaire en temps réel. Ce système présente l'avantage de pouvoir analyser 6 plaques de culture de 96 puits simultanément, et le réseau de microélectrodes permet de mesurer les variations de valeurs d'impédance traduisant les modifications du nombre de cellules et de leurs morphologies (Solly et al., 2004). Ces variations sont retranscrites en un signal arbitraire appelé l'index cellulaire (CI – « Cell Index ») qui permet de quantifier le statut cellulaire de manière non invasive au cours du temps. Witkowski et al. ont développé un modèle de titrage des anticorps de poxvirus à l'aide de cette technologie (Witkowski et al., 2010). Récemment, une étude réalisée dans l'espèce équine a décrit pour la première fois le suivi en temps réel de la réponse immunitaire par un test de neutralisation des anticorps (RTNA) utilisant la technologie RTCA. Ce suivi des

anticorps sériques dirigée contre l'EHV-1 peut être réalisé chez des chevaux suite à une infection ou après vaccination (Sutton, 2021).

Si la méthode SRH est bien reconnue dans le suivi de la réponse à la vaccination contre la grippe chez le cheval, elle demeure une technique assez lourde à mettre en œuvre et la lecture qui fait appel à l'œil de l'expérimentateur peut présenter des biais. Aussi la mise en œuvre d'une méthode automatisée pouvant être réalisée sur un grand nombre d'échantillons présente un réel intérêt.

Ce travail présente la mise au point du suivi en temps réel (sur xCELLigence®) sur cellules MDCK, des anticorps anti-EIV issus de sérums équins caractérisés. La deuxième partie de l'étude porte sur l'analyse de la corrélation entre les mesures obtenues par ce système innovant et celles obtenues par la technique SRH.

1.2.2. Article 2

Flora Carnet, Gabrielle Sutton, Christine Fortier, Romain Paillot, Pierre-Olivier Vidalain & Stéphane Pronost. **Measurement of the antibodies neutralisation of the equine influenza virus by impedancemetry.** (En préparation pour soumission dans le journal *Veterinary Microbiology*).

1 **Measurement of neutralizing serum antibodies against equine influenza virus by**
2 **impedancemetry**

3 Flora Carnet^{1,2}, Gabrielle Sutton^{1,2}, Christine Fortier^{1,2,3}, Romain Paillot^{1,2,4}, Pierre-Olivier Vidalain⁵
4 & Stéphane Pronost^{1,2,3}

5 ¹LABÉO, 14280 Saint Contest, France;

6 ² Université de Caen Normandie, UNICAEN, BIOTARGEN UR 7450, F-14000 Caen, France;

7 ³ Normandie Univ, UNICAEN, PLATON Service Unit, ImpedanCELL, Caen, France

8 ⁴School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle,
9 Chelmsford CM1 3RR, United Kingdom;

10 ⁵ CIRI Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université
11 Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 69007, Lyon, France ; pierre-
12 olivier.vidalain@inserm.fr;

13 *Correspondence: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr

14

15 **Highlights**

16 Measurement of EIV neutralisation by Real-time cellular analysis.

17 Monitoring of equine influenza infection by Impedancemetry.

18 Impedancemetry could be used to screen the antibodies neutralising the EIV.

19 An alternative to conventional methods of studying EIV infection.

20

21 **Abstract**

22 The equine influenza virus (EIV) is responsible for equine influenza (EI), a disease associated with
23 the infection of the upper respiratory tract of equids. Beyond the welfare issue, equine influenza
24 epizooty can induce significant losses to the equine industry. Vaccination is the most important
25 strategy to prevent EIV infection. Several tools (Single Radial Haemolysis Test, Hemagglutination

1

26 inhibition test and seroneutralisation on eggs model) are available to monitor antibody levels in horse
27 sera. However, as EIV strains have limited growth ability in cell lines and induction of cytopathic
28 seroneutralisation on cell model is poor documented. Real-time cell analysis (RTCA) methods are
29 based on impedancemetry and microscopy to finely monitor cell cultures and present advantages
30 compared to mesure in end point. Their use has been described in the context of *in vitro* virus infection
31 and measurement of seroneutralisation (e.g: equine herpesviruses and West Nile virus). The current
32 study aimed to adapt RTCA methods to EIV. The method was validated by using EDQM and horses
33 sera previously characterized by SRH. A good correlation was observed between the two methods
34 ($R^2 = 0.6459$). RTCA methods were successfully used to measure the activity of neutralizing
35 antibodies against EIV infectious *in vitro*. RTCA could therefore be considered as appropriate for the
36 testing of sera to measure serum neutralisation.

37

38 **Keywords:** equine influenza virus, seroneutralisation, impedancemetry.

39

40 **1. Introduction**

41 Equine influenza (EI) is a major respiratory disease of horses caused by subtypes H7N7 and
42 H3N8 of influenza A virus. Equine influenza viruses (EIV) infect and replicate in epithelial cells of
43 the upper respiratory tract (Landolt, 2014). EIV infection is usually associated with an increase in
44 body temperature, nasal secretion, cough and respiratory distress. Mortality is infrequent but usually
45 due to secondary bacterial infection (Paillot, 2014).

46 Vaccination is used as prophylaxis to prevent epizootics caused by EIV. Neutralizing
47 antibodies, produced in response to infection or immunisation, represent the most important line of
48 defence against EIV infection (Paillot et al., 2006). These antibodies target the virus haemagglutinin
49 (HA) and neuraminidase (NA) and disrupt viral replication by preventing the virus from attaching to
50 the cell surface (HA-specific antibody) or its release (NA-specific antibody). Today, the humoral
51 response induced by vaccination or infection with EIV is usually characterized by measurement of
52 antibodies that (i) inhibit red blood cell haemagglutination by IAV (anti-HA) using the
53 Haemagglutination Inhibition test (HI) or (ii) activate the complement cascade using the Single Radial
54 Haemolysis (SRH) assay (Paillot, 2014). The SRH assay, which measures complement-mediated
55 lysis of red blood cells coated with whole virus, was introduced as a more reproducible assay for
56 measuring antibodies. In addition, antibody levels determined by SRH correlate with protection
57 against EIV infection and thresholds associated with virus shedding reduction and clinical protection
58 are well-established (Mumford et al., 1994; Newton et al., 2000). Although inhibition of the
59 cytopathic effect (CPE) is a standard procedure to measure neutralizing antibodies against IAV in
60 human samples, it is uncommon in the equine field. Indeed, most EIV strains have limited CPE in
61 cell cultures and neutralisation assays must be performed on embryonated chicken eggs (Yamanaka
62 et al., 2018). This conventional approach is cumbersome and requires a large number of eggs. An
63 assay using pseudotyped virus expressing EIV-HA has been developed (Kinsley et al., 2020; Scott et
64 al., 2012). This may represent an alternative in the future, but correlates of protection have yet to be
65 established.

66 New technologies such as impedancemetry are now available to quantify cellular stress and
67 detect more subtle modifications of cellular activity. Impedancemetry is using a grid of
68 microelectrodes covering the bottom of the wells to measure variations of impedance, which is
69 affected by cell count and attachment. It is thus able to quantify cell proliferation, rounding,
70 detachment and cell death (Solly et al., 2004). It is one of the new Real-Time Cell Analysis (RTCA)
71 methods which are “label free” and allow cell growth to be finely monitored. In the context of a virus
72 infection process, RTCA methods combining impedancemetry and microscopic monitoring make it
73 possible to understand the dynamic of viral infections. It can be used for screening molecules with a
74 potential antiviral activity and sera to detect the presence of neutralising antibodies (Limame et al.,
75 2012). Impedancemetry combined with microscopic monitoring has been successfully used to screen
76 compound libraries and select drugs that inhibit equine herpesvirus type 1 (EHV-1)(Thieulent et al.,
77 2019). The Real-Time Neutralisation Assay (RTNA) is a variation of the same method to measure
78 the presence of neutralizing antibodies in biological samples. It has been successfully used to detect
79 neutralizing antibodies against EHV-1 in the serum of horses after experimental infection or field
80 vaccination (Sutton, 2021). Impedancemetry was also used to measure CPE induced by human IAV
81 infection and to detect the presence of neutralizing antibodies in human sera (Tian et al., 2012).
82 However, there is no similar work that has been conducted on EIV.

83 The aim of this study was (i) to demonstrate that EIV infection can be monitored by
84 impedancemetry in cell culture, and then (ii) to develop an assay to measure the presence of
85 neutralisation antibodies against EIV in horse serum. Finally, a correlation was established between
86 the protection thresholds described in SRH and the values obtained by impedancemetry. We propose
87 to use this RTNA as an alternative to SRH for monitoring the serological status and protection level
88 of equine populations.

89

90 **2. Materials and methods**

91 *2.1. Cells*

92 MDCK (NBL-2) cells (ATCC[®] CCL-34[™]) were maintained in Eagle's Minimum Essential
93 Medium (EMEM; ATCC[®]) supplemented with 10% foetal calf serum (Eurobio, Courtaboeuf,
94 France), 100 IU/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B (Eurobio) at
95 37°C and 5% CO₂. For the virus infection, the EMEM was supplemented with antibiotics as above
96 and with TPCK-trypsin (trypsin Tosyl Phenylalanyl Chloromethyl Ketone treated; Sigma-Aldrich).

97

98 2.2. *Virus*

99 The EIV strain A/equine/Jouars/4/2006 (H3N8, Florida Clade 2 sub-lineage) was used in this
100 study (Fougerolle et al, Virology, 2017). The titre of the stock was 4.9×10^3 TCID₅₀/ml.

101

102 2.3. *Equine sera*

103 Seven equine sera previously characterized by SRH (Fougerolle et al., 2019) were used for
104 developing the assay: one reference serum (sera #1; Equine influenza subtype 2 American-like/South
105 Africa/4/03, reference EU SA/4/03 Y0000712, European Directorate for the Quality of Medicines
106 and Healthcare (EDQM); 200 mm²) and sera #1 to #2 with high SRH titres (222.05 mm² and 251.65
107 mm², respectively), sera #3 and #4 with intermediate SRH titres (123.42 mm² and 81.67 mm²), and
108 sera #5 and #6 that were negative (SRH titres = 0 mm²).

109 To determine the correlation between SRH titres and RTNA values, we used the EDQM serum
110 and 100 sera randomly selected from the 6 sera described above and 301 additional sera with the
111 following characteristics: 205 sera with high SRH titres (150 to 254 mm²), 65 sera with intermediate
112 SRH titres (91 to 149 mm²), 20 with low SRH titres (27 to 81.7 mm²) and 17 sera with negative SRH
113 titres (0 mm²). This experiment follows the CONSORT 2010 guidelines (Supplementary Figure 1).

114

115 2.4. *Real-time neutralisation assay*

116 Impedance-based cell monitoring was performed with the RTCA MP system (ACEA
117 Biosciences, CA, USA) with 96-well E-plates (ACEA Biosciences). Impedance, which depends on

118 cell count and adhesion, is translated in a dimensionless value, the Cell Index (CI) and is graphically
119 represented (Abassi et al., 2011). The background value was determined with EMEM alone in each
120 well. Cells were seeded (1.6×10^4 per well), incubated at room temperature for 30 min and then
121 placed into the device located in the incubator. After 24 h of incubation, medium was refreshed and
122 cells were infected with EIV (T = 0 hpi) with or without pre-incubation in the presence of equine
123 serum (neutralisation assay). To determine antibody titres, a two-fold dilution series of each serum
124 was prepared. Then, 16 μ l of each dilution were incubated for 1 h at 37°C with an equal volume of a
125 1/10 dilution of the EIV stock, and added to cells in a final volume of 100 μ L of culture medium
126 containing TPCK-trypsin (0.25 μ g/mL). Negative controls were mock infected with medium and
127 TPCK-trypsin. Cultures were incubated at 37°C, and the CI values were recorded for 120 h from the
128 start of the experiment (cell seeding). According to the manufacturer's recommendations, CI values
129 were first normalised (CIn) to match the last time point before cell infection using the RTCA software
130 version 2.0 (ACEA Biosciences) prior to data analysis. Cell morphology and CPE were observed
131 using the IncuCyte S3 system (Essen Bioscience, Ann Arbor, Michigan, USA). Three independent
132 experiments were performed.

133 Neutralizing antibody titres were calculated as previously described (Sutton, 2021). First, the
134 percentage of inhibition (inhibition %) for each dilution point was calculated after 120 h of culture
135 post infection using the area under the curve (AUC) from mock-infected (AUC_{mi}) and EIV-infected
136 (AUC_i) control conditions, as follows:

$$137 \quad \text{inhibition\%} = 100 * (1 - (AUC_{mi} - AUC_{dilution}) / (AUC_i - AUC_{mi}))$$

138 Inhibition percentages and their corresponding serum dilution then allowed the determination of the
139 sera dilution inhibiting EIV infection by 50% (IC₅₀). The distribution of the inhibition percentage was
140 determined on GraphPad PRISM® 7.04 (San Diego, CA, USA).

141 The neutralising titre 50 in impedancemetry (NT₅₀) was determined as follow:

$$142 \quad NT_{50} = 1/IC_{50}$$

143

144 The specificity of the recorded signals was measured by qPCR by quantifying the EIV genome (data
145 not shown).

146

147 2.4 Single Radial Haemolysis

148 The SRH assay was used to measure EIV-specific antibody levels in horse serum and was
149 performed according to the WOAHA recommendations, 2019 (OIE - World Organisation for Animal
150 Health, 2019). Briefly, EIV strains (A/equine/Jouars/4/06 (H3N8; Florida Clade 2)) were used as a
151 source of SRH antigens. Sheep red blood cells were coated with EIV by incubation at +4 °C for 10
152 min. Next, a solution of CrCl₃ was added to the mixture (1:400 dilution of a stock solution at 2.25
153 M) and incubated for 10 min at room temperature. After centrifugation to isolate red blood cells (10
154 min, 1000 rpm, 22 °C), the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in buffered
155 saline (HEPES supplemented with albumin bovine serum 2.10⁻³ mg/ml). Then, the solution was
156 mixed with an agarose solution (1%) and guinea pig complement (IDvet, Grabels, France, ref CPLT-
157 2x5ML). The agarose gel was then stamped to make wells into which 10 µL of test and control sera
158 were placed. Sera were previously decomplexed at 56 °C for 30 min. The plates were incubated
159 for 24 h at 42 °C before reading. A clear haemolytic zone appeared around the well when anti-
160 influenza antibodies coupled to complement lysed the antigen-coated red blood cells. The size of the
161 zone was directly proportional to the level of strain-specific antibodies in the serum. A haemolysis
162 area of less than 85 mm² indicates a non-immune horse; between 85 mm² and 150 mm², the horse is
163 clinically protected; above 150 mm², the horse is virologically protected (Mumford et al., 1994;
164 Newton et al., 2000). Control antiserum from EDQM was included on each plate (A/equine/South
165 Africa/4/03 reference EU SA/4/03 Y0000712, EDQM for antigen A/equine/Jouars/4/06).

166

167 2.5. *Statistical analyses:*

168 Statistical analysis was performed using GraphPad PRISM® 7.04 (San Diego, CA, USA).
169 The impedance curves were analysed in measurement of area under curve (AUC). For %AUC

170 analysis comparing the effect of different concentrations of TPCK-trypsin on cells with and without
171 virus, mock infected cells without TPCK-trypsin are used as a reference. For the analysis of the effects
172 of viral dilution as a function of TPCK-trypsin concentration, the mock infected cells with TPCK-
173 trypsin are used as reference. Statistical analyses were carried using Student's t-tests for compared
174 difference between the percentages of area under curve. Values of $p < 0.05$ were considered
175 statistically significant. A receiver operating characteristic (ROC) test was used to test the correlation
176 between the RTNA method and the SRH method and to determine the different protection thresholds
177 for the RTNA method. The analyses were performed using the RStudio Team version 4.1.3 (2022-
178 03-10 RStudio: Integrated Development Environment for R, Boston, MA.).

179

180 **3. Results**

181 *3.1. Real time monitoring of EIV infection by RTCA*

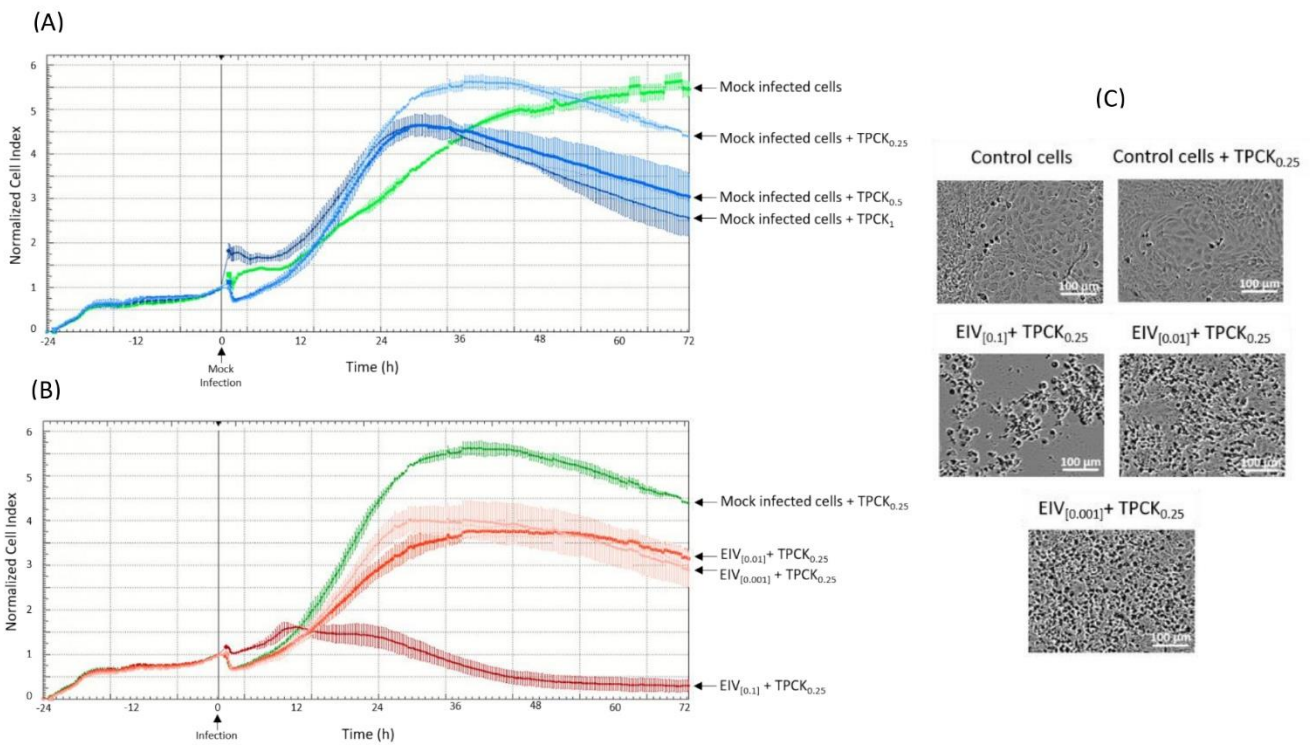
182 TPCK-trypsin is essential for EIV infection *in vitro*. It cleaves and activates the viral
183 hemagglutinin HA that *in vivo* is processed by enzymes expressed in the respiratory tract. In order to
184 determine the maximal concentration that does not affect cell growth, MDCK cells were cultivated
185 in the presence of TPCK-trypsin at different concentrations and viability was monitored by
186 impedancemetry. During the first 24 h after seeding, the CIn increased due to cell adhesion and
187 multiplication (Figure 1A). At this point (T = 0 hpi), the culture medium was replaced with fresh
188 culture medium with or without three different concentrations of TPCK-trypsin (1, 0.5 and 0.25
189 $\mu\text{g/ml}$). From 0 hpi to 36 hpi without TPCK-trypsin, the CIn further increased as a result of cell
190 multiplication. In the presence of TPCK-trypsin (blue curves), a slight decrease in CIn values was
191 observed after 36 h of culture. TPCK-trypsin at 0.25 $\mu\text{g/ml}$ had the lowest impact on cell proliferation
192 and was selected for the following experiments.

193 Cells were infected with three dilutions of the viral stock (4.9×10^3 TCID₅₀/ml;
194 A/equine/Jouars/4/2006 strain), and CIn values were monitored for 72 h. In cell cultures infected with

8

195 a 1/10 dilution of the viral stock, the CIn quickly decreased to reach zero (Figure 1B). When 1/100
 196 and 1/1000 dilutions of the EIV stock were used, CIn values were lower than in the mock-infected
 197 control but the curves showed similar shapes.

198 The results were confirmed by microscopy, as shown in Figure 1C. At 72 hpi, a 1/10 dilution
 199 of the EIV stock induced significant CPE. When 1/100 and 1/1000 dilutions were used, the integrity
 200 of the cellular layer was maintained but rounded cells, sometimes floating in suspension, and clusters
 201 were present. Therefore, we decided to use the 1/10 dilution of EIV for antibody titration by RTNA.



202

203 **Figure 1. Determination of optimal trypsin-TPCK concentration and consequences of EIV**
 204 **infection on MDCK proliferation and morphology analysed by RTCA.** All normalized Cell Index
 205 (CIn) values determined by impedancetry were normalised using the last measure before infection of
 206 the cells (black vertical line). (A) The green curve represents the CIn values of untreated cultures and
 207 the blue curves correspond to the CIn values for different concentrations of TPCK-trypsin. (B) The
 208 green curves represent the CIn values of mock-infected cells and the curves in red represent the CIn

209 values of cells infected with three different dilutions of the viral stock (0.1, 0.01, and 0.001). Each
210 data point indicates the means \pm SD of one assay in duplicates. Three independent experiments were
211 performed. (C) Microscopic observation of MDCK cells infected or not with EIV at 72 hpi.
212 Microscope lens: x20; scale bar: 100 μ m.

213

214 3.2 Neutralisation activity of anti-EIV antibodies

215 3.2.1 RTNA method

216 To measure neutralizing antibodies, EIV was pre-incubated with different equine sera, whose
217 antibody level was previously defined by the SRH assay. The reference EDQM serum containing an
218 EIV-specific SRH antibody titre (#EDQM: 200 mm²) potently inhibited the decrease in CIn values
219 due to EIV infection (Figure 2A). Similar results were obtained with the two sera with a high SRH
220 titre (#1: 222.5 mm², #2: 251.65 mm²; Figure 2B) and with the two sera with intermediate SRH titres
221 (#3: 123.42 mm², #4: 81.67 mm²; Figure 2C). In contrast, the two negative sera #5 and #6 (SRH titre
222 = 0 mm²) did not prevent the CIn decrease induced by EIV infection (Figure 2D). This demonstrates
223 that the presence of neutralizing antibodies against EIV can be detected by impedancemetry.

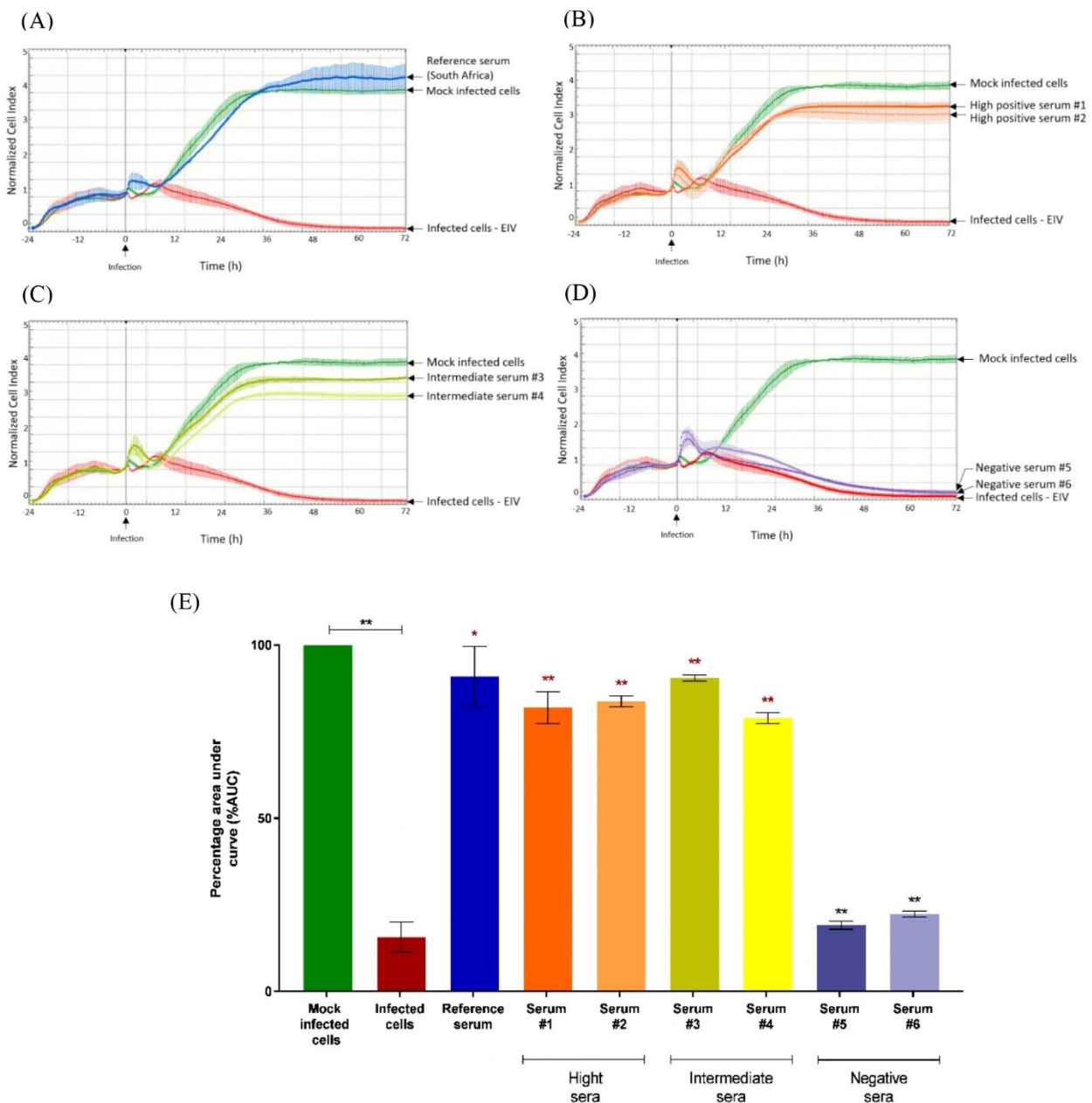
224

225 3.2.2 Comparison of RTNA and SRH

226 To quantify the inhibitory effect of horse sera, the area under the curve (AUC) was calculated
227 for the mock-infected condition (AUC_{mi}) and the EIV-infected conditions, in the absence (AUC_i) or
228 in the presence of horse sera (AUC_{sera}). Results were expressed as a percentage (%AUC) relative to
229 the mock-infected condition. In the EIV-infected condition, the AUC was much lower than in the
230 mock-infected condition as shown in Figure 2E (16% \pm 3.7%; p-value = 0.0071). The %AUC for the
231 EDQM reference serum (#reference) and the two sera with high SRH titres (#1 and #2) were 92.9%
232 \pm 10.3%, 83.8% \pm 3.6% and 85.6% \pm 5.6%, respectively. These values were significantly higher than
233 the %AUC of infected cells without serum with p-values of 0.0147, 0.0045 and 0.0023, respectively).
234 The %AUC of the two intermediate sera (#3 and #4) was 92.4% \pm 1.8% and 80.7% \pm 1.2%,

10

235 respectively. These values were significantly higher than the %AUC of infected cells with p-values
 236 of 0.0018 and 0.0026, respectively. The %AUC of the two negative sera (#5 and #6) was very low as
 237 expected ($19.6\% \pm 2.5\%$ and $23.6\% \pm 2.9\%$), but was significantly different from the mock-infected
 238 control (p-value_{#5} = 0.0064 and p-value_{#6} = 0.0069). This shows that negative sera have a weak,
 239 although significant, inhibitor effect on EIV infection which could be explained by the antigen
 240 independent interaction of serum proteins with viral particles. Nevertheless, results obtained clearly
 241 demonstrate that only immune sera potently inhibit the decrease in CIn values due to EIV infection.



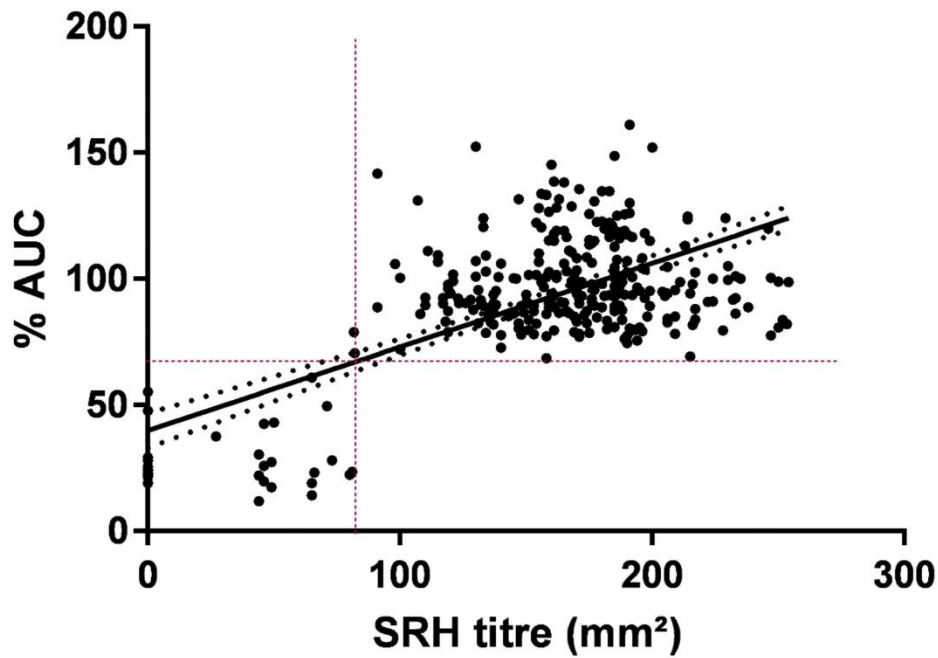
242 **Figure 2. Real time monitoring by impedancemetry of MDCK cells infected by EIV and treated**
243 **by different horse sera with known SRH antibody titres. MDCK cells were infected with EIV**
244 **alone or pre-incubated with** EDQM reference sera (A), two sera with high antibody titres (B), two
245 sera with intermediate antibody titres (C) and to negative sera (D). CIn values were acquired from
246 the time of infection to 72 hpi, and were normalised to the last time point before infection (black
247 vertical line). The green curve represents the CIn values of mock-infected cells and the red curve
248 represents the CIn values of EIV-infected cells without serum. The other coloured curves correspond
249 to CIn values of cells infected with EIV pre-incubated with the different sera: the EDQM reference
250 serum is displayed in blue, sera #1 and #2 with high antibody titres are in orange; sera #3 and #4 with
251 intermediate antibody titres are in yellow and negative sera #5 and #6 are in purple. Each data point
252 indicates the means \pm SD of one assay in duplicates. (E) %AUC of the different experimental
253 conditions. Results are the means \pm SEM of two independent experiments. Black stars correspond to
254 significant differences in the %AUC compared to the mock-infected condition (t-test; * for $p < 0.05$
255 and ** for $p < 0.005$). Red stars represent significant differences in the %AUC for the conditions with
256 sera compared to infected cells without sera.

257

258 *3.3. Comparison of SRH titres and neutralizing effects measured by impedancemetry for 308 horse* 259 *sera*

260 To further support the ability of this assay to detect neutralizing antibodies against EIV, we analysed
261 308 sera and compared SRH titres to %AUC values. Figure 3 shows the correlation between %AUC
262 and SRH titre values. The R factor of 0.5779 (95% CIn 0.7088 – 0.8035; $p < 0.0001$) obtained by ROC
263 test showed a correlation between the SRH titres and the %AUC values. Results showed that the
264 samples with an SRH titre value under 85 mm² (corresponding to unprotected horses) were related to
265 a %AUC under 71%. Conversely, this suggests that when the %AUC is above this threshold, horses
266 are clinically protected according to the Mumford definition (Mumford et al., 1994).

267



268

269 **Figure 3. Linear regression modelling the correlation between the SRH titre and the %AUC**
 270 **for 308 horse sera.** ROC test shows $R^2= 0.5779$ (95% CIn 0.7088 – 0.8035; $p<0.0001$). The vertical
 271 red line represented the limit of protection value in SRH (85 mm²) and the horizontal red line
 272 highlights the corresponding %AUC value that is 71%. All %AUC values are available in
 273 Supplementary Table 1.

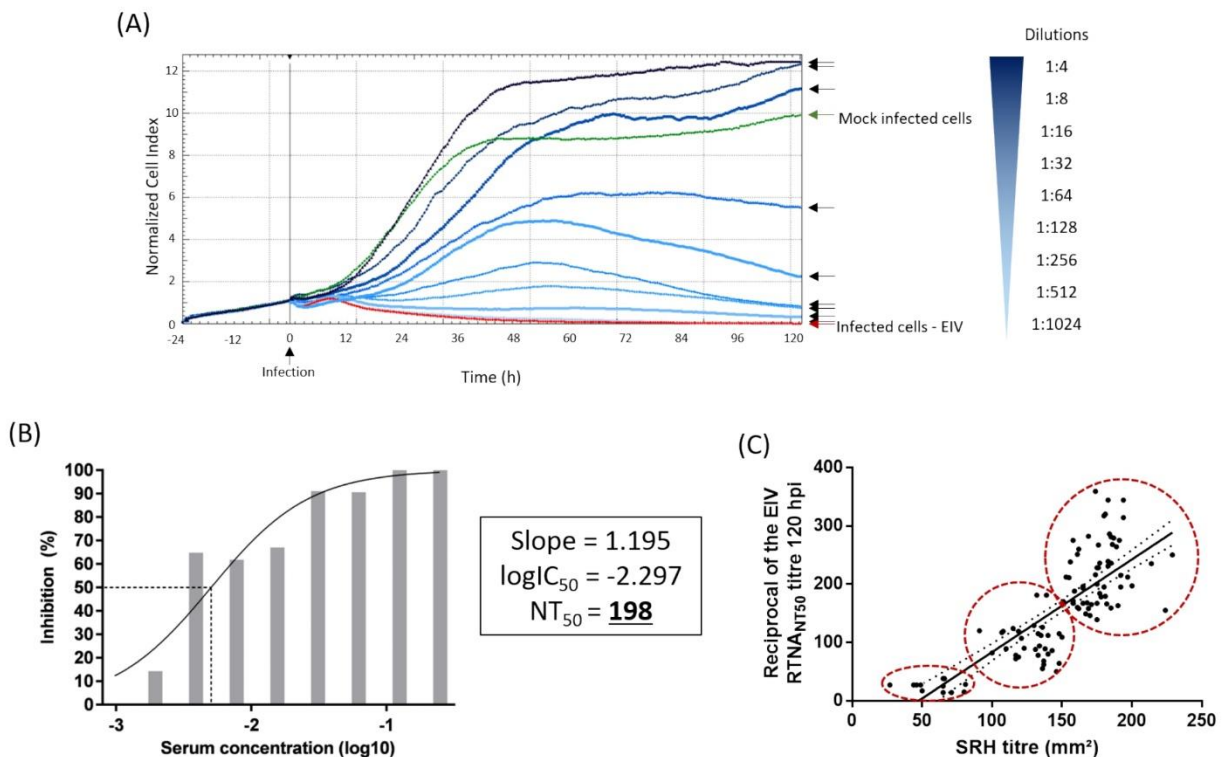
274

275 *3.4 Correlation between the protection thresholds described in SRH and the values obtained with*
 276 *RTNA*

277 The %AUC is only a crude estimation of the neutralizing activity of a serum sample because
 278 only a single dilution is tested. In order to obtain a neutralizing titre by impedancemetry, we tested a
 279 total of 101 horse sera with well-defined SRH titres at different dilutions ranging from 1:4 to 1:1024.
 280 We first tested the EDQM reference serum, and Figure 4A shows the kinetic of CIn values obtained
 281 for the different dilutions of serum. As expected, CIn values decreased along with serum dilution with
 282 last three dilutions (i.e. 1:256; 1:512 and 1:1024) being undistinguishable from the EIV-infected
 283 control without serum.

13

284 In order to calculate a neutralizing titre from impedancemetry data, we first calculated for
 285 each serum dilution of percentage of inhibitory effect using AUC values. The infected control was
 286 used as background and results were normalized to the mock-infected control (see Material and
 287 Methods for details). From the dose-response curve (Figure 4B), we calculated the half-maximal
 288 inhibitory concentration (IC₅₀) of serum using the four-parameter logistic curve model. Finally,
 289 results can be expressed as a half-maximal neutralizing titre (NT₅₀) by calculating the inverse of the
 290 IC₅₀ value. This gives a value of 198 for the EDQM serum (SRH titre; 222.5 mm²). The same
 291 approach was used to determine the NT₅₀ values of the other sera and results are presented in
 292 supplementary Table 1. The samples with SRH titres under 85 mm² showed NT₅₀ values under 44,
 293 the samples with SRH titres between 85 and 150 mm², which correlates with clinical protection, had
 294 NT₅₀ values between 44 and 134, and the samples with SRH titre above 150 mm², which correlates
 295 with virological protection, had NT₅₀ values above 134. These three groups are represented by the 3
 296 dotted circles in Figure 4C.



297 **Figure 4. Calculation of the half-maximal neutralisation titre (NT₅₀) from impedancemetry**
 298 **data and correlation with SRH titres. (A) Kinetic curves of CIn values from MDCK cells infected**

299 by EIV pre-incubated with dilutions of EDQM reference serum. A two-fold serial dilution of the
300 EDQM reference serum, from 1:4 to 1:1024, was prepared before incubation with the virus. At the
301 indicated time point (black arrow), the cells were inoculated with the serum-virus mixture and CIn
302 values were monitored for 120 h. (B) The inhibition of EIV-induced CPE was calculated from %AUC
303 from the curves presented in (A), and plotted as function of serum dilution. The IC₅₀ value is
304 indicated by the dotted line, and corresponds to a NT₅₀ of 198 for the EDQM reference serum. (C)
305 Correlation between the SRH titre (mm²) and the NT₅₀ values obtained by impedancemetry. The
306 black line represented linear correlation line between SRH titre and NT₅₀ values. The threshold was
307 determined with ROC test $R^2 = 0.6459$ (95% CI 1,368 - 1,836; $p < 0.0001$). The dotted circles
308 correspond to unprotected, clinically protected and virologically protected animals according to SRH
309 titres.

310

311 **4. Discussion**

312 With the occurrence of equine influenza epizootics, it is essential to vaccinate animals and
313 to monitor the immune status of the equine population. In equids, the antibody response is mainly
314 evaluated with the haemagglutination inhibition (HI) test and SRH methods. The standard method to
315 measure neutralizing antibodies in equine serum samples is based on the infection of embryonated
316 chicken eggs (Yamanaka et al., 2015), which is a time consuming and cumbersome procedure. EIV
317 neutralisation tests performed in cell cultures are an attractive alternative. Virus neutralisation tests
318 have the advantage of detecting functional antibodies to a specific influenza virus, which may suggest
319 protective immunity after vaccination or infection (Chambers and Reedy, 2014). However, they have
320 to be robust and simple enough to be implemented in high-throughput settings to analyse large
321 collections of sera. Here, the real-time cell analysis methods xCELLigence® and IncuCyte® were
322 used to detect the phenotypic changes induced by EIV infection in MDCK cells. We showed that the
323 EIV strain A/equine/Jouars/4/2006 infects MDCK cells as assessed by much lowered CIn values
324 compared to uninfected controls and CPEs observed under the microscope. In 2012, Tian et al

325 developed a similar method model for studying infections by human influenza A virus (H1N1)(Tian
326 et al., 2012). The authors showed that the RTCA analysis of influenza A virus distinguished different
327 infection kinetics between strains despite similar clinical characteristics. The authors showed that the
328 RTCA used for human influenza allowed the virulence of strains to be analysed in vitro (Tian et al.,
329 2012). The analysis of the infectivity of several strains of equine influenza virus was not performed
330 in this study but it would be interesting to analyse the infection capacity of different strains of EIV
331 by RTCA.

332 We then used this technology to measure neutralizing antibodies in horse serum samples as
333 previously performed for human influenza A viruses (Tian et al., 2012). Sera with a high neutralizing
334 activity as determined by other methods allowed cell growth comparable to that of mock-infected
335 cells as assessed by increasing CIn values. When serum was diluted, the protective effect vanished
336 and CIn values decreased as a consequence of EIV infection and CPEs. Surprisingly, some sera with
337 high levels of neutralizing antibodies showed CIn values that were even higher than the mock-
338 infected control. This observation can be explained by the fact that some sera are very rich in growth
339 factors that boost cell cultures (Yao and Asayama, 2017). Conclusions made on single CIn values
340 remained valid when taking into account all the points of the kinetics by calculating the %AUC. The
341 agreement observed between %AUC values and the SRH titres suggests that the system can be used
342 to accurately quantify antibody titres. Sera with a %AUC similar to that of infected cells are
343 considered negative. Sera with a %AUC greater than that of infected cells are considered positive for
344 EIV antibody. Nevertheless, our study was carried out with only a small number of sera presenting
345 low titre ($<85\text{mm}^2$) which could modify the level of this correspondence and the threshold values
346 (%AUC: 71%) defined with this seroneutralisation method. It would be interesting to test a larger
347 number of samples with low antibody levels but obtaining this type of sample was made difficult by
348 the high rate of vaccination in France (Fougerolle et al., 2019). However, this first approach based on
349 undiluted serum is suitable for testing a large number of samples all at once. Despite limitations, it
350 was possible to establish a threshold based on CIn values to discriminate protected from unprotected

351 horses. This first approach only requires a very small volume of serum and could be interesting for
352 the screening of numerous samples in only 72 h and with little handling.

353 The second approach is more accurate as it is based on the testing of several dilutions of each
354 serum and allows the calculation of a neutralisation titre, the NT50 value. As this experiment required
355 to work with a minimum of 8 dilutions of each serum, we chose not to work on the 308 sera but on a
356 large subset of 101 samples to limit the number of wells. A good correlation was found between SRH
357 and NT50 values. However, as previously explained, it would be interesting to screen a larger number
358 of sera below the SRH protection threshold as well as sera with values leading to clinical protection
359 in SRH. It is likely that by increasing the number of sera, it will be possible to more precisely define
360 the protection thresholds.

361 Furthermore, this study showed that sera with high SRH titre values had more dispersed NT50
362 values. Optimising protection thresholds is important for the development of equine influenza virus
363 seroneutralisation methods and application to antibody response studies (Kinsley et al., 2020; Scott
364 et al., 2016). Kinsley et al. (2020) showed that the use of a serum neutralisation test, which may be
365 less discriminating than the SRH test, would explain why it is more difficult to correlate this type of
366 data with clinical or virological protection (Kinsley et al., 2020). Although this study was based on
367 the use of pseudovirus and not an EIV virus as performed in the present study, the findings could be
368 similar which would explain why some sera characterised as clinically or virologically protected by
369 SRH appear outside the thresholds determined by RTNA.

370 The differences observed between the results of SRH and impedance neutralisation could be
371 explained by the fact that these two methods do not measure the same antibodies. The SRH method
372 measures haemolysis which reflects the binding of antibodies and the activation of complement,
373 whereas RTNA measures antibodies that bind HA and prevent virus entry. The correlation observed
374 in this study are in agreement with previous reports on EIV showing that antibodies measured by
375 SRH and HI tests correlate strongly with the levels of neutralizing antibodies (Kinsley et al., 2020;
376 Morley et al., 1995; Scott et al., 2016). Serum neutralisation measurement studies have already been

377 performed by impedancemetry on poxvirus-specific antibodies (Witkowski et al., 2010), human
378 enteroviruses (Teng et al., 2013), human influenza (Tian et al., 2012) and equine herpesvirus-1
379 (Sutton, 2021). A method for measuring serum neutralisation of human influenza virus has shown a
380 correlation between antibody titres measured with the RTCA device and values measured by the HI
381 test (Tian et al., 2012). Serum neutralisation measured by impedancemetry saves time and allows a
382 very large number of sera to be screened at the same time. This technique can be useful when
383 screening sera for the first time when the number of samples is high in order to determine the presence
384 or absence of anti-EIV antibodies. This may be the case before competitions involving a large number
385 of horses, in order to verify that the expected level of protection has been reached after vaccination.
386 This method would also be very useful for confirming the immunogenicity of target species of EIV
387 vaccines. Currently, the humoral response induced by EIV vaccination is characterised by the
388 measurement of haemagglutination inhibitory (anti-HA) and/or complement binding (SRH)
389 antibodies. Few data are available on the induction of EIV-neutralising antibodies that inhibit cellular
390 infection. This new high-throughput method of analysing the EIV neutralising antibody response
391 could expand the range of methods for studying antibodies to equine influenza.

392

393 **5. Conclusion**

394 This study confirms the effectiveness of the RTCA method in recording viral infection with equine
395 influenza virus on MDCK cells. This is the first study of the measurement of the neutralisation of an
396 equine influenza virus by impedance measurement (RTNA). In addition, the measurement of viral
397 neutralisation by equine sera is an interesting tool for screening many sera in a short time. In
398 conclusion, impedance measurement is an interesting tool to complement the range of study methods
399 in equine virology.

400

401

402

403 **Acknowledgement**

404 This project was supported by the CENTAURE CPER, the EPERON Funds and the IFCE
405 (OVERLORD2 Project).

406

407 **References**

- 408 Abassi, Y.A., Sieler, A., Watzele, M., Wang, X., Xu, X., 2011. Dynamic and Label-Free Cell-Based
409 Assays Using the xCELLigence System, in: Label-Free Technologies for Drug Discovery.
410 John Wiley & Sons, Ltd, pp. 71–81. <https://doi.org/10.1002/9780470979129.ch5>
- 411 Chambers, T.M., Reedy, S.E., 2014. Equine influenza serological methods. *Methods Mol. Biol.*
412 Clifton NJ 1161, 411–422. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_36
- 413 Fougereolle, S., Fortier, C., Legrand, L., Jourdan, M., Pitel, C.M., Pronost, S., Paillot, R., 2019.
414 Success and Limitation of Equine Influenza Vaccination: The First Incursion in a Decade of
415 a Florida Clade 1 Equine Influenza Virus that Shakes Protection Despite High Vaccine
416 Coverage. *Vaccines* 7, 174. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040174>
- 417 Gauger, P.C., Vincent, A.L., 2014. Serum Virus Neutralization Assay for Detection and Quantitation
418 of Serum-Neutralizing Antibodies to Influenza A Virus in Swine, in: Spackman, E. (Ed.),
419 Animal Influenza Virus, *Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 313–
420 324. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_26
- 421 Kinsley, R., Pronost, S., De Bock, M., Temperton, N., Daly, J.M., Paillot, R., Scott, S., 2020.
422 Evaluation of a Pseudotyped Virus Neutralisation Test for the Measurement of Equine
423 Influenza Virus-Neutralising Antibody Responses Induced by Vaccination and Infection.
424 *Vaccines* 8, 466. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030466>
- 425 Landolt, G.A., 2014. Equine Influenza Virus. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 30, 507–522.
426 <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.003>
- 427 Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., Pauwels,
428 P., 2012. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments
429 by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* 7, e46536.
430 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046536>
- 431 Morley, P.S., Hanson, L.K., Bogdan, J.R., Townsend, H.G.G., Appleton, J.A., Haines, D.M., 1995.
432 The relationship between single radial hemolysis, hemagglutination inhibition, and virus
433 neutralization assays used to detect antibodies specific for equine influenza viruses. *Vet.*
434 *Microbiol.* 45, 81–92. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00105-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00105-6)

435 Mumford, J.A., Jessett, D., Dunleavy, U., Wood, J., Hannant, D., Sundquist, B., Cook, R.F., 1994.
436 Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines.
437 Vaccine 12, 857–863. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90297-6](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90297-6)

438 Newton, J.R., Townsend, H.G.G., Wood, J.L.N., Sinclair, R., Hannant, D., Mumford, J.A., 2000.
439 Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young
440 Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2
441 viruses (H3N8). *Equine Vet. J.* 32, 65–74. <https://doi.org/10.2746/042516400777612116>

442 OIE - World Organisation for Animal Health, 2019. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for
443 Terrestrial Animals., Equine influenza (infection with equine influenza virus). Available
444 online: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm

445 Paillot, R., 2014. A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination.
446 Vaccines 2, 797–831. <https://doi.org/10.3390/vaccines2040797>

447 Paillot, R., Hannant, D., Kydd, J.H., Daly, J.M., 2006. Vaccination against equine influenza: quid
448 novi? *Vaccine* 24, 4047–4061. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.030>

449 Scott, S., Molesti, E., Temperton, N., Ferrara, F., Böttcher-Friebertshäuser, E., Daly, J., 2012. The
450 use of equine influenza pseudotypes for serological screening. *J. Mol. Genet. Med. Int. J.*
451 *Biomed. Res.* 6, 304–308.

452 Scott, S.D., Kinsley, R., Temperton, N., Daly, J.M., 2016. The Optimisation of Pseudotyped Viruses
453 for the Characterisation of Immune Responses to Equine Influenza Virus. *Pathog. Basel*
454 *Switz.* 5, 68. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040068>

455 Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., Zheng, W., 2004. Application of Real-Time Cell
456 Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays. *ASSAY Drug Dev. Technol.*
457 2, 363–372. <https://doi.org/10.1089/adt.2004.2.363>

458 Sutton, G., 2021. Étude phylogénique de souches d’alphaherpèsvirus isolées chez les équidés français
459 et développement d’un outil innovant pour la mesure des anticorps neutralisants après
460 infection ou vaccination (These de doctorat). Normandie.

461 Teng, Z., Kuang, X., Wang, J., Zhang, X., 2013. Real-time cell analysis--a new method for dynamic,
462 quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *J. Virol.*
463 *Methods* 193, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.034>

464 Thieulent, C.J., Hue, E.S., Fortier, C.I., Dallemagne, P., Zientara, S., Munier-Lehmann, H., Hans, A.,
465 Fortier, G.D., Pitel, P.-H., Vidalain, P.-O., Pronost, S.L., 2019. Screening and evaluation of
466 antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular
467 assay. *Virology* 526, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013>

468 Tian, D., Zhang, W., He, J., Liu, Y., Song, Z., Zhou, Z., Zheng, M., Hu, Y., 2012. Novel, real-time
469 cell analysis for measuring viral cytopathogenesis and the efficacy of neutralizing antibodies

470 to the 2009 influenza A (H1N1) virus. *PloS One* 7, e31965.
471 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031965>

472 Witkowski, P.T., Schuenadel, L., Wiethaus, J., Bourquain, D.R., Kurth, A., Nitsche, A., 2010.
473 Cellular impedance measurement as a new tool for poxvirus titration, antibody neutralization
474 testing and evaluation of antiviral substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 401, 37–41.
475 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.003>

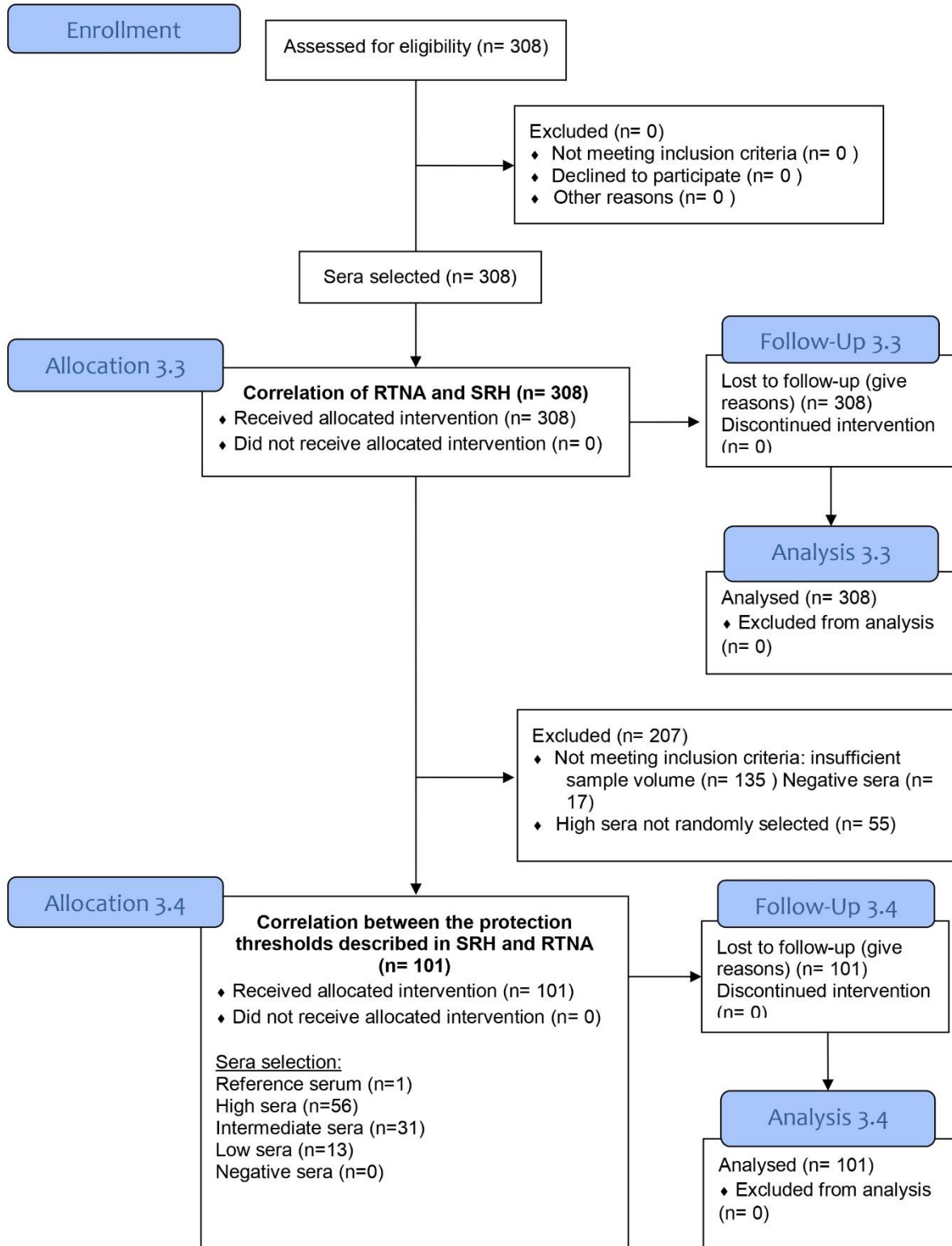
476 Yamanaka, T., Cullinane, A., Gildea, S., Bannai, H., Nemoto, M., Tsujimura, K., Kondo, T.,
477 Matsumura, T., 2015. The potential impact of a single amino-acid substitution on the efficacy
478 of equine influenza vaccines. *Equine Vet. J.* 47, 456–462. <https://doi.org/10.1111/evj.12290>

479 Yamanaka, T., Nemoto, M., Bannai, H., Tsujimura, K., Matsumura, T., Kokado, H., Gildea, S.,
480 Cullinane, A., 2018. Neutralization antibody response to booster/priming immunization with
481 new equine influenza vaccine in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 80, 382–386.
482 <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0538>

483 Yao, T., Asayama, Y., 2017. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues.
484 *Reprod. Med. Biol.* 16, 99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>

485

CONSORT 2010 Flow Diagram: Measurement of the antibodies neutralisation of the equine influenza virus by impedancemetry



Supplementary Figure 1 CONSORT Flow diagram adapted to CONSORT 2010.

Supplementary Table 1: Screening of 308 sera for determined their effect in viral EIV neutralisation. For each compound, the following values are provided: the area under curve provided to normalised Cell Index curve (AUC), the %AUC and the $RTNA_{NT50}$ for selected sera. N.D., not defined.

	Sample name	SRH titre value (mm ²)	AUC	%AUC	$RTNA_{NT50}$
Hight sera	EDQM reference serum	200	209	92.9	198
	Hight serum #1	222.05	188.5	83.8	179
	Hight serum #2	251.7	192.5	85.6	N.d.
	1	191	211.6	92	N.d.
	2	190	204.7	89	N.d.
	3	233	230	100	N.d.
	4	224	255.3	111	N.d.
	5	197	207	90	N.d.
	6	250	207	90	N.d.
	7	215	232.3	101	N.d.
	8	206	264.5	115	N.d.
	9	247	213.9	93	N.d.
	10	206	225.4	98	N.d.
	11	230	255.3	111	N.d.
	12	186	285.2	124	N.d.
	13	181	188.6	82	N.d.
	14	192	193.2	84	N.d.
	15	185	204.7	89	N.d.
	16	217	260.82	113.4	N.d.
	17	169	260.82	113.4	158
	18	158	226.09	98.3	N.d.
	19	171	237.13	103.1	N.d.
	20	151	238.05	103.5	170
	21	151	236.44	102.8	N.d.
	22	173	281.75	122.5	N.d.
	23	168	281.52	122.4	N.d.
	24	209	257.14	111.8	N.d.
25	176	274.16	119.2	228	
26	183	282.67	122.9	239	
27	159	290.26	126.2	188	

28	238	299.92	130.4	N.d.
29	233	304.98	132.6	N.d.
30	159	261.28	113.6	N.d.
31	199	213.44	92.8	N.d.
32	169	320.85	139.5	282
33	156	238.28	103.6	N.d.
34	196	264.96	115.2	N.d.
35	209	275.08	119.6	N.d.
36	190	281.52	122.4	163
37	191	260.82	113.4	N.d.
38	156	294.4	128	N.d.
39	185	290.26	126.2	159
40	161	270.71	117.7	251
41	167	257.14	111.8	149
42	166	283.36	123.2	N.d.
43	161	319.47	138.9	N.d.
44	217	271.4	118	N.d.
45	161	237.82	103.4	N.d.
46	159	306.59	133.3	N.d.
47	187	311.42	135.4	N.d.
48	170	295.55	128.5	146
49	254	331.43	144.1	N.d.
50	183	313.49	136.3	344
51	153	311.42	135.4	212
52	197	285.2	124	212
53	188	260.59	113.3	N.d.
54	189	262.43	114.1	264
55	188	319.24	138.8	N.d.
56	190	273.7	119	N.d.
57	177	287.73	125.1	236
58	196	288.88	125.6	N.d.
59	171	264.5	115	165
60	186	284.05	123.5	268
61	250	305.67	132.9	N.d.
62	172	270.48	117.6	N.d.
63	157	249.78	108.6	N.d.
64	185	215.74	93.8	281
65	178	276.69	120.3	178
66	215	303.83	132.1	N.d.

67	158	278.99	121.3	167
68	206	290.72	126.4	N.d.
69	216	262.43	114.1	N.d.
70	186	240.35	104.5	N.d.
71	154	257.14	111.8	N.d.
72	176	296.47	128.9	267
73	247	283.13	123.1	N.d.
74	206	327.06	142.2	N.d.
75	182	316.02	137.4	166
76	188	301.3	131	N.d.
77	209	296.7	129	N.d.
78	150	292.1	127	109
79	187	301.3	131	N.d.
80	205	271.4	118	N.d.
81	228	243.8	106	N.d.
82	199	264.5	115	N.d.
83	195	289.8	126	N.d.
84	166	253	110	N.d.
85	194	239.2	104	344
86	168	305.9	133	N.d.
87	196	250.7	109	N.d.
88	159	276	120	N.d.
89	235	303.6	132	N.d.
90	216	243.8	106	N.d.
91	198	262.2	114	N.d.
92	166	255.3	111	N.d.
93	171	246.1	107	N.d.
94	175	243.8	106	167
95	188	266.8	116	N.d.
96	217	266.8	116	N.d.
97	211	308.2	134	N.d.
98	230	315.1	137	N.d.
99	170	262.2	114	N.d.
100	176	273.7	119	359
101	164	264.5	115	N.d.
102	153	255.3	111	N.d.
103	174	269.1	117	216
104	151	312.8	136	N.d.
105	177	294.4	128	184

106	183	282.9	123	231
107	162	289.8	126	158
108	246	280.6	122	N.d.
109	154	282.9	123	N.d.
110	169	292.1	127	N.d.
111	160	273.7	119	N.d.
112	160	280.6	122	N.d.
113	151	264.5	115	N.d.
114	174	264.5	115	N.d.
115	195	248.4	108	N.d.
116	161	372.6	162	160
117	186	363.4	158	N.d.
118	170	287.5	125	N.d.
119	192	271.4	118	195
120	174	271.4	118	N.d.
121	162	372.6	162	260
122	214	248.4	108	235
123	158	255.3	111	171
124	185	257.6	112	236
125	204	345	150	N.d.
126	184	289.8	126	286
127	171	239.2	104	N.d.
128	182	250.7	109	N.d.
129	168	259.9	113	N.d.
130	217	292.1	127	N.d.
131	185	294.4	128	N.d.
132	172	236.9	103	N.d.
133	153	273.7	119	N.d.
134	170	236.9	103	N.d.
135	193	294.4	128	N.d.
136	177	319.7	139	N.d.
137	190	248.4	108	N.d.
138	180	223.1	97	317
139	189	227.7	99	N.d.
140	169	255.3	111	N.d.
141	185	259.9	113	N.d.
142	155	299	130	211
143	162	312.8	136	N.d.
144	163	186.3	81	N.d.

145	161	218.5	95	N.d.
146	162	239.2	104	N.d.
147	158	230	100	275
148	192	285.2	124	N.d.
149	165	253	110	196
150	166	255.3	111	N.d.
151	180	328.9	143	195
152	186	292.1	127	N.d.
153	185	271.4	118	N.d.
154	197	285.2	124	N.d.
155	177	271.4	118	N.d.
156	191	301.3	131	275
157	192	243.8	106	215
158	178	296.7	129	N.d.
159	233	243.8	106	N.d.
160	165	303.6	132	193
161	165	324.3	141	167
162	194	239.2	104	314
163	185	264.5	115	N.d.
164	190	253	110	N.d.
165	184	289.8	126	N.d.
166	171	322	140	N.d.
167	224	296.7	129	155
168	165	296.7	129	N.d.
169	167	317.4	138	N.d.
170	191	266.8	116	N.d.
171	175	308.2	134	139
172	183	282.9	123	N.d.
173	187	289.8	126	N.d.
174	199	285.2	124	N.d.
175	181	278.3	121	320
176	183	315.1	137	N.d.
177	176	271.4	118	N.d.
178	163	312.8	136	N.d.
179	229	294.4	128	250
180	180	287.5	125	N.d.
181	214	299	130	N.d.
182	174	257.6	112	N.d.
183	161	280.6	122	N.d.

184	175	269.1	117	228
185	158	365.7	159	N.d.
186	213	276	120	N.d.
187	156	338.1	147	238
188	175	262.2	114	200
189	176	264.5	115	N.d.
190	160	354.2	154	N.d.
191	155	299	130	N.d.
192	189	301.3	131	N.d.
193	189	276	120	N.d.
194	192	276	120	N.d.
195	166	278.3	121	N.d.
196	170	259.9	113	N.d.
197	168	308.2	134	N.d.
198	200	361.1	157	N.d.
199	183	280.6	122	N.d.
200	170	241.5	105	N.d.
201	185	227.7	99	N.d.
202	185	227.7	99	N.d.
203	180	225.4	98	N.d.
Intermediate serum #3	123.4	208	92.4	N.d.
204	137	227.7	99	N.d.
205	138	259.9	113	N.d.
206	98	225.4	98	N.d.
207	91	218.5	95	N.d.
208	118	239.2	104	N.d.
209	100	273.7	119	N.d.
210	134	227.7	99	N.d.
211	132	216.2	94	181
212	110	239.2	104	N.d.
213	111	282.9	123	N.d.
214	130	223.1	97	N.d.
215	119	193.2	84	119
216	119	253	110	N.d.
217	115	269.1	117	N.d.
218	133	190.9	83	N.d.
219	137	267.49	116.3	62
220	146	291.41	126.7	50
221	148	270.02	117.4	N.d.
222	143	252.31	109.7	86

223	126	220.11	95.7	N.d.
224	120	293.02	127.4	N.d.
225	148	273.93	119.1	115
226	117	278.76	121.2	78
227	145	303.37	131.9	N.d.
228	100	287.96	125.2	82
229	107	268.41	116.7	117
230	91	257.37	111.9	120
231	148	262.43	114.1	64
232	138	277.38	120.6	89
233	136	304.06	132.2	55
234	121	234.83	102.1	107
235	149	301.3	131	N.d.
236	137	328.67	142.9	68
237	121	332.35	144.5	N.d.
238	134	281.98	122.6	94
239	132	298.54	129.8	N.d.
240	128	267.95	116.5	N.d.
241	139	280.83	122.1	181
242	131	257.6	112	N.d.
243	110	282.9	123	89
244	137	259.9	113	N.d.
245	147	294.4	128	N.d.
246	140	262.2	114	80
247	130	322	140	129
248	131	294.4	128	88
249	137	292.1	127	N.d.
250	147	248.4	108	N.d.
251	117	266.8	116	72
252	145	301.3	131	N.d.
253	135	271.4	118	112
254	123	259.9	113	90
255	108	292.1	127	119
256	136	232.3	101	126
257	149	294.4	128	N.d.
258	129	269.1	117	N.d.
259	134	243.8	106	N.d.
260	147	227.7	99	N.d.
261	140	232.3	101	112
262	115	264.5	115	124
263	130	255.3	111	N.d.
264	119	179.4	78	75
265	119	232.3	101	N.d.

	266	133	285.2	124	115
	267	133	305.9	133	78
Intermediate sera	Intermediate serum #4	81.7	181.5	80.7	28
	268	44	48.3	21	27
	269	44	36.8	16	27
	270	65	23	10	14
	271	49	36.8	16	27
	272	46	27.6	12	27
	273	66	32.2	14	38
	274	65	36.8	16	38
	275	46	43.7	19	27
	276	50	41.4	18	17
	277	27	27.6	12	N.d.
	278	50	38.41	16.7	N.d.
	279	27	136.62	59.4	27
	280	71	101.2	44	14
	281	73	71.3	31	N.d.
	282	44	20.47	8.9	N.d.
	283	44	28.52	12.4	N.d.
	284	65	30.13	13.1	25
	285	49	28.98	12.6	N.d.
	286	46	31.05	13.5	N.d.
Negative sera	Negative serum #5	0	44	19.6	N.d.
	Negative serum #6	0	53	23.6	N.d.
	287	0	30.59	13.3	N.d.
	288	0	34.04	14.8	N.d.
	289	0	30.59	13.3	N.d.
	290	0	40.02	17.4	N.d.
	291	0	31.05	13.5	N.d.
	292	0	32.43	14.1	N.d.
	293	0	35.42	15.4	N.d.
	294	0	31.05	13.5	N.d.
	295	0	31.74	13.8	N.d.
	296	0	32.43	14.1	N.d.
	297	0	31.8	13.8	N.d.
	298	0	29.44	12.8	N.d.
	299	0	30.59	13.3	N.d.
300	0	31.74	13.8	N.d.	
301	0	29.9	13	N.d.	

1.2.3. Résultats et discussion

Lors de ce travail, nous avons pu établir la preuve de concept de l'utilisation de l'appareil xCELLigence® pour suivre l'infection en temps réel des cellules MDCK par une souche de virus de la grippe (A/equine/Jouars/4/2006 (H3N8)) et démontrer l'utilisation de l'outil pour mesurer en temps réel la séroneutralisation du virus suite à l'ajout de sérums.

Dans un premier temps, nous avons défini les conditions de suivi de la formation d'ECP induits par la souche A/equine/Jouars/4/2006 (H3N8) sur cellules MDCK par l'appareil xCELLigence®. Pour cela le développement d'un modèle d'infection par l'EIV a été établi en réalisant un suivi par impédancemétrie et en parallèle par microscopie. Le modèle développé a mis en évidence une diminution du Cell Index au cours du temps lors de l'infection cellulaire par l'EIV lorsque les conditions optimales ont été définies. Comme décrit dans le manuel de l'OMSA la culture de l'EIV sur les cellules MDCK nécessite l'ajout, dans le milieu de culture cellulaire, de trypsine-TPCK au moment de l'infection virale (OIE, 2019). La concentration optimale de trypsine-TPCK permettant l'infection des cellules et induisant le minimum de cytotoxicité a donc été déterminée dans notre modèle (0,25 µg/ml). Parallèlement, la concentration virale induisant l'infection totale du tapis cellulaire et entraînant un CI nul au bout de 48 heures suivant l'infection a été déterminée (inoculum 4.9×10^3 TCID₅₀/ml ; dilution 0,1). La détermination des conditions d'infection optimales est un élément indispensable et déterminant pour effectuer des analyses sur l'infection virale (i.e. mesure de neutralisation virale).

Dans un second temps nous avons vérifié s'il existait une corrélation entre les mesures d'anticorps par SRH et les mesures d'aire sous la courbe obtenues avec le modèle de séroneutralisation en temps réel. En effet, l'incubation de l'EIV avec des sérums équins non dilués permet d'obtenir une corrélation avec la protection induite par les anticorps présents dans le sérum avec une analyse par le test ROC ($R^2 = 0,56$). Cette étude a permis de déterminer le seuil de protection (71%) d'un sérum par RTNA en utilisant les valeurs de pourcentage d'aire sous la courbe. La possibilité de déterminer le niveau de protection d'un sérum contre l'EIV en utilisant une faible quantité de sérum et un temps de manipulation restreint peut s'avérer intéressante.

Enfin, les mesures d'anticorps par la méthode SRH étant associées à des corrélats de protection bien définis (Mumford et al., 1994 ; Newton et al., 2000) (i.e. valeur $< 85 \text{ mm}^2$: pas ou peu de protection ; $85 \text{ mm}^2 < \text{valeur} < 150 \text{ mm}^2$: protection clinique ; valeur $> 150 \text{ mm}^2$: protection virologique), nous avons cherché si une corrélation existait avec les valeurs obtenues par RTNA. L'approche utilisée dans cette étude est basée sur celles développées par Witkowski et al. (2010) et Sutton (2021). La mesure de l'activité neutralisante des anticorps contre la grippe équine peut être réalisée à partir de la dilution des sérums et permet d'obtenir un titre en anticorps basé sur les mesures d'aire sous la courbe et la détermination d' IC_{50} . L'analyse des valeurs RTNA comparées aux valeurs SRH par un test ROC a révélé que celles-ci, bien que plus dispersées, présentent une relation avec les niveaux de protections établis en SRH ($R^2 = 0,65$ et $R = 0,80$). Yamagishi et al. ont trouvé une corrélation entre le test SRH et le test de neutralisation ($R = 0,75$) (Yamagishi et al., 1982). Par ailleurs, une étude de Scott et al. menée sur 20 sérums équins a montré une corrélation entre un test de seroneutralisation utilisant un pseudovirus et le test SRH ($R = 0,65$) (Scott et al., 2012). Plus récemment, la comparaison des valeurs de ces deux derniers tests sur un nombre plus important de sérums équins ($n=134$) a permis d'améliorer la corrélation ($R = 0,70$) (Kinsley et al., 2020). Nos résultats sont en accord avec les coefficients de corrélation obtenus dans des études comparant une méthode de seroneutralisation de l'EIV aux valeurs obtenues par SRH.

Ainsi, les sérums dont les valeurs en SRH ne sont pas associées à une protection contre l'EIV ont été corrélés à un titre inférieur à 1:44 en RTNA. Les sérums dont les valeurs en SRH sont associées à une protection clinique contre l'EIV présentent un titre compris entre 1:44 et 1:134 en RTNA. Enfin, les sérums dont les valeurs en SRH sont associées à une protection virologique contre l'EIV présentent un titre supérieur à 1:134 en RTNA. Un modèle de seroneutralisation du virus influenza chez l'homme (A/Shanghai/37T/2009 (H1N1) et A/Shanghai/143T/2009 (H1N1)) développé par impédancemétrie, a montré une corrélation entre les titres obtenus avec cette méthode et les titres obtenus avec le test d'inhibition de l'hémagglutination ($R = 0,78$) (Tian et al., 2012). Il est intéressant de noter que chez l'homme, un titre HI de 1:40 est davantage considéré comme protecteur vis-à-vis de la grippe (Hannoun, Megas et Piercy, 2004). Dans l'étude de Tian et al. (2012), les sérums présentant un titre HI de 1 :40 présentaient un titre similaire en RTNA. Ces résultats sont en accord avec le titre d'anticorps protecteurs obtenu dans notre étude (1 :44).

Le système a permis de collecter de nombreuses informations en temps réel en minimisant les manipulations et indépendamment de l'utilisation d'œufs embryonnés contrairement à la

méthode de séroneutralisation de l'EIV actuelle. L'étude a mis en évidence une corrélation entre la méthode SRH traduisant les niveaux d'anticorps dirigés contre le complément présents dans le sérum et la méthode de séroneutralisation en temps réel qui mesure les niveaux d'anticorps neutralisants l'EIV. La méthode SRH est actuellement la méthode de référence pour le suivi des taux d'anticorps contre la grippe équine. C'est une méthode pour laquelle des corrélats de protection sont associés. Il serait intéressant d'employer la méthode RTNA à plus large échelle. L'utilisation d'un tel outil par exemple lors de manifestations équestres de grande ampleur pourrait présenter des avantages, notamment afin de réaliser le criblage haut débit de sérums et réduire les temps de manipulation ainsi que le temps nécessaire à l'obtention de résultats et ainsi renseigner sur le statut vaccinal des chevaux.

2. Effet adjuvant de l'iPPVO en co-administration avec le vaccin EQUIP® EHV 1,4

2.1. Introduction

La recherche de vaccins contre la rhinopneumonie équine est au cœur de nombreux travaux. La vaccination contre l'EHV-1 a débuté dans les années 1940 aux Etats-Unis. Les premiers vaccins, dont les antigènes avaient été produits *in vivo* se sont révélés inefficaces (Doll and Bryans, 1963). En revanche, la production d'EHV-1 sur des cultures cellulaires a permis l'élaboration des vaccins inactivés auquel a été ajouté un adjuvant revendiquant une efficacité contre l'EHV-1 (Bryans, 1978). Ces premiers vaccins inactivés ont finalement montré qu'ils ne protégeaient pas contre les avortements et la forme nerveuse de la maladie engendrés par l'EHV-1 (Burrows et al., 1984 ; Bürki et al., 1990 ; Mumford et al., 1991). Actuellement, parmi les vaccins utilisés, un vaccin inactivé contre l'EHV-1 et l'EHV-4 adjuvanté avec un carbomère, a montré une protection contre les avortements à EHV-1 (Heldens et al., 2001a) avec un protocole précis de trois injections au 5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} mois de gestation. Malgré une augmentation de la vaccination contre la rhinopneumonie dans la population équine, de nombreux foyers d'infection par l'EHV-1 sont recensés dans le monde. De manière générale, les vaccins présentent une efficacité dans leur capacité à réduire les signes cliniques notamment ceux observés lors de la forme respiratoire (Marenzoni et al., 2022). Cependant la capacité des vaccins à maintenir un niveau d'anticorps élevé dans le temps semble plus difficile à maintenir et une diminution des titres en anticorps contre l'EHV-1 est généralement observée à partir du 3^{ème} mois suivant la dernière vaccination (Hannant et al., 1993; Wagner et al., 2015; El Brini et al., 2021). Ce constat a poussé les organisations telles que l'OMSA à recommander la vaccination semi-annuelle.

La mise au point de nouveaux vaccins est généralement un processus long et coûteux. Notre précédente étude (étude 1.1) a établi la preuve de concept de la mesure d'un effet positif sur la réponse humorale de l'iPPVO administré en tant qu'adjuvant lors de la vaccination contre la grippe équine. Lors de cette nouvelle étude, nous présentons la possibilité d'utiliser l'iPPVO au moment de la vaccination contre la rhinopneumonie pour stimuler la réponse en anticorps contre l'EHV-1. L'étude a été réalisée en étroite collaboration avec la Jumenterie du Pin, dans l'Orne, sur le plateau technique de l'IFCE. Le protocole est inspiré de celui mis en place lors de l'étude réalisée sur la vaccination contre la grippe : mesure du taux d'anticorps dans une population ciblée ; identification d'un panel de 20 chevaux présentant un taux d'anticorps

relativement homogène et répartition de manière aléatoire des 20 chevaux dans les 2 populations de l'étude (10 chevaux contrôles et 10 chevaux traités à l'iPPVO). Cette étude montre la capacité de l'iPPVO à maintenir un titre en anticorps neutralisants l'EHV-1, 5 mois après les injections de rappel, plus élevé par rapport à un rappel classique en l'absence d'iPPVO. Nous proposons donc l'utilisation de l'iPPVO, sous sa forme commerciale, lors d'un protocole de vaccination contre l'EHV-1 pour permettre un maintien du taux d'anticorps neutralisants, étape essentielle pour une meilleure protection des chevaux.

2.2. Article 3

Flora Carnet, Romain Paillot, Christine Fortier, Erika Hue, Laurie Briot, Frédéric de Geoffroy, Pierre-Olivier Vidalain, Stéphane Pronost. **Booster effect of inactivated parapoxvirus ovis on EHV-1 neutralizing antibodies when co-injecting with equine herpesvirus 1/4 vaccine.** (En préparation pour soumission dans le journal « Vaccines »).

Booster effect of inactivated parapoxvirus ovis on EHV-1 neutralising antibodies when co-injected with equine herpesvirus 1/4 vaccine

Flora Carnet^{1,2}, Romain Paillot^{1,2,3}, Christine Fortier^{1,2,4}, Erika Hue^{1,2,4}, Laurie Briot⁵, Frédéric de Geoffroy⁵, Pierre-Olivier Vidalain^{6,†}, Stéphane Pronost^{1,2,4,†,*}

¹ LABÉO, 14280 Saint-Contest France; flora.carnet@laboratoire-labeo.fr (F.C.); christine.fortier@laboratoire-labeo.fr (C.F.); erika.hue@laboratoire-labeo.fr (E.H.); stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr (S.P.);

² Université de Caen Normandie, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France;

³ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, United Kingdom; Romain.Paillot@writtle.ac.uk (R.P.);

⁴ Université de Caen Normandie, UNICAEN, IMPEDANCELL, 14000 Caen, France;

⁵ Haras National du Pin La Jumenterie, Institut français du cheval et de l'équitation, 61310 Gouffern en Auge, France; laurie.briot@ifce.fr (L.B.); frederic.degeoffroy@ifce.fr (F.G.);

⁶ CIRI Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 69007, Lyon, France; pierre-olivier.vidalain@inserm.fr (P.-O.V.);

† The authors have contributed equally to this work;

* Correspondence: stephane.pronost@laboratoire-labeo.fr

Abstract: Equid herpesvirus 1 (EHV-1) is regularly responsible for outbreaks in many parts of the world, with a significant impact on the equine industry. Protection against EHV-1 relies on sanitary measures including vaccination, but the efficacy and duration of protection offered by existing vaccines is often limited and vaccines do not show protection against all forms of the disease. To improve vaccine efficacy, the benefit of immune stimulation with inactivated Parapoxvirus ovis (iPPVO) was measured on the antibody response induced by a semi-annual boost of EHV-1/4 vaccine. Carbopol-adjuvanted inactivated EHV-1/4 vaccine was administered alone (n = 9) or combined with iPPVO injections at D0, D2 and D4 after vaccination (n = 10) to adult horses as a booster vaccination (i.e., 6 months after the last immunization). EHV-1 neutralising antibody titres were measured by classical serum neutralisation and by a real-time neutralising assay 1, 3 and 6 months after vaccination. The results showed that iPPVO was safe and the horses had higher antibody levels than the control group injected with EHV-1/4 vaccine alone. In contrast to horses that received the vaccine alone, antibody titres increased or were at least maintained up to 3 months after immunization in horses that received the vaccine plus iPPVO. Immune stimulation with iPPVO could be used to improve vaccination protocols against EHV-1 in horses.

Keywords: Horse; Equid Herpesvirus; Vaccine; Immunomodulator; Inactivated Parapoxvirus ovis.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The equid herpesvirus 1 (EHV-1) is responsible for 4 different forms of disease: respiratory, the most common one, ocular, abortive and neurological. While the latter is the least common, it was flagged as a re-emerging disease by the Food and Drugs Administration in 2012 and is a major concern for the global equine industry [1,2]. EHV-1 is a respiratory virus mainly transmitted by inhalation but also by direct contact with contaminated fomites and environment, leading to the propagation of the virus and regular outbreaks worldwide [3,4]. Over last five years, outbreaks of EHV-1 have resulted in the discontinuation of some competitions in Europe [5], and have recently impacted the United

States. Epizootics due to EHV-1 detrimental to animal welfare, but also have important economic consequences [1]. Abortions, which generally occur during the third trimester of gestation, cause economic losses for the equine industry. In addition, it is usually accepted for the nervous form of the disease that when the horse lies recumbent, this leads in 50% of the cases to the euthanasia of the animal [1]. After the first infection, the virus establishes life-long latency, and reactivation can occur under natural conditions following transport, handling, postpartum period, or after treatment with corticosteroids [6]. The risk induced is the excretion of the virus that could occur after a reactivation. One of the recommended prevention strategies against EHV-1 is vaccination. Studies have shown the benefit of vaccination in experimental challenges, including reduction of clinical signs and severity and reduction of viral shedding [7–11]. However, cases of EHV-1 infection are frequently described in vaccinated horses [12,13]. Recently, the EHV-1 epizooty that occurred during an equine competition in Valencia (2021; Spain) included both unvaccinated and vaccinated horses [14]. Currently available vaccines prevent respiratory disease and/or abortion due to EHV-1, but to date, no licensed vaccine has been tested against the nervous form [15]. Furthermore, as the antibody levels decrease over time, the horse racing authorities such as the Fédération Équestre Internationale recommend booster injections every six months and at least once a year, depending on activity and/or risk of infection [15]. To date, there are no clear guidelines for vaccination of naive animals (emergency vaccination) in the event of an EHV-1 outbreak. The American Association of Equine Practitioners (AAEP) supports the vaccination of animals that have not been exposed to EHV-1 and new arrivals in the epidemic area in order to induce a primary response in naïve animals or an anamnestic response in horses that have been previously vaccinated [16].

Stimulation of the innate immune response at the time of vaccination is a prerequisite for inducing a good antigenic response. Improving the antibody level but also maintaining this level over time until the next vaccination is a great challenge for the vaccine industry. Inactivated Parapoxvirus ovis or iPPVO is an immunostimulant marketed under the name Zylexis by Zoetis®. Studies have well established the ability of iPPVO to boost the innate immune response and to stimulate the expression of interferons (IFNs), pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8, IL-18, TNF-alpha and mediators of the adaptive immune response such as IL-12 [17–23]. The mode of action of iPPVO and its effect on respiratory infections under field conditions has not been reviewed extensively [23]. iPPVO has been shown to increase the number of innate immune cells and neutralising antibody levels in guinea pig infected by genital herpesviruses and in mice infected with herpes simplex virus type 1 [17]. A recent study showed the effectiveness of iPPVO in stimulating antibody responses measured by single radial haemolysis during vaccination against equine influenza (EI). Co-injection of iPPVO at the time of EI vaccination increased antibody levels and duration after a vaccine boost [24].

Because iPPVO is an approved veterinary immunostimulant that has been shown to improve vaccination against equine influenza in horses, we wanted to study test the effect of iPPVO on EHV-1/4 booster vaccination.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval/Animal Welfare

This study was approved by the CENOMEXA n°54 ethics committee (N° APAFIS 2021081914235114_V3 (#32718)) and the Ministry of Higher Education, Research and Innovation (France).

2.2. Horses and screening process

The study was carried out at the Jumenterie du Pin in Orne, France between November 2021 and November 2022. In the absence of previous information on the effect of iPPVO in co-injection with an EHV-1/4 vaccine, it was decided to select a homogeneous

group of horses with similar EHV-1 antibody titres as determined by real-time neutralisation assay (RTNA) after an annual booster vaccination. This method allows the measurement of neutralising antibody titres with a limited number of serum dilutions and can be used to quickly determine the serological status of a large number of animals [25]. A group of 59 horses were screened and showed antibody titres ranging from 1:18 to 1:1134 (livestock of the stud farm where the study took place). EHV-1 RTNA antibody titres were measured immediately before and one and three months after the annual EHV-1/4 booster vaccination (Equip® EHV-1, 4, Zoetis®). Twenty horses were selected according to the following criteria: antibody titres determined by RTNA ranging from 1:20 to 1:300 in the three months period following the booster vaccination. The sample size was determined using three methods as described in Carnet *et al.*, (2022) [24]. Twenty healthy mares, breed selle-français, anglo-arabian, trotter and draft horses between 3 to 25 years of age were enrolled in the study. Horses were stratified into three different age groups (i.e., 3-10, 11-20 and 21-25 years), and randomly allocated to the “control group” that would receive the semi-annual EHV-1/4 booster (SAB) vaccination or the “iPPVO group” that would receive the SAB vaccination plus iPPVO injections. The selection process is presented in supplementary data (Figure S1). During the study, one horse had to be euthanized for a reason external to the study. Therefore, the results of 19 horses are presented in this study.

2.3. Study design

Mares in the control group received the inactivated EHV-1/4 vaccine (Equip® EHV-1,4, Zoetis) according to the manufacturer’s recommendations (i.e., 1 mL of suspension injected intramuscularly into the neck). This vaccine contains the two following viruses adjuvanted with Carbopol 934P: EHV-1 438/77 strain and EHV-4 405/76 strain. Mares in the iPPVO group received one dose of the same EHV-1,4 vaccine and three doses of iPPVO (Zylexis®, Zoetis). A batch of Zylexis® produced under commercial conditions was used. The Zylexis® consisted of the lyophilised iPPVO strain D1701 resuspended in 1 mL of water for injection prior to administration by intramuscular injection (1 mL of solution injected intramuscularly into the neck according to the manufacturer’s recommendations, followed by two other injections of iPPVO at 48 h intervals (i.e., D0, D + 2 and D + 4) (Figure 1). The label information provided with Zylexis® mentioned the use of different volumes depending of the targeted species. This product had no marketing authorization in France at the time of this study, and this study represents the first use of Zylexis® in combination with the vaccine EHV-1,4. A previous study combining iPPVO with an equine influenza vaccine showed effects with the minimal volume (1 mL) [24]. In the absence of information on the effect of iPPVO in co-injection with a carbomer-adjuvanted vaccine, it was decided to conduct the study with 1 mL of iPPVO. The injection of iPPVO was performed within a 15 cm radius of the vaccine injection site. After injection, the horses were monitored for side effects for 1 week. Temperature, general condition and local reaction at the injection site were monitored 48 h after the injections. Fever was reported for rectal temperatures > 38.8 °C. It was not possible to monitor the temperature of mare #2 in the control group because the horse was too agitated. Five of the ten horses in the iPPVO group showed at least a slight swelling at the injection site. However, all swellings were less than 1 cm in diameter (Table S1).

2.4. Blood samples

All blood samples (screening and study phases) were taken from the jugular vein (2 dry tubes of 10 mL, 1 EDTA tube of 10 mL per horse). Blood counts and serum amyloid A determinations were performed for all horses before the semi-annual boost, 24 h, 1 month, 3 months and 5 months after the semi-annual boost. The results are shown in supplementary data (Figure S2; Table S2). During the study phase and for both groups, 1 blood sample was taken immediately prior to boost EHV-1 immunisation. Other blood sample were collected 1, 3 and 5 months after the semi-annual boost (SAB) vaccination. All the samples were stored for a maximum of 4 h at +4°C before the serum was collected and stored at -20°C.

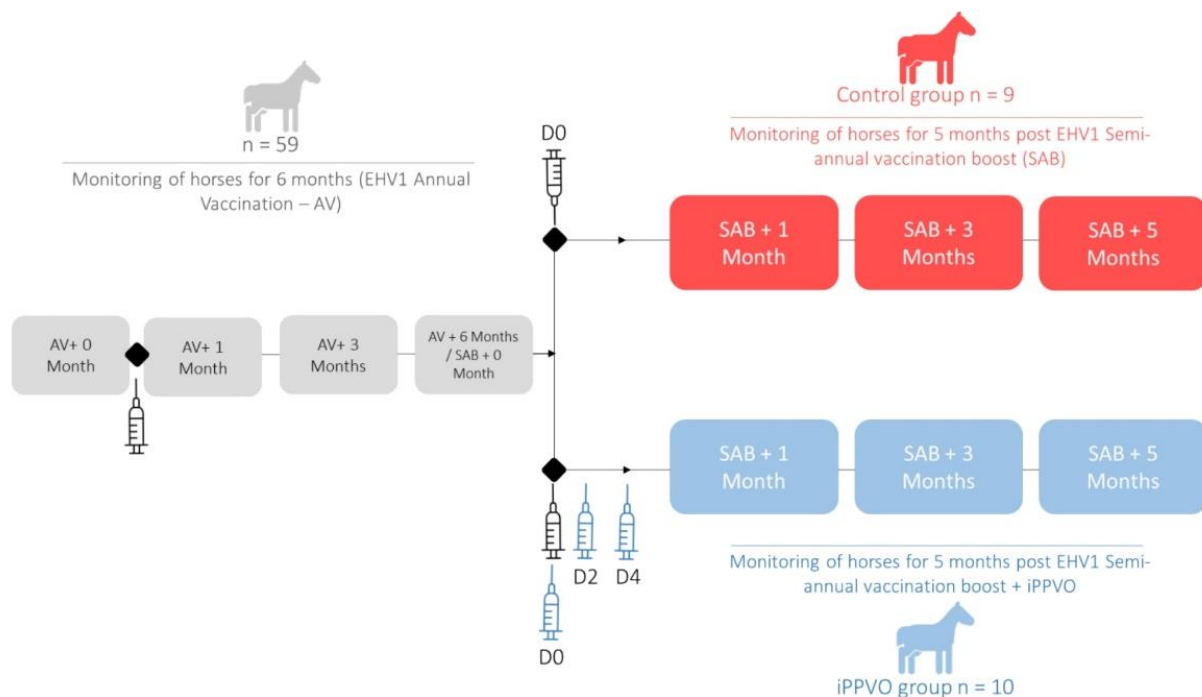


Figure 1. Horse selection and EHV-1/4 vaccination protocol with or without iPPVO®.

155

156

157

158

2.5. Cell and virus culture

159

Two cell lines were used in this study. RK13 cells (rabbit kidney cells, ATCC®, Molsheim, France) were maintained in Minimum Essential Medium with Earle's salts (MEM, Eurobio, Courtaboeuf, France) complemented with 1 % L-glutamine. E.Derm cells (equine dermal fibroblasts, NBL-6, ATCC®, CCL57™) were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC® 30-2003). The two media were complemented with 10 % Fetal Bovine Serum and 1 % antibiotics (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin). Cell growth was observed both using xCELLigence® technology (ACEA Biosciences, CA, USA) and by microscopy using IncuCyte S3 (Essen Bioscience, Ann Arbor, Michigan, USA). RK13 cells were used to perform the EHV-1 seroneutralisation assay and E.Derm cells for the RTNA.

160

161

162

163

164

165

166

167

168

The EHV-1 strain KyD VR700 (ATCC®) was used during this study. The strain was amplified on RK13 cells. The virus titre was measured with the Karber method [26] on E.Derm cells (3.65×10^7 TCID₅₀/mL).

169

170

171

172

2.6. Serological analysis: Virus Neutralisation Assay

173

A seroneutralisation assay was performed using RK13 cells and the EHV-1 KyD VR700 strain (ATCC®), according to the WOAAH recommendations [27]. Briefly, on day 1, 50 µL of sera were serially diluted (7 times) on a 2-fold basis in complemented MEM and mixed with 50 µL of medium containing 100 TCID₅₀ of EHV-1 strain VR700 in 96-well plate, Falcon®, Corning, MA, USA). After 1 h of incubation of incubation (37°C with 0.5% CO₂), 100 µL of RK13 cells suspension were added to each well (2.5×10^4 cells per well). All serum dilutions were tested in duplicate. Controls included sera of known titres. After 3 days of culture, cell monolayers were examined using an inverted microscope. The SN titre was estimated as the last dilution of serum neutralising the virus (no cytopathic effect formation). The results are presented as the harmonic mean of the antibody titres.

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

2.7. Real time neutralisation assay (RTNA)

A neutralisation test was also performed using Real Time Cell Analysis (RTCA) on the xCELLigence® technology platform (ACEA Biosciences, CA, USA). On day 1, cells were seeded in 96-well plates (1.2×10⁴ cells per well, E-plate 96-well) for xCELLigence acquisition. On day 2, 24 h after seeding and prior to infection, the culture medium was removed and replaced with fresh supplemented EMEM medium. Sera were diluted (7 times) on a 2-fold basis, and 50 µL of each sera dilution were incubated for 1 h at 37°C with 50 µL of EHV-1 VR700 strain dilution (100 TCID₅₀). The 100 µL of sera incubated with the virus were added to the cells (2.5×10⁴ cells per well) and incubated at 37°C with 5% CO₂. Controls included uninfected cells, cells infected with the virus alone and two previously characterized sera. Neutralising antibody titres were calculated as previously described [25,28]. The percentage of inhibition (inhibition %) for each dilution point was calculated after 10 h of culture post infection using area under the curve from mock infected (AUC_{mi}) and EHV-1 infected (AUC_i) control conditions, as follows:

$$\text{inhibition\%} = 100 * (1 - (AUC_{mi} - AUC_{dilution}) / (AUC_{mi} - AUC_i))$$

Inhibition percentages and their corresponding serum concentration allowed the determination of the sera concentration inducing 50 % of the EHV-1 inhibition (IC₅₀) and the neutralising titre 50 (NT₅₀).

2.6. Statistical data analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad PRISM® 7.04 (San Diego, CA, USA). Normally distributed group samples were analyzed using 2-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparisons post-test to test significant differences between groups. The annual vaccination samples of 19 horses were analyzed using one-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's comparisons post-test to test significant differences between antibodies titres before and after vaccination. The frequency of presenting an antibody titre increased in each group was compared at equivalent time points post immunization (i.e., post-AV time points compared with post-SAB time points) using a χ² test. The frequency of horses with local swelling after injection was also compared using a χ² test. The significance level was set at a p-value of <0.05.

3. Results

3.1. Antibody response to annual EHV1 vaccination and screening/selection phase

To evaluate the potential impact of iPPVO injection, 19 horses that received six months earlier the annual vaccination (AV) were selected for having antibody titres ranging from 1:20 to 1:300 (determined by RTNA). Horses were stratified into three different age groups (i.e., 3-10, 11-20 and 21-25 years), and randomly allocated to the "control group" that would receive the semi-annual booster (SAB) vaccination or the "iPPVO group" that would receive the SAB vaccination plus iPPVO injections. At the time for SAB (i.e. 6 months after AV), antibody titres were measured by 2 different seroneutralisation methods: the WOA reference method with RK13 cells and an automatized method on ED cells (RTNA).

Results from the WOA reference seroneutralisation assay

The values corresponding to 19 horses are presented in Table S3. At the time of AV (AV+0M), the mean antibody titres against EHV-1 were 88.00 ± 43.08 for the control group and 92.80 ± 52.69, for the iPPVO group (Figure 2), and no significant differences were observed (p-value > 0.05). One month after the annual vaccination (AV + 1M), horses in both groups did not show a significant increase in neutralising antibody levels when compared with AV + 0M (124.44 ± 86.45 for the control group and 117.60 ± 75.62, for the iPPVO

group; p-value > 0.05). Three months after the annual vaccination (AV + 3M), the horses maintained the mean antibody titre was 126.22 ± 78.56 for the control group and 136.00 ± 85.75 for the iPPVO group. No significant difference was detected when compared with AV + 1M or between groups (p-value > 0.05). Six months after annual vaccination (AV + 6M), antibody titres were 122.67 ± 58.79 for the control group and 134.40 ± 72.03 for the iPPVO group (Figure 2). The differences between the two groups were not significant (p-value > 0.05). A two-way ANOVA using vaccination and timing (from AV + 0M to AV + 6M) showed no significant difference between the two groups (p-value > 0.05). A one-way ANOVA using timing before and after vaccination (from AV + 0M to AV + 6M) for the 19 horses was performed and showed a significant difference between the times after vaccination compared before vaccination (p-value = 0.0198). Three and six months after annual vaccination antibody titres were significantly higher than before annual vaccination (p-value = 0.0227 and p-value = 0.0041, respectively).

237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250

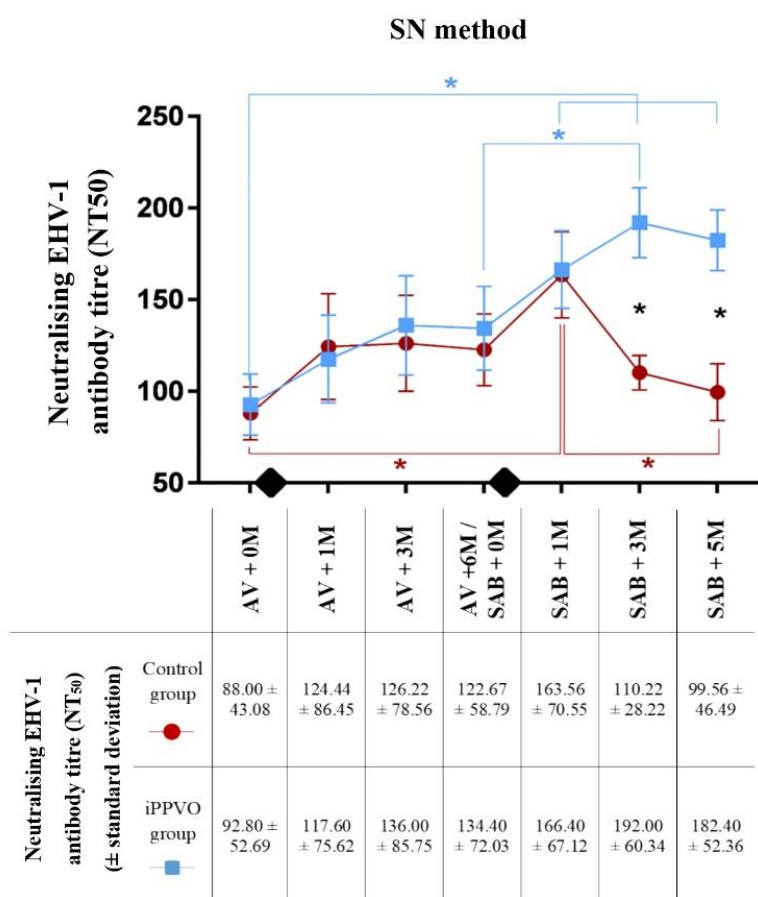


Figure 2. Mean antibody response against EHV-1 measured before and after booster vaccination using the WOA reference seroneutralisation assay (SN). The values correspond to sera collected in the control and iPPVO groups before the annual vaccination (AV), 1 and 3 months after the AV, before the semi-annual boost (SAB), 1, 3 and 5 months after the SAB. The red and the blue circles correspond to the mean of the neutralising antibody titre against EHV-1 in the control group (n=9) and in the iPPVO group (n=10), respectively. The diamonds represent the time of the AV and the 6 months SAB injections with or without iPPVO. Error bars represent standard error of the mean. A black star corresponds to a significant increase in the neutralising EHV-1 antibody titre for the iPPVO

251
252
253
254
255
256
257
258
259
260

group compared to the control group (two-factor ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test; * for $p < 0.05$). A red star represents the significant increase in the neutralising EHV-1 antibody titre for the control group over time, and the blue stars represent the significant increase in the neutralising EHV-1 antibody titre for the iPPVO group over time (two-factor ANOVA with Tukey's multiple comparisons post-test; $p < 0.05$).

Results from the real time neutralising assay (RTNA)

At the time of AV (AV+0M), mean of the EHV-1 RTNA antibody titre were 79.78 ± 65.92 , for the control group and 58.40 ± 22.93 for the iPPVO group (Figure 3). No significant difference in RTNA antibody titres were measured between groups (p -value > 0.05). One month after the annual vaccination (AV + 1M), horses showed an increase in RTNA antibody titres up to 172.67 ± 78.64 for the control group and the difference was significant compared to when compared with AV + 0M (p -value = 0.0001). However, the difference was not significant for the iPPVO group whose titre only increased to 107.40 ± 60.23 (p -value > 0.05). RTNA antibody titres were significantly different between control and iPPVO groups (p -value > 0.024). Three months after the annual vaccination (AV + 3M), the horses showed a mean RTNA antibody titre of 134.89 ± 63.95 for the control group and 119.40 ± 61.27 for the iPPVO group. No significant difference was measured when compared with AV + 1M for the control group (p -value > 0.05). The results were significant when compared with AV + 0M for the iPPVO group (p -value = 0.0222). At 6 months post annual vaccination (AV + 6M), all horses of the two groups showed lower antibody titres similar to AV + 0M level for the control group and to AV+ 1M for the iPPVO group. Neutralising antibody titres were 81.50 ± 36.05 for the control group and 100.00 ± 46.79 for the iPPVO group (Figure 3). The difference between the two groups was not significant (p -value > 0.05). A two-way ANOVA using vaccination and timing (from AV to AV + 6M) showed no significant difference between the two groups (p -value > 0.05 for RTNA antibody titres). A one-way ANOVA using timing before and after vaccination (from AV + 0M to AV + 6M) for the 19 horses was performed and showed a significant difference between the times after vaccination compared before vaccination (p -value = 0.0005). One and three months after annual vaccination means antibody titres were significantly higher than before annual vaccination (p -value = 0.0005).

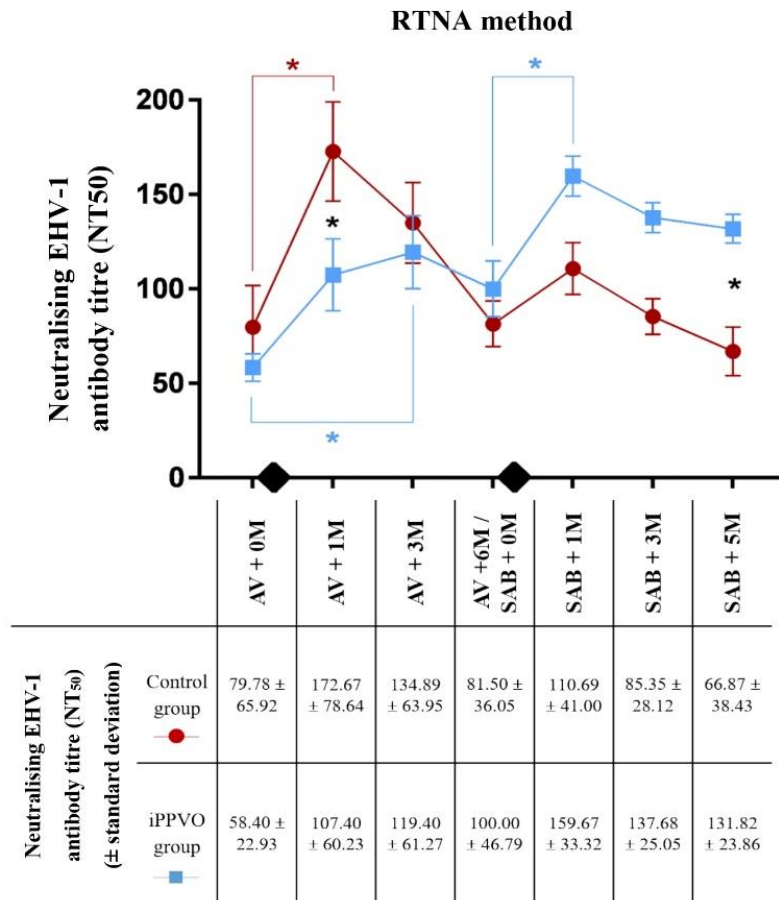


Figure 3. Mean antibody response against EHV-1 measured before and after booster vaccination using the RTNA. The values correspond to sera collected in the control and iPPVO groups before the annual vaccination (AV), 1 and 3 months after the AV and before the semi-annual boost (SAB), 1, 3 and 5 months after the SAB. The red and the blue circles correspond to the mean of the neutralising antibody titre against in the control group (n=9) and in the iPPVO group (n=10), respectively. The diamonds represent the time of the AV injection and the 6 months SAB injections with or without iPPVO. Error bars represent standard error of the mean. Black stars correspond to a significant increase in the neutralising antibody titre for the iPPVO group compared to the control group (two-factor ANOVA with Tukey’s multiple comparisons post-test; * for p < 0.05). A red star represents a significant increase in the neutralising antibody titre for the control group over time, and the blue stars represent a significant increase in the neutralising antibody titre (RTNA) for the iPPVO group over time (two-factor ANOVA with Tukey’s multiple comparisons post-test; p < 0.05).

3.2. Neutralising antibody response against EHV-1 after semi-annual booster vaccination with or without iPPVO as immunostimulant

Results from the WOA reference seroneutralisation assay

Horses received the SAB vaccination alone (control group) or together with iPPVO injections (iPPVO group). In the control group, there was an increase in the mean antibody titre one month after the semi-annual boost (SAB+ 1M) compared to the mean titre before SAB (SAB+0M) (Figure 2). However, this increase was not significant. Nevertheless, the

mean antibody titre was significantly higher compared to the mean titre before the annual vaccination (163.56 ± 70.55 ; p -value = 0.0089) (red star). Then three and five months after SAB (SAB+3M and 5M, respectively), the mean EHV-1 neutralising antibody titre decreased to a mean titre similar to that before annual vaccination. Furthermore, the differences between the mean titre one month after SAB and 5 months after SAB were significant (p -value = 0.0456) (red star).

In the iPPVO group, there was an increase in the mean antibody titre 1, 3 and 5 months after the SAB compared to the mean titre before SAB. The difference in mean antibody titres was not significant between 1 and 5 months after SAB compared before SAB. However, 3 months after SAB, the EHV-1 neutralising antibody titre increased significantly in the iPPVO group (192.00 ± 60.34 ; p -value = 0.028) compared to the titres measured before SAB (0M) (blue star). Finally, the mean antibody titres were significantly higher 1, 3 and 5 months after SAB compared to the mean titre before the annual vaccination (166.40 ± 67.12 (p -value = 0.0065); 192.00 ± 60.34 (p -value < 0.0001) and 182.40 ± 52.36 (p -value = 0.0004), respectively) (blue star).

One month after SAB, no significant differences in EHV-1 neutralising antibody titres were measured between the two groups. However, antibody titres were significantly different (black star) between the control and iPPVO groups when measured three and five months after SAB (p -value = 0.049 and 0.044, respectively). A two-way ANOVA using treatment (\pm iPPVO) and timing (from SAB + 1M to SAB + 5M) showed a significant difference (p -value = 0.003 and p -value < 0.0001, respectively) for the mean neutralising EHV-1 antibody titre.

Results from the real time neutralising assay (RTNA)

Horses received the SAB vaccination alone (control group) or together with iPPVO injections (iPPVO group). In the control group, there was an increase in the mean antibody titre one month after the semi-annual boost (SAB+ 1M) compared to the mean titre before SAB (SAB+0M) (Figure 3). However, this difference was not significant. Then 3 and 5 months after SAB, the mean EHV-1 neutralising antibody titre decreased to a mean titre similar to that before annual vaccination.

In the iPPVO group, there was an increase in the mean antibody titre one, 3 and 5 months after the semi-annual boost (SAB+ 1M, 3M and 5M) compared to the mean titre before SAB. One month after the SAB, the EHV-1 neutralising antibody titre increased significantly in the iPPVO group (159.67 ± 33.32 ; p -value = 0.027) compared to the pre-injection SAB titre (SAB+0M) (blue star). However, 3 and 5 months after SAB, the EHV-1 neutralising antibody titre showed no significant difference in the group compared to the titre measured before SAB (0M).

One and three months after SAB, no significant differences in EHV-1 neutralising antibody titres were measured between the control and iPPVO groups. However, the antibody titres were significantly different (black star) between the control and iPPVO groups when measured three and five months after SAB (p -value = 0.025). A two-way ANOVA using treatment (\pm iPPVO) and timing (from SAB + 1M to SAB + 5M) showed a significant difference (p -value = 0.0009 and p -value < 0.0001, respectively) for the neutralising EHV-1 antibody titres.

3.3. Individual neutralising antibody response to EHV-1 vaccination with or without iPPVO and level of protection

Individual antibody titres determined by RTNA are presented in Figure 4a-c. One month after the annual vaccine boost (AV + 1M), all horses in the control group (Figure 4a) and eight out of ten horses in the iPPVO group (Figure 4b) showed higher antibody titres. Three months after the AV (AV + 3M), all horses from the two groups had higher

antibody titres when compared to the matching titres before the AV (Figure 4a, b). At six months after AV, and thus right before the semi-annual boost (AV + 6M / SAB + 0M), six horses in the control group showed a titre that was higher than before AV, whereas three horses presented a lower titre (Figure 4a). Similar results were obtained in the iPPVO group where five horses had a higher titre but five presented a lower titre (Figure 4b). This showed that the increase in antibody titres induced by AV is temporary in a large fraction of the animals (8/18). One month after the SAB (SAB + 1M), seven horses in the control group and nine horses in the iPPVO group showed an increase in neutralising antibody titres when compared to AV + 6M / SAB + 0M (Figure 4a, b). Three months after the SAB (SAB + 3M), six horses in each group presented an increase of antibody titre compared to the values before the SAB (SAB + 0M). Finally, five months after the SAB (SAB + 5M), only three horses in the control group (33.3%) showed a titre that was higher than before the SAB (AV + 6M / SAB + 0M; Figure 4a). In comparison seven horses presented higher titres in the iPPVO group (70%; Figure 4b). Thus, antibody titres can be maintained at higher levels with iPPVO injections. To easily visualize individual variations on Figures 4a-b, we calculated the mean of EHV-1 antibody titres for the control group ($M_{ab1} = 117.21 \pm 72.10$) and the iPPVO group ($M_{ab2} = 96.30 \pm 53.57$) measured by RTNA for all time points before and after the annual vaccination (AV + 0M, 1M, 3M and 6M). The difference between M_{ab} in two groups were not significant. measured by RTNA for all time points in the control group. This corresponds to an average antibody titre in horses that regularly receive the EHV-1 vaccine without iPPVO and is presented as a dotted line on Figure 4a-b. One and three months after the SAB (SAB + 1M and SAB + 3M) all horses in the iPPVO group were above this value compared to four and two, respectively, in the control group. Five months after the semi-annual boost (SAB + 5M), two horses were above this threshold in the control group versus nine in the iPPVO group.

When examining the frequency of horses showing an increase in mean titre between the different time points after SAB (1M, 3M and 5M) and the mean titre before annual vaccination (AV + 0M). The frequencies of increase in mean titre at 1 and 3 months after SAB compared to before AV did not differ significantly between the two groups (Figure 4c). However, all horses in the iPPVO group showed an increase in mean titre at 1 and 3 months after SAB. In contrast, the difference was significant five months after SAB (SAB + 5M) compared to before AV (AV + 0M) (p -value = 0.0018). Indeed, in the control group, only three horses showed a higher average titre 5 months after SAB compared to the titre before AV. In the iPPVO group all 10 horses had a higher titre 5 months after SAB compared to the titre before AV. These results show that significantly more horses in the iPPVO group showed an increase in neutralising antibody titre to EHV-1 five months after a six-monthly booster than before the annual vaccination, compared to the control group.

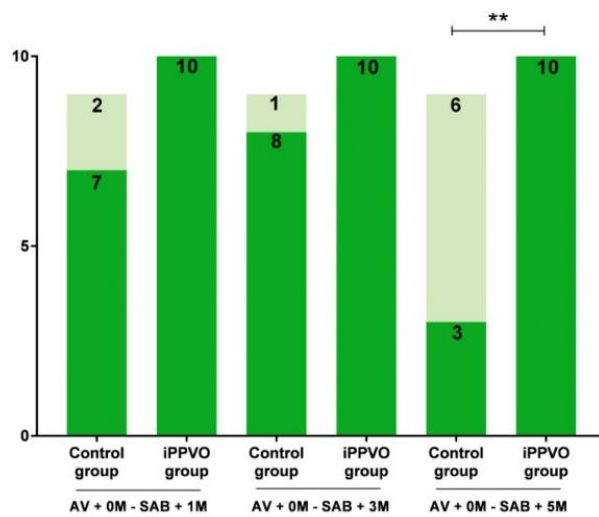
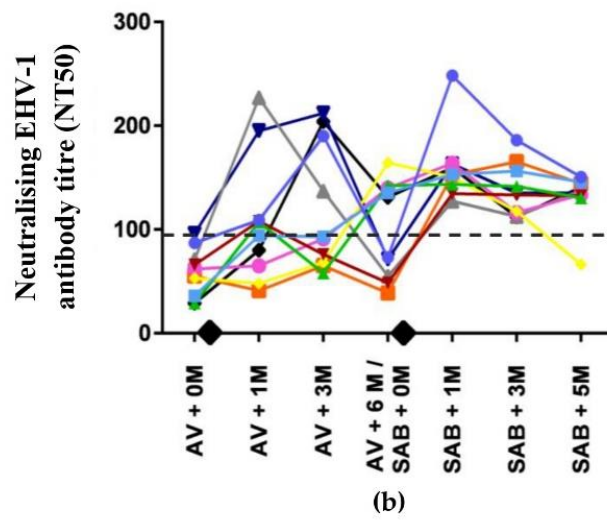
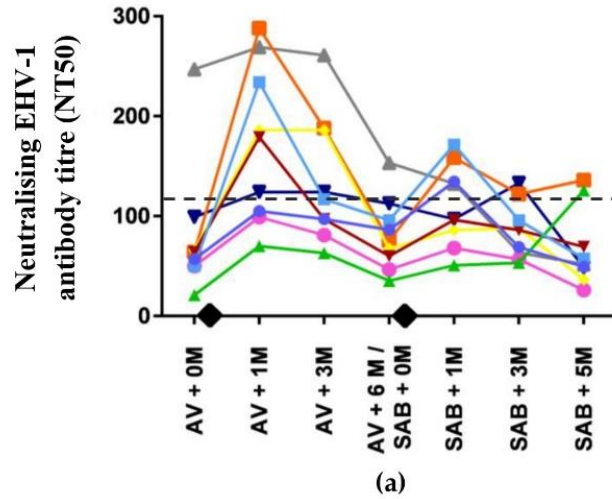


Figure 4. Individual neutralising antibody response (RTNA) to EHV-1 annual vaccination (AV), and semi-annual vaccination (SAB) with (a) or without (b) iPPVO. Values are from sera collected during 1 year from AV to 5 months after SAB in the control and iPPVO group. Each horse is represented with a specific color (a and b). The diamond represents the timing of the AV injection and the 6-month SAB injections with or without iPPVO. The black dotted line represents the mean of titre without iPPVO and before the SAB (for each group) (c) Cumulative histograms represent the frequency of horses showing an augmentation (dark green) or diminution (light green) of the antibody titre when AV and SAB responses were compared (after 1, 3 and 5 or 6-months after injections) with or without iPPVO (c). ** indicate significant difference (χ^2 tests; p-value < 0.005, respectively) in the frequency of horses presenting an augmentation or a diminution compared to the titre before annual vaccination in the control group and the iPPVO group. The time points post semi-annual vaccination were compared to the time point before annual vaccination.

4. Discussion

The recent EHV-1 outbreak in Valencia, Spain, during a show jumping competition in 2021, well illustrates the consequences of such an event on animal health and the economy. It also shows the efforts that still need to be made to control the spreading of this virus [14]. Protection against EHV-1 relies primarily on health measures such as confining sick horses and vaccination. Protection against EHV-1 relies primarily on health measures such as confining sick horses and vaccination [5]. Vaccination against EHV-1 reduces virus shedding and clinical signs but does not systematically prevent viral infection [7,10,29]. Inactivated vaccines are considered relatively safe, as the virus cannot replicate and cause clinical disease. However, inactivated vaccines tend to have a reduced ability to induce and maintain an effective and balanced immune response, requiring multiple and repeated doses to maintain protection [30]. Some studies have already shown the immunomodulatory effect of iPPVO *in vitro* and *in vivo* on various infections in horses. *In vitro*, PBMCs pre-treated with iPPVO prior to EHV-1 infection showed earlier and higher IFN- α and IFN- β expression than infected PBMCs not treated with iPPVO [21]. Although the mechanism of action is not known, it appears that iPPVO promotes innate immune defenses *in vitro* and *in vivo*. This led to the hypothesis that iPPVO injections could enhance the antibody response to vaccination, and this was recently established for EI vaccination [24]. Result presented here show that injections of iPPVO at the time of EHV-1 vaccination improve the humoral immune response of horses.

To perform this clinical trial, a selection process based on antibody levels was performed to assemble small homogenous groups where the detection of an effect of iPPVO injections would be possible with a limited number of horses. This approach was recently validated for testing the immunostimulatory effect of iPPVO on EI vaccination [24]. As before, iPPVO was administered separately but close to the vaccine injections site. It has been suggested that a proximity effect between iPPVO and vaccine components could be the result of convergence in the same draining lymph node. In our previous report, iPPVO was shown to increase the humoral response to an EI vaccine boost and to promote the maintenance of high antibody levels over time. The study also showed that iPPVO injected at the time of a semi-annual boost enabled all horses to pass the virological protection threshold at 1 and 6 months after injections [24]. To date, no studies have been conducted on the use of iPPVO to improve vaccination against EHV-1, and this motivated the present work.

We first showed that a majority of horses did not maintain high antibody titres 6 months after an annual boost or 5 months after a semi-annual boost with an inactivated vaccine (i.e. control group). This observation supports the WOA recommendations that horses should be vaccinated every 6 months. It is therefore important to maintain ade-

quate vaccination coverage in the equine population to limit the occurrence of EHV-1 outbreaks. An epidemiological study on the seroprevalence of EHV-1 in a horse population in Morocco showed that horses vaccinated with a monovalent, mostly inactivated vaccine usually had a low antibody titre of 1:49 as determined by SN [31]. The authors described an inverse relationship between the time since the last vaccination was done and the neutralising antibody titre. Similar results were reported in other studies where antibody titres were shown to decrease 3-6 months after vaccination [6,32,33]. These observations are consistent with the decrease in EHV-1 antibody titers observed in our study at 3 and 6 months after the booster vaccination (i.e., AV +3M, AV +6M in both groups and SAB+3M, SAB+5M in control group). Attili et al., (2020) suggested that administration of the vaccine to animals with high antibody titres due to a previous infection or vaccination could induce a decrease in antibody titre due to an interaction between the antibodies and the vaccine [34]. This observation could explain the individual variations observed in antibody titres.

We then evaluated the effect of iPPVO injection during the SAB. Importantly, the increase in neutralising antibodies was demonstrated by two different assays, including conventional SN but also RTNA that has been recently developed by our team. The results showed with classical SN that horses that received iPPVO had significantly higher antibody levels at 3 and 5 months after SAB compared to those that received the vaccine alone. The RTNA showed that horses given iPPVO had significantly higher antibody levels only at 5 months post SAB compared to the vaccine alone. While the principle of measuring antibody levels in serum samples is based on viral neutralisation in both cases, the two assays differ in the cellular model (RK13 vs. ED cells) and the approach that is used to calculate antibody titres (endpoint for SN vs real-time monitoring for RTNA). This provides two different measurements for neutralising antibody titres, and this could explain observed discrepancies between the two methods. Nevertheless, the results presented here clearly show that iPPVO co-injections increased the levels of EHV-1-specific antibodies induced by the Equip EHV-1,4 inactivated vaccine. Unfortunately, there are no established protective correlates for antibody levels during EHV-1 vaccination as there are for EI vaccination with the SRH test [35,36]. At this stage of the study, it is not possible to determine the level of protection of horses and whether this is different for horses that received iPPVO. A future study looking at the protection of horses given iPPVO at the time of vaccination against EHV-1,4 would be interesting.

Ons et al (2014) reported that only 25% of horses seroconverted after an EHV-1 challenge and none of the iPPVO treated horses seroconverted [37]. The authors hypothesised that iPPVO better controlled EHV-1 infection and that its protective effect is probably attributed to a stimulation of the innate immune system. This suggests that the fact that iPPVO reduces the number of animals that seroconvert may be related to its protective effect against infection.

The limitations of this study were that (i) the horses were all females from the same farm for reasons of availability in performing this work, (ii) the antibody responses of the horses to the inactivated EHV-1,4 vaccine were low, only 3 horses seroconverted in each group, (iii) Only the humoral response for EHV-1 was analyzed and it could be interesting to measure if there is an effect of cellular response and (iv) only EHV-1 antibodies was realized albeit a vaccine with 2 valences was used.

Indeed, in this study, the vaccination schedule of the animals was not disturbed and an inactivated EHV-1,4 vaccine was used to test the effect of iPPVO. It would be interesting to test iPPVO with other vaccine technologies such as subunit vaccines or modified live attenuated virus vaccines. However, differences in vaccination schedules should also be considered. In addition, vaccines are composed of one or more antigens specific to the infection against which an individual is to be protected and adjuvants. EHV-1 genetic and antigenic variability is believed to be relatively limited in EHV (i.e., around one point mutation involving single nucleotide substitution per 1000 bp between the EHV-1 strains

Ab4 and V592) [38]. It is advantageous to avoid regular updating of vaccines. The adjuvants serve to boost the innate immune response, which in turn triggers the adaptive immune response. The adjuvants found in EHV-1 vaccines are mainly carbomers and oil-in-water emulsions [29]. Our previous study showed the interesting properties of iPPVO as a potential adjuvant in a separate but close co-injection of an EI vaccine [24]. Zylexis® was used at half the manufacturer's recommended dose for horses as co-injection in close proximity with an EHV-1 vaccine containing Carbopol as the main adjuvant. It is possible that the EHV-1 neutralising antibody response may be further enhanced at the recommended dose of iPPVO. However, future tests should look at whether or not side effects such as local swelling occur at a higher dose. Furthermore, it was only possible to analyse humoral responses 5 months after SAB, it would be interesting to conduct a similar study and follow antibody titres beyond 5 months.

This study presents an interesting approach to improve immune protection in horses using the combination of a commercial vaccine and an immunostimulant approved in veterinary medicine. The use of such a protocol including iPPVO could also be of interest for vaccination during EHV-1 outbreaks. The increase in recent years of episodes reported by surveillance organisations such as RESPE, WOA and International Collating Centre demonstrates the interest in increasing herd immunity [15]. Moreover, from 2015 to early 2017, many European countries have been impacted with a shortage of rhinopneumonitis vaccines [39]. Based on our results, the use of iPPVO in combination with vaccination against rhinopneumonitis could be beneficial after a vaccine shortage to enhance immunity at the individual and, consequently, at the herd level. However, the potential of iPPVO to enhance protection from EHV-1 needs to be further demonstrated by challenging animals using an experimental design similar to the study conducted by Ons et al. (2014) [37].

In conclusion, the current seroneutralisation results show that iPPVO can be used in its marketed form to enhance the immunogenicity of an existing inactivated EHV-1 vaccine without the need to modify product formulations.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1. Rectal temperature (°C) and injection site effects before injection and 6 days after the first injection of iPPVO. Table S2. Serum amyloid A dosage (µg/ml) for each horse before the annual vaccine injection and semi-annual boost and 1, 3 and 6 months after the annual vaccination and 1, 3 and 5 months after the semi-annual boost for control group and iPPVO group. Table S3. Reciprocal of neutralising EHV-1 antibody titre measured by seroneutralisation assay before the annual vaccine injection and semi-annual boost and 1, 3 and 6 months after the annual vaccination and 1, 3 and 5 months after the semi-annual boost for control group and iPPVO group. Figure S1. Diagram of the selection process for the population of 20 horses. Figure S2. Evolution of the values of (a) large lymphocytes, (b) small lymphocytes, (c) monocytes, (d) basophils, (e) eosinophils and (f) neutrophils before and after the semi-annual boost. The red circles represent the different values of each horse in the control group (n=9) and the blue squares represent the different values of each horse in the iPPVO group (n=10). The standard deviations represent the standard deviations from the mean.

Author Contributions: Study design: F.C., R.P., L.B., F.D.G. and S.P.; data collection, analysis, and interpretation: L.B., F.D.G., F.C., C.F., R.P., P.-O.V. and S.P.; manuscript preparation: F.C., R.P., P.-O.V. and S.P.; critically reviewed by R.P., S.P., E.H. and P.-O.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fonds Eperon OVERLORD N12-2017, Normandy County Council (17E01598/17EP04324), the IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) grant number Rech-CS-2022-2023-019-VacAdEq_HVE. CENTAURE European project co-funded by Normandy County Council, European Union in the framework of the ERDF-ESF operational program 2014–2020.

Institutional Review Board Statement: The animal study was reviewed and approved by the CENOMEXA n°54 ethics committee (N° APAFIS 2021081914235114_V3 (#32718)) and the Ministry of Higher Education, Research and Innovation.

Informed Consent Statement: Not applicable. 569

Data Availability Statement: Not applicable. 570

Acknowledgments: The authors would like to thank the team at the Jumenterie du Pin (IFCE) for providing the animals and collecting the samples. 571
572

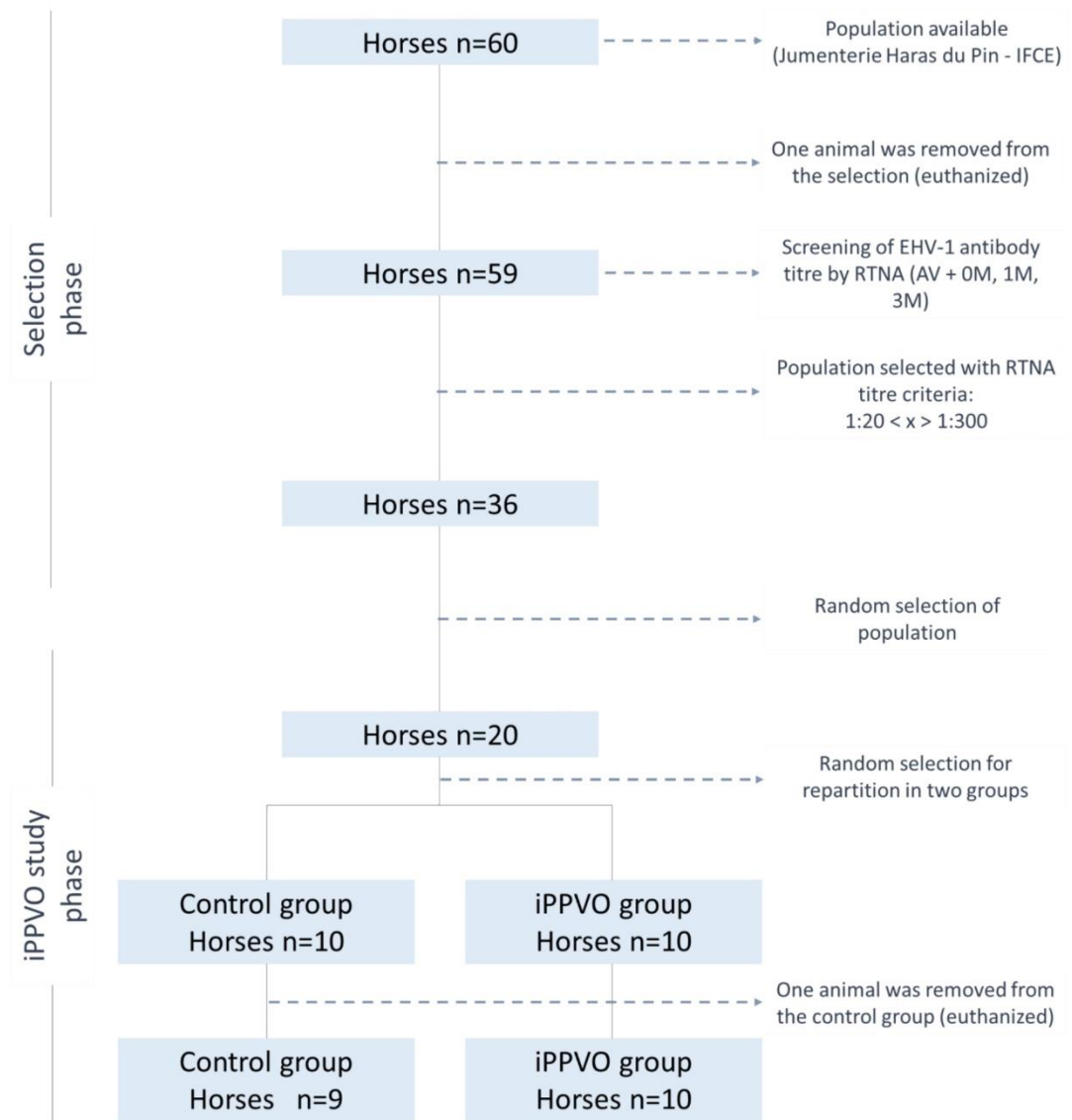
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. 573

References

- 574
- 575
- 576
1. Khusro, A.; Aarti, C.; Rivas-Caceres, R.R.; Barbabosa-Pliego, A. Equine Herpesvirus-1 Infection in Horses: Recent Updates on Its Pathogenicity, Vaccination, and Preventive Management Strategies. *J. Equine Vet. Sci.* **2020**, *40*, 102923, doi:10.1016/j.jevs.2020.102923. 577
 2. Patel, J.R.; Heldens, J. Equine Herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – Epidemiology, Disease and Immunoprophylaxis: A Brief Review. *The Veterinary Journal* **2005**, *170*, 14–23, doi:10.1016/j.tvjl.2004.04.018. 580
 3. Oladunni, F.S.; Horohov, D.W.; Chambers, T.M. EHV-1: A Constant Threat to the Horse Industry. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 2668, doi:10.3389/fmicb.2019.02668. 582
 4. Vereecke, N.; Carnet, F.; Pronost, S.; Vanschandevijl, K.; Theuns, S.; Nauwynck, H. Genome Sequences of Equine Herpesvirus 1 Strains from a European Outbreak of Neurological Disorders Linked to a Horse Gathering in Valencia, Spain, in 2021. *Microbiol Resour Announc* **2021**, *10*, e00333-21, doi:10.1128/MRA.00333-21. 584
 5. European Food Safety Authority (EFSA); Carvelli, A.; Nielsen, S.S.; Paillet, R.; Broglia, A.; Kohnle, L. Clinical Impact, Diagnosis and Control of Equine Herpesvirus-1 Infection in Europe. *EFSA J* **2022**, *20*, e07230, doi:10.2903/j.efsa.2022.7230. 585
 6. Heldens, J.G.M.; Hannant, D.; Cullinane, A.A.; Prendergast, M.J.; Mumford, J.A.; Nelly, M.; Kydd, J.H.; Weststrate, M.W.; van den Hoven, R. Clinical and Virological Evaluation of the Efficacy of an Inactivated EHV1 and EHV4 Whole Virus Vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/Challenge Experiments in Foals and Pregnant Mares. *Vaccine* **2001**, *19*, 4307–4317, doi:10.1016/S0264-410X(01)00131-1. 588
 7. Minke, J.M.; Fischer, L.; Baudu, P.; Guigal, P.M.; Sindle, T.; Mumford, J.A.; Audonnet, J.C. Use of DNA and Recombinant Canarypox Viral (ALVAC) Vectors for Equine Herpes Virus Vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* **2006**, *111*, 47–57, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.008. 591
 8. Goehring, L.S.; Wagner, B.; Bigbie, R.; Hussey, S.B.; Rao, S.; Morley, P.S.; Lunn, D.P. Control of EHV-1 Viremia and Nasal Shedding by Commercial Vaccines. *Vaccine* **2010**, *28*, 5203–5211, doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.065. 594
 9. Marenzoni, M.L.; De Waure, C.; Timoney, P.J. Efficacy of Vaccination against Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Infection: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Challenge Trials. *Equine Vet J* **2022**, doi:10.1111/evj.13870. 597
 10. Patel, J.R.; Bateman, H.; Williams, J.; Didlick, S. Derivation and Characterisation of a Live Equid Herpes Virus-1 (EHV-1) Vaccine to Protect against Abortion and Respiratory Disease Due to EHV-1. *Veterinary Microbiology* **2003**, *91*, 23–39, doi:10.1016/S0378-1135(02)00259-6. 599
 11. Walter, J.; Seeh, C.; Fey, K.; Bleul, U.; Osterrieder, N. Clinical Observations and Management of a Severe Equine Herpesvirus Type 1 Outbreak with Abortion and Encephalomyelitis. *Acta Vet Scand* **2013**, *55*, 19, doi:10.1186/1751-0147-55-19. 600
 12. Damiani, A.M.; de Vries, M.; Reimers, G.; Winkler, S.; Osterrieder, N. A Severe Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Abortion Outbreak Caused by a Neuropathogenic Strain at a Breeding Farm in Northern Germany. *Vet Microbiol* **2014**, *172*, 555–562, doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.023. 603
 13. Couroucé, A.; Tessier, C.; Pomares, R.; Thévenot, J.; Pitel, C.M.; Pronost, S.; Legrand, L.; Pitel, P.-H. EHV-1 Neurological Outbreak during a Show-jumping Competition: A Clinical and Epidemiological Study.; *Equine Veterinary Journal*, September 27 2021; Vol. 53, p. 52. 605
606
607
608
609
610

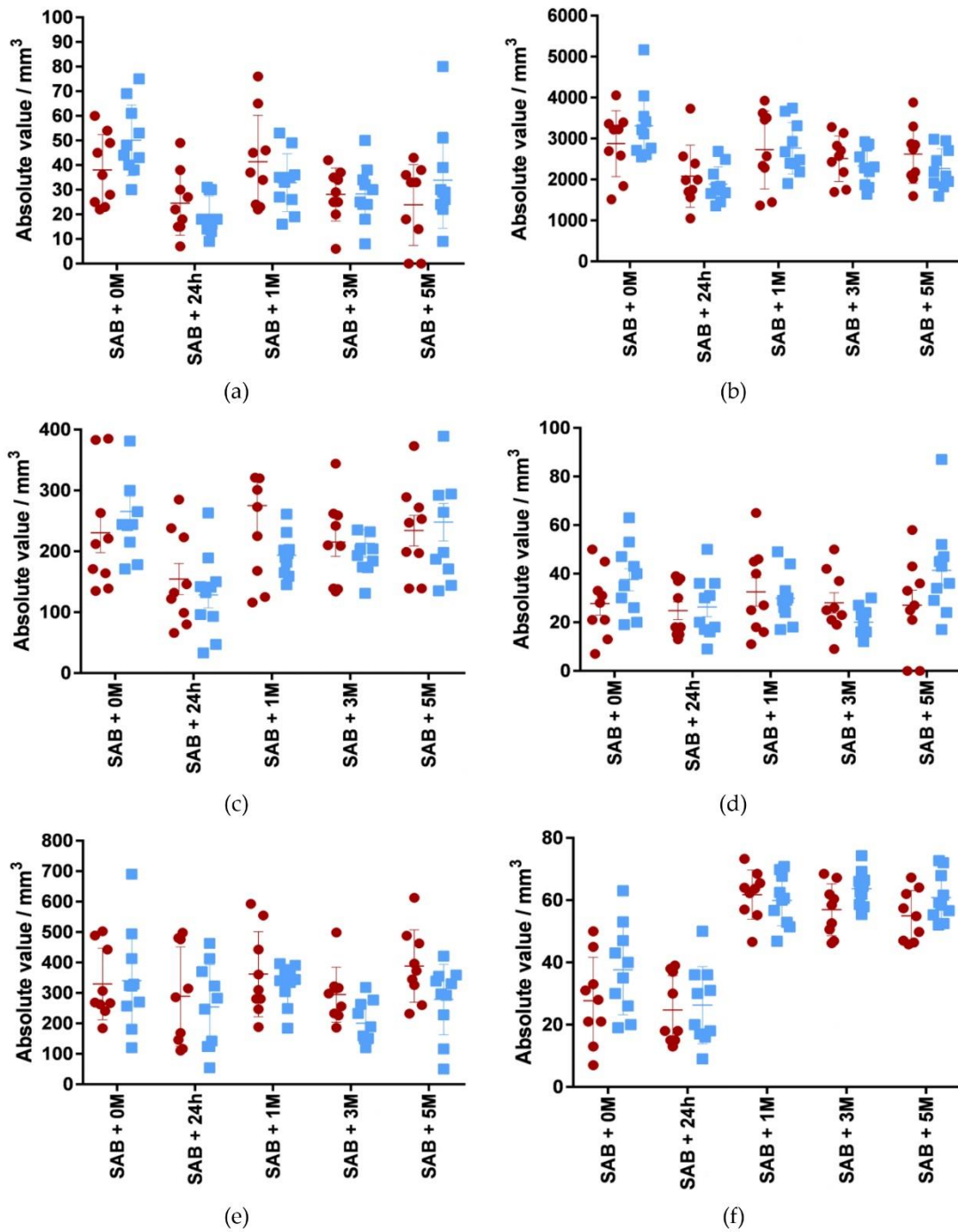
14. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Nielsen, S.S.; Alvarez, J.; Bicout, D.J.; Calistri, P.; Canali, E.; Drewe, J.A.; Garin-Bastuji, B.; Gonzales Rojas, J.L.; Gortázar, C.; et al. Assessment of Listing and Categorisation of Animal Diseases within the Framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): Infection with Equine Herpesvirus-1. *EFSA Journal* **2022**, *20*, e07036, doi:10.2903/j.efsa.2022.7036. 611–614
15. Equine Herpesvirus Resources | AAEP Available online: <https://aaep.org/guidelines/infectious-disease-control/equine-herpesvirus-resources> (accessed on 30 March 2023). 615–616
16. Weber, O.; Siegling, A.; Friebe, A.; Limmer, A.; Schlapp, T.; Knolle, P.; Mercer, A.; Schaller, H.; Volk, H.-D. 2003 Inactivated Parapoxvirus Ovis (Orf Virus) Has Antiviral Activity against Hepatitis B Virus and Herpes Simplex Virus. *Journal of General Virology* **2003**, *84*, 1843–1852, doi:10.1099/vir.0.19138-0. 617–619
17. Friebe, A.; Siegling, A.; Friederichs, S.; Volk, H.-D.; Weber, O. Immunomodulatory Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis (ORF Virus) on Human Peripheral Immune Cells: Induction of Cytokine Secretion in Monocytes and Th1-like Cells. *J Virol* **2004**, *78*, 9400–9411, doi:10.1128/JVI.78.17.9400-9411.2004. 620–622
18. Sturgill, T.L.; Giguère, S.; Franklin, R.P.; Cohen, N.D.; Hagen, J.; Kalyuzhny, A.E. Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis on the Cumulative Incidence of Pneumonia and Cytokine Secretion in Foals on a Farm with Endemic Infections Caused by *Rhodococcus Equi*. *Vet Immunol Immunopathol* **2011**, *140*, 237–243, doi:10.1016/j.vetimm.2010.12.012. 623–625
19. Ryan, C.; Giguère, S.; Fultz, L.; Long, M.T.; Crawford, P.C. Effects of Two Commercially Available Immunostimulants on Leukocyte Function of Foals Following Ex Vivo Exposure to *Rhodococcus Equi*. *Vet Immunol Immunopathol* **2010**, *138*, 198–205, doi:10.1016/j.vetimm.2010.07.027. 626–628
20. Horohov, D.W.; Breathnach, C.C.; Sturgill, T.L.; Rashid, C.; Stiltner, J.L.; Strong, D.; Nieman, N.; Holland, R.E. In Vitro and in Vivo Modulation of the Equine Immune Response by Parapoxvirus Ovis. *Equine Vet J* **2008**, *40*, 468–472, doi:10.2746/042516408X322111. 629–631
21. Hue, E.S.; Richard, E.A.; Fortier, C.I.; Fortier, G.D.; Paillot, R.; Raue, R.; Pronost, S.L. Equine PBMC Cytokines Profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines* **2017**, *5*, doi:10.3390/vaccines5030028. 632–634
22. Rush, B.R.; Flaminio, M.J. Immunomodulation in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* **2000**, *16*, 183–197, viii, doi:10.1016/s0749-0739(17)30126-8. 635–636
23. Paillot, R. A Systematic Review of the Immune-Modulators Parapoxvirus Ovis and *Propionibacterium Acnes* for the Prevention of Respiratory Disease and Other Infections in the Horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2013**, *153*, 1–9, doi:10.1016/j.vetimm.2013.01.010. 637–639
24. Carnet, F.; Paillot, R.; Fortier, C.; Hue, E.S.; Briot, L.; de Geoffroy, F.; Vidalain, P.-O.; Pronost, S. Immunostimulating Effect of Inactivated Parapoxvirus Ovis on the Serological Response to Equine Influenza Booster Vaccination. *Vaccines (Basel)* **2022**, *10*, 2139, doi:10.3390/vaccines10122139. 640–642
25. Sutton, G. Étude Phylogénique de Souches d’alphaherpèsvirus Isolées Chez Les Équidés Français et Développement d’un Outil Innovant Pour La Mesure Des Anticorps Neutralisants Après Infection Ou Vaccination. These de doctorat, Normandie, 2021. 643–644
26. Ramakrishnan, M.A. Determination of 50% Endpoint Titer Using a Simple Formula. *World J Virol* **2016**, *5*, 85–86, doi:10.5501/wjv.v5.i2.85. 645–646
27. International Office of Epizootics *Biological Standards Commission Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial 539 Animals: (Mammals, Birds and Bees)*; 2018; Vol. ISBN 978-92-95108-18-9; 647–648
28. Witkowski, P.T.; Schuenadel, L.; Wiethaus, J.; Bourquain, D.R.; Kurth, A.; Nitsche, A. Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *401*, 37–41, doi:10.1016/j.bbrc.2010.09.003. 649–651
29. Carnet, F.; Perrin-Cocon, L.; Paillot, R.; Lotteau, V.; Pronost, S.; Vidalain, P.-O. An Inventory of Adjuvants Used for Vaccination in Horses: The Past, the Present and the Future. *Veterinary Research* **2023**, *54*, 18, doi:10.1186/s13567-023-01151-3. 652–653

30. Minke, J.M.; Audonnet, J.-C.; Fischer, L. Equine Viral Vaccines: The Past, Present and Future. *Vet Res* **2004**, *35*, 425–443, doi:10.1051/vetres:2004019. 654
655
31. El Brini, Z.; Fassi Fihri, O.; Paillot, R.; Lotfi, C.; Amraoui, F.; El Ouadi, H.; Dehhaoui, M.; Colitti, B.; Alyakine, H.; Piro, M. Seroprevalence of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) and Equine Herpesvirus 4 (EHV-4) in the Northern Moroccan Horse Populations. *Animals* **2021**, *11*, 2851, doi:10.3390/ani11102851. 656
657
658
32. Hannant, D.; Jessett, D.M.; O'Neill, T.; Dolby, C.A.; Cook, R.F.; Mumford, J.A. Responses of Ponies to Equid Herpesvirus-1 Iscom Vaccination and Challenge with Virus of the Homologous Strain. *Research in Veterinary Science* **1993**, *54*, 299–305, doi:10.1016/0034-5288(93)90126-Z. 659
660
661
33. Wagner, B.; Goodman, L.B.; Babasyan, S.; Freer, H.; Torsteinsdóttir, S.; Svansson, V.; Björnsdóttir, S.; Perkins, G.A. Antibody and Cellular Immune Responses of Naïve Mares to Repeated Vaccination with an Inactivated Equine Herpesvirus Vaccine. *Vaccine* **2015**, *33*, 5588–5597, doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.009. 662
663
664
34. Attili, A.-R.; Colognato, R.; Preziuso, S.; Moriconi, M.; Valentini, S.; Petrini, S.; De Mia, G.M.; Cuteri, V. Evaluation of Three Different Vaccination Protocols against EHV1/EHV4 Infection in Mares: Double Blind, Randomized Clinical Trial. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8*, doi:10.3390/vaccines8020268. 665
666
667
35. Mumford, J.A.; Jessett, D.M.; Rollinson, E.A.; Hannant, D.; Draper, M.E. Duration of Protective Efficacy of Equine Influenza Immunostimulating Complex/Tetanus Vaccines. *Vet Rec* **1994**, *134*, 158–162, doi:10.1136/vr.134.7.158. 668
669
36. Newton, J.R.; Townsend, H.G.G.; Wood, J.L.N.; Sinclair, R.; Hannant, D.; Mumford, J.A. Immunity to Equine Influenza: Relationship of Vaccine-Induced Antibody in Young Thoroughbred Racehorses to Protection against Field Infection with Influenza A/Equine-2 Viruses (H3N8). *Equine Veterinary Journal* **2000**, *32*, 65–74, doi:10.2746/042516400777612116. 670
671
672
37. Ons, E.; Van Brussel, L.; Lane, S.; King, V.; Cullinane, A.; Kenna, R.; Lyons, P.; Hammond, T.-A.; Salt, J.; Raue, R. Efficacy of a Parapoxvirus Ovis-Based Immunomodulator against Equine Herpesvirus Type 1 and Streptococcus Equi Equi Infections in Horses. *Vet. Microbiol.* **2014**, *173*, 232–240, doi:10.1016/j.vetmic.2014.07.015. 673
674
675
38. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *Journal of Virology* **2006**, *80*, 4047–4060, doi:10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006. 676
677
678
679
39. Paillot, R.; Marcillaud Pitel, C.; D'Ablon, X.; Pronost, S. Equine Vaccines: How, When and Why? Report of the Vaccinology Session, French Equine Veterinarians Association, 2016, Reims. *Vaccines* **2017**, *5*, 46, doi:10.3390/vaccines5040046. 680
681
682



1
2
3
4

Figure S1. Diagram of the selection process for the population of 20 horses.



10 **Figure S2.** Evolution of the values of (a) large lymphocytes, (b) small lymphocytes, (c) monocytes, (d)
 11 basophils, (e) eosinophils and (f) neutrophils before and after the semi-annual boost. The red circles
 12 represent the different values of each horse in the control group (n=9) and the blue squares represent the
 13 different values of each horse in the iPPVO group (n=10). The standard deviations represent the standard
 14 deviations from the mean.
 15

1 **Table S1.** Rectal temperature (°C) and injection site effects before injection and 6 days after the first injection of iPPVO.
 2

Horse n°	Injection -1D		Injection D		Injection +1D		Injection +2D		Injection +3D		Injection +4D		Injection +5D		Injection +6D		
	Evening	Morning	Evening**	Morning	Evening	Morning	Evening*	Morning*	Evening	Morning	Evening	Morning*	Evening	Morning	Evening	Morning	Evening
1	37.8	36.8	38.1	37.1	38.1	37.6	37.2	37.2	37.2	37.8	37.2	37.2	37.3	38	37.3	38	37.6
3	37.7	37.5	38	38.3	37.4	37.2	37.1	37.1	37	37.7	37.6	36.9	37	37.2	37.2	37.7	38.2
4	37.8	37.4	37.8	37.5 swelling	37.3	36.6	36.9	37.2	37.7	37.2	37.4	37.6	36.6	37.4	37.2	37.2	38
5	37.4	37.3	37.8	37.7	37.1	37.6	37.7	37.1	37.2	37.2	36.7	37	36.5	37.2	37.3	38	38
6	38	37.8	38	37.3	37	37.2	37.7	37.7	37.7	37.8	37.1	37.8	37	37.8	38	38.2	38.2
7	37.7	37.3	37.7	37.6	37	37.6	37.6	37.1	37.6	37.6	37.2	37.9	37.2	37.7	37.6	38.2	38.2
8	38	37.5	37.5	37.6	37.4	37.4	37.7	37.7	37.7	38.1	37.6	37.9	37.8	37.9	37.6	36.3	36.3
10	37.7	37.5	37.7	38.1	37.7	37.3	37	37.3	37.4	37.3	37.3	38	37.2	37.5	37.7	36.9	36.9
11	37.9	37.6	38.1	37.7 swelling	38.1	37.5	37.9	37.8	38	37.3	37.3	37.6	37.4	37.6	37.6	37.7	37.7
12	37.2	37.2	37.4	37.8	38.4	37	38.1	37	37.3	37.3	37.2	36.9	36.3	37.5	36.8	37.1	37.1
13	37.9	37.9	38.2	38.1	37.8	37.8	37.8	37.9	37.8	37.8	37.7	38.4 swelling	37.2	37.9	37.8	38.2	38.2
14	38	37.6	38	37.9	38	37.5	37.4	37.8	37.7	37.7	37.2	37.2 swelling	37	38	36.1	37.6	37.6
15	37.7	37.5	37.7	37.6 swelling	37.7	37	37.5	37.8	37.7	37.5	37.6	37.6	37.2	37.5	37.8	37.9	37.9
16	37.8	37.6	37.8	37.8	38	37.3	37.8	37.5	37.7	37.8	37.8	37.8	37.2	37.7	37.5	38	38
17	37.9	37.5	38.1	38.6	38.1	37.6	37.4	37.9	37.4	37.4	37.3	37.7 swelling	36.5	37.8	37.7	38.7	38.7
18	37.8	37.6	37.9	38.6	38.1	37.3	37.9	37.7	37.6	37.6	37.2	37.5	36.8	37.6	37.4	37.9	37.9
19	37.7	37.3	37.5	37.8	37.7	37.3	37	37.5	37.9	37.9	37.7	37.6	37.4	37.1	37.5	37.4	37.4
20	37.8	37.4	37.8	37.4	37.5	37.3	37.3	37.7	37.8	37.8	37.5	37.2	36.9	37.3	37.3	38	38

3 *iPPVO injection

4 **co-injection of iPPVO and EHV-1,4 vaccination

5 Mare #2 no temperature monitoring; Mare #9 was euthanised

6 **Table S2.** Serum amyloid A dosage ($\mu\text{g/ml}$) for each horse before the annual vaccine injection and semi-annual boost and 1, 3 and 6 months after the
 7 annual vaccination and 1, 3 and 5 months after the semi-annual boost for control group and iPPVO group.
 8

Horse n°	Control group										iPPVO group									
	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
SAB + 0M	<1.25	3.27	2.46	37.15	<1.25	<1.25	<1.25	>100	<1.25	>100	<1.25	2.04	<1.25	>100	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	
SAB + 24h	>100	>100	>100	98.87	10.71	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	88.05	>100	>100	>100	>100	>100	
SAB + 1M	<1.25	<1.25	4.00	<1.25	18.00	11.00	<1.25	>100	<1.25	13	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	4.00	2.00	<1.25	<1.25	
SAB + 3M	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	<1.25	
SAB + 5M	<1.25	<1.25	2.00	2.00	3.00	6.00	4.00	11.00	2.00	8.00	7.00	5.00	17.00	2.00	3.00	3.00	>100	>100	<1.25	

9

10 Mare #9 was euthanised

11

12 **Table S3.** Reciprocal of neutralising EHV-1 antibody titre measured by seroneutralization assay before the annual vaccine injection and semi-annual boost
 13 and 1, 3 and 6 months after the annual vaccination and 1, 3 and 5 months after the semi-annual boost for control group and iPPVO group.
 14

Horse n°	Control group										iPPVO group									
	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
AV+0M	128	64	24	128	32	128	128	96	64	96	192	128	48	128	32	48	96	128		
AV+1M	256	96	48	192	48	64	256	96	64	96	64	256	80	256	64	64	128	96		
AV+3M	128	64	128	256	48	64	256	96	96	96	160	256	64	192	64	48	192	256		
AV+6M/ SAB+0M	128	128	128	256	48	96	128	128	64	128	192	192	96	256	64	64	128	192		
SAB+1M	128	256	96	256	128	128	256	96	128	256	128	256	96	256	96	128	128	192		
SAB+3M	128	128	64	128	128	96	128	64	128	256	256	192	128	256	128	128	192	256		
SAB+5M	64	192	64	128	64	64	128	64	128	192	192	192	256	192	128	128	192	256		

15

16

17

Mare #9 was euthanised

2.3. Résultats et discussion

Au cours de cette étude, la réponse immunitaire humorale et notamment la réponse en anticorps neutralisants l'EHV-1 a été mesurée par séroneutralisation classique et par la méthode de séroneutralisation en temps réel chez des juments ayant reçu un rappel vaccinal annuel puis semi-annuel avec ou sans iPPVO.

Dans un premier temps, une population de 20 chevaux a été étudiée. La sélection des 20 juments est basée sur la réponse en anticorps neutralisants contre l'EHV-1 mesurée lors d'un rappel vaccinal annuel puis 1 et 3 mois après la vaccination contre la rhinopneumonie. Ce modèle d'étude a été statistiquement validé avec un nombre de chevaux limité à 20 lors de notre précédente étude sur l'effet immunostimulant de l'iPPVO sur la réponse en anticorps contre la grippe équine. Les chevaux sélectionnés ont ensuite été divisés en 2 groupes de 10 chevaux. Les chevaux ont reçu une injection de vaccin inactivé EHV-1/4, 6 mois après la vaccination annuelle, et seuls 10 chevaux ont reçu simultanément des injections d'iPPVO au moment de la vaccination (T0, T+48h et T+96h).

Notre étude a d'abord montré qu'une majorité de chevaux ne conservait pas un taux d'anticorps élevé 6 mois après un rappel vaccinal annuel. Cette observation est en accord avec les données de la littérature. En effet, plusieurs études ont montré une diminution de la réponse humorale entre 3 et 6 mois après la vaccination et en particulier avec l'utilisation de vaccins inactivés (Hannant et al., 1993; Heldens et al., 2001b; Wagner et al., 2015; El Brini et al., 2021).

La méthode de séroneutralisation classique a permis de constater que l'iPPVO augmente les réponses en anticorps neutralisants l'EHV-1 au 3^{ème} et 5^{ème} mois suivant les injections contrairement à un boost semi-annuel seul. La méthode de séroneutralisation par RTNA, quant à elle, a permis de constater que l'iPPVO augmente les réponses en anticorps neutralisants l'EHV-1 au 5^{ème} mois suivant les injections contrairement à un boost semi-annuel seul. Même si des différences sont observées entre les deux approches, pouvant être dues aux modèles cellulaires et au mode de calcul qui diffèrent, l'effet observé avec ces deux approches renforce la validité des résultats.

Cette étude nous a également permis de constater que les réponses individuelles à la vaccination EHV-1/4 mesurées par séroneutralisation présentaient une grande variabilité chez les chevaux de notre étude. Peu de données sont publiées dans la littérature qui présentent les résultats individuels sur les chevaux (Stokes et al., 1991). La majorité des travaux rapportent les données par populations d'étude (Heldens et al., 2001a; Goodman et al., 2006; Goehring et al., 2010; Bresgen et al., 2012). Ce mode de présentation a également été publié par Thieulent et al. dans notre laboratoire, sur le suivi des anticorps anti-EHV-1, mesurés par SN, lors d'une étude expérimentale démontrant l'effet du valganciclovir (Thieulent et al., 2022). L'analyse fine des résultats au niveau individuel montrait également une variation (communication personnelle).

En l'absence de corrélat de protection, comme cela est bien décrit pour la grippe, la capacité des vaccins à protéger les chevaux ne peut être clairement établie. Sur la base de la réponse moyenne des 20 chevaux soumis à une vaccination annuelle et semi-annuelle, nous avons proposé un titre RTNA moyen : $RTNA M_{ab} = 1:101 \pm 1:59$. Les 10 chevaux du groupe iPPVO ont présenté un titre supérieur à cette moyenne 1 mois et 3 mois après les injections puis seulement 1 cheval a présenté un titre inférieur au 5^{ème} mois. Dans le groupe témoin au 6^{ème} mois, 4 chevaux ont présenté un titre supérieur à cette valeur moyenne. Cette approche ne peut à ce stade avoir valeur de référence au vu du faible nombre de sérums considéré et de la différence (5 mois/6 mois) du moment d'analyse entre les deux populations. Néanmoins elle pourrait constituer une première piste pour établir des comparaisons de valeurs.

Cette étude a permis de déterminer l'effet de l'iPPVO sur la production d'anticorps neutralisants l'EHV-1 lorsque celui-ci est administré au même moment et à proximité du site d'injection du vaccin inactivé contre l'EHV-1/4 adjuvanté avec des carbomères. L'iPPVO a permis d'augmenter la réponse immunitaire humorale de façon significative par rapport à la population contrôle non traitée. Cette étude montre également que l'iPPVO peut être utilisé sous sa forme commerciale pour renforcer le pouvoir immunogène d'un vaccin EHV-1/4 inactivé contenant des carbomères en tant qu'adjuvant sans qu'il soit nécessaire de modifier les formulations des produits.

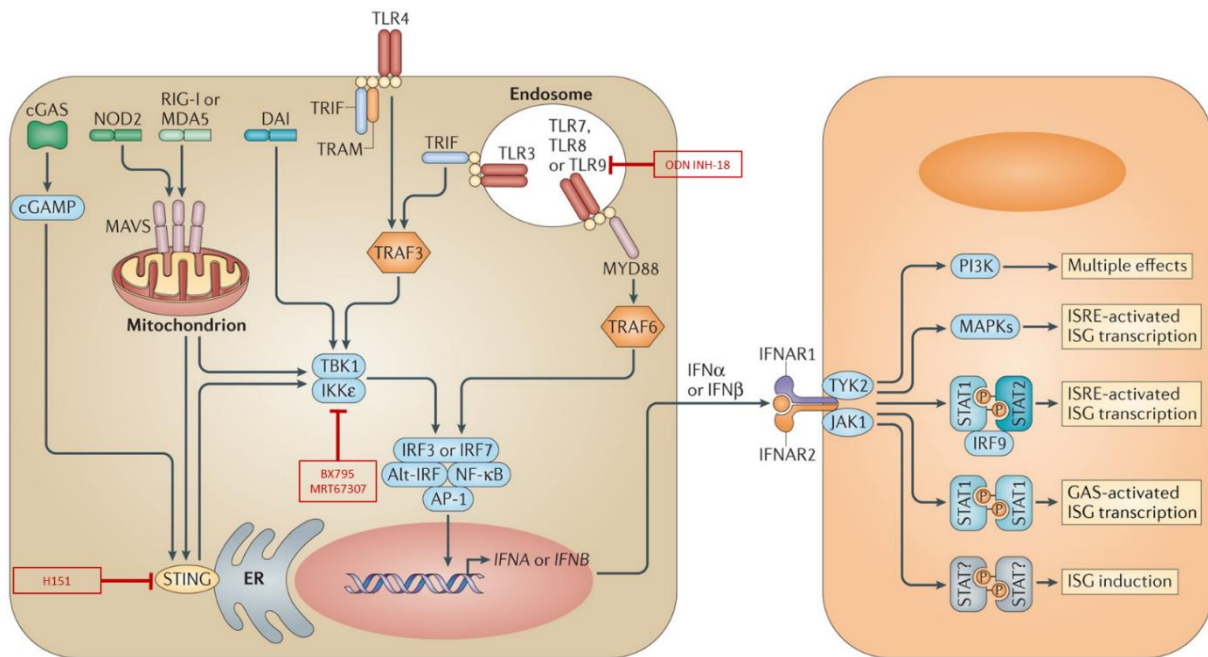
3. Etude préliminaire du mécanisme d'action de l'iPPVO sur les cellules mononucléées du sang périphérique

3.1. Introduction

Le Parapoxvirus ovis (PPVO) est un membre du genre Parapoxvirus de la famille des Poxviridae. Lorsque celui-ci est inactivé (iPPVO) il possède des propriétés immunomodulatrices (Siegemund et al., 2009; Schütze et al., 2010). *In vitro*, la caractérisation du profil cytokinique a mis en évidence la capacité de l'iPPVO à augmenter l'expression de l'IFN- γ et de l'IFN- β à des niveaux supérieurs à ceux observés avec la Concanavaline A sur des cultures de PBMC équins (Horohov et al., 2008). Le traitement par l'iPPVO a montré sa capacité à entraîner une expression élevée et transitoire d'IFN- α et IFN- β et de manière plus modérée d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-10 dans les premières 48h sur PBMC équins (Horohov et al., 2008; Hue et al., 2017). En revanche, la variation de l'expression de cytokines comme l'IL-1- β et l'IL-6 n'a pas été observée (Hue et al., 2017). Des études ont montré l'effet immunostimulateur de l'iPPVO sur les leucocytes du sang périphérique humain et *in vivo* chez la souris (Weber et al., 2003; Friebe et al., 2004). L'iPPVO induit notamment la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1, IL-6, IL-8 mais également des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 et de l'IFN- γ (Weber et al., 2003; Friebe et al., 2004). Les cytokines pro-inflammatoires sont significativement augmentées par l'iPPVO *in vitro* et *in vivo* dans les 48 premières heures post-injection (Siegemund et al., 2009; Anziliero et al., 2014b, 2014a; von Buttlar et al., 2014; Avci et al., 2016). Chez la souris, il semble que l'iPPVO stimule également les réponses interféron type I (IFN- α et - β) (Siegemund et al., 2009; Anziliero et al., 2014b; von Buttlar et al., 2014), de type II (IFN- γ) (Anziliero et al., 2014b, 2014a) et de type III (von Buttlar et al., 2014). De manière générale, l'iPPVO renforce les mécanismes immunitaires innés tels que l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et la production d'IFN.

Les IFN de type I sont divisés en plusieurs sous-types dont les IFN- α et - β font partie. Plusieurs voies de signalisation cellulaire permettent la synthèse des IFN de type 1, soit par la détection de motifs microbiens via les TLR, soit par le biais de voies de signalisation intracellulaire telle que la voie « stimulator of interferon genes » (STING) au sein des cellules infectées (Figure 29). Une étude de Siegmund et al. (2009) a montré que l'iPPVO entraînait la libération d'IFN- α et - β par des voies indépendantes des TLR sur des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris. La libération d'IFN a été constatée en absence du gène

MyD88 ou de la protéine adaptatrice contenant le domaine TIR qui induit l'interféron (TRIF). Il semblerait que l'induction d'IFN soit dépendante du facteur de régulation de l'IFN 7 (IRF7) mais pas de l'IRF3. Cependant, Von Buttlar et al. (2014), ont identifié le TLR9 endosomal comme le principal récepteur reconnaissant le PPVO et l'iPPVO dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes de souris. Le TLR9 est impliqué dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux présents dans les voies endosomales.



Nature Reviews | Immunology

Figure 29 Reconnaissance des pathogènes par des récepteurs de surface cellulaire et intracellulaire et différentes voies de signalisation des gènes codant pour les interférons de type I (IFN). Les encadrés rouges indiquent les molécules inhibitrices utilisées dans l'étude. Schéma adapté d'après (McNab et al., 2015).

L'activation des TLR ou de la voie STING après reconnaissance d'un pathogène entraîne l'activation de TBK1 et d'IKKε. Ces deux kinases phosphorylent et induisent la translocation nucléaire des facteurs de transcription IRF3 et 7 qui contrôlent l'expression des IFN de type I (Manes and Nita-Lazar, 2021). La production d'IFN permet d'induire l'expression de gènes appelés ISG (Interferon Stimulated Genes) par l'intermédiaire du récepteur aux interférons de type I IFNAR. Les IFN de type 1 ainsi produits agissent indirectement sur les particules infectieuses en propageant un signal cellulaire permettant la synthèse de protéines à action antivirale. Pour cela, ils se lient à leurs récepteurs membranaires (IFNAR1/IFNAR2) et génèrent un signal d'activation propagé dans la cellule par la voie de

signalisation JAK/STAT (Au-Yeung et al., 2013). Les JAK sont des kinases qui activent par phosphorylation les facteurs de transcription STAT1 et STAT2, permettant leur dimérisation et leur association à la protéine IRF9. Le complexe ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3) ainsi formé, composé de STAT1, STAT2 et IRF9, agit comme facteur de transcription nucléaire. Il se fixe en amont des gènes ISG pour induire leur expression et l'expression de protéines aux propriétés immunostimulatrices et antivirales (Bonjardim, 2005).

L'objectif de cette étude préliminaire était de mieux documenter le profil cytokinique induit par l'iPPVO sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), et de caractériser les voies d'activation mises en jeu.

3.2. Matériels et méthodes

PBMC

Trois chevaux (3 hongres, Selle français, âgés de 4 ans) ont été impliqués dans cette étude. L'étude et tous les travaux sur les animaux impliqués ont reçu l'approbation du comité d'éthique et du ministère de l'enseignement supérieur de la Recherche et de l'innovation (APAFIS 2020041610351986 _V4 (#25880)). Des échantillons de sang héparinés ont été prélevés au niveau de la veine jugulaire. Les cellules mononucléaires du sang périphérique équin (PBMC) ont été purifiés par centrifugation par gradient de densité sur Ficoll® et Diatrizoate ($d = 1,077 \pm 0,001$) et lavés deux fois dans une solution saline stérile tamponnée au phosphate (PBS) ($\text{pH} = 7,2$). Les PBMC (4×10^5 cellules/puits) de chaque cheval ont été placés dans une plaque 24 puits et cultivés dans un milieu (RMPI 1640, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) supplémenté de 5 % de sérum bovin fœtal (FBS), 200 UI/mL de pénicilline et 200 ng/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). La cytotoxicité de l'iPPVO sur les PBMC équins a été mesurée 48 heures post traitement (hpt) par des tests d'exclusion au bleu trypan (Figure 35).

Les PBMC humains ont été isolées à partir de sang total de donateurs sains fourni par l'Etablissement Français du Sang. Les cellules ont été purifiées par centrifugation sur la base de leur densité sur un coussin de Ficoll (Lymphoprep ; StemCell Technologies), et cultivées dans du RPMI-1640 (Sigma-Aldrich ; R8758) contenant 10% de sérum bovin fœtal (4×10^5 cellules/puits).

Lignée cellulaire et analyse de l'activité luciférase

Les cellules HEK-293-ISRE-Luc ont été maintenues dans du milieu Eagle modifié de

Dulbecco (DMEM ; Gibco-Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau fœtal (FCS), de la pénicilline et de la streptomycine à 37 °C et 5% de CO₂. Les cellules HEK-ISRE-Luc, préalablement décrites (lignée STING-37 ; (Lucas-Hourani et al., 2013)), sont stablement transfectées avec un gène rapporteur ISRE-Luc et produisent de la luciférase après stimulation par les IFN de type I, II ou III. Ces cellules ont été utilisées pour mesurer l'activité IFN dans les surnageant de culture des PBMCs. Pour cela, 35 000 cellules HEK-ISRE-Luc sont cultivées pendant 24h en présence de 50 µl de surnageant de PBMCs dans un volume final de 200 µl en plaques 96 puits. La production luciférase par les cellules HEK-ISRE-Luc est mesurée après élimination de 100 µl de surnageant et ajout de 50 µl/puits du réactif Bright-GLO (Promega) et acquisition du signal lumineux pendant 0,1 s avec un luminomètre.

Composé immunostimulant et molécules inhibitrices

Un lot de Zylexis[®] (Zoetis) produit dans des conditions commerciales a été utilisé (Grovet, Pays-Bas). Le Zylexis[®] est composé de la souche PPVO D1701 inactivée et lyophilisée.

Nous avons utilisé les composés BX795 (1 µM; Sigma-Aldrich) et MRT67307 (1 µM; Tocris Bioscience) pour inhiber TBK1 et d'IKKε, ODN INH-18 (5 µM; Invivogen) pour inhiber TLR9 et H151 (10 µM; Tocris Bioscience) pour inhiber STING (Figure 29).

Analyse des concentrations en cytokines

Par LegendPlex

Les surnageants de culture de PBMC humains ont été recueillis après 24h et 48h de traitement et conservés à -20 °C. Les cytokines ont été dosées à l'aide du test multiplex LEGENDplex (Human Anti-Virus Response Panel, BioLegend). Le signal de fluorescence a été analysé à l'aide d'un FACS Canto II (BD Biosciences). Les cytokines testées étaient : IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, TNF-α, IFN-α₂, IFN-λ₁, IFN-λ_{2/3}, IFN-β et IFN-γ.

Par kit ELISA

Les surnageants de culture de PBMC équins ont été recueillis et conservés à -20°C. les cytokines équine IL-6 (Equine IL-6, DuoSet, DY1886), IL-10 (Equine IL-10, DuoSet, DY1605) et TNF-α (Equine TNF-α, DuoSet, DY1814) ont été dosées à l'aide du kit DuoSet[®] ELISA development system (R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA). Les analyses ont été réalisées selon les recommandations des fournisseurs. Les lectures ont été effectuées à 450 nm avec le luminomètre Infinite[®] M200 (Tecan, Lyon, France).

Analyse de l'expression des cytokines par RT-qPCR en temps réel

Extraction d'ARN et Reverse transcription

L'ARN cellulaire total a été extrait à l'aide du mini kit RNeasy® (Qiagen, Courtaboeuf, France) et traité avec le RNase-Free DNase Set (Qiagen) directement sur les colonnes RNeasy pour éliminer l'ADN génomique selon les instructions du fabricant. La qualité et la quantité d'ARN ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop® 2000c (Thermoscientific, Courtaboeuf, France). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à leur traitement ultérieur. Environ 500 ng d'ARN total ont été rétrotranscrits avec le Superscript® First Strand System for RT-PCR (Life Technologies, Courtaboeuf, France) en combinaison avec des amorces Oligo(dT) 12-18 et RNase-OUT en suivant les instructions du fabricant. Un échantillon a été traité en l'absence de transcriptase inverse pour valider l'absence d'ADN génomique. Tous les échantillons d'ADNc ont été conservés à -20°C jusqu'à leur traitement ultérieur.

Analyse de l'expression des gènes des cytokines

Les amorces spécifiques de la séquence et les sondes TaqMan utilisées pour la quantification relative des cytokines ont été décrites dans l'article de Hue et al. (2017). Les cytokines analysées étaient IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- α , IFN- β et IFN- γ . Pour chaque réaction, 2,5 μ L d'ADNc dilué au 1:10 ont été amplifiés dans une réaction standard de 25 μ L (Taqman® Universal PCR Master Mix, Life Technologies). Le thermoprofil utilisé était 10 min à 95°C, suivi de 50 cycles de 15 s à 95°C et de 1 min à 60°C. Les PCR ont été réalisées sur un système QuantStudio™ 12 K Flex RealTime PCR System (Life Technologies).

Tous les échantillons ont été normalisés par rapport à la moyenne géométrique de trois gènes de ménage: la β -actine (ACTB), la β -glucuronidase (β -GUS) et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les changements dans l'expression des gènes des cytokines ont été calculés par quantification relative à l'aide de la méthode des $\Delta\Delta C_t$.

$$\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ gène cytokine} - C_t \text{ HKG moyen}) \text{ échantillon stimulé} - (C_t \text{ gène cytokine} - C_t \text{ HKG moyen}) \text{ échantillon témoin}$$

Les changements induits par le traitement dans l'expression des gènes des cytokines pour chaque cheval ont été calculés comme quantification relative $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les résultats (RQ) sont exprimés en tant que changement de RQ moyen \pm SEM dans l'expression du gène cytokinique.

Statistiques :

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de GraphPad PRISM® 7.04 (San Diego, CA, USA). Les analyses statistiques ont été effectuées après un test de Shapiro-Wilk pour évaluer si les données suivaient une distribution normale. Les échantillons de groupes normalement distribués ont été analysés en utilisant une ANOVA à un facteur pour tester les différences significatives entre les échantillons. Le niveau de significativité a été fixé à une valeur $p < 0,05$.

3.3. Résultats

Effet de l'iPPVO sur l'expression des ARNm d'un ensemble de cytokines dans des PBMC équins

Pour étudier l'effet immunostimulateur de l'iPPVO sur des PBMCs équins, des cellules ont été purifiées à partir de sang périphérique puis incubées pendant 24h en présence d'iPPVO à différentes doses. Une analyse par RT-qPCR en temps réel a permis d'analyser le profil d'expression de six gènes codant des cytokines : IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- α , - β et - γ (Figure 30). L'iPPVO induit significativement l'expression d'ARNm de l'IL-10 ($p < 0,05$) mais pas de l'IL-6, du TNF- α , IFN- α , - β et - γ lorsque les PBMC sont incubés avec 2,5 μ l d'iPPVO. Un volume d'iPPVO de 10 μ l a permis d'induire significativement l'expression d'ARNm de l'IL-10 ($p < 0,005$), du TNF- α ($p < 0,05$), de l'IFN- α ($p < 0,05$) et - β ($p < 0,0001$). Bien que l'induction de l'expression des ARNm de l'IL-6 et de l'IFN- γ ait montré en moyenne une augmentation dose réponse, les différences n'étaient pas significatives avec les cellules incubées sans iPPVO.

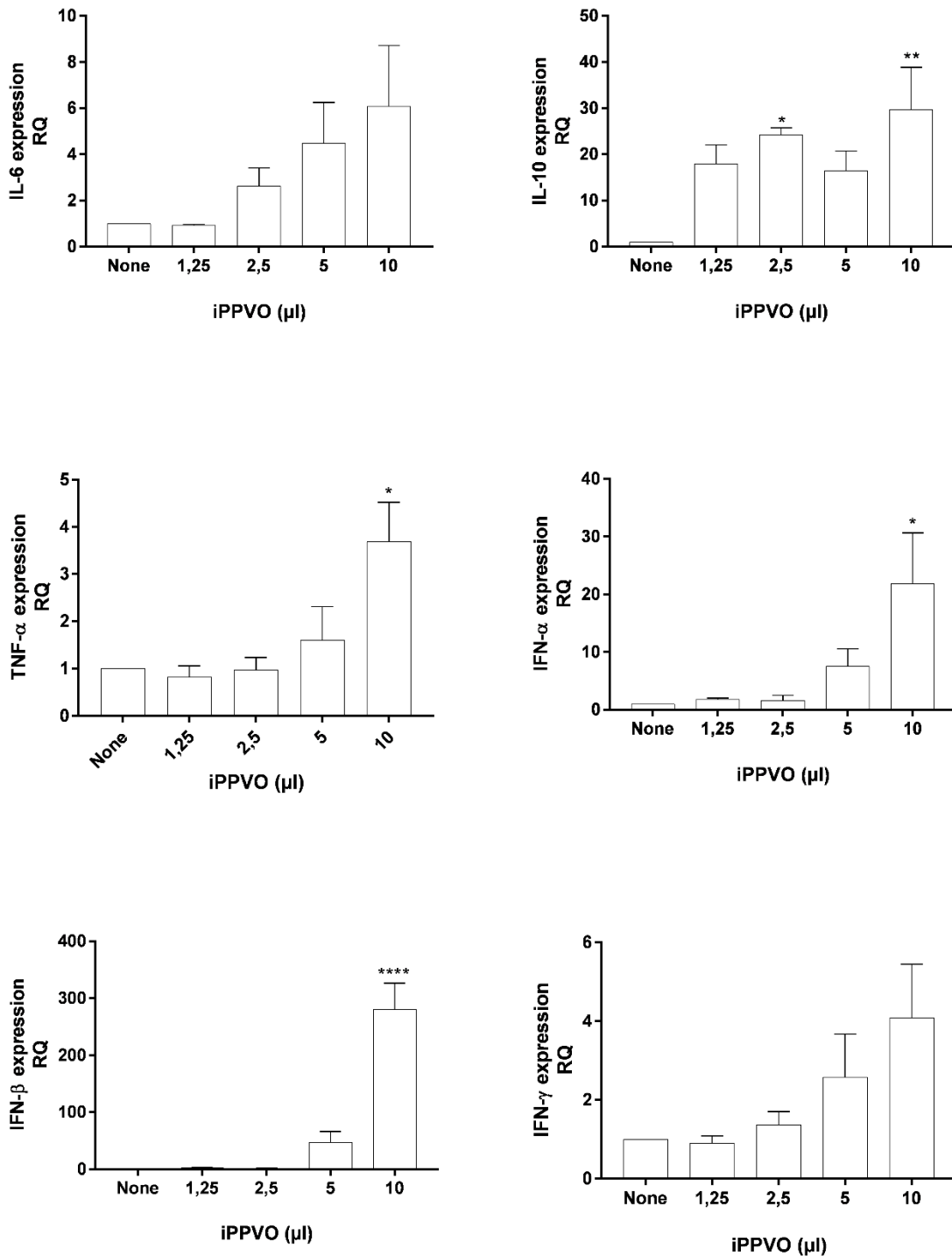


Figure 30 Expression d'un panel de cytokines mesuré par RT-qPCR en temps réel après traitement des PBMC équins avec des volumes croissants d'iPPVO. Les cytokines mesurées étaient l'IL-6 (A), l'IL-10 (B), le TNF-α (C), l'IFN-α (D), l'IFN-β (E) et l'IFN-γ (F). Les données sont présentées sous la forme de moyennes des résultats de 3 chevaux \pm SEM en tant qu'augmentation par rapport au contrôle qui a été normalisé à 1. Les étoiles correspondent à une augmentation significative de la quantité relative des cytokines exprimée par rapport à la valeur contrôle (test ANOVA à un facteur ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$).

Effet de l'iPPVO sur la sécrétion de cytokines par des PBMC équins

Les données obtenues par test ELISA ont permis d'analyser la sécrétion des cytokines dans des surnageants de culture de PBMC équins cultivés en présence d'iPPVO pendant 24h. Les résultats obtenus pour l'IL-6, l'IL-10 et le TNF- α sont présentés sur la figure 31. Les résultats obtenus montrent que l'iPPVO induit la sécrétion d'IL-6 de façon proportionnelle à la dose utilisée. Les quantités d'IL-6 étaient significativement plus élevées pour les volumes 2,5 μ l d'iPPVO ($p=0.0012$), 5 et 10 μ l d'iPPVO ($p < 0.0001$). L'iPPVO induit également la sécrétion d'IL-10 dans le surnageant après 24h d'incubation. Les quantités d'IL-10 étaient significativement plus élevées pour 10 μ l d'iPPVO ($p = 0.0451$). L'iPPVO a induit la sécrétion de TNF- α dans le surnageant après 24h d'incubation pour les volumes de 0,31 à 10 μ l. Les quantités de TNF- α étaient significativement plus élevées pour les volumes de 0,625 à 10 μ l d'iPPVO ($p= 0,0770$; 0,0188 ; 0,0370 ; 0,0056 ; 0,0013, respectivement). L'ensemble de ces résultats montre que l'iPPVO est capable de stimuler la production de cytokines inflammatoires (IL-6, TNF- α) et immunorégulatrices (IL-10) dans les PBMC équins.

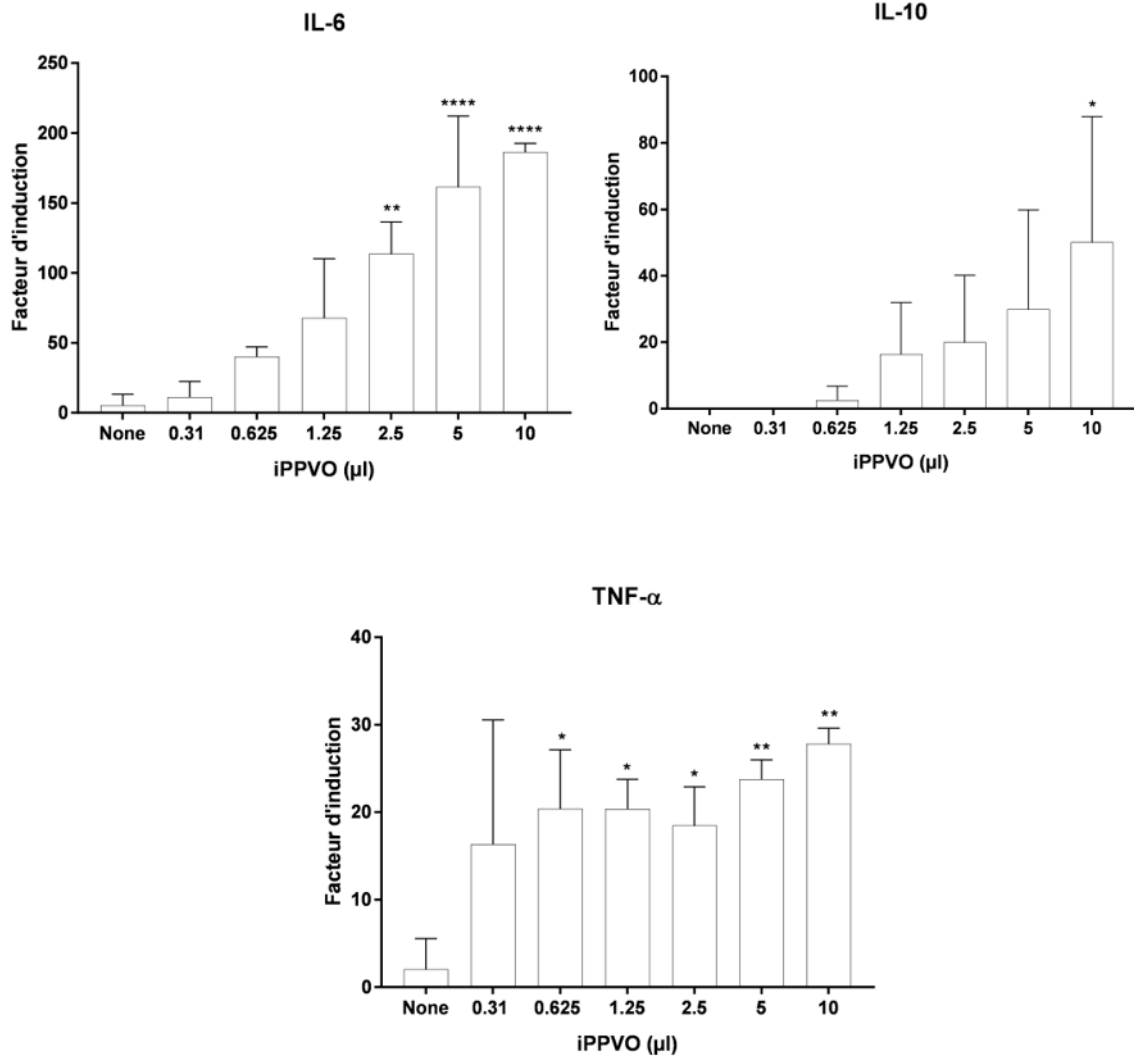
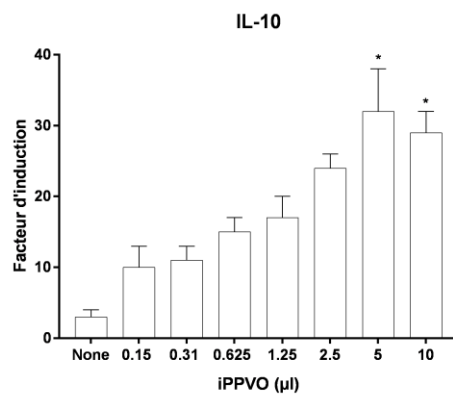
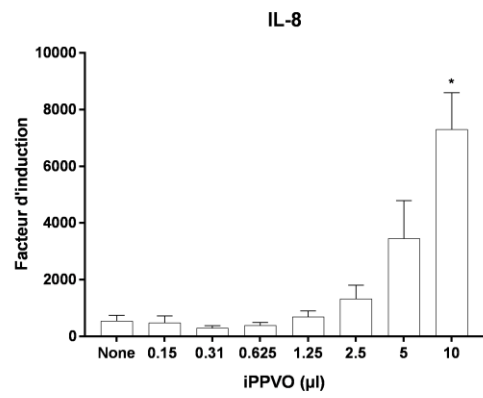
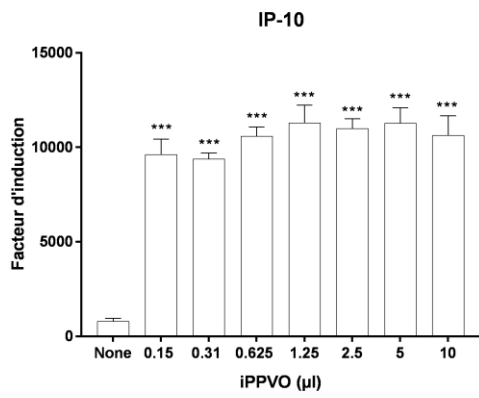
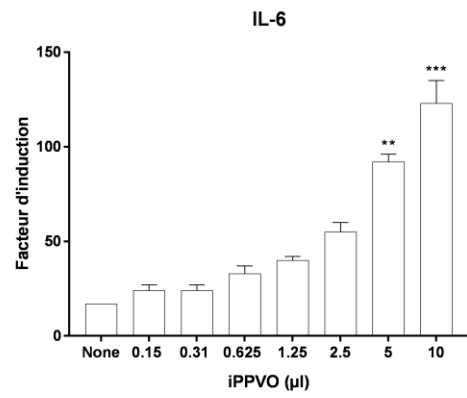
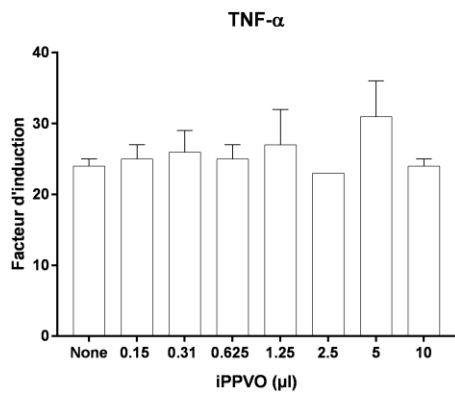


Figure 31 Quantification par ELISA d'un ensemble de trois cytokines dans les surnageants de culture de PBMC équins stimulés avec des volumes croissants d'iPPVO pendant 24h. Les cytokines mesurées étaient l'IL-6 (A), l'IL-10 (B) et le TNF- α (C). Les données montrent le facteur d'augmentation par rapport au contrôle et correspondent à une moyenne des résultats de 3 chevaux \pm SEM. Les étoiles correspondent à une augmentation significative de la quantité relative des cytokines exprimée par rapport à la valeur contrôle (test ANOVA à un facteur ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ et **** $p < 0.0001$).

Effet de l'iPPVO sur la sécrétion de cytokines par des PBMC humains

L'analyse des surnageants de culture par ELISA multiplex a permis de quantifier un ensemble de cytokines sécrétées dans le surnageant de culture de PBMC humains incubés pendant 24h en présence d'iPPVO (Figure 32). L'iPPVO n'a pas eu d'effet sur l'expression du TNF- α et de l'IFN- λ 2/3. Une légère augmentation de niveau d'IFN- γ est observée pour les volumes d'iPPVO les plus importants mais celle-ci n'est pas statistiquement significative. L'iPPVO a en revanche induit de façon significative la sécrétion des cytokines suivantes : IL-6, IL-8, IL-10, IFN- α 2, IFN- β et IFN- λ 1. Ainsi, les quantités d'IL-6, IL-10, IFN- α 2 et IFN- β sécrétées sont significativement plus élevées lorsque les PBMC ont été incubés en présence de 5 et 10 μ l d'iPPVO ($p < 0.05$). La quantité d'IL-8 sécrétée dans le surnageant est significativement plus élevée lorsque les PBMC ont été incubés avec 10 μ l d'iPPVO ($p = 0,0357$). L'iPPVO a également induit une forte production d'IFN- λ 1 pour des volumes allant de 0,625 à 10 μ l ($p < 0.05$). Enfin, les quantités d'IP-10 sont significativement plus élevées pour l'ensemble des volumes d'iPPVO testés ($p < 0,001$).



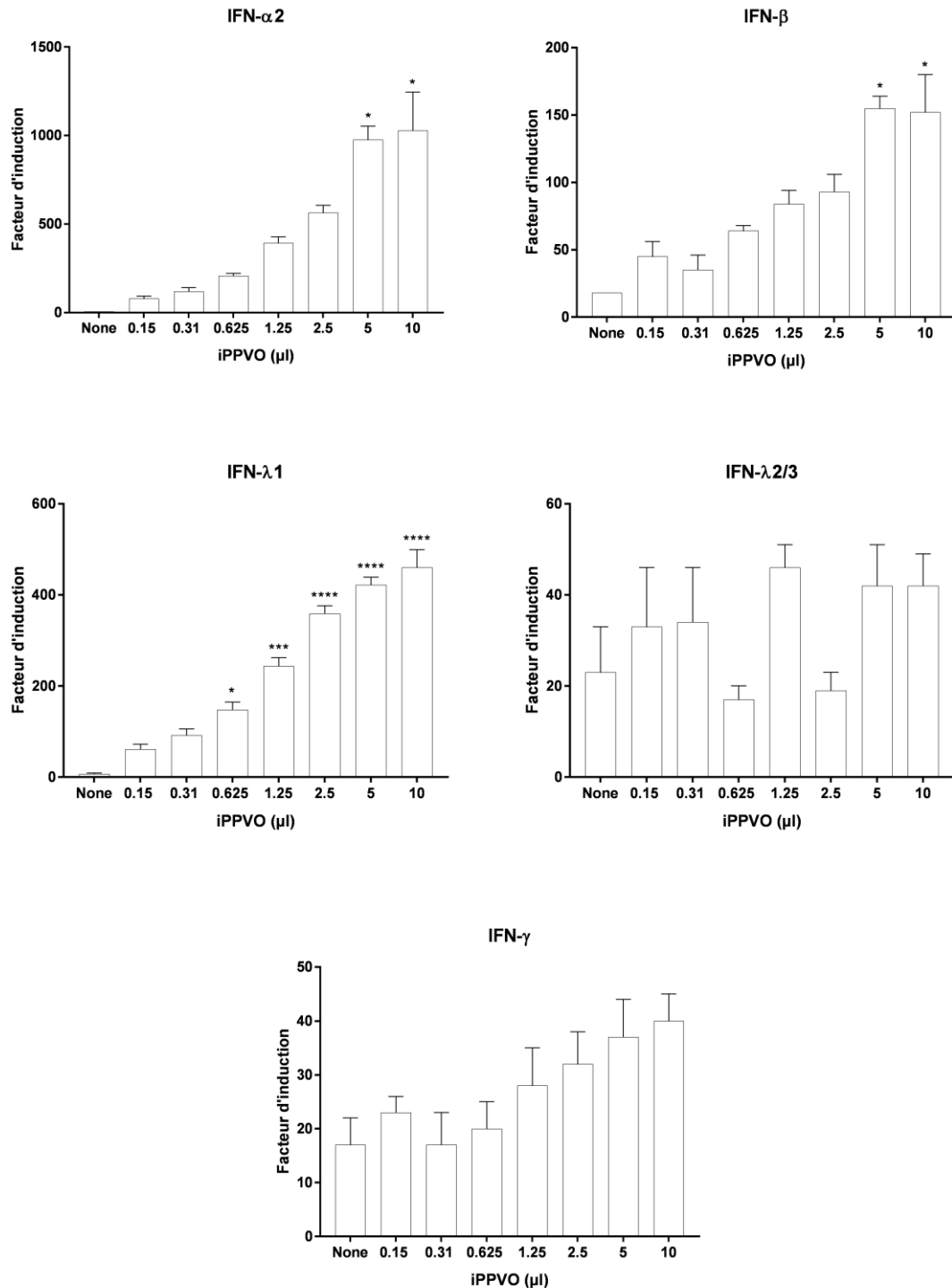


Figure 32 Analyse des cytokines présentes dans les surnageants de culture de PBMC humains stimulés avec des volumes croissants d'iPPVO pendant 24h : TNF-α (A), l'IL-6 (B), l'IP-10 (C), l'IL8 (D), l'IL-10 (E), l'IFN-α2 (F), l'IFN-β (G), l'IFN-λ1 (H), l'IFN-λ2/3 (I) et l'IFN-γ (J). Les données montrent le facteur d'induction par rapport au contrôle et correspondent à une moyenne des résultats de deux donneurs ± SEM. Les étoiles correspondent à une augmentation significative de la quantité relative des cytokines exprimées par rapport à la valeur contrôle (test ANOVA à un facteur ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ et **** $p < 0.0001$).

Mesure de l'effet de l'iPPVO sur la réponse interféron sur des PBMC humains

L'effet de l'iPPVO sur l'activité IFN a été mesuré par un test d'activité biologique sur une lignée rapportrice HEK-293-ISRE-Luc (Figure 33). L'incubation de volumes croissants (0,15 à 10 μ l) d'iPPVO a permis d'observer un effet dose réponse de l'iPPVO sur l'induction de l'activité IFN après 24h d'incubation. L'induction de l'activité IFN était significativement plus élevée pour les volumes d'iPPVO de 0,625 à 10 μ l ($p < 0,005$). L'induction la plus élevée a été observée pour une incubation avec un volume de 10 μ l d'iPPVO ($53,20 \pm 4,71$; $p = 0,0015$).

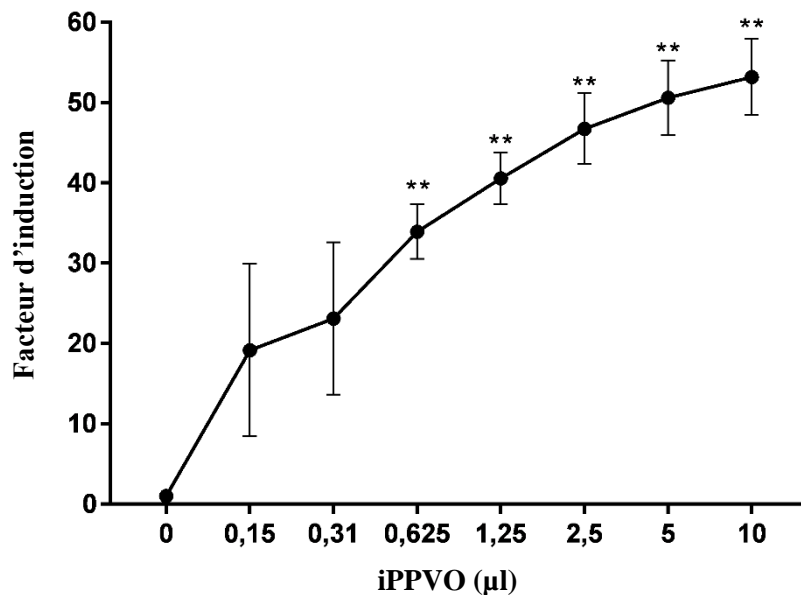


Figure 33 Mesure de l'effet de l'iPPVO sur la réponse interféron. Mesure de l'activité luciférase sur les cellules HEK293 après traitement iPPVO pendant 24h dans les surnageants de culture. L'expression de la luciférase est mesurée par luminescence avec le kit Bright-Glo®. Les données représentent la moyenne de la luminescence de 4 individus en tant que facteur d'induction par rapport à la valeur sans iPPVO \pm SEM. Les étoiles correspondent à une augmentation significative de la quantité relative des cytokines exprimées par rapport à la valeur contrôle (test ANOVA à un facteur ; ** $p < 0,005$).

Analyse des voies de signalisations impliquées dans la réponse interféron en présence d'iPPVO

Afin de caractériser les voies de signalisation impliquées dans l'activation des PBMC par l'iPPVO, des inhibiteurs de TLR9, de STING et des kinases TBK1/IKK ϵ ont été testés (Figure 34). Comme précédemment, les PBMC ont été stimulés avec l'iPPVO en absence ou présence de ces inhibiteurs. Puis les surnageants ont été collectés et l'activité IFN a été mesurée à l'aide de la lignée rapportrice HEK293-ISRE-Luc. En absence d'inhibiteur, l'activité IFN était significativement plus élevée 48h après l'ajout d'iPPVO par rapport aux contrôles sans iPPVO à 24h et 48h ($p < 0,05$). Les résultats obtenus montrent que les inhibiteurs de la voie TBK1/IKK ϵ (BX795 et MRT67307) bloquent totalement la production d'IFN par les PBMC stimulés avec l'iPPVO. En revanche, l'oligodéoxynucléotide INH-18, inhibiteur de TLR9, est sans effet sur la production d'IFN induite par l'iPPVO dans les PBMC. De même, le composé H151 inhibiteur de la voie STING ne semble avoir aucun effet sur la production d'IFN. L'ensemble de ces résultats suggère que ni TLR9 ni STING ne sont impliqués dans l'activation des PBMC par l'iPPVO. Cette conclusion peut sembler surprenante dans la mesure où le PPVO est un virus à ADN on pouvait s'attendre à ce que l'un ou l'autre de ces deux récepteurs soient impliqués dans la détection du virus par le PBMC. Les doses de INH-18 et H151 ont été choisies à partir de données de la littérature. A l'avenir, il semble nécessaire d'ajouter un contrôle positif permettant de valider l'inhibition de ces deux récepteurs dans les conditions expérimentales employées. En revanche, les kinases TBK1/IKK ϵ semblent jouer un rôle clé dans l'activation des PBMC par l'iPPVO. Ces kinases se trouvent en aval de nombreux récepteurs de l'immunité innée et nos résultats suggèrent que l'un d'entre eux, autre que TLR9 ou STING, serait impliqué.

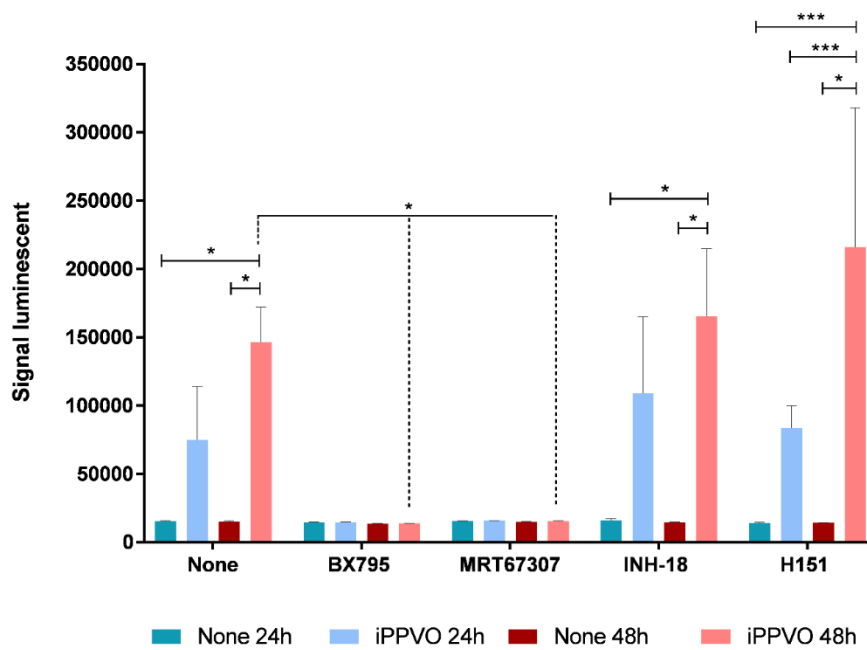


Figure 34 Effet de différents inhibiteurs (BX795, MRT67307, INH-18 et H151) des voies de signalisation impliquées dans la réponse interféron en présence ou absence d'iPPVO pendant 24 et 48h. L'activité interféron est mesurée dans les surnageants de culture, à l'aide de la lignée rapportrice HEK293-ISRE-Luc. Les données représentent la moyenne de la luminescence de 2 individus en tant qu'augmentation du signal par rapport à la valeur sans iPPVO \pm SEM. Les étoiles correspondent à une augmentation significative de la quantité relative des cytokines exprimées par rapport à la valeur contrôle (test ANOVA à un facteur ; * $p < 0.05$ et *** $p < 0.0005$).

Figure supplémentaire :

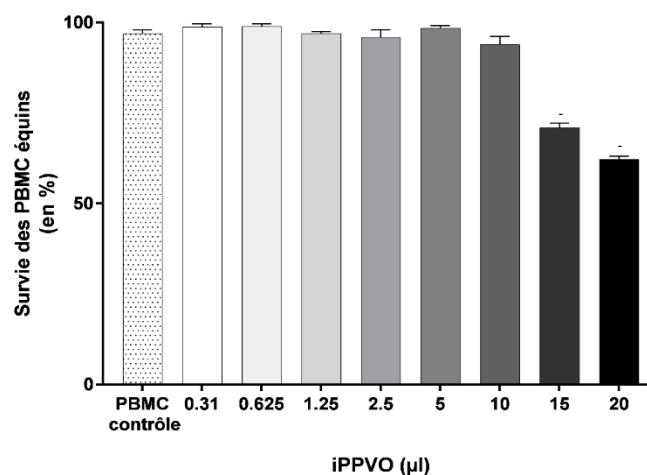


Figure 35 Évaluation de la toxicité de l'iPPVO sur les PBMC. Viabilité cellulaire mesurée à 48 hpt par des tests d'exclusion au bleu trypan. Chaque histogramme représente le pourcentage de viabilité des PBMC contrôles (points noirs sur fond blanc) et des PBMC avec des volumes croissants d'iPPVO (μ l) (dégradé de gris). Les données correspondent aux moyennes \pm SD de trois échantillons indépendants. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de l'ANOVA un facteur (* : $P < 0,05$).

3.4. Discussion

Le profil cytokinique obtenu sur PBMC équins traités avec l'iPPVO a mis en évidence une réponse à la fois pro-inflammatoire (TNF- α) et anti-inflammatoire (IL-10) mais également l'induction de facteurs clés de l'immunité innée antivirale comme les IFN de type I (IFN- α et β). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui avaient montré une augmentation de l'expression des ARNm du TNF- α , de l'IFN- α et de l'IFN- β (Horohov et al., 2008; Hue et al., 2017). L'induction de ces trois cytokines a été mise en évidence *ex vivo* à partir de 18h et jusqu'à 48h post traitement sur PBMC équins (Hue et al., 2017). Dans une autre étude réalisée sur des PBMC équins isolés de 12 chevaux, il a été montré que l'expression de l'ARNm du TNF- α était induite par l'iPPVO après 48h de traitement (Horohov et al., 2008). Dans cette même étude, l'expression des ARNm de l'IFN- α et de l'IFN- β n'a pas augmenté de manière significative sur PBMC isolés après des injections d'iPPVO chez le cheval. Cependant, l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ a été multipliée par deux 24h après le traitement. Bien que l'expression de l'ARNm de l'IFN- γ ait présenté une augmentation dans notre étude pour le volume le plus élevé d'iPPVO après 24h d'incubation, cette augmentation n'était pas significative. Cette différence peut s'expliquer par le nombre d'individus dans notre étude (n=3) plus faible que dans l'étude réalisée par Horohov et al. (2008). En effet, avec des variations des quantités relatives d'IFN- γ plus faibles que pour les autres cytokines étudiées et des variations des réponses individuelles élevées il est plus difficile d'obtenir une différence significative. Un constat similaire a été fait pour l'expression des ARNm de l'IL-6, pour laquelle l'augmentation observée n'est pas significative. Cette observation est en accord avec les travaux de Hue et al. (2017). Cependant, l'augmentation d'IL-6 détectée par un test ELISA dans les surnageants était significative pour les volumes les plus élevés d'iPPVO (2,5 à 10 μ l). Il est possible que les ARNm de l'IL-6 soient exprimés très tôt au contact de l'iPPVO et que l'expression diminue au bout de 24h dans les PBMC. En effet, une étude utilisant le lipopolysaccharide (LPS) a montré la capacité de cet immunostimulant à augmenter les niveaux d'ARNm du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans les leucocytes équins entre 2 et 6h après stimulation par le LPS (Martin et al., 2017).

Afin de mieux caractériser le profil cytokinique induit par l'iPPVO, les cytokines sécrétées dans le surnageant de PBMC humain ont également été analysées. Dans ce modèle, l'iPPVO stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8), anti-inflammatoires (IL-10) mais également la réponse IFN (IFN- α 2, IFN- β et IFN- λ 1). Des résultats similaires ont

été préalablement obtenus pour la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-10 sur des PBMC humains traités avec de l'iPPVO (Friebe et al., 2004). Dans notre étude, nous avons montré que l'iPPVO a également entraîné une augmentation significative d'IFN de type 1 et 3 mais pas d'IFN de type 2 (IFN- γ) après 24h de traitement. Friebe et al. (2004) avaient observé une légère augmentation de la quantité d'IFN- γ libéré dans le surnageant de PBMC humains par test ELISA, mais alertent sur le fait que les quantités mesurées étaient en limite de détection. Chez l'homme, il n'y a pas d'étude de l'effet de l'iPPVO sur la sécrétion d'IFN de type 1 et 3 à notre connaissance. Dans cette étude, nous avons montré qu'après 24h d'incubation l'iPPVO induit de façon significative la sécrétion d'IFN- α 2 et d'IFN- β avec 5 et 10 μ l d'iPPVO et la sécrétion d'IFN- λ 1 à partir de 0.625 μ l. Par ailleurs, la chimiokine CXCL10 (ou IP10) est fortement induite après 24h de traitement pour tous les volumes d'iPPVO testés. L'IP-10 est une chimiokine sécrétée par les cellules stimulées par les IFN de type I et II dont la fonction est d'attirer les cellules T activées. Il a été montré que l'IP-10 jouait un rôle dans la différenciation, l'activation et le trafic des cellules T effectrices (Dufour et al., 2002). En revanche, l'iPPVO n'a pas entraîné d'augmentation d'IFN- λ 2/3, du TNF- α et de l'IL-1 β après 24h d'incubation. De la même manière, les travaux de Friebe et al. rapportent que l'iPPVO seul n'a pas induit la sécrétion du TNF- α sur des PBMC humains (Friebe et al., 2004). Il semble que les gènes humains IFN- λ 1 et IFN- β aient une régulation transcriptionnelle similaire et contrôlée par IRF3 ou IRF7, alors que les gènes d'IFN- λ 2/3, comme la plupart des gènes d'IFN- α , dépendent principalement d'IRF7 (Osterlund et al., 2007). Ces observations sont cohérentes avec le fait qu'IRF3 est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire dans les cellules et que la détection de l'entrée d'un virus active l'IRF3 qui va alors permettre l'augmentation de l'expression des gènes IFN- β et IFN- λ 1. En revanche, les gènes IFN- λ 2/3 nécessitent l'activation d'IRF3 et IRF7, ce dernier n'étant pas exprimé de manière constitutive dans la plupart des types cellulaires mais induit en réponse aux IFN (Kotenko, 2011). Par ailleurs, l'activité IFN mesurée dans les surnageants de PBMC humains après 24h de traitement par l'iPPVO a montré une augmentation significative de facteurs d'induction d'environ 30 et 50 pour des volumes de 0.625 à 10 μ l d'iPPVO respectivement. Au vu des résultats observés sur les modèles humains et équin, il serait intéressant d'étudier des conditions similaires sur des PBMC équin afin d'observer davantage le rôle de la réponse IFN chez le cheval.

L'utilisation des PBMC humains afin de mieux caractériser la réponse cytokinique à l'iPPVO et mieux comprendre les mécanismes induits est pertinente. En effet, les outils biologiques pour mesurer la réponse cytokinique chez l'homme sont davantage développés. Le

cheval n'est pas très éloigné phylogénétiquement de l'homme. En effet, le cheval est déjà reconnu comme modèle pour plusieurs maladies humaines, notamment les dérèglements métaboliques, l'asthme, les maladies ostéo-articulaires, les mélanomes et l'uvéite auto-immune (Turlej et al., 2001; Seltenhammer et al., 2004; Hodavance et al., 2007; Koch and Betts, 2007; Deeg et al., 2007; Bullone and Lavoie, 2016) mais également dans les mécanismes immunitaires impliquant les macrophages (Karagianni et al., 2021). Les différences observées entre les deux modèles (équins et humains) pourraient s'expliquer par les différences de méthodes utilisées. En effet, les outils de détection de cytokines chez le cheval sont moins sensibles que les méthodes disponibles chez l'homme. Une comparaison entre le test ELISA et le test multiplex utilisant les mêmes anticorps a montré que le test multiplex améliorait la sensibilité analytique pour les trois cytokines de 13 à 150 fois (Wagner and Freer, 2009). Cette augmentation de la sensibilité des tests multiplex par rapport à l'ELISA a également été rapportée pour la détection de cytokines humaines et de rongeurs. Les tests multiplex développés pour la détection des cytokines humaines permettent de détecter des quantités de l'ordre de quelques pg/ml à 10 ng/ml (Kellar and Douglass, 2003; Prabhakar et al., 2004), ce qui démontre leur sensibilité.

Le matériel génétique de l'iPPVO correspond à de l'ADN double brin (Cottone et al., 1998) riche en cytosine et en guanosine (63%) (Haig, 2006). Par conséquent, la détection par TLR9 des motifs ADN CpG double brin, qui sont courants dans l'ADN viral, est un candidat probable pour l'induction de l'IFN de type I par l'iPPVO. Dans cette étude, l'utilisation d'un inhibiteur de TLR9 n'a pas entraîné le blocage de l'induction d'IFN de type I sur des PBMC humains incubés avec l'iPPVO. Une étude de Siegemund et al. (2009) a montré l'implication du TLR9 dans la détection de l'iPPVO et l'induction de l'IFN de type I dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Il a été montré que des poxvirus qui se répliquent dans le cytosol sont susceptibles de déclencher la détection de l'ADN cytosolique par la voie cGAS-STING (Georgana et al., 2018). Dans notre étude, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie STING n'a pas entraîné le blocage de l'induction d'IFN de type I sur des PBMC humains incubés avec l'iPPVO. Il a été montré que les voies cGAS-STING et TLR9 induisaient la synthèse d'IFN de type I et III par des mécanismes cellulaires distincts (Deb et al., 2020). Il a également été montré que l'activation de la voie cGAS-STING pouvait soit induire des facteurs inhibant la production d'IFN par la voie TLR9 dans des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines (Deb et al., 2020) soit à l'inverse jouer un rôle synergique avec la production d'IFN par la voie TLR9 sur un modèle de PBMC murins (Temizoz et al., 2015). Il serait donc possible que l'iPPVO

déclenche la production d'IFN par ces deux voies ce qui expliquerait les résultats de l'étude. En revanche, les inhibiteurs de TBK1/IKK ϵ ont bloqué la capacité de l'iPPVO à induire l'IFN de type I par les PBMC humains. Les voies cGAS-STING et TLR9 sont impliquées dans l'activation de TBK1/IKK ϵ pour permettre la production d'IFN. Ce constat implique donc que l'iPPVO a un rôle crucial dans la stimulation de la réponse IFN et notamment dans les réponses IFN de type 1 et 3. De plus, d'autres PRR sont également impliqués dans l'activation de TBK1/IKK ϵ tels que TLR4, TLR7/8 et RIG-I/MDA5. La transcription des gènes de l'iPPVO lors de son entrée dans la cellule pourrait entraîner la production d'ARN qui pourrait être reconnu par ces différents PRR. Des études complémentaires en couplant des inhibiteurs des différentes voies étudiées permettraient d'apporter des réponses à ces hypothèses.

Chapitre 4 :
Discussion générale et perspectives

Les virus de la grippe équine et de l'herpès équin-1 sont connus pour causer d'importantes pertes dans la filière équine. Les compétitions sportives et les mouvements de chevaux sont interrompus en cas d'épizooties, et l'EHV-1 peut entraîner des avortements et des troubles nerveux qui peuvent avoir de lourdes conséquences sanitaires et économiques. Bien qu'il existe des vaccins, des foyers infectieux dus à l'EIV ou à l'EHV-1 surviennent chaque année en France et dans le monde. Si les vaccins contre la grippe équine ont montré une bonne efficacité sur le terrain (Fougerolle et al., 2019), la durée de protection peut encore être améliorée (Couroucé et al., 2023). L'existence de corrélats de protection associés à une méthode de mesure du niveau des anticorps fixant le complément contre la grippe équine, permet de suivre l'efficacité des vaccins contre l'EIV. Les vaccins contre l'EHV-1 ont démontré une activité pour réduire les troubles respiratoires et diminuer l'excrétion virale mais ceux-ci pourraient être améliorés. Bien que l'introduction et l'utilisation à large échelle des vaccins aient réduit le nombre de foyers de rhinopneumonie et les cas d'avortement, des foyers de myéloencéphalopathie à EHV-1 sont toujours rapportés chaque année dans le monde (Vissani et al., 2009; Pronost et al., 2010; Stasiak et al., 2020; Lecollinet et al., 2020; Pusterla et al., 2021; Vereecke et al., 2021). Il est donc important de continuer à améliorer les vaccins et les protocoles de vaccination pour favoriser une bonne couverture vaccinale dans la population équine et ainsi limiter la propagation de ces virus très contagieux. Une possibilité d'amélioration consiste à cibler la réponse immunitaire innée au moment de la vaccination. Dans les vaccins, ce rôle est attribué en grande partie aux adjuvants. Les adjuvants sont des composants indispensables pour stimuler la réponse immunitaire pour des vaccins inactivés ou sous-unitaires par exemple (Sarkar et al., 2019). Il est essentiel de stimuler les réponses humorales et/ou cellulaires *ad hoc* en fonction du pathogène ciblé. Cependant, peu de nouveaux adjuvants ou de combinaisons d'adjuvants sont étudiés dans les vaccins équins contre la grippe équine et la rhinopneumonie, et la modification d'une formulation vaccinale peut s'avérer longue et coûteuse. Parmi ces composés, l'iPPVO a fait l'objet d'études expérimentales chez l'espèce cible notamment pour son potentiel immunostimulant (Horohov et al., 2008; Hue et al., 2017; Ons et al., 2014). L'utilisation d'un adjuvant supplémentaire, tel que l'iPPVO, (Zylexis®, Zoetis®), composé commercialisé en tant qu'immunostimulant, lors de la vaccination pourrait être une stratégie intéressante pour améliorer la réponse humorale lors de la vaccination contre l'EIV et l'EHV-1. De plus, cette stratégie permettrait répondre rapidement aux besoins sur le terrain car l'iPPVO est déjà autorisé en médecine vétérinaire dans de nombreux pays. Ce sont ces approches que nous avons étudiées dans ce travail de thèse.

Dans un premier temps, afin de mesurer l'effet de l'iPPVO en temps qu'adjuvant vaccinal, le modèle de la vaccination contre la grippe équine a été choisi. En effet, afin d'établir la preuve de concept du potentiel adjuvant de l'iPPVO, le choix du modèle s'est porté sur un vaccin contre la grippe équine, pathogène pour lequel il existe une méthode avec des corrélats de protection bien définis en fonction du niveau d'anticorps mesuré. Plusieurs études ont démontré la corrélation entre le niveau de protection des chevaux et les taux d'anticorps mesurés par SRH (Mumford et al., 1994a, 1994b, 1994c; Newton et al., 2000). Cette méthode permet de caractériser avec précision le niveau de protection attendu. Dans cette première étude, le choix de la population équine était un élément déterminant à prendre en considération. En l'absence d'informations sur l'effet de l'iPPVO sur la réponse anticorps mesurée par le test SRH et pour une plus grande robustesse, un groupe de chevaux présentant une faible variabilité et des valeurs de SRH suboptimales a été constitué. Un processus de sélection a ensuite permis d'assembler deux sous-groupes homogènes où la détection des effets positifs des injections d'iPPVO serait possible avec un nombre limité d'animaux. Une précédente étude menée sur des chevaux infectés par l'EIV avait montré que l'iPPVO utilisé comme immunostimulant avait augmenté la réponse en anticorps chez les chevaux (Lunn and Rush, 2004). Les résultats de notre étude montrent pour la première fois que l'iPPVO co-injecté avec le vaccin Equilis prequenza® Te augmente significativement le niveau d'anticorps spécifiques de l'EIV lorsqu'il est mesuré par le test SRH de 1 à 6 mois après le rappel vaccinal semi-annuel. Le vaccin utilisé dans cette étude ne contenait pas de souche Florida Clade 2 mais a induit des niveaux d'anticorps similaires lorsqu'il a été testé contre des souches de EIV Florida Clade 1 et Florida Clade 2. Cette observation rejoint les études de Paillot et al. (2012) et de Reemers et al. (2020) dans lesquelles le vaccin Equilis prequenza® Te conférait une bonne protection clinique contre des souches récentes d'EIV (Florida Clade 2) isolées sur le terrain. De manière plus générale, nos résultats montrent qu'une vaccination entraînant une protection clinique entraîne, en présence d'iPPVO, une protection virologique à plus long terme sur l'ensemble du groupe. Certains chevaux ne présentent pas de niveaux d'anticorps suffisants pour assurer une bonne protection clinique et peuvent être considérés comme faibles répondeurs à la vaccination (Fougerolle et al., 2019). Nos résultats montrent la capacité potentielle de l'iPPVO à augmenter la réponse immunitaire chez un cheval faible répondeur. Si elle était confirmée, cette propriété serait intéressante pour renforcer la réponse immunitaire des chevaux, afin de limiter le risque lorsque ceux-ci sont introduits dans une nouvelle population. En effet, l'introduction de chevaux infectés de manière subclinique pourrait être à l'origine d'épizooties telle que celle de 2007 en Australie (Reeve-

Johnson, 2007; Callinan, 2008). Cette observation renforce l'intérêt de l'utilisation de l'iPPVO comme immunostimulant dans le cadre de la vaccination contre l'EI.

Cette étude a mis en évidence des propriétés intéressantes de l'iPPVO, une substance approuvée dans plusieurs pays en tant qu'immunostimulant mais pas, à ce jour, en tant qu'adjuvant de vaccin. Il convient de noter que dans ce protocole expérimental, l'iPPVO n'a pas été mélangé et co-injecté avec le vaccin, mais administré à proximité du site d'injection du vaccin. Nous avons émis l'hypothèse que l'effet de proximité est probablement dû au fait que l'iPPVO et les composants du vaccin convergent vers le même ganglion lymphatique drainant. Dans un premier temps, afin d'éviter que la combinaison du Zylexis® avec un vaccin à plusieurs valences contenant un adjuvant n'entraîne une réaction inflammatoire locale importante, le Zylexis® a été administré à la demi-dose des recommandations fournisseur. Il serait intéressant de tester si l'augmentation de la dose permet d'augmenter davantage la réponse en anticorps sans provoquer de réaction locale ou systémique indésirable. Afin d'élargir le panel des substances adjuvantes disponibles sur le marché et de maintenir des vaccins efficaces, il serait également justifié d'étudier les effets de l'iPPVO lorsqu'il est directement incorporé dans une préparation vaccinale, soit seul, soit en complément d'autres adjuvants.

Sur la base des résultats de cette première étude ((Carnet et al., 2022) ; Article 1) établissant la preuve de concept de l'utilisation de l'iPPVO en tant qu'adjuvant pour augmenter la réponse en anticorps lors de la vaccination contre la grippe équine, nous avons testé l'effet de l'iPPVO sur les anticorps neutralisants contre l'EHV-1 induits lors de la vaccination des chevaux (Carnet et al., en rédaction : Article 3). Au cours de cette seconde étude nous avons montré pour la première fois que l'iPPVO co-injecté avec le vaccin inactivé Equip EHV-1,4® augmentait le taux d'anticorps neutralisant l'EHV-1, un et trois mois après un rappel vaccinal semi-annuel. Deux méthodes d'analyse de la réponse humorale ont été utilisées dans cette étude. La méthode classique de séroneutralisation, qui est la méthode de référence, et la méthode RTNA sur la base des travaux de thèse de Gabrielle Sutton (Sutton, 2021).

L'iPPVO a permis aux chevaux de conserver un titre en anticorps plus élevé cinq mois après le rappel semi-annuel. Cette étude a également montré qu'une majorité de chevaux ne conservait pas de titres d'anticorps élevés six mois après un rappel vaccinal annuel ou cinq mois après un rappel vaccinal semi-annuel lorsqu'ils étaient vaccinés avec un vaccin inactivé. Des études ont montré que le titre en anticorps neutralisant l'EHV-1 commençait à diminuer trois à six mois après la vaccination (Heldens et al., 2001a; Minke et al., 2006). Nos résultats sont cohérents avec ces données de la littérature et montrent une diminution des titres d'anticorps anti-EHV-1

trois et six mois après le rappel vaccinal. D'après nos résultats, il semblerait que les réponses humorales des chevaux à la vaccination contre l'EHV-1,4 soient hétérogènes et fortement dépendantes de l'individu, ce qui est une limite lorsque les études portent sur un petit nombre d'animaux. Cette hétérogénéité de la réponse immunitaire a également été observée dans d'autres études réalisées au cours d'une infection expérimentale (Marenzoni et al., 2022; Thieulent et al., 2022), ce qui montre la difficulté d'interprétation des résultats au niveau individuel. Des divergences ont pu être observées entre les résultats de séroneutralisation classique et RTNA. Celles-ci peuvent être dues au fait que les deux méthodes n'utilisent pas les mêmes cellules ou la même méthode de calcul. L'effet immunostimulant de l'iPPVO a été testé lorsqu'il était administré en co-injection séparée mais proche du vaccin inactivé contre l'EHV-1,4. Les résultats de cette deuxième étude viennent donc renforcer l'hypothèse selon laquelle l'injection d'iPPVO à proximité du site d'injection du vaccin permet aux deux substances de converger vers le même ganglion lymphatique drainant. Dans cette étude, la réponse en anticorps des chevaux vaccinés était faible (peu de chevaux ont séroconverti dans chaque groupe selon les critères établis par l'OMSA). Mais seule la réponse humorale pour l'EHV-1 a été mesurée et il pourrait être intéressant de mesurer un potentiel effet sur la réponse cellulaire. Enfin, seuls les anticorps anti-EHV-1 ont été étudiés bien qu'un vaccin à deux valences ait été utilisé. Il sera intéressant de mesurer la réponse en anticorps neutralisants contre l'EHV-4 et de comparer ces résultats avec ceux obtenus pour l'EHV-1 en prenant en compte les possibilités de réponses croisées dues au pourcentage d'homologie entre ces deux virus.

Contrairement ce qui est décrit pour le virus de la grippe équine, il n'existe pas de corrélats de protection établis pour les taux d'anticorps lors de la vaccination contre l'EHV-1. À ce stade de l'étude, il n'est donc pas possible de déterminer le niveau de protection des chevaux et de savoir s'il est différent pour les chevaux ayant reçu l'iPPVO. Un challenge vaccinal portant sur la protection des chevaux ayant reçu l'iPPVO au moment de la vaccination contre l'EHV-1,4 serait intéressant pour apporter des éléments d'information et tenter d'établir des premières données. Le test RTNA utilisé dans notre étude pourrait également, du fait de son aspect quantitatif aider à la détermination de ces valeurs.

Dans l'hypothèse où l'iPPVO aurait un mode d'action général en ciblant les mécanismes de l'immunité innée, il serait intéressant de le tester dans des préparations vaccinales, seul ou en combinaison avec d'autres adjuvants. Cependant, un tel test demande d'établir une ou plusieurs formulations vaccinales. Une nouvelle formulation entraînerait un test préalable d'innocuité sur un groupe défini de chevaux avant de tester l'effet de l'iPPVO. La mise au point de nouvelles formulations de vaccins s'avère longue et coûteuse. C'est pourquoi notre approche

a été de modifier le protocole de vaccination en ajoutant des injections d'iPPVO sous sa forme commercialisée lors de la vaccination. Cela peut s'appliquer au vaccin grippe qui est mis à jour selon les recommandations de l'OMSA mais également au vaccin herpès qui ne nécessite pas ces mises à jour régulières. En effet, la variabilité génétique et antigénique de l'EHV-1 est relativement limitée (environ une mutation ponctuelle impliquant une substitution d'un seul nucléotide pour 1 000 pb entre les souches Ab4 et V592 de l'EHV-1) (Nugent et al., 2006).

Cette approche intéressante pour améliorer la protection immunitaire chez les chevaux pourrait également s'avérer utile lors d'une épizootie. La multiplication des cas signalés par les organismes de surveillance (RESPE et OMSA) ces dernières années témoigne de l'intérêt d'augmenter l'immunité de la population équine (AAEP, 2022). En outre, entre 2015 et début 2017, de nombreux pays européens ont été confrontés à une pénurie de vaccins contre la rhinopneumonie (Paillot et al., 2017) et encore récemment avec des restrictions sur l'accès au vaccin contre la grippe. Selon nos résultats, l'utilisation de l'iPPVO en association avec la vaccination permettrait de renforcer et de maintenir dans la durée l'immunité individuelle et, par conséquent, celle du troupeau dans un contexte de pénurie de vaccins.

Ces deux études réalisées sur l'effet de l'iPPVO en tant qu'adjuvant vaccinal (Article 1 ; Article 3) ont été menées sur une population de juments provenant du même haras (Jumenterie du Pin) pour des raisons de disponibilité des modèles d'études. Ces deux études ont chacune été menées sur une année, depuis la période de sélection jusqu'à l'analyse de l'effet de l'iPPVO. Il serait intéressant de mesurer les effets de l'iPPVO sur les anticorps contre l'EIV et l'EHV-1 sur une période plus longue au-delà de 6 mois. En reproduisant les conditions expérimentales des articles 1 et 3, il serait intéressant de tester d'autres types de vaccins ainsi que la combinaison de l'iPPVO avec des vaccins contenant d'autres adjuvants.

Une partie de ce travail a été consacré à l'apport de connaissances sur les mécanismes d'action de l'iPPVO. Des variations du niveau d'expression d'ARNm codant différentes cytokines ont pu être mises en évidence sous l'effet de l'iPPVO sur modèle de PBMC équins. La sécrétion de certaines cytokines dans les mêmes conditions expérimentales a pu être démontrée. Ces résultats démontrent l'effet de l'iPPVO sur la réponse innée.

Les chevaux sont déjà reconnus en tant que modèle d'étude pour plusieurs maladies et mécanismes immunitaires humains (Turlej et al., 2001; Seltenhammer et al., 2004; Hodavance et al., 2007; Koch and Betts, 2007; Deeg et al., 2007; Bullone and Lavoie, 2016; Karagianni et al., 2021), mais les outils disponibles pour étudier la réponse cytokinique chez l'homme sont davantage développés. L'utilisation des PBMC humains était donc pertinente pour mieux

caractériser la réponse cytokinique entraînée par l'iPPVO et ainsi tenter de mieux comprendre ses mécanismes. Nous avons observé certaines similitudes entre les résultats obtenus sur les PBMC équins et les PBMC humains. Notre étude a montré que le traitement des PBMC équins avec l'iPPVO induit une réponse pro-inflammatoire (IL-6, TNF- α) et anti-inflammatoire (IL-10) ainsi que l'expression de cytokines clés de l'immunité innée antivirale telles que les IFN de type I (IFN- α et - β). Le profil cytokinique sécrété en réponse à la présence d'iPPVO sur les PBMC humains a mis en avant des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8), anti-inflammatoire (IL-10) ainsi que les IFN de type 1 et 3 (IFN- α , - β et - λ). Des études antérieures avaient montré des résultats similaires avec une augmentation de l'expression des ARNm de certaines cytokines telles que le TNF- α , l'IFN- α et l'IFN- β (Friebe et al., 2004; Horohov et al., 2008; Hue et al., 2017). Notre étude a également permis de mieux caractériser l'activité IFN en présence d'iPPVO. Les inhibiteurs de TBK1/IKK ϵ ont totalement bloqué la capacité de l'iPPVO à induire l'IFN de type I dans les PBMC humains. Alors que des études ont montré l'implication du TLR9 dans la détection de l'iPPVO et dans l'induction d'IFN de type I dans des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Siegemund et al., 2009), dans notre étude l'utilisation d'un inhibiteur de TLR9 n'a pas inhibé l'induction d'IFN de type I sur des PBMC humains. De même, l'inhibition de la voie cGAS-STING n'a pas eu d'effet sur la réponse à l'iPPVO. Il serait donc intéressant de tester d'autres voies pouvant être mises en jeu par l'iPPVO et capables d'induire la réponse IFN. Une hypothèse est que TLR4 serait impliqué comme le suggèrent les résultats de Friebe et al. qui impliquent CD14, le cofacteur de TLR4, dans la réponse des monocytes à l'iPPVO (Friebe et al., 2004). Au vu des résultats observés sur les modèles humains et équins, il serait intéressant d'étudier des conditions similaires sur des PBMC équins afin de caractériser davantage le rôle de la réponse IFN chez le cheval.

Ce travail a été facilité dans sa réalisation par la disponibilité du test SRH et des corrélats de protection pour le suivi des anticorps neutralisants contre l'EIV et ceci a constitué la première étape de preuve de concept. Une autre partie de ce projet consistait à développer une méthode de séroneutralisation de l'EIV mesurée par impédancemétrie. Surveiller le statut immunitaire de la population équine est essentiel pour aider à prévenir l'apparition d'épizooties. Une méthode d'analyse cellulaire en temps réel avec l'appareil xCELLigence® a été utilisée pour détecter les changements morphologiques induits par l'infection par l'EIV dans les cellules MDCK. Nous avons montré que la souche A/equine/Jouars/4/2006 infectait les cellules MDCK. Un modèle similaire a été développé pour étudier les infections par le virus de la grippe humaine A (H1N1) (Tian et al., 2012). Les auteurs ont montré que l'analyse RTCA du virus de la grippe

A mettait en évidence différentes cinétiques d'infection entre différentes souches malgré des caractéristiques cliniques similaires. Ils ont ainsi montré que la méthode RTCA utilisée pour la grippe humaine permettait d'analyser la virulence des souches *in vitro* (Tian et al., 2012). L'analyse *in vitro* de l'infectivité de plusieurs souches du virus de la grippe équine n'a pas été réalisée dans cette étude mais il serait intéressant de poursuivre ces travaux en particulier en étudiant des virus des différents clades.

Cette technologie a également été utilisée pour mesurer les anticorps neutralisants contre différents pathogènes : poxvirus (Witkowski et al., 2010), entérovirus humains (Teng et al., 2013), grippe humaine (Tian et al., 2012) et EHV-1 (Sutton, 2021). Le test développé est basé sur les valeurs de Cell Index et les pourcentages d'aires sous la courbe (% AUC). La concordance observée dans le cadre de ce travail entre les valeurs de %AUC et les titres de SRH suggère que le système peut être utilisé pour quantifier avec précision les titres d'anticorps. Notre étude a été réalisée avec un faible nombre de sérums présentant un titre faible ce qui pourrait, à l'avenir, modifier le niveau de cette correspondance et les valeurs seuils définies avec cette méthode de séroneutralisation en temps réel. Il serait intéressant de tester un plus grand nombre d'échantillons présentant de faibles taux d'anticorps mais l'obtention de ce type d'échantillons est rendue difficile par le taux élevé de chevaux vaccinés en France (>86% ; Fougerolle et al., 2019). Cependant, cette première approche basée sur l'utilisation de sérums non dilués est adaptée pour tester un grand nombre d'échantillons à la fois. Nous avons pu établir un seuil (%AUC : 71%) pour discriminer les chevaux protégés des chevaux non protégés. Cette première approche ne nécessite qu'un faible volume de sérum et pourrait être intéressante pour le dépistage de nombreux échantillons en seulement 72 heures et avec peu de manipulation. Ceci pourrait présenter un intérêt lors de grandes manifestations équestres comme les championnats internationaux ou encore les jeux olympiques.

Une seconde approche, plus précise, car basée sur les données de plusieurs dilutions de chaque sérum permet de calculer un titre de neutralisation (NT50). Une corrélation a pu être établie entre les valeurs de SRH et de NT50. Cependant, comme expliqué précédemment, il serait intéressant de poursuivre cette étude en criblant un plus grand nombre de sérums. Il est probable qu'en augmentant le nombre de sérums, il sera possible de définir plus précisément les seuils de protection. Kinsley et al. ont montré que l'utilisation d'un test de séroneutralisation est moins discriminant que le test SRH et il est de ce fait plus difficile de corrélérer ce type de données avec la protection clinique ou virologique (Kinsley et al., 2020). Bien que cette étude soit basée sur l'utilisation d'un pseudovirus et non d'un virus EIV comme réalisé dans la présente étude, les résultats pourraient être similaires ce qui expliquerait que certains sérums caractérisés (au

seuil clinique et au seuil virologique par SRH) apparaissent en dehors des zones de seuils déterminés par impédancemétrie. La corrélation observée dans notre étude est en accord avec les rapports précédents sur l'EIV montrant que les taux d'anticorps mesurés par les tests SRH et HI sont fortement corrélés avec les niveaux d'anticorps neutralisants (Morley et al., 1995; Scott et al., 2016; Kinsley et al., 2020). L'optimisation de la définition des seuils de protection est importante pour le développement des méthodes de séroneutralisation du virus de la grippe équine et pour l'application à de futures études (Scott et al., 2016; Kinsley et al., 2020).

Cette méthode qui présente l'avantage d'être automatisée et à haut débit serait également très utile pour confirmer l'immunogénicité des espèces cibles des vaccins anti-EIV. Actuellement, la réponse humorale induite par la vaccination EIV est caractérisée par la mesure des anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination (anti-HA) et/ou des anticorps fixant le complément (SRH). Peu de données sont disponibles sur l'induction d'anticorps neutralisant le virus EIV qui inhibent l'infection cellulaire. Cette nouvelle méthode d'analyse à haut débit de la réponse des anticorps neutralisants l'EIV pourrait élargir le panel des méthodes d'étude des anticorps contre la grippe équine.

Ce travail de thèse a en définitive contribué à faire progresser la recherche dans le domaine de la vaccination en santé équine en proposant une amélioration des protocoles vaccinaux pour renforcer la réponse immunitaire humorale contre la grippe équine et la rhinopneumonie. Les deux études menées chez l'espèce cible ont permis de démontrer que l'ajout d'iPPVO sous sa forme commerciale au moment de la vaccination augmente la réponse immunitaire humorale des chevaux. L'ajout d'un adjuvant dans une seringue séparée ouvre de nouvelles perspectives pour améliorer les protocoles vaccinaux des chevaux. Bien que cette étude n'ait testé l'effet de l'iPPVO que sur deux vaccins : un vaccin inactivé contre l'EIV adjuvanté à base d'ISCOM et un vaccin inactivé contre l'EHV-1/4 adjuvanté avec des carbomères, des tests sur d'autres types de vaccins contenant des adjuvants différents, permettraient de proposer un plus large éventail de vaccins avec lesquels l'iPPVO serait efficace. Cette approche originale pourrait également être testée dans d'autres espèces animales.

Chapitre 5 :
Références

- AAEP, 2022. Vaccination Guidelines AAEP - American Association of Equine Practitioners. Available online: <https://aaep.org/guidelines/vaccination-guidelines> (accessed 5.11.23).
- Adams, A.A., Breathnach, C.C., Katepalli, M.P., Kohler, K., Horohov, D.W., 2008. Advanced age in horses affects divisional history of T cells and inflammatory cytokine production. *Mech Ageing Dev* 129, 656-664. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.09.004>
- Adams, A.A., Sturgill, T.L., Breathnach, C.C., Chambers, T.M., Siger, L., Minke, J.M., Horohov, D.W., 2011. Humoral and cell-mediated immune responses of old horses following recombinant canarypox virus vaccination and subsequent challenge infection. *Vet Immunol Immunopathol* 139, 128-140. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.09.006>
- Allen, G.P., 2008. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *American Journal of Veterinary Research* 69, 1595-1600. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.12.1595>
- Allen, G.P., 2006. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. *Am J Vet Res* 67, 1401-1405. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.8.1401>
- Allen, G. P., 2002a. Epidemic disease caused by Equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Veterinary Education* 14, 136-142. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2002.tb00157.x>
- Allen, G.P., 2002b. Respiratory Infections by Equine Herpesvirus Types 1 and 4 - IVIS. Available online: <https://www.ivis.org/library/equine-respiratory-diseases/respiratory-infections-by-equine-herpesvirus-types-1-and-4> (accessed 3.29.23).
- Ambagala, A.P.N., Gopinath, R.S., Srikumaran, S., 2004. Peptide transport activity of the transporter associated with antigen processing (TAP) is inhibited by an early protein of equine herpesvirus-1. *Journal of General Virology* 85, 349-353. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19563-0>
- Andoh, K., Takasugi, M., Mahmoud, H.Y.A.H., Hattori, S., Terada, Y., Noguchi, K., Shimoda, H., Bannai, H., Tsujimura, K., Matsumura, T., Kondo, T., Maeda, K., 2013. Identification of a major immunogenic region of equine herpesvirus-1 glycoprotein E and its application to enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 164, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.033>
- Andrišić, M., Žarković, I., Šandor, K., Vujnović, A., Perak Junaković, E., Bendelja, K., Savić Mlakar, A., Oršolić, N., Šver, L., Benić, M., Terzić, S., 2022. Effects of immunostimulators of microbial origin on T cells of pigs vaccinated with attenuated vaccine against Aujeszky's disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 243, 110365. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110365>
- Ansprenger, C., Vogt, V., Schick, J., Hirn-Lopez, A., Vokac, Y., Harabacz, I., Braeu, M., Kroell, T., Karenberg, A., Kolb, H.-J., Schmetzer, H., 2018. Paramunity-inducing Factors (PINDs) in dendritic cell (DC) cultures lead to impaired antileukemic functionality of DC-stimulated T-cells. *Cellular Immunology* 328, 33-48. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.005>
- Anziliero, D., Kreutz, L.C., Flores, E.F., Weiblen, R., 2014a. Effects of inactivated parapoxvirus ovis on cellular and humoral events of the innate immune response in mice. *Cell. Immunol.* 289, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.005>
- Anziliero, D., Weiblen, R., Kreutz, L.C., Spilki, F., Flores, E.F., 2014b. Inactivated Parapoxvirus ovis induces a transient increase in the expression of proinflammatory, Th1-related, and autoregulatory cytokines in mice. *Braz J Med Biol Res* 47, 110-118. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133358>

- Aoshi, T., Koyama, S., Kobiyama, K., Akira, S., Ishii, K.J., 2011. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Current Opinion in Virology, Vaccines/Viral genomics* 1, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.002>
- Attili, A.-R., Colognato, R., Preziuso, S., Moriconi, M., Valentini, S., Petrini, S., De Mia, G.M., Cuteri, V., 2020. Evaluation of Three Different Vaccination Protocols against EHV1/EHV4 Infection in Mares: Double Blind, Randomized Clinical Trial. *Vaccines (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020268>
- Ault, A., Zajac, A.M., Kong, W.-P., Gorres, J.P., Royals, M., Wei, C.-J., Bao, S., Yang, Z., Reedy, S.E., Sturgill, T.L., Page, A.E., Donofrio-Newman, J., Adams, A.A., Balasuriya, U.B.R., Horohov, D.W., Chambers, T.M., Nabel, G.J., Rao, S.S., 2012. Immunogenicity and clinical protection against equine influenza by DNA vaccination of ponies. *Vaccine* 30, 3965–3974. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.026>
- Au-Yeung, N., Mandhana, R., Horvath, C.M., 2013. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAK-STAT* 2, e23931. <https://doi.org/10.4161/jkst.23931>
- Avci, O., Bulut, O., Dik, I., 2016. Effects of inactive parapoxvirus ovis on cytokine levels in rats. *J Vet Med Sci* 78, 129–131. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0231>
- Awan, A., Chong, Y., Field, H., 1990. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. *The Journal of general virology* 71 (Pt 5). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-5-1131>
- Azab, W., Gramatica, A., Herrmann, A., Osterrieder, N., 2015. Binding of Alphaherpesvirus Glycoprotein H to Surface $\alpha 4\beta 1$ -Integrins Activates Calcium-Signaling Pathways and Induces Phosphatidylserine Exposure on the Plasma Membrane. *mBio* 6, e01552-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01552-15>
- Azab, W., Lehmann, M.J., Osterrieder, N., 2013. Glycoprotein H and $\alpha 4\beta 1$ integrins determine the entry pathway of alphaherpesviruses. *J Virol* 87, 5937–5948. <https://doi.org/10.1128/JVI.03522-12>
- Azab, W., Osterrieder, N., 2012. Glycoproteins D of Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) and EHV-4 Determine Cellular Tropism Independently of Integrins. *Journal of Virology* 86, 2031–2044. <https://doi.org/10.1128/JVI.06555-11>
- Baghi, H.B., Laval, K., Favoreel, H., Nauwynck, H.J., 2014. Isolation and characterization of equine nasal mucosal CD172a + cells. *Vet Immunol Immunopathol* 157, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.12.001>
- Baghi, H.B., Nauwynck, H.J., 2014. Impact of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection on the migration of monocytic cells through equine nasal mucosa. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.09.004>
- Bannai, H., Kambayashi, Y., Nemoto, M., Ohta, M., Tsujimura, K., 2023. Experimental challenge of horses after prime-boost immunization with a modified live equid alphaherpesvirus 1 vaccine administered by two different routes. *Arch Virol* 168, 27. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05638-w>
- Bannai, H., Nemoto, M., Tsujimura, K., Yamanaka, T., Kokado, H., Kondo, T., Matsumura, T., 2018. Comparison of protective efficacies between intranasal and intramuscular vaccination of horses with a modified live equine herpesvirus type-1 vaccine. *Veterinary Microbiology* 222, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.015>
- Bannai, H., Tsujimura, K., Nemoto, M., Ohta, M., Yamanaka, T., Kokado, H., Matsumura, T., 2019. Epizootiological investigation of equine herpesvirus type 1 infection among Japanese racehorses before and after the replacement of an inactivated vaccine with a modified live vaccine. *BMC Vet Res* 15, 280. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2036-0>
- Barakat, C., 2020. The equine contribution to the new COVID-19 vaccine. *Equus Magazine*. Available online: [https://equusmagazine.com/news/horses-contribute-covid-](https://equusmagazine.com/news/horses-contribute-covid-19)

- vaccine/ (accessed 3.7.23).
- Baxi, M.K., Efstathiou, S., Lawrence, G., Whalley, J.M., Slater, J.D., Field, H.J., 1995. The detection of latency-associated transcripts of equine herpesvirus 1 in ganglionic neurons. *Journal of General Virology* 76, 3113–3118. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-12-3113>
- Bayry, J., Prabhudas, K., Gopalakrishna, S., Patil, P.K., Ramakrishna, C., Misra, L.D., Suryanarayana, V.V.S., 1999. Protective Immune Response to 16 kDa Immunoreactive Recombinant Protein Encoding the C-Terminal VP1 Portion of Foot and Mouth Disease Virus Type Asia 1. *Microbiology and Immunology* 43, 765–771. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02468.x>
- Birzer, A., Kraner, M.E., Heilingloh, C.S., Mühl-Zürbes, P., Hofmann, J., Steinkasserer, A., Popella, L., 2020a. Mass Spectrometric Characterization of HSV-1 L-Particles From Human Dendritic Cells and BHK21 Cells and Analysis of Their Functional Role. *Frontiers in Microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01997>
- Birzer, A., Krawczyk, A., Draßner, C., Kuhnt, C., Mühl-Zürbes, P., Heilingloh, C.S., Steinkasserer, A., Popella, L., 2020b. HSV-1 Modulates IL-6 Receptor Expression on Human Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology* 11. <https://doi.org/doi:10.3389/fimmu.2020.01970>
- Biuk-Rudan, N., Šver, L., Valpotić, I., Vrbanac, I., Madić, J., Župančić, Ž., Vijtiuk, N., Pavičić, Ž., 2004. Effect of Baypamun Treatment on Aujeszky's Disease Virus (ADV) Transmission in Pigs. *Acta Vet. Brno* 73, 59–68. <https://doi.org/10.2754/avb200473010059>
- Blanco-Lobo, P., Rodriguez, L., Reedy, S., Oladunni, F.S., Nogales, A., Murcia, P.R., Chambers, T.M., Martinez-Sobrido, L., 2019. A Bivalent Live-Attenuated Vaccine for the Prevention of Equine Influenza Virus. *Viruses* 11, 933. <https://doi.org/10.3390/v11100933>
- Bonjardim, C.A., 2005. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses—and viruses counteract IFN action. *Microbes and Infection* 7, 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.02.001>
- Breathnach, C.C., Clark, H.J., Clark, R.C., Olsen, C.W., Townsend, H.G.G., Lunn, D.P., 2006. Immunization with recombinant modified vaccinia Ankara (rMVA) constructs encoding the HA or NP gene protects ponies from equine influenza virus challenge. *Vaccine* 24, 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.091>
- Breathnach, C.C., Rudersdorf, R., Lunn, D.P., 2004. Use of recombinant modified vaccinia Ankara viral vectors for equine influenza vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 98, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.11.004>
- Breathnach, C.C., Soboll, G., Suresh, M., Lunn, D.P., 2005. Equine herpesvirus-1 infection induces IFN- γ production by equine T lymphocyte subsets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 103, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.024>
- Breathnach, C.C., Yeargan, M.R., Sheoran, A.S., Allen, G.P., 2001. The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens. *Equine Vet J* 33, 651–657. <https://doi.org/10.2746/042516401776249318>
- Bresgen, C., Lämmer, M., Wagner, B., Osterrieder, N., Damiani, A.M., 2012. Serological responses and clinical outcome after vaccination of mares and foals with equine herpesvirus type 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) vaccines. *Vet Microbiol* 160, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.042>
- Bryans, J.T., 1978. Immunization of pregnant mares with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. *Journal of Equine Medicine and Surgery. Supplement (USA)* 1 p. 83-92.
- Bryant, N.A., Rash, A.S., Russell, C.A., Ross, J., Cooke, A., Bowman, S., MacRae, S., Lewis, N.S., Paillot, R., Zaroni, R., Meier, H., Griffiths, L.A., Daly, J.M., Tiwari, A., Chambers, T.M.,

- Newton, J.R., Elton, D.M., 2009. Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Veterinary Microbiology* 138, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.004>
- Bryant, N.A., Wilkie, G.S., Russell, C.A., Compston, L., Grafham, D., Clissold, L., McLay, K., Medcalf, L., Newton, R., Davison, A.J., Elton, D.M., 2018. Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 817–832. <https://doi.org/10.1111/tbed.12809>
- Bueno, I., Pearce, P., Dunowska, M., 2020. Frequency of latent equine herpesvirus type-1 infection among a sample of horses in the central North Island of New Zealand. *N Z Vet J* 68, 23–30. <https://doi.org/10.1080/00480169.2019.1653238>
- Bullone, M., Lavoie, J.-P., 2016. Recurrent Airway Obstruction and Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease, in: *Equine Clinical Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 127–144. <https://doi.org/10.1002/9781119086512.ch16>
- Callinan, I.D.F. (Ed.), 2008. *Equine influenza: the August 2007 outbreak in Australia*, Australia. ed, Parliamentary paper - The Parliament of the Commonwealth of Australia. Commonwealth of Australia, Canberra.
- Cao, S., Liu, X., Yu, M., Li, J., Jia, X., Bi, Y., Sun, L., Gao, G.F., Liu, W., 2012. A Nuclear Export Signal in the Matrix Protein of Influenza A Virus Is Required for Efficient Virus Replication. *Journal of Virology* 86, 4883–4891. <https://doi.org/10.1128/JVI.06586-11>
- Carnet, F., Paillot, R., Fortier, C., Hue, E.S., Briot, L., de Geoffroy, F., Vidalain, P.-O., Pronost, S., 2022. Immunostimulating Effect of Inactivated Parapoxvirus Ovis on the Serological Response to Equine Influenza Booster Vaccination. *Vaccines (Basel)* 10, 2139. <https://doi.org/10.3390/vaccines10122139>
- Castrucci, G., Ferrari, M., Osburn, B.I., Frigeri, F., Barreca, F., Tagliati, S., Cuteri, V., 1995. The use of a non-specific defence mechanism inducer in calves exposed to bovine herpesvirus-1 infection: preliminary trials. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 18, 85–91. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(95\)98849-d](https://doi.org/10.1016/0147-9571(95)98849-d)
- Castrucci, G., Osburn, B.I., Frigeri, F., Ferrari, M., Salvatori, D., Lo Dico, M., Barreca, F., 2000. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 23, 163–173. [https://doi.org/10.1016/s0147-9571\(99\)00069-7](https://doi.org/10.1016/s0147-9571(99)00069-7)
- Caughman, G.B., Staczek, J., O'Callaghan, D.J., 1985. Equine herpesvirus type 1 infected cell polypeptides: Evidence for immediate early/early/late regulation of viral gene expression. *Virology* 145, 49–61. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90200-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90200-4)
- Chambers, T.M., Holland, R.E., Tudor, L.R., Townsend, H.G., Cook, A., Bogdan, J., Lunn, D.P., Hussey, S., Whitaker-Dowling, P., Youngner, J.S., Sebring, R.W., Penner, S.J., Stiegler, G.L., 2001. A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge. *Equine Vet J* 33, 630–636. <https://doi.org/10.2746/042516401776249291>
- Chambers, T.M., Reedy, S.E., 2014. Equine influenza serological methods. *Methods Mol. Biol.* 1161, 411–422. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_36
- Charan, S., Palmer, K., Chester, P., Mire-Sluis, A.R., Meager, A., Edington, N., 1997. Transforming growth factor-beta induced by live or ultraviolet-inactivated equid herpes virus type-1 mediates immunosuppression in the horse. *Immunology* 90, 586–591. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00202.x>
- Chen, X., Liu, S., Goraya, M.U., Maarouf, M., Huang, S., Chen, J.-L., 2018. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320>
- Chentoufi, A.A., Dhanushkodi, N.R., Srivastava, R., Prakash, S., Coulon, P.-G.A., Zayou, L., Vahed, H., Chentoufi, H.A., Hormi-Carver, K.K., BenMohamed, L., 2022.

- Combinatorial Herpes Simplex Vaccine Strategies: From Bedside to Bench and Back. *Front Immunol* 13, 849515. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.849515>
- Chesters, P.M., Allsop, R., Purewal, A., Edington, N., 1997. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *Journal of Virology* 71, 3437–3443. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3437-3443.1997>
- Coombs, D.K., Patton, T., Kohler, A.K., Soboll, G., Breathnach, C., Townsend, H.G.G., Lunn, D.P., 2006. Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. *Vet Immunol Immunopathol* 111, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.013>
- Cornick, J., Martens, J., Martens, R., Crandell, R., McConnell, S., Kit, S., 1990. Safety and efficacy of a thymidine kinase negative equine herpesvirus-1 vaccine in young horses. *Can J Vet Res* 54, 260–266.
- Cottone, R., Büttner, M., Bauer, B., Henkel, M., Hettich, E., Rziha, H.-J., 1998. Analysis of genomic rearrangement and subsequent gene deletion of the attenuated Orf virus strain D1701. *Virus Research* 56, 53–67. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(98\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(98)00056-2)
- Couroucé, A., Normand, C., Tessier, C., Pomares, R., Thévenot, J., Pitel, C.M., Legrand, L., Pitel, P.-H., Pronost, S., Lupo, C., 2023. EHV-1 outbreak during a show-jumping competition: a clinical and epidemiological study. SSRN Scholarly Paper, 4419092. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4419092>
- Crabb, B.S., Studdert, M.J., 1995. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv Virus Res* 45, 153–190. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60060-3](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60060-3)
- Crabb, B.S., Studdert, M.J., 1993. Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host. *J Virol* 67, 6332–6338. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.10.6332-6338.1993>
- Crabb, B.S., Studdert, M.J., 1990. Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *Journal of General Virology* 71, 2033–2041. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-9-2033>
- Crouch, C.F., Daly, J., Hannant, D., Wilkins, J., Francis, M.J., 2004. Immune responses and protective efficacy in ponies immunised with an equine influenza ISCOM vaccine containing an ‘American lineage’ H3N8 virus. *Vaccine* 23, 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.074>
- Crouch, C.F., Daly, J., Henley, W., Hannant, D., Wilkins, J., Francis, M.J., 2005. The use of a systemic prime/mucosal boost strategy with an equine influenza ISCOM vaccine to induce protective immunity in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 108, 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.06.009>
- Csellner, H., Walker, C., Wellington, J.E., McLure, L.E., Love, D.N., Whalley, J.M., 2000. EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol* 145, 2371–2385. <https://doi.org/10.1007/s007050070027>
- Cui, H., Zhao, K., Zhang, Cheng, Lin, J., Sun, S., Li, Q., Du, L., Zhang, Chunmao, Liu, J., Gao, F., He, W., Gao, Y., Guo, Z., Guan, J., 2022. Parapoxvirus-based therapy eliminates SARS-CoV-2-loaded fine aerosol and blocks viral transmission in hamster models. *Front Microbiol* 13, 1086627. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1086627>
- Cullinane, A., Gahan, J., Walsh, C., Nemoto, M., Entenfellner, J., Olguin-Periglione, C., Garvey, M., Huang Fu, T.Q., Venner, M., Yamanaka, T., Barrandeguy, M., Fernandez, C.J., 2020. Evaluation of Current Equine Influenza Vaccination Protocols Prior to Shipment, Guided by OIE Standards. *Vaccines* 8, 107. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010107>
- Cullinane, A., Gildea, S., Weldon, E., 2014. Comparison of primary vaccination regimes for equine influenza: working towards an evidence-based regime. *Equine Vet J* 46, 669–

673. <https://doi.org/10.1111/evj.12214>
- Cullinane, A., Newton, J.R., 2013. Equine influenza—A global perspective. *Veterinary Microbiology, Special Issue: Equine Infectious Diseases* 167, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.029>
- Cullinane, A.A., Rixon, F.J., Davison, A.J., 1988. Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. *J Gen Virol* 69 (Pt 7), 1575–1590. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1575>
- Cymerys, J., Słońska, A., Chodkowski, M., Golke, A., Krzyżowska, M., Bańbura, M.W., 2020. Neuropathogenic and non-neuropathogenic EHV-1 strains induce the accumulation of hyperphosphorylated Tau in primary murine neurons. *Acta Virol* 64, 490–495. https://doi.org/10.4149/av_2020_407
- Daly, J.M., Newton, J.R., Mumford, J.A., 2004. Current perspectives on control of equine influenza. *Vet. Res.* 35, 411–423. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004023>
- Dargan, D.J., Patel, A.H., Subak-Sharpe, J.H., 1995. PREPs: herpes simplex virus type 1-specific particles produced by infected cells when viral DNA replication is blocked. *J Virol* 69, 4924–4932.
- Dargan, D.J., Subak-Sharpe, J.H., 1997. The Effect of Herpes Simplex Virus Type 1 L-Particles on Virus Entry, Replication, and the Infectivity of Naked Herpesvirus DNA. *Virology* 239, 378–388. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8893>
- Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154, 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
- Deb, P., Dai, J., Singh, S., Kalyoussef, E., Fitzgerald-Bocarsly, P., 2020. Triggering of the cGAS-STING Pathway in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Inhibits TLR9-Mediated IFN Production. *The Journal of Immunology* 205, 223–236. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800933>
- Deeg, C.A., Altmann, F., Hauck, S.M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M., Ueffing, M., 2007. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* 7, 1540–1548. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600795>
- Demirlek, T., Sabuncu, A., Enginler, S.Ö., Çelik, B., Koçak, Ö., 2021. Efficacy of inactivated Parapoxvirus ovis paraimmune activator as a prophylaxis against mastitis and therapy for subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet Res Forum* 12, 421–427. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.110810.2628>
- DeNotta, S., McFarlane, D., 2023. Immunosenescence and inflammaging in the aged horse. *Immun Ageing* 20, 2. <https://doi.org/10.1186/s12979-022-00325-5>
- Di Francesco, C.E., Smoglica, C., De Amicis, I., Cafini, F., Carluccio, A., Contri, A., 2020. Evaluation of Colostral Immunity Against Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) in Martina Franca's Foals. *Frontiers in Veterinary Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.579371>
- Doll, E.R., Bryans, J.T., 1963. Immunization of young horses against viral rhinopneumonitis. *Cornell Vet* 53, 24–41.
- Dory, D., Jestin, A., 2021. Vaccins à ADN et à ARN : des technologies également utilisées en vaccinologie vétérinaire. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 174, 113–116. <https://doi.org/10.3406/bavf.2021.70927>
- Dufour, J.H., Dziejman, M., Liu, M.T., Leung, J.H., Lane, T.E., Luster, A.D., 2002. IFN- γ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *The Journal of Immunology* 168, 3195–3204. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3195>
- Dunowska, M., 2014. A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B:

- pathogenesis and epidemiology. *N Z Vet J* 62, 179–188. <https://doi.org/10.1080/00480169.2014.899946>
- Edington, N., Bridges, C.G., Griffiths, L., 1989. Equine interferons following exposure to equid herpesvirus-1 or -4. *J Interferon Res* 9, 389–392. <https://doi.org/10.1089/jir.1989.9.389>
- Edington, N., Bridges, C.G., Patel, J.R., 1986. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch Virol* 90, 111–124. <https://doi.org/10.1007/BF01314149>
- Edington, N., Smyth, B., Griffiths, L., 1991. The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions. *J Comp Pathol* 104, 379–387. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(08\)80148-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(08)80148-x)
- Edlund Toulemonde, C., Daly, J., Sindler, T., Guigal, P.M., Audonnet, J.C., Minke, J.M., 2005. Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 2003 outbreak in the United Kingdom. *Vet Rec* 156, 367–371. <https://doi.org/10.1136/vr.156.12.367>
- Ehsanifar, M., 2021. Airborne aerosols particles and COVID-19 transition. *Environmental Research* 200, 111752. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111752>
- El Brini, Z., Fassi Fihri, O., Paillot, R., Lotfi, C., Amraoui, F., El Ouadi, H., Dehhaoui, M., Colitti, B., Alyakine, H., Piro, M., 2021. Seroprevalence of Equine Herpesvirus 1 (EHV-1) and Equine Herpesvirus 4 (EHV-4) in the Northern Moroccan Horse Populations. *Animals* 11, 2851. <https://doi.org/10.3390/ani11102851>
- El-Hage, C., Hartley, C., Savage, C., Watson, J., Gilkerson, J., Paillot, R., 2022. Assessment of Humoral and Long-Term Cell-Mediated Immune Responses to Recombinant Canarypox-Vectored Equine Influenza Virus Vaccination in Horses Using Conventional and Accelerated Regimens Respectively. *Vaccines* 10, 855. <https://doi.org/10.3390/vaccines10060855>
- Elliott, G., O'Hare, P., 1995. Equine herpesvirus 1 gene 12, the functional homologue of herpes simplex virus VP16, transactivates via octamer sequences in the equine herpesvirus IE gene promoter. *Virology* 213, 258–262. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1568>
- Entenfellner, J., Gahan, J., Garvey, M., Walsh, C., Venner, M., Cullinane, A., 2020. Response of Sport Horses to Different Formulations of Equine Influenza Vaccine. *Vaccines* 8, 372. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030372>
- Fachinger, V., Schlapp, T., Saalmüller, A., 2000a. Evidence for a parapox ovis virus-associated superantigen. *Eur J Immunol* 30, 2962–2971. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200010\)30:10<2962::AID-IMMU2962>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200010)30:10<2962::AID-IMMU2962>3.0.CO;2-1)
- Fachinger, V., Schlapp, T., Strube, W., Schmeer, N., Saalmüller, A., 2000b. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. *J Virol* 74, 7943–7951. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.17.7943-7951.2000>
- Fiebig, H.-H., Siegling, A., Volk, H.-D., Friebe, A., Knolle, P., Limmer, A., Weber, O., 2011. Inactivated orf virus (Parapoxvirus ovis) induces antitumoral activity in transplantable tumor models. *Anticancer Res* 31, 4185–4190.
- Fodor, E., te Velhuis, A.J.W., 2020. Structure and Function of the Influenza Virus Transcription and Replication Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10, a038398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038398>
- Foote, A.K., Ricketts, S.W., Whitwell, K.E., 2012. A racing start in life? The hurdles of equine fetoplacental pathology. *Equine Vet J Suppl* 120–129. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00507.x>
- Foote, C.E., Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., Love, D.N., 2003. Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in mares and foals on a large Hunter Valley stud farm in years pre- and postvaccination. *Aust Vet J* 81, 283–288. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb12576.x>
- Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Rota, J., Trevor-Jones, P., Ruitenbergh, K.M., Wellington,

- J.E., Whalley, J.M., 2005. Serum antibody responses to equine herpesvirus 1 glycoprotein D in horses, pregnant mares and young foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 105, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.12.012>
- Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Wellington, J.E., Whalley, J.M., 2006. EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology, Equine Herpesvirus-1* 111, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.007>
- Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., 2004. Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in unweaned Thoroughbred foals from vaccinated mares on a large stud farm. *Equine Vet J* 36, 341–345. <https://doi.org/10.2746/0425164044890634>
- Fougerolle, S., Fortier, C., Legrand, L., Jourdan, M., Pitel, C.M., Pronost, S., Paillot, R., 2019. Success and Limitation of Equine Influenza Vaccination: The First Incursion in a Decade of a Florida Clade 1 Equine Influenza Virus that Shakes Protection Despite High Vaccine Coverage. *Vaccines* 7, 174. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040174>
- Fougerolle, S., Legrand, L., Garrett, D., Birand, I., Foursin, M., D’Ablon, X., Bayssat, P., Newton, R.J., Pronost, S., Paillot, R., 2016. Influential factors inducing suboptimal humoral response to vector-based influenza immunisation in Thoroughbred foals. *Vaccine* 34, 3787–3795. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.05.068>
- Fougerolle, S., Legrand, L., Lecouturier, F., Sailleau, C., Paillot, R., Hans, A., Pronost, S., 2017. Genetic evolution of equine influenza virus strains (H3N8) isolated in France from 1967 to 2015 and the implications of several potential pathogenic factors. *Virology* 505, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.003>
- Frampton, A.R., Goins, W.F., Cohen, J.B., von Einem, J., Osterrieder, N., O’Callaghan, D.J., Glorioso, J.C., 2005. Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor. *J Virol* 79, 3169–3173. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.3169-3173.2005>
- Frampton, A.R., Stolz, D.B., Uchida, H., Goins, W.F., Cohen, J.B., Glorioso, J.C., 2007. Equine herpesvirus 1 enters cells by two different pathways, and infection requires the activation of the cellular kinase ROCK1. *J Virol* 81, 10879–10889. <https://doi.org/10.1128/JVI.00504-07>
- Frampton, A.R., Uchida, H., Einem, J. von, Goins, W.F., Grandi, P., Cohen, J.B., Osterrieder, N., Glorioso, J.C., 2010. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) utilizes microtubules, dynein, and ROCK1 to productively infect cells. *Vet Microbiol* 141, 12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.035>
- France Galop, 2023. Code des Courses & Conditions Générales Available online: https://www.france-galop.com/fr/Code_des_Courses_et_Conditions_Generales (accessed 4.4.23).
- Friebe, A., Siegling, A., Friederichs, S., Volk, H.-D., Weber, O., 2004. Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol* 78, 9400–9411. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9400-9411.2004>
- Fukushi, H., Yamaguchi, T., Yamada, S., 2012. Complete Genome Sequence of Equine Herpesvirus Type 9. *Journal of Virology* 86, 13822–13822. <https://doi.org/10.1128/JVI.02607-12>
- Galvin, P., Gildea, S., Arkins, S., Walsh, C., Cullinane, A., 2013. The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA). *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7, 73–80. <https://doi.org/10.1111/irv.12195>
- Garber, D.A., Beverley, S.M., Coen, D.M., 1993. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197, 459–462. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1612>
- Georgana, I., Sumner, R.P., Towers, G.J., Maluquer de Motes, C., 2018. Virulent Poxviruses

- Inhibit DNA Sensing by Preventing STING Activation. *J Virol* 92, e02145-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02145-17>
- Giessler, K.S., Samoilowa, S., Soboll Hussey, G., Kiupel, M., Matiasek, K., Sledge, D.G., Liesche, F., Schlegel, J., Fux, R., Goehring, L.S., 2020. Viral Load and Cell Tropism During Early Latent Equid Herpesvirus 1 Infection Differ Over Time in Lymphoid and Neural Tissue Samples From Experimentally Infected Horses. *Front Vet Sci* 7, 621. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00621>
- Gildea, S., Arkins, S., Walsh, C., Cullinane, A., 2011a. A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following annual booster vaccination of National Hunt horses - a randomised blind study. *Vaccine* 29, 3917-3922. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.003>
- Gildea, S., Arkins, S., Walsh, C., Cullinane, A., 2011b. A comparison of antibody responses to commercial equine influenza vaccines following primary vaccination of Thoroughbred weanlings – A randomised blind study. *Vaccine* 29, 9214-9223. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.101>
- Gildea, S., Quinlivan, M., Murphy, B.A., Cullinane, A., 2013. Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings – A blinded comparison of commercially available vaccines. *Vaccine* 31, 5216-5222. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.083>
- Goehring, L.S., Van Winden, S.C., Van Maanen, C., Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., 2006. Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in The Netherlands: a four-year retrospective study (1999-2003). *J Vet Intern Med* 20, 601-607. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[601:ehtami\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[601:ehtami]2.0.co;2)
- Goehring, L.S., Wagner, B., Bigbie, R., Hussey, S.B., Rao, S., Morley, P.S., Lunn, D.P., 2010. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine* 28, 5203-5211. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.065>
- Gonzalez-Obando, J., Forero, J.E., Zuluaga-Cabrera, A.M., Ruiz-Saenz, J., 2022. Equine Influenza Virus: An Old Known Enemy in the Americas. *Vaccines* 10, 1718. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101718>
- Goodman, L.B., Wagner, B., Flaminio, M.J.B.F., Sussman, K.H., Metzger, S.M., Holland, R., Osterrieder, N., 2006. Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* 24, 3636-3645. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.01.062>
- Gorelik, L., Flavell, R.A., 2002. Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2, 46-53. <https://doi.org/10.1038/nri704>
- Gote, V., Bolla, P.K., Kommineni, N., Butreddy, A., Nukala, P.K., Palakurthi, S.S., Khan, W., 2023. A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 2700. <https://doi.org/10.3390/ijms24032700>
- Grant, E.J., Quiñones-Parra, S.M., Clemens, E.B., Kedzierska, K., 2016. Human influenza viruses and CD8+ T cell responses. *Current Opinion in Virology, Emerging viruses* • *Viral immunology* 16, 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.016>
- Granzow, H., Klupp, B.G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., Mettenleiter, T.C., 2001. Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *Journal of Virology* 75, 3675-3684. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3675-3684.2001>
- Gray, W. L., Baumann, R.P., Robertson, A.T., Caughman, G.B., O'Callaghan, D.J., Staczek, J., 1987a. Regulation of equine herpesvirus type 1 gene expression: characterization of immediate early, early, and late transcription. *Virology* 158, 79-87. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90240-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90240-6)
- Gray, Wayne L., Baumann, R.P., Robertson, A.T., O'Callaghan, D.J., Staczek, J., 1987b. Characterization and mapping of equine herpesvirus type 1 immediate early, early,

- and late transcripts. *Virus Research* 8, 233–244. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(87\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0168-1702(87)90018-9)
- Gryspeerd, A., Vandekerckhove, A., Van Doorselaere, J., Van de Walle, G., Nauwynck, H., 2011. Description of an unusually large outbreak of nervous system disorders caused by equine herpesvirus 1 (EHV1) in 2009 in Belgium. *VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT* 80, 147–153.
- Gryspeerd, A.C., Vandekerckhove, A.P., Baghi, H.B., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J., 2012. Expression of late viral proteins is restricted in nasal mucosal leucocytes but not in epithelial cells during early-stage equine herpes virus-1 infection. *The Veterinary Journal* 193, 576–578. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.022>
- Gryspeerd, A.C., Vandekerckhove, A.P., Garré, B., Barbé, F., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J., 2010. Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. *Vet Microbiol* 142, 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.015>
- Guo, H., Shen, S., Wang, L., Deng, H., 2010. Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein Cell* 1, 987–998. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0120-0>
- Haig, D.M., 2006. Orf virus infection and host immunity. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19, 127. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000216622.75326.ef>
- Hannant, D., Jessett, D.M., O'Neill, T., Dolby, C.A., Cook, R.F., Mumford, J.A., 1993. Responses of ponies to equid herpesvirus-1 Iscom vaccination and challenge with virus of the homologous strain. *Research in Veterinary Science* 54, 299–305. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90126-Z](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90126-Z)
- Hannant, D., Mumford, J.A., 1989. Cell mediated immune responses in ponies following infection with equine influenza virus (H3N8): the influence of induction culture conditions on the properties of cytotoxic effector cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 21, 327–337. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(89\)90040-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90040-8)
- Hannant, D., O'Neill, T., Jessett, D.M., Mumford, J.A., 1991. Evidence for non-specific immunosuppression during the development of immune responses to Equid Herpesvirus-1. *Equine Veterinary Journal* 23, 41–45. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1991.tb04756.x>
- Hannant, D., O'Neill, T., Ostlund, E.N., Kydd, J.H., Hopkin, P.J., Mumford, J.A., 1999. Equid herpesvirus-induced immunosuppression is associated with lymphoid cells and not soluble circulating factors. *Viral Immunol* 12, 313–321. <https://doi.org/10.1089/vim.1999.12.313>
- Harms, 2014. Detection of modified-live equine intranasal vaccine pathogens in adult horses using quantitative PCR - ProQuest Available online: <https://www.proquest.com/openview/55e697c926efadf6eb4ca007d46c2f45/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2041027> (accessed 2.7.23).
- Hartmann, K., Block, A., Ferk, G., Vollmar, A., Goldberg, M., Lutz, H., 1998. Treatment of feline leukemia virus-infected cats with paramunity inducer. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 65, 267–275. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00161-5)
- Hasebe, R., Sasaki, M., Sawa, H., Wada, R., Umemura, T., Kimura, T., 2009. Infectious entry of equine herpesvirus-1 into host cells through different endocytic pathways. *Virology* 393, 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.032>
- Heldens, J. G. M., Hannant, D., Cullinane, A.A., Prendergast, M.J., Mumford, J.A., Nelly, M., Kydd, J.H., Weststrate, M.W., Van den Hoven, R., 2001a. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine* 19, 4307–4317. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00131-1)
- Heldens, J. G. M., Kersten, A.J., Weststrate, M.W., Hoven, R. Van den, 2001b. Vaccinology: Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza,

- tetanus and equine herpesvirus 1 and 4 combination vaccine. *Veterinary Quarterly* 23, 210–217. <https://doi.org/10.1080/01652176.2001.9695116>
- Heldens, J.G.M., Pouwels, H.G.W., Derks, C.G.G., Van de Zande, S.M.A., Hoeijmakers, M.J.H., 2010. Duration of immunity induced by an equine influenza and tetanus combination vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix. *Vaccine* 28, 6989–6996. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.043>
- Heldens, J.G.M., Pouwels, H.G.W., Derks, C.G.G., Van de Zande, S.M.A., Hoeijmakers, M.J.H., 2009. The first safe inactivated equine influenza vaccine formulation adjuvanted with ISCOM-Matrix that closes the immunity gap. *Vaccine* 27, 5530–5537. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.06.085>
- Henninger, R.W., Reed, S.M., Saville, W.J., Allen, G.P., Hass, G.F., Kohn, C.W., Sofaly, C., 2007. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J Vet Intern Med* 21, 157–165. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[157:oondcb\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[157:oondcb]2.0.co;2)
- Hirst, G.K., 1942. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J Exp Med* 75, 49–64. <https://doi.org/doi:10.1084/jem.75.1.49>
- Hodavance, M.S., Ralston, S.L., Pelczer, I., 2007. Beyond blood sugar: the potential of NMR-based metabonomics for type 2 human diabetes, and the horse as a possible model. *Anal Bioanal Chem* 387, 533–537. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0979-z>
- Holmes, M.A., Townsend, H.G.G., Kohler, A.K., Hussey, S., Breathnach, C., Barnett, C., Holland, R., Lunn, D.P., 2006. Immune responses to commercial equine vaccines against equine herpesvirus-1, equine influenza virus, eastern equine encephalomyelitis, and tetanus. *Veterinary Immunology and Immunopathology, Equine Herpesvirus-1* 111, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.010>
- Holz, C.L., Nelli, R.K., Wilson, M.E., Zarski, L.M., Azab, W., Baumgardner, R., Osterrieder, N., Pease, A., Zhang, L., Hession, S., Goehring, L.S., Hussey, S.B., Soboll Hussey, G., 2017. Viral genes and cellular markers associated with neurological complications during herpesvirus infections. *J Gen Virol* 98, 1439–1454. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000773>
- Hörber, D., Mayr, B., 1991. Paramunisierung FeLV-positiver Katzen mit PIND-AVI. *Tierärztl. Prax.* 19, 311–314.
- Horohov, D.W., Breathnach, C.C., Sturgill, T.L., Rashid, C., Stiltner, J.L., Strong, D., Nieman, N., Holland, R.E., 2008. In vitro and in vivo modulation of the equine immune response by parapoxvirus ovis. *Equine Vet J* 40, 468–472. <https://doi.org/10.2746/042516408X322111>
- Horohov, D.W., Dimock, A., Guirnalda, P., Folsom, R.W., McKeever, K.H., Malinowski, K., 1999. Effect of exercise on the immune response of young and old horses. *Am J Vet Res* 60, 643–647
- Horohov, D.W., Kydd, J.H., Hannant, D., 2002. The effect of aging on T cell responses in the horse. *Dev Comp Immunol* 26, 121–128. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00027-1](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00027-1)
- Hou, L.-N., Wang, F.-X., Wang, Y.-X., Guo, H., Liu, C.-Y., Zhao, H.-Z., Yu, M.-H., Wen, Y.-J., 2022. Subunit vaccine based on glycoprotein B protects pattern animal guinea pigs from tissue damage caused by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Virus Res* 320, 198899. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198899>
- Hue, E.S., Richard, E.A., Fortier, C.I., Fortier, G.D., Paillot, R., Raue, R., Pronost, S.L., 2017. Equine PBMC Cytokines Profile after In Vitro α - and γ -EHV Infection: Efficacy of a Parapoxvirus Ovis Based-Immunomodulator Treatment. *Vaccines* 5. <https://doi.org/10.3390/vaccines5030028>
- Huemer, H.P., Nowotny, N., Crabb, B.S., Meyer, H., Hübner, P.H., 1995. gp13 (EHV-gC): a complement receptor induced by equine herpesviruses. *Virus Research* 37, 113–126.

- [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00027-N](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00027-N)
- Huemer, H.P., Strobl, B., Nowotny, N., 2000. Use of apathogenic vaccinia virus MVA expressing EHV-1 gC as basis of a combined recombinant MVA/DNA vaccination scheme. *Vaccine* 18, 1320–1326. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00413-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00413-2)
- Hultén, C., Sandgren, B., Skiöldebrand, E., Klingeborn, B., Marhaug, G., Forsberg, M., 1999. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet Scand* 40, 323–333. <https://doi.org/10.1186/BF03547012>
- Hussey, G.S., Giessler, K.S., 2022. Contribution of the immune response to the pathogenesis of equine herpesvirus-1 (EHV-1): Are there immune correlates that predict increased risk or protection from EHV-1 myeloencephalopathy? *The Veterinary Journal* 282, 105827. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105827>
- Hussey, G.S., Goehring, L.S., Lunn, D.P., Hussey, S.B., Huang, T., Osterrieder, N., Powell, C., Hand, J., Holz, C., Slater, J., 2013. Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions. *Vet Res* 44, 118. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-118>
- Hussey, G.S., Hussey, S.B., Wagner, B., Horohov, D.W., Van de Walle, G.R., Osterrieder, N., Goehring, L.S., Rao, S., Lunn, D.P., 2011. Evaluation of immune responses following infection of ponies with an EHV-1 ORF1/2 deletion mutant. *Vet Res* 42, 23. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-23>
- Hutchinson, E.C., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R., Digard, P., 2010. Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* 91, 313–328. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017608-0>
- Ichinohe, T., Lee, H.K., Ogura, Y., Flavell, R., Iwasaki, A., 2009. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *Journal of Experimental Medicine* 206, 79–87. <https://doi.org/10.1084/jem.20081667>
- International Committee of the OIE, 2008. Equine rhinopneumonitis, in: *The Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 6th Ed., OIE Biological Standards Commission Ed. pp. 894–903.
- Jacob, R.J., Cohen, D., Bouchey, D., Davis, T., Borchelt, J., 1988. Molecular pathogenesis of equine coital exanthema: identification of a new equine herpesvirus isolated from lesions reminiscent of coital exanthema in a donkey. University Press of Kentucky. ISBN 08-131-16767. p. 140-146.
- Jayasekera, J.P., Moseman, E.A., Carroll, M.C., 2007. Natural Antibody and Complement Mediate Neutralization of Influenza Virus in the Absence of Prior Immunity. *Journal of Virology* 81, 3487–3494. <https://doi.org/10.1128/JVI.02128-06>
- Kanesa-athan, N., Smucny, J.J., Hoke, C.H., Marks, D.H., Konishi, E., Kurane, I., Tang, D.B., Vaughn, D.W., Mason, P.W., Shope, R.E., 2000. Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus – poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 19, 483–491. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00191-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00191-2)
- Karagianni, A.E., Lisowski, Z.M., Hume, D.A., Scott Pirie, R., 2021. The equine mononuclear phagocyte system: The relevance of the horse as a model for understanding human innate immunity. *Equine Vet J* 53, 231–249. <https://doi.org/10.1111/evj.13341>
- Kellar, K.L., Douglass, J.P., 2003. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines. *Journal of Immunological Methods* 279, 277–285. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00248-5)
- Kinsley, R., Pronost, S., De Bock, M., Temperton, N., Daly, J.M., Paillot, R., Scott, S., 2020. Evaluation of a Pseudotyped Virus Neutralisation Test for the Measurement of Equine Influenza Virus-Neutralising Antibody Responses Induced by Vaccination and Infection. *Vaccines (Basel)* 8, 466. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030466>
- Klouth, E., Zablotzki, Y., Goehring, L.S., 2021. Apparent Breed Predilection for Equid

- Herpesvirus-1-Associated Myeloencephalopathy (EHM) in a Multiple-Breed Herd. *Pathogens* 10, 537. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050537>
- Koch, T.G., Betts, D.H., 2007. Stem cell therapy for joint problems using the horse as a clinically relevant animal model. *Expert Opin Biol Ther* 7, 1621–1626. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.11.1621>
- Kolyvushko, O., Kelch, M.A., Osterrieder, N., Azab, W., 2020. Equine Alphaherpesviruses Require Activation of the Small GTPases Rac1 and Cdc42 for Intracellular Transport. *Microorganisms* 8, 1013. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071013>
- Kondo, T., McGregor, M., Chu, Q., Chen, D., Horimoto, T., Kawaoka, Y., 2004. A protective effect of epidermal powder immunization in a mouse model of equine herpesvirus-1 infection. *Virology* 318, 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.031>
- Kotenko, S.V., 2011. IFN-λs. *Curr Opin Immunol* 23, 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.007>
- Kurtz, B.M., Singletary, L.B., Kelly, S.D., Frampton, A.R., 2010. Equus caballus Major Histocompatibility Complex Class I Is an Entry Receptor for Equine Herpesvirus Type 1. *Journal of Virology* 84, 9027–9034. <https://doi.org/10.1128/JVI.00287-10>
- Kydd, J.H., Hannant, D., Mumford, J.A., 1996. Residence and recruitment of leucocytes to the equine lung after EHV-1 infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 52, 15–26. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05533-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05533-9)
- Kydd, J.H., Smith, K.C., Hannant, D., Livesay, G.J., Mumford, J.A., 1994a. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet J* 26, 470–473. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04052.x>
- Kydd, J.H., Smith, K.C., Hannant, D., Livesay, G.J., Mumford, J.A., 1994b. Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Vet J* 26, 466–469. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04051.x>
- Kydd, J.H., Townsend, H.G.G., Hannant, D., 2006. The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.005>
- Kydd, J.H., Watrang, E., Hannant, D., 2003. Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.08.004>
- Kyriakis, S.C., Tzika, E.D., Lyras, D.N., Tsinas, A.C., Saoulidis, K., Sarris, K., 1998. Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. *Res Vet Sci* 64, 187–190. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(98\)90122-9](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(98)90122-9)
- Landolt, G.A., 2014. Equine Influenza Virus. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 30, 507–522. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.003>
- Lang, A., de Vries, M., Feineis, S., Müller, E., Osterrieder, N., Damiani, A.M., 2013. Development of a peptide ELISA for discrimination between serological responses to equine herpesvirus type 1 and 4. *Journal of Virological Methods* 193, 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.044>
- Larson, E.M., Wagner, B., 2021. Viral infection and allergy – What equine immune responses can tell us about disease severity and protection. *Molecular Immunology* 135, 329–341. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.04.013>
- Laval, K., Favoreel, H.W., Nauwynck, H.J., 2015a. Equine herpesvirus type 1 replication is delayed in CD172a+ monocytic cells and controlled by histone deacetylases. *J Gen Virol* 96, 118–130. <https://doi.org/10.1099/vir.0.067363-0>
- Laval, K., Favoreel, H.W., Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Nauwynck, H.J., 2015b. Equine

- Herpesvirus Type 1 Enhances Viral Replication in CD172a+ Monocytic Cells upon Adhesion to Endothelial Cells. *J Virol* 89, 10912–10923. <https://doi.org/10.1128/JVI.01589-15>
- Laval, K., Favoreel, H.W., Van Cleemput, J., Poelaert, K.C.K., Brown, I.K., Verhasselt, B., Nauwynck, H.J., 2016. Entry of equid herpesvirus 1 into CD172a+ monocytic cells. *J Gen Virol* 97, 733–746. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000375>
- Laval, K., Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Zhao, J., Vandekerckhove, A.P., Gryspeerdt, A.C., Garré, B., Van der Meulen, K., Baghi, H.B., Dubale, H.N., Zarak, I., Van Crombrugge, E., Nauwynck, H.J., 2021. The Pathogenesis and Immune Evasive Mechanisms of Equine Herpesvirus Type 1. *Front Microbiol* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662686>
- Laval, K., Van Cleemput, J., Poelaert, K.C., Brown, I.K., Nauwynck, H.J., 2017. Replication of neurovirulent equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in CD172a+ monocytic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 50, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.006>
- Lecollinet, S., Pronost, S., Coulpier, M., Beck, C., Gonzalez, G., Leblond, A., Tritz, P., 2020. Viral Equine Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? *Viruses* 12, 23. <https://doi.org/10.3390/v12010023>
- Legrand, L.J., Pitel, P.-H.Y., Marcillaud-Pitel, C.J., Cullinane, A.A., Couroucé, A.M., Fortier, G.D., Freymuth, F.L., Pronost, S.L., 2013. Surveillance of equine influenza viruses through the RESPE network in France from November 2005 to October 2010. *Equine Veterinary Journal* 45, 776–783. <https://doi.org/10.1111/evj.12100>
- Lester, S.N., Li, K., 2014. Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity. *Journal of Molecular Biology, Antiviral Innate Immunity (Part II)* 426, 1246–1264. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.024>
- Lewis, M.J., Wagner, B., Woof, J.M., 2008. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. *Molecular Immunology, Special section: Theories and Modelling of T Cell Behaviour* 45, 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.158>
- Little, P.B., Thorsen, J., Moran, K., 1974. Virus involvement in equine paresis. *Vet Rec* 95, 575. <https://doi.org/10.1136/vr.95.25-26.575-a>
- Lucas-Hourani, M., Dauzonne, D., Jorda, P., Cousin, G., Lupan, A., Helynck, O., Caignard, G., Janvier, G., André-Leroux, G., Khiar, S., Escriou, N., Desprès, P., Jacob, Y., Munier-Lehmann, H., Tangy, F., Vidalain, P.-O., 2013. Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity. *PLoS Pathog* 9, e1003678. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003678>
- Lunn, D.P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M.J.B.F., Horohov, D.W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H.G.G., 2009. Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med* 23, 450–461. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x>
- Lunn, D.P., Rush, B.R., 2004. Immunomodulation: Principles and Mechanisms. Presented at the AAEP Annual Convention, Denver, 2004.
- Lunn, D.P., Soboll, G., Schram, B.R., Quass, J., McGregor, M.W., Drape, R.J., Macklin, M.D., McCabe, D.E., Swain, W.F., Olsen, C.W., 1999. Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine* 17, 2245–2258. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00496-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00496-4)
- Machida, N., Taniguchi, T., Nakamura, T., Kiryu, K., 1997. Cardio-histopathological observations on aborted equine fetuses infected with equid herpesvirus 1 (EHV-1). *J Comp Pathol* 116, 379–385. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(97\)80054-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(97)80054-0)
- Mahmoud, H.Y.A.H., Andoh, K., Hattori, S., Terada, Y., Noguchi, K., Shimoda, H., Maeda, K., 2013. Characterization of Glycoproteins in Equine Herpesvirus-1. *J Vet Med Sci* 75, 1317–1321. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0168>

- Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235-254. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(65\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0019-2791(65)90004-2)
- Manes, N.P., Nita-Lazar, A., 2021. Molecular Mechanisms of the Toll-Like Receptor, STING, MAVS, Inflammasome, and Interferon Pathways. *mSystems* 6, e00336-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00336-21>
- Manuguerra, J.C., Zientara, S., Sailleau, C., Rousseaux, C., Gicquel, B., Rijks, I., Van der Werf, S., 2000. Evidence for evolutionary stasis and genetic drift by genetic analysis of two equine influenza H3 viruses isolated in France. *Vet Microbiol* 74, 59-70. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00166-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00166-8)
- Marenzoni, M.L., De Waure, C., Timoney, P.J., 2022. Efficacy of vaccination against equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled challenge trials. *Equine Vet J*. <https://doi.org/10.1111/evj.13870>
- Marrack, P., McKee, A.S., Munks, M.W., 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 9, 287-293. <https://doi.org/10.1038/nri2510>
- Martin, E.M., Messenger, K.M., Sheats, M.K., Jones, S.L., 2017. Misoprostol Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Pro-inflammatory Cytokine Production by Equine Leukocytes. *Frontiers in Veterinary Science* 4.
- Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Eisfeld, A.J., Neumann, G., Hase, T., Ghosh, S., Shoemaker, J.E., Lopes, T.J., Watanabe, T., Watanabe, S., Fukuyama, S., Kitano, H., Kawaoka, Y., 2013. A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Systems Biology* 7, 97. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-97>
- Mayr, A., Mayr, B., 1999. A new concept in prophylaxis and therapy: paramunization by poxvirus inducers. *Pesq. Vet. Bras.* 19, 91-98. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1999000300001>
- Mazanec, M.B., Nedrud, J.G., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E., 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunology Today* 14, 430-435. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90245-G](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90245-G)
- McCown, M.F., Pekosz, A., 2006. Distinct Domains of the Influenza A Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Mediate Binding to the M1 Protein and Facilitate Infectious Virus Production. *J Virol* 80, 8178-8189. <https://doi.org/10.1128/JVI.00627-06>
- McCulloch, J., Williamson, S.A., Powis, S.J., Edington, N., 1993. The effect of EHV-1 infection upon circulating leucocyte populations in the natural equine host. *Veterinary Microbiology* 37, 147-161. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90189-E](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90189-E)
- McFarlane, D., Sellon, D.C., Gibbs, S.A., 2001. Age-related quantitative alterations in lymphocyte subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses. *Am J Vet Res* 62, 1413-1417. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1413>
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., O'Garra, A., 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15, 87-103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- Mesquita, L.P., Costa, R.C., Zanatto, D.A., Bruhn, F.R.P., Mesquita, L.L.R., Lara, M.C.C.S.H., Villalobos, E.M.C., Massoco, C.O., Mori, C.M.C., Mori, E., Maiorka, P.C., 2021. Equine herpesvirus 1 elicits a strong pro-inflammatory response in the brain of mice. *Journal of General Virology* 102, 001556. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001556>
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., Granzow, H., 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* 143, 222-234. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.03.018>
- Minke, J.M., Audonnet, J.-C., Fischer, L., 2004. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet Res* 35, 425-443. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004019>
- Minke, J.M., Fischer, L., Baudu, P., Guigal, P.M., Sindler, T., Mumford, J.A., Audonnet, J.C., 2006. Use of DNA and recombinant canarypox viral (ALVAC) vectors for equine herpes virus vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 111, 47-57.

- <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.008>
- Mohd-Azmi, M.L., Field, H.-J., Rixon, F., McLauchlan, J., 2002a. Protective Immune Responses Induced by Non-infectious L-particles of Equine Herpesvirus Type-1: Implication of Cellular Immunity. *Journal of Microbiology* 40, 11–19.
- Mohd-Azmi, M.L., Gibson, J., Rixon, F., McLauchlan, J., Field, H.-J., 2002b. Protection of Specific-pathogen-free (Spf) Foals from Severe Equine Herpesvirus Type-1 (Ehv-1) Infection Following Immunization with Non-infectious L-particles. *Journal of Microbiology* 40, 183–192.
- Moore, S.E., Strang, C.L., Marr, C.M., Newton, R., Cameron, I.J., 2019. Management of an outbreak of multiple equine herpesvirus type 1 abortions among vaccinated mares on a large UK Thoroughbred stud farm. *Veterinary Record Case Reports* 7, e000799. <https://doi.org/10.1136/vetreccr-2018-000799>
- Morawska, L., Johnson, G.R., Ristovski, Z.D., Hargreaves, M., Mengersen, K., Corbett, S., Chao, C.Y.H., Li, Y., Katoshevski, D., 2009. Size distribution and sites of origin of droplets expelled from the human respiratory tract during expiratory activities. *Journal of Aerosol Science* 40, 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2008.11.002>
- Morley, P.S., Hanson, L.K., Bogdan, J.R., Townsend, H.G.G., Appleton, J.A., Haines, D.M., 1995. The relationship between single radial hemolysis, hemagglutination inhibition, and virus neutralization assays used to detect antibodies specific for equine influenza viruses. *Veterinary Microbiology* 45, 81–92. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00105-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00105-6)
- Moss, B., 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11341–11348.
- Muirhead, T.L., McClure, J.T., Wichtel, J.J., Stryhn, H., Frederick Markham, R.J., McFarlane, D., Lunn, D.P., 2008. The effect of age on serum antibody titers after rabies and influenza vaccination in healthy horses. *J Vet Intern Med* 22, 654–661. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0091.x>
- Muirhead, T.L., McClure, J.T., Wichtel, J.J., Stryhn, H., Markham, R.J.F., McFarlane, D., Lunn, D.P., 2010. The Effect of Age on the Immune Response of Horses to Vaccination. *Journal of Comparative Pathology, Proceedings of the Second Merial European Comparative Vaccinology Symposium: “Vaccination Challenges in Ageing Populations”* 142, S85–S90. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.10.010>
- Mumford, J.A., Jessett, D., Dunleavy, U., Wood, J., Hannant, D., Sundquist, B., Cook, R.F., 1994a. Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine* 12, 857–863. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90297-6](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90297-6)
- Mumford, J.A., Jessett, D.M., Rollinson, E.A., Hannant, D., Draper, M.E., 1994b. Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Vet Rec* 134, 158–162. <https://doi.org/10.1136/vr.134.7.158>
- Mumford, J.A., Wilson, H., Hannant, D., Jessett, D.M., 1994c. Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. *Epidemiol Infect* 112, 421–437.
- Myers, C., Wilson, W.D., 2006. Equine Influenza Virus. *Clinical Techniques in Equine Practice, Infectious Respiratory Diseases* 5, 187–196. <https://doi.org/10.1053/j.ctep.2006.03.013>
- Nelson, K.M., Schram, B.R., McGregor, M.W., Sheoran, A.S., Olsen, C.W., Lunn, D.P., 1998. Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 16, 1306–1313. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00009-7)
- Neubauer, A., Osterrieder, N., 2004. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress. *Virology* 329, 18–32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.034>
- Newcomb, W.W., Homa, F.L., Thomsen, D.R., Booy, F.P., Trus, B.L., Steven, A.C., Spencer,

- J.V., Brown, J.C., 1996. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J Mol Biol* 263, 432–446. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0587>
- Newton, J.R., Daly, J.M., Spencer, L., Mumford, J.A., 2006. Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. *Veterinary Record* 158, 185–192. <https://doi.org/10.1136/vr.158.6.185>
- Newton, J.R., Townsend, H.G.G., Wood, J.L.N., Sinclair, R., Hannant, D., Mumford, J.A., 2000. Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8). *Equine Veterinary Journal* 32, 65–74. <https://doi.org/10.2746/042516400777612116>
- Noton, S.L., Medcalf, E., Fisher, D., Mullin, A.E., Elton, D., Digard, P., 2007. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *Journal of General Virology* 88, 2280–2290. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82809-0>
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P., Davis-Poynter, N., 2006. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *Journal of Virology* 80, 4047–4060. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006>
- OIE - World Organisation for Animal Health, 2019. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals., Equine influenza (infection with equine influenza virus).
- OIE - World Organisation for Animal Health, 2019. Expert surveillance panel on equine influenza vaccine composition, OIE, Paris, 4 April 2019, 2019. . O.I.E (World Organisation for Animal Health). <https://doi.org/10.20506/bull.2019.2.3013>
- Oladunni, F.S., Oseni, S.O., Martinez-Sobrido, L., Chambers, T.M., 2021. Equine Influenza Virus and Vaccines. *Viruses* 13, 1657. <https://doi.org/10.3390/v13081657>
- Olsen, C.W., McGregor, M.W., Dybdahl-Sissoko, N., Schram, B.R., Nelson, K.M., Paul Lunn, D., Macklin, M.D., Swain, W.F., Hinshaw, V.S., 1997. Immunogenicity and efficacy of baculovirus-expressed and DNA-based equine influenza virus hemagglutinin vaccines in mice. *Vaccine* 15, 1149–1156. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00309-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00309-X)
- Ons, E., Van Brussel, L., Lane, S., King, V., Cullinane, A., Kenna, R., Lyons, P., Hammond, T.-A., Salt, J., Raue, R., 2014. Efficacy of a Parapoxvirus ovis-based immunomodulator against equine herpesvirus type 1 and *Streptococcus equi equi* infections in horses. *Vet. Microbiol.* 173, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.015>
- Ortega, C., Ruiz, I., De Blas, I., Muzquiz, J.L., Fernandez, A., Alonso, J.L., 1996. Furunculosis control using a paraimmunization stimulant (Baypamun) in rainbow trout. *Vet Res* 27, 561–568.
- Osterlund, P.I., Pietilä, T.E., Veckman, V., Kotenko, S.V., Julkunen, I., 2007. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol* 179, 3434–3442. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3434>
- Osterrieder, N., 1999. Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Res* 59, 165–177. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(98\)00134-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(98)00134-8)
- Packiarajah, P., Walker, C., Gilkerson, J., Whalley, J.M., Love, D.N., 1998. Immune responses and protective efficacy of recombinant baculovirus-expressed glycoproteins of equine herpesvirus 1 (EHV-1) gB, gC and gD alone or in combinations in BALB/c mice. *Vet Microbiol* 61, 261–278. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00189-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00189-8)
- Paillet, R., 2014. A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination.

- Vaccines (Basel) 2, 797–831. <https://doi.org/10.3390/vaccines2040797>
- Paillot, R., Case, R., Ross, J., Newton, R., Nugent, J., 2008. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *The Open Veterinary Science Journal* 2: 68-91. <https://doi.org/10.2174/1874318808002010068>
- Paillot, R., Daly, J.M., Luce, R., Montesso, F., Davis-Poynter, N., Hannant, D., Kydd, J.H., 2007. Frequency and phenotype of EHV-1 specific, IFN- γ synthesising lymphocytes in ponies: The effects of age, pregnancy and infection. *Developmental & Comparative Immunology* 31, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.05.010>
- Paillot, R., El-Hage, C.M., 2016. The Use of a Recombinant Canarypox-Based Equine Influenza Vaccine during the 2007 Australian Outbreak: A Systematic Review and Summary. *Pathogens* 5, 42. <https://doi.org/10.3390/pathogens5020042>
- Paillot, R., Hannant, D., Kydd, J.H., Daly, J.M., 2006a. Vaccination against equine influenza: quid novi? *Vaccine* 24, 4047–4061. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.030>
- Paillot, R., Fraser, S., Prowse-Davis, L., Rash, N., Montesso, F., Slotmans, N., Thomas, A., Besognet, B., Meinert, T., Ons, E., Salt, J., 2015. ISCOM-based equine influenza vaccine: Duration of immunity and randomised clinical trials to assess an accelerated schedule of immunisation and efficacy. *Trials in Vaccinology* 4, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.trivac.2015.07.002>
- Paillot, R., Garrett, D., Lopez-Alvarez, M.R., Birand, I., Montesso, F., Horspool, L., 2018. The Immunity Gap Challenge: Protection against a Recent Florida Clade 2 Equine Influenza Strain. *Vaccines (Basel)* 6, 38. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030038>
- Paillot, R., Grimmett, H., Elton, D., Daly, J.M., 2008. Protection, systemic IFN γ , and antibody responses induced by an ISCOM-based vaccine against a recent equine influenza virus in its natural host. *Vet Res* 39, 21. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007062>
- Paillot, R., Ellis, S.A., Daly, J.M., Audonnet, J.C., Minke, J.M., Davis-Poynter, N., Hannant, D., Kydd, J.H., 2006b. Characterisation of CTL and IFN- γ synthesis in ponies following vaccination with a NYVAC-based construct coding for EHV-1 immediate early gene, followed by challenge infection. *Vaccine* 24, 1490–1500. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.10.019>
- Paillot, R., Marcillaud Pitel, C., D'Ablon, X., Pronost, S., 2017. Equine Vaccines: How, When and Why? Report of the Vaccinology Session, French Equine Veterinarians Association, 2016, Reims. *Vaccines* 5, 46. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040046>
- Paillot, R., Prowse, L., 2012. ISCOM-matrix-based equine influenza (EIV) vaccine stimulates cell-mediated immunity in the horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145, 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.11.019>
- Paillot, R., Prowse, L., Montesso, F., Huang, C.M., Barnes, H., Escala, J., 2013. Whole inactivated equine influenza vaccine: Efficacy against a representative clade 2 equine influenza virus, IFN γ synthesis and duration of humoral immunity. *Vet. Microbiol.* 162, 396–407. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.019>
- Paillot, R., Sutton, G., Thieulent, C., Marcillaud-Pitel, C., Pronost, S., 2020. New EHV-1 variant identified. *Vet Rec* 186, 573. <https://doi.org/10.1136/vr.m1441>
- Pan, T., Khare, S., Ackah, F., Huang, B., Zhang, W., Gabos, S., Jin, C., Stampfl, M., 2013. In vitro cytotoxicity assessment based on KC50 with real-time cell analyzer (RTCA) assay. *Computational Biology and Chemistry* 47, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2013.08.008>
- Paoletti, E., 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11349–11353. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11349>
- Pasdeloup, D., Blondel, D., Isidro, A.L., Rixon, F.J., 2009. Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J Virol* 83, 6610–6623.

- <https://doi.org/10.1128/JVI.02655-08>
- Patel, J.R., Bateman, H., Williams, J., Didlick, S., 2003. Derivation and characterisation of a live equid herpes virus-1 (EHV-1) vaccine to protect against abortion and respiratory disease due to EHV-1. *Veterinary Microbiology* 91, 23–39. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00259-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00259-6)
- Patel, J.R., Didlick, S., Bateman, H., 2004. Efficacy of a live equine herpesvirus-1 (EHV-1) strain C147 vaccine in foals with maternally-derived antibody: protection against EHV-1 infection. *Equine Vet J* 36, 447–451. <https://doi.org/10.2746/0425164044868332>
- Patel, J.R., Edington, N., Mumford, J.A., 1982. Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals. *Arch Virol* 74, 41–51. <https://doi.org/10.1007/BF01320781>
- Patel, J.R., Heldens, J., 2005. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *The Veterinary Journal* 170, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.018>
- Paterson, D., Fodor, E., 2012. Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLOS Pathogens* 8, e1003019. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003019>
- Paulsen, D., Urban, A., Knorr, A., Hirth-Dietrich, C., Siegling, A., Volk, H.-D., Mercer, A.A., Limmer, A., Schumak, B., Knolle, P., Ruebsamen-Schaeff, H., Weber, O., 2013. Inactivated ORF virus shows antifibrotic activity and inhibits human hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) replication in preclinical models. *PLoS One* 8, e74605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074605>
- Pavan, T.R., Nied, C.O., Noro, M., Anziliero, D., Frandoloso, R., Kreutz, L.C., 2016. Inactivated Parapoxvirus ovis as inducer of immunity in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *An Acad Bras Cienc* 88, 1451–1457. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150590>
- Pavulraj, S., Bergmann, T., Trombetta, C.M., Marchi, S., Montomoli, E., Alami, S.S.E., Ragni-Alunni, R., Osterrieder, N., Azab, W., 2021. Immunogenicity of Calvenza-03 EIV/EHV® Vaccine in Horses: Comparative In Vivo Study. *Vaccines (Basel)* 9, 166. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020166>
- Perglione, C.O., Gildea, S., Rimondi, A., Miño, S., Vissani, A., Carossino, M., Cullinane, A., Barrandeguy, M., 2016. Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in South America in 2012. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 10, 37–46. <https://doi.org/10.1111/irv.12349>
- Perkins, G., Babasyan, S., Stout, A.E., Freer, H., Rollins, A., Wimer, C.L., Wagner, B., 2019. Intranasal IgG4/7 antibody responses protect horses against equid herpesvirus-1 (EHV-1) infection including nasal virus shedding and cell-associated viremia. *Virology* 531, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.03.014>
- Perkins, G.A., 2016. Chronic Inflammatory Bowel Disease, in: *Equine Clinical Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 113–120. <https://doi.org/10.1002/9781119086512.ch14>
- Perkins, G.A., Wagner, B., 2015. The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Vet. J.* 47, 267–274. <https://doi.org/10.1111/evj.12387>
- Plotkin, S.A., Cadoz, M., Meignier, B., Méric, C., Leroy, O., Excler, J.L., Tartaglia, J., Paoletti, E., Gonczol, E., Chappuis, G., 1995. The safety and use of canarypox vectored vaccines. *Dev Biol Stand* 84, 165–170.
- Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Laval, K., Favoreel, H.W., Couck, L., Van den Broeck, W., Azab, W., Nauwynck, H.J., 2019. Equine Herpesvirus 1 Bridles T Lymphocytes To Reach Its Target Organs. *J Virol* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.02098-18>
- Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Laval, K., Favoreel, H.W., Soboll Hussey, G., Maes, R.K., Nauwynck, H.J., 2018. Abortigenic but Not Neurotropic Equine Herpes Virus 1 Modulates the Interferon Antiviral Defense. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8.

- Powell, D.G., 1988. *Equine Infectious Diseases V: Proceedings of the Fifth International Conference*. University Press of Kentucky.
- Prabhakar, U., Eirikis, E., Reddy, M., Silvestro, E., Spitz, S., Pendley, C., Davis, H.M., Miller, B.E., 2004. Validation and comparative analysis of a multiplexed assay for the simultaneous quantitative measurement of Th1/Th2 cytokines in human serum and human peripheral blood mononuclear cell culture supernatants. *Journal of Immunological Methods* 291, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.018>
- Pronost, S., Léon, A., Legrand, L., Fortier, C., Miszczak, F., Freymuth, F., Fortier, G., 2010. Neuropathogenic and non-neuropathogenic variants of equine herpesvirus 1 in France. *Veterinary Microbiology* 145, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.031>
- Pushko, P., Lukashevich, I.S., Weaver, S.C., Tretyakova, I., 2016. DNA-launched live-attenuated vaccines for biodefense applications. *Expert Rev Vaccines* 15, 1223–1234. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1175943>
- Pusterla, N., Barnum, S., Lawton, K., Wademan, C., Corbin, R., Hodzic, E., 2023. Investigation of the EHV-1 Genotype (N752, D752, and H752) in Swabs Collected From Equids With Respiratory and Neurological Disease and Abortion From the United States (2019–2022). *Journal of Equine Veterinary Science* 123, 104244. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104244>
- Pusterla, N., Barnum, S., Miller, J., Varnell, S., Dallap-Schaer, B., Aceto, H., Simeone, A., 2021. Investigation of an EHV-1 Outbreak in the United States Caused by a New H752 Genotype. *Pathogens* 10, 747. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060747>
- Pusterla, N., Estell, K., Mapes, S., Wademan, C., 2014. Detection of clade 2 equine influenza virus in an adult horse recently imported to the USA. *Equine Veterinary Education* 26, 453–455. <https://doi.org/10.1111/eve.12159>
- Pusterla, N., Hussey, G.S., 2014. Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. *Veterinary Clinics: Equine Practice* 30, 489–506. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.006>
- Pusterla, N., Hussey, G.S., Goehring, L.S., 2022. Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 38, 339–362. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2022.05.006>
- Pusterla, N., Mapes, S., Akana, N., Barnett, C., MacKenzie, C., Gaughan, E., Craig, B., Chappell, D., Vaala, W., 2016. Prevalence factors associated with equine herpesvirus type 1 infection in equids with upper respiratory tract infection and/or acute onset of neurological signs from 2008 to 2014. *Vet Rec* 178, 70. <https://doi.org/10.1136/vr.103424>
- Pusterla, N., Wilson, W.D., Conrad, P.A., Barr, B.C., Ferraro, G.L., Daft, B.M., Leutenegger, C.M., 2006. Cytokine gene signatures in neural tissue of horses with equine protozoal myeloencephalitis or equine herpes type 1 myeloencephalopathy. *Vet Rec* 159, 341–346. <https://doi.org/10.1136/vr.159.11.341>
- Quinlivan, M., Nelly, M., Prendergast, M., Breathnach, C., Horohov, D., Arkins, S., Chiang, Y.-W., Chu, H.-J., Ng, T., Cullinane, A., 2007. Pro-inflammatory and antiviral cytokine expression in vaccinated and unvaccinated horses exposed to equine influenza virus. *Vaccine* 25, 7056–7064. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.059>
- Quinlivan, M., Zamarin, D., García-Sastre, A., Cullinane, A., Chambers, T., Palese, P., 2005. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J Virol* 79, 8431–8439. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8431-8439.2005>
- Rappocciolo, G., Birch, J., Ellis, S.A., 2003. Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1. *Journal of General Virology* 84, 293–300. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18612-0>
- Reed, S.M., Toribio, R.E., 2004. Equine herpesvirus 1 and 4. *Vet Clin North Am Equine Pract* 20, 631–642. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2004.09.001>

- Reeve-Johnson, L., 2007. Equine influenza in Australia. *Vet Rec* 161, 635. <https://doi.org/10.1136/vr.161.18.635>
- Rodriguez, L., Blanco-Lobo, P., Reilly, E.C., Maehigashi, T., Nogales, A., Smith, A., Topham, D.J., Dewhurst, S., Kim, B., Martínez-Sobrido, L., 2019. Comparative Study of the Temperature Sensitive, Cold Adapted and Attenuated Mutations Present in the Master Donor Viruses of the Two Commercial Human Live Attenuated Influenza Vaccines. *Viruses* 11, 928. <https://doi.org/10.3390/v11100928>
- Rodriguez, L., Reedy, S., Nogales, A., Murcia, P.R., Chambers, T.M., Martinez-Sobrido, L., 2018. Development of a novel equine influenza virus live-attenuated vaccine. *Virology* 516, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.005>
- Roizmann, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert, M.J., 1992. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 123, 425–449. <https://doi.org/10.1007/BF01317276>
- Rooney, J.F., Wohlenberg, C., Cremer, K.J., Moss, B., Notkins, A.L., 1988. Immunization with a vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D: long-term protection and effect of revaccination. *J Virol* 62, 1530–1534.
- Rudolph, J., Osterrieder, N., 2002. Equine Herpesvirus Type 1 Devoid of gM and gp2 Is Severely Impaired in Virus Egress but Not Direct Cell-to-Cell Spread. *Virology* 293, 356–367. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1277>
- Ruitenbergh, K.M., Gilkerson, J.R., Wellington, J.E., Love, D.N., Whalley, J.M., 2001. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris* is hyperglycosylated and elicits a protective immune response in the mouse model of EHV-1 disease. *Virus Research* 79, 125–135. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00337-9)
- Ruitenbergh, K.M., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Wellington, J.E., Whalley, J.M., 2000. Equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein D DNA inoculation in horses with pre-existing EHV-1/EHV-4 antibody. *Vet Microbiol* 76, 117–127. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00237-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00237-6)
- Ruitenbergh, K.M., Walker, C., Wellington, J.E., Love, D.N., Whalley, J.M., 1999a. DNA-mediated immunization with glycoprotein D of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in a murine model of EHV-1 respiratory infection. *Vaccine* 17, 237–244. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00192-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00192-3)
- Ruitenbergh, K.M., Walker, C., Wellington, J.E., Love, D.N., Whalley, J.M., 1999b. Potential of DNA-mediated vaccination for equine herpesvirus 1. *Veterinary Microbiology* 68, 35–48. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00059-0)
- Rush, B.R., Flaminio, M.J., 2000. Immunomodulation in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 16, 183–197, viii. [https://doi.org/10.1016/s0749-0739\(17\)30126-8](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30126-8)
- Russell, T., Bleasdale, B., Hollinshead, M., Elliott, G., 2018. Qualitative Differences in Capsidless L-Particles Released as a By-Product of Bovine Herpesvirus 1 and Herpes Simplex Virus 1 Infections. *Journal of Virology* 92, e01259-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01259-18>
- Ryan, C., Giguère, S., Fultz, L., Long, M.T., Crawford, P.C., 2010. Effects of two commercially available immunostimulants on leukocyte function of foals following ex vivo exposure to *Rhodococcus equi*. *Vet Immunol Immunopathol* 138, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.07.027>
- Sabine, M., Robertson, G.R., Whalley, J.M., 1981. Differentiation of sub-types of equine herpesvirus I by restriction endonuclease analysis. *Aust Vet J* 57, 148–149. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1981.tb00495.x>
- Sakai, T., Nishimura, S.I., Naito, T., Saito, M., 2017. Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. *Sci Rep* 7, 45043. <https://doi.org/10.1038/srep45043>

- Salco, R., Bowers, J., Hernandez, V., Barnum, S., Pusterla, N., 2020. Prevention of respiratory infections with alpha- and gamma-herpesviruses in weanling foals by using a modified live intra-nasal equine influenza vaccine. *Can Vet J* 61, 517–520.
- Salk, J.E., 1944. A Simplified Procedure for Titrating Hemagglutinating Capacity of Influenza-Virus and the Corresponding Antibody. *The Journal of Immunology* 49, 87–98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.49.2.87>
- Samoilowa, S., Giessler, K.S., Torres, C.E.M., Hussey, G.S., Allum, A., Fux, R., Jerke, C., Kiupel, M., Matiasek, K., Sledge, D.G., Goehring, L.S., 2021. Equid herpesvirus-1 Distribution in Equine Lymphoid and Neural Tissues 70 Days Post Infection. *Pathogens* 10, 707. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060707>
- Sarkar, I., Garg, R., Van Drunen Littel-van den Hurk, S., 2019. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. *Expert Rev Vaccines* 18, 505–521. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1604231>
- Sasaki, M., Hasebe, R., Makino, Y., Suzuki, T., Fukushi, H., Okamoto, M., Matsuda, K., Taniyama, H., Sawa, H., Kimura, T., 2011. Equine major histocompatibility complex class I molecules act as entry receptors that bind to equine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Genes to Cells* 16, 343–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01491.x>
- Schild, G.C., Pereira, M.S., Chakraverty, P., 1975. Single-radial-hemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. Applications for diagnosis and seroepidemiologic surveillance of influenza. *Bull World Health Organ* 52, 43–50.
- Schnabel, C.L., Babasyan, S., Rollins, A., Freer, H., Wimer, C.L., Perkins, G.A., Raza, F., Osterrieder, N., Wagner, B., 2019. An Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Ab4 Open Reading Frame 2 Deletion Mutant Provides Immunity and Protection from EHV-1 Infection and Disease. *J Virol* 93, e01011-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01011-19>
- Schnabel, C.L., Wimer, C.L., Perkins, G., Babasyan, S., Freer, H., Watts, C., Rollins, A., Osterrieder, N., Wagner, B., 2018. Deletion of the ORF2 gene of the neuropathogenic equine herpesvirus type 1 strain Ab4 reduces virulence while maintaining strong immunogenicity. *BMC Veterinary Research* 14, 245. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1563-4>
- Schrenzel, M.D., Tucker, T.A., Donovan, T.A., Busch, M.D.M., Wise, A.G., Maes, R.K., Kiupel, M., 2008. New Hosts for Equine Herpesvirus 9. *Emerg Infect Dis* 14, 1616–1619. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080703>
- Schulman, M.L., Kass, P.H., Becker, A., Van der Merwe, B., 2013. A predictive model for reproductive performance following abortion in Thoroughbred mares. *Vet Rec* 172, 44. <https://doi.org/10.1136/vr.100670>
- Schütze, N., Raue, R., Büttner, M., Alber, G., 2009. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet. Microbiol.* 137, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.035>
- Schütze, N., Raue, R., Büttner, M., Köhler, G., McInnes, C.J., Alber, G., 2010. Specific antibodies induced by inactivated parapoxvirus ovis potentially enhance oxidative burst in canine blood polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet. Microbiol.* 140, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.027>
- Scott, S., Molesti, E., Temperton, N., Ferrara, F., Böttcher-Friebertshäuser, E., Daly, J., 2012. The use of equine influenza pseudotypes for serological screening. *J Mol Genet Med* 6, 304–308.
- Scott, S.D., Kinsley, R., Temperton, N., Daly, J.M., 2016. The Optimisation of Pseudotyped Viruses for the Characterisation of Immune Responses to Equine Influenza Virus. *Pathogens* 5, 68. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040068>
- Seltenhammer, M.H., Heere-Ress, E., Brandt, S., Druml, T., Jansen, B., Pehamberger, H., Niebauer, G.W., 2004. Comparative histopathology of grey-horse-melanoma and human malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 17, 674–681.

- <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00192.x>
- Siegemund, S., Hartl, A., von Buttlar, H., Dautel, F., Raue, R., Freudenberg, M.A., Fejer, G., Büttner, M., Köhler, G., Kirschning, C.J., Sparwasser, T., Alber, G., 2009. Conventional Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Contribute to Toll-Like Receptor-Independent Production of Alpha/Beta Interferon in Response to Inactivated Parapoxvirus Ovis. *J Virol* 83, 9411-9422. <https://doi.org/10.1128/JVI.02362-08>
- Sjölander, A., Cox, J.C., Barr, I.G., 1998. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *Journal of Leukocyte Biology* 64, 713-723. <https://doi.org/10.1002/jlb.64.6.713>
- Slater, J., 2014. Chapter 14 - Equine Herpesviruses, in: Sellon, D.C., Long, M.T. (Eds.), *Equine Infectious Diseases (Second Edition)*. W.B. Saunders, St. Louis, pp. 151-168.e8. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0891-8.00014-2>
- Slater, J.D., Borchers, K., Thackray, A.M., Field, H.J., 1994. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J Gen Virol* 75 (Pt 8), 2007-2016. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-8-2007>
- Slater, J.D., Gibson, J.S., Barnett, K.C., Field, H.J., 1992. Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Vet Rec* 131, 237-239. <https://doi.org/10.1136/vr.131.11.237-a>
- Slater, J.D., Gibson, J.S., Field, H.J., 1993. Pathogenicity of a Thymidine Kinase-Deficient Mutant of Equine Herpesvirus 1 in Mice and Specific Pathogen-Free Foals. *Journal of General Virology* 74, 819-828. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-5-819>
- Smith, D.J., Iqbal, J., Purewal, A., Hamblin, A.S., Edington, N., 1998. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5+/CD8+ leukocytes indirectly by IL-2 or chorionic gonadotrophin. *J Gen Virol* 79 (Pt 12), 2997-3004. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-2997>
- Smith, K.C., Mumford, J.A., Lakhani, K., 1996. A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. *J Comp Pathol* 114, 231-247. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(96\)80045-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80045-4)
- Smith, R.H., Caughman, G.B., O'Callaghan, D.J., 1992. Characterization of the regulatory functions of the equine herpesvirus 1 immediate-early gene product. *Journal of Virology* 66, 936-945. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.2.936-945.1992>
- Soboll, G., Horohov, D.W., Aldridge, B.M., Olsen, C.W., McGregor, M.W., Drape, R.J., Macklin, M.D., Swain, W.F., Lunn, D.P., 2003. Regional antibody and cellular immune responses to equine influenza virus infection, and particle mediated DNA vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 94, 47-62. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00060-6)
- Soboll, G., Hussey, S.B., Minke, J.M., Landolt, G.A., Hunter, J.S., Jagannatha, S., Lunn, D.P., 2010. Onset and duration of immunity to equine influenza virus resulting from canarypox-vectored (ALVAC®) vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.11.007>
- Soboll, G., Hussey, S.B., Whalley, J.M., Allen, G.P., Koen, M.T., Santucci, N., Fraser, D.G., Macklin, M.D., Swain, W.F., Lunn, D.P., 2006. Antibody and cellular immune responses following DNA vaccination and EHV-1 infection of ponies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Equine Herpesvirus-1 111, 81-95. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.011>
- Soboll Hussey, G., Ashton, L.V., Quintana, A.M., Lunn, D.P., Goehring, L.S., Annis, K., Landolt, G., 2014. Innate immune responses of airway epithelial cells to infection with Equine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology* 170, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.01.018>
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., Zheng, W., 2004. Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays. *ASSAY and Drug Development Technologies* 2, 363-372. <https://doi.org/10.1089/adt.2004.2.363>

- Sovinova, O., Tumova, B., Pouska, F., Nemeč, J., 1958. Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol* 2, 52–61.
- Spann, K., Barnum, S., Pusterla, N., 2023. Investigation of the Systemic Antibody Response and Antigen Detection Following Intranasal Administration of Two Commercial Equine Herpesvirus-1 Vaccines to Adult Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 122, 104229. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104229>
- Spear, P.G., Longnecker, R., 2003. Herpesvirus Entry: an Update. *Journal of Virology* 77, 10179–10185. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10179-10185.2003>
- Spencer Clinton, J.L., Hoornweg, T.E., Tan, J., Peng, R., Schaftenaar, W., Rutten, V.P.M.G., de Haan, C.A.M., Ling, P.D., 2022. EEHV1A glycoprotein B subunit vaccine elicits humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vaccine* 40, 5131–5140. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.016>
- Sriwilaijaroen, N., Suzuki, Y., 2012. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 88, 226–249. <https://doi.org/10.2183/pjab.88.226>
- Stark, J.M., Tibbitt, C.A., Coquet, J.M., 2019. The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.011>
- Stasiak, K., Dunowska, M., Rola, J., 2020. Outbreak of equid herpesvirus 1 abortions at the Arabian stud in Poland. *BMC Veterinary Research* 16, 374. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02586-y>
- Stokes, A., Alber, D.G., Cameron, R.S., Marshall, R.N., Allen, G.P., Killington, R.A., 1996. The production of a truncated form of baculovirus expressed EHV-1 glycoprotein C and its role in protection of C3H (H-2Kk) mice against virus challenge. *Virus Res* 44, 97–109. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(96\)01339-1](https://doi.org/10.1016/0168-1702(96)01339-1)
- Stokes, A., Corteyn, A.H., Murray, P.K., 1991. Clinical signs and humoral immune response in horses following equine herpesvirus type-1 infection and their susceptibility to equine herpesvirus type-4 challenge. *Research in Veterinary Science* 51, 141–148. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90004-8)
- Strube, W., Kretzdorn, D., Grunmach, J., Bergle, R.D., Thein, P., 1989. [The effectiveness of the paramunity inducer Baypamun (PIND-ORF) for the prevention and metaphylaxis of an experimental infection with the infectious bovine rhinotracheitis virus in cattle]. *Tierarztl Prax* 17, 267–272.
- Studdert, M.J., Simpson, T., Roizman, B., 1981. Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science* 214, 562–564. <https://doi.org/10.1126/science.6270790>
- Sturgill, T.L., Giguère, S., Franklin, R.P., Cohen, N.D., Hagen, J., Kalyuzhny, A.E., 2011. Effects of inactivated parapoxvirus ovis on the cumulative incidence of pneumonia and cytokine secretion in foals on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*. *Vet Immunol Immunopathol* 140, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.12.012>
- Su, Y.-H., Moxley, M.J., Ng, A.K., Lin, J., Jordan, R., Fraser, N.W., Block, T.M., 2002. Stability and circularization of herpes simplex virus type 1 genomes in quiescently infected PC12 cultures. *J Gen Virol* 83, 2943–2950. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-2943>
- Sutton, G., 2021. Étude phylogénique de souches d’alphaherpèsvirus isolées chez les équidés français et développement d’un outil innovant pour la mesure des anticorps neutralisants après infection ou vaccination (These de doctorat). Normandie.
- Sutton, G., Garvey, M., Cullinane, A., Jourdan, M., Fortier, C., Moreau, P., Foursin, M., Gryspeerdt, A., Maisonnier, V., Marcillaud-Pitel, C., Legrand, L., Paillot, R., Pronost, S., 2019. Molecular Surveillance of EHV-1 Strains Circulating in France during and

- after the Major 2009 Outbreak in Normandy Involving Respiratory Infection, Neurological Disorder, and Abortion. *Viruses* 11, 916. <https://doi.org/10.3390/v11100916>
- Sutton, G., Normand, C., Carnet, F., Couroucé, A., Garvey, M., Castagnet, S., Fortier, C.I., Hue, E.S., Marcillaud-Pitel, C., Legrand, L., Paillot, R., Pitel, P.-H., Cullinane, A., Pronost, S., 2021. Equine Herpesvirus 1 Variant and New Marker for Epidemiologic Surveillance, Europe, 2021. *Emerging Infectious Diseases journal - CDC* 27. <https://doi.org/10.3201/eid2710.210704>
- Sutton, G., Thieulent, C., Fortier, C., Hue, E.S., Marcillaud-Pitel, C., Pléau, A., Deslis, A., Guitton, E., Paillot, R., Pronost, S., 2020. Identification of a New Equid Herpesvirus 1 DNA Polymerase (ORF30) Genotype with the Isolation of a C2254/H752 Strain in French Horses Showing no Major Impact on the Strain Behaviour. *Viruses* 12, 1160. <https://doi.org/10.3390/v12101160>
- Sutton, G.A., Viel, L., Carman, P.S., Boag, B.L., 1998. Pathogenesis and clinical signs of equine herpesvirus-1 in experimentally infected ponies in vivo. *Can J Vet Res* 62, 49-55.
- Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R.E., Chambers, T.M., Kiso, M., Ishida, H., Kawaoka, Y., 2000. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *Journal of Virology* 74, 11825-11831. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.24.11825-11831.2000>
- Tabynov, K., Kydyrbayev, Z., Ryskeldinova, S., Assanzhanova, N., Kozhamkulov, Y., Inkarbekov, D., Sansyzybay, A., 2014. Safety and immunogenicity of a novel cold-adapted modified-live equine influenza virus vaccine. *Aust Vet J* 92, 450-457. <https://doi.org/10.1111/avj.12248>
- Telford, E.A., Watson, M.S., McBride, K., Davison, A.J., 1992. The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189, 304-316. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90706-u](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90706-u)
- Temizoz, B., Kuroda, E., Ohata, K., Jounai, N., Ozasa, K., Kobiyama, K., Aoshi, T., Ishii, K.J., 2015. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN. *Eur J Immunol* 45, 1159-1169. <https://doi.org/10.1002/eji.201445132>
- Teng, Z., Kuang, X., Wang, J., Zhang, X., 2013. Real-time cell analysis--a new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *J Virol Methods* 193, 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.034>
- Tewari, D., Whalley, J.M., Love, D.N., Field, H.J., 1994. Characterization of immune responses to baculovirus-expressed equine herpesvirus type 1 glycoproteins D and H in a murine model. *J Gen Virol* 75 (Pt 7), 1735-1741. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-7-1735>
- Thieulent, C.J., Hue, E.S., Fortier, C.I., Dallemagne, P., Zientara, S., Munier-Lehmann, H., Hans, A., Fortier, G.D., Pitel, P.-H., Vidalain, P.-O., Pronost, S.L., 2019. Screening and evaluation of antiviral compounds against Equid alpha-herpesviruses using an impedance-based cellular assay. *Virology* 526, 105-116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.013>
- Thieulent, C.J., Sutton, G., Toquet, M.-P., Fremaux, S., Hue, E., Fortier, C., Pléau, A., Deslis, A., Abrioux, S., Guitton, E., Pronost, S., Paillot, R., 2022a. Oral Administration of Valganciclovir Reduces Clinical Signs, Virus Shedding and Cell-Associated Viremia in Ponies Experimentally Infected with the Equid Herpesvirus-1 C2254 Variant. *Pathogens* 11, 539. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050539>
- Tian, D., Zhang, W., He, J., Liu, Y., Song, Z., Zhou, Z., Zheng, M., Hu, Y., 2012. Novel, real-time cell analysis for measuring viral cytopathogenesis and the efficacy of neutralizing antibodies to the 2009 influenza A (H1N1) virus. *PLoS ONE* 7, e31965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031965>
- Tong, P., Duan, R., Palidan, N., Deng, H., Duan, L., Ren, M., Song, X., Jia, C., Tian, S., Yang, E., Kuang, L., Xie, J., 2022. Outbreak of neuropathogenic equid herpesvirus 1 causing abortions in Yili horses of Zhaosu, North Xinjiang, China. *BMC Veterinary Research*

- 18, 83. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03171-1>
- Tretyakova, I., Lukashevich, I.S., Glass, P., Wang, E., Weaver, S., Pushko, P., 2013. Novel vaccine against Venezuelan equine encephalitis combines advantages of DNA immunization and a live attenuated vaccine. *Vaccine* 31, 1019–1025. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.050>
- Turlej, R.K., Fiévez, L., Sandersen, C.F., Dogné, S., Kirschvink, N., Lekeux, P., Bureau, F., 2001. Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway. *Thorax* 56, 696–702. <https://doi.org/10.1136/thorax.56.9.696>
- Ura, T., Okuda, K., Shimada, M., 2014. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines* 2, 624–641. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030624>
- Van Cleemput, J., Poelaert, K.C.K., Laval, K., Impens, F., Van den Broeck, W., Gevaert, K., Nauwynck, H.J., 2019. Pollens destroy respiratory epithelial cell anchors and drive alphaherpesvirus infection. *Sci Rep* 9, 4787. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41305-y>
- Van de Walle, G.R., May, M.A., Peters, S.T., Metzger, S.M., Rosas, C.T., Osterrieder, N., 2010. A vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine elicits protective immune responses against EHV-1 and H3N8 equine influenza virus. *Vaccine* 28, 1048–1055. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.123>
- Van de Walle, G.R., Peters, S.T., VanderVen, B.C., O’Callaghan, D.J., Osterrieder, N., 2008. Equine herpesvirus 1 entry via endocytosis is facilitated by alphaV integrins and an RSD motif in glycoprotein D. *J Virol* 82, 11859–11868. <https://doi.org/10.1128/JVI.00868-08>
- Van der Meulen, K.M., Favoreel, H.W., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2006. Immune escape of equine herpesvirus 1 and other herpesviruses of veterinary importance. *Veterinary Immunology and Immunopathology, Equine Herpesvirus-1* 111, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.006>
- Van Galen, G., Leblond, A., Tritz, P., Martinelle, L., Pronost, S., Saegerman, C., 2015. A retrospective study on equine herpesvirus type-1 associated myeloencephalopathy in France (2008-2011). *Vet Microbiol* 179, 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.003>
- Van Maanen, C., 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infections: An update. *Veterinary Quarterly* 24, 57–78. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695126>
- Van Maanen, C., Bruin, G., de Boer-Luijtz, E., Smolders, G., de Boer, G.F., 1992. Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. *Vet Q* 14, 13–17. <https://doi.org/10.1080/01652176.1992.9694319>
- Van Oirschot, J.T., Bruin, G., de Boer-Luytze, E., Smolders, G., 1991. Maternal antibodies against equine influenza virus in foals and their interference with vaccination. *Zentralbl Veterinarmed B* 38, 391–396. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1991.tb00887.x>
- Vandekerckhove, A.P., Glorieux, S., Gryspeerdt, A.C., Steukers, L., Duchateau, L., Osterrieder, N., Van de Walle, G.R., Nauwynck, H.J., 2010. Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. *Journal of General Virology* 91, 2019–2028. <https://doi.org/10.1099/vir.0.019257-0>
- Vargas-Bermudez, D., Corredor F, A., Ramírez-Nieto, G., Vera A, V., Jaime C, J., Vargas-Bermudez, D., Corredor F, A., Ramírez-Nieto, G., Vera A, V., Jaime C, J., 2018. Detection of equine herpesvirus 1 and 4 and its association with latency-associated transcripts in naturally infected horses in Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 23, 6826–6837. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1371>
- Verecke, N., Carnet, F., Pronost, S., Vanschandevijl, K., Theuns, S., Nauwynck, H., 2021.

- Genome Sequences of Equine Herpesvirus 1 Strains from a European Outbreak of Neurological Disorders Linked to a Horse Gathering in Valencia, Spain, in 2021. *Microbiol Resour Announc* 10, e00333-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00333-21>
- Villacres, M.C., Behboudi, S., Nikkila, T., Lovgren-Bengtsson, K., Morein, B., 1998. Internalization of iscom-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction. *Cell Immunol* 185, 30–38. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1278>
- Virmani, N., Bera, B.C., Gulati, B.R., Karuppusamy, S., Singh, B.K., Kumar Vaid, R., Kumar, S., Kumar, R., Malik, P., Khurana, S.K., Singh, J., Manuja, A., Dedar, R., Gupta, A.K., Yadav, S.C., Chugh, P.K., Narwal, P.S., Thankur, V.L.N., Kaul, R., Kanani, A., Rautmare, S.S., Singh, R.K., 2010. Descriptive epidemiology of equine influenza in India (2008-2009): temporal and spatial trends. *Vet Ital* 46, 449–458.
- Vissani, M.A., Becerra, M.L., Olguín Perglione, C., Tordoya, M.S., Miño, S., Barrandeguy, M., 2009. Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of Equid Herpesvirus type 1 in Argentina. *Veterinary Microbiology* 139, 361–364. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.025>
- Von Buttlar, H., Siegemund, S., Büttner, M., Alber, G., 2014. Identification of Toll-like receptor 9 as parapoxvirus ovis-sensing receptor in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 9, e106188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106188>
- Waddell, G.H., Teigland, M.B., Sigel, M.M., 1963. A NEW INFLUENZA VIRUS ASSOCIATED WITH EQUINE RESPIRATORY DISEASE. *J Am Vet Med Assoc* 143, 587–590.
- Wagner, B., 2006. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Developmental & Comparative Immunology, Antibody repertoire development* 30, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.008>
- Wagner, B., Freer, H., 2009. Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.313>
- Wagner, B., Goodman, L.B., Babasyan, S., Freer, H., Torsteinsdóttir, S., Svansson, V., Björnsdóttir, S., Perkins, G.A., 2015. Antibody and cellular immune responses of naïve mares to repeated vaccination with an inactivated equine herpesvirus vaccine. *Vaccine* 33, 5588–5597. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.009>
- Wagner, B., Perkins, G., Babasyan, S., Freer, H., Keggan, A., Goodman, L.B., Glaser, A., Torsteinsdóttir, S., Svansson, V., Björnsdóttir, S., 2017. Neonatal Immunization with a Single IL-4/Antigen Dose Induces Increased Antibody Responses after Challenge Infection with Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) at Weanling Age. *PLOS ONE* 12, e0169072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169072>
- Walker, C., Ruitenber, K.M., Love, D.N., Millar Whalley, J., 2000. Immunization of BALB/c mice with DNA encoding equine herpesvirus 1 (EHV-1) glycoprotein D affords partial protection in a model of EHV-1-induced abortion. *Vet Microbiol* 76, 211–220. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00262-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00262-5)
- Wang, T., Hu, L., Wang, Y., Liu, W., Liu, G., Zhu, M., Zhang, W., Wang, C., Ren, H., Li, L., 2022. Identification of equine herpesvirus 8 in donkey abortion: a case report. *Virol J* 19, 10. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01738-2>
- Watson, J., Daniels, P., Kirkland, P., Carroll, A., Jeggo, M., 2011. The 2007 outbreak of equine influenza in Australia: lessons learned for international trade in horses. *Rev Sci Tech* 30, 87–93. <https://doi.org/10.20506/rst.30.1.2021>
- Watrang, E., Jessett, D.M., Yates, P., Fuxler, L., Hannant, D., 2003. Experimental Infection of Ponies with Equine Influenza A2 (H3N8) Virus Strains of Different Pathogenicity Elicits Varying Interferon and Interleukin-6 Responses. *Viral Immunology* 16, 57–67. <https://doi.org/10.1089/088282403763635456>
- Weber, O., Siegling, A., Friebe, A., Limmer, A., Schlapp, T., Knolle, P., Mercer, A., Schaller, H., Volk, H.-D. 2003, 2003. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity

- against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *Journal of General Virology* 84, 1843–1852. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19138-0>
- Webster, R.G., 1993. Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet J* 25, 537–538. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb03009.x>
- Weiler, E., Melletz, E.W., Breuninger-Peck, E., 1965. Facilitation of immune hemolysis by an interaction between red cell-sensitizing antibody and gamma-globulin allotype antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54, 1310–1317. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.5.1310>
- Welch, H.M., Bridges, C.G., Lyon, A.M., Griffiths, L., Edington, N., 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *J Gen Virol* 73 (Pt 2), 261–268. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-2-261>
- Whitaker-Dowling, P., Youngner, J.S., Chambers, T.M., 2001. A new intranasal, modified-live virus vaccine for equine H3N8 influenza. *International Congress Series* 1219, 961–964. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(01\)00370-3](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(01)00370-3)
- Whitwell, K.E., Blunden, A.S., 1992. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection. *Equine Vet J* 24, 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02771.x>
- Wilson, M.E., Holz, C.L., Kopec, A.K., Dau, J.J., Luyendyk, J.P., Soboll Hussey, G., 2019. Coagulation parameters following equine herpesvirus type 1 infection in horses. *Equine Vet J* 51, 102–107. <https://doi.org/10.1111/evj.12843>
- Wilson, W.D., 1997. Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 13, 53–72. [https://doi.org/10.1016/s0749-0739\(17\)30255-9](https://doi.org/10.1016/s0749-0739(17)30255-9)
- Wilson, W.D., Mihalyi, J.E., Hussey, S., Lunn, D.P., 2001. Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J* 33, 644–650. <https://doi.org/10.2746/042516401776249435>
- Wilsterman, S., Soboll-Hussey, G., Lunn, D.P., Ashton, L.V., Callan, R.J., Hussey, S.B., Rao, S., Goehring, L.S., 2011. Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet Microbiol* 149, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.004>
- Wimer, C.L., Schnabel, C.L., Perkins, G., Babasyan, S., Freer, H., Stout, A.E., Rollins, A., Osterrieder, N., Goodman, L.B., Glaser, A., Wagner, B., 2018. The deletion of the ORF1 and ORF71 genes reduces virulence of the neuropathogenic EHV-1 strain Ab4 without compromising host immunity in horses. *PLoS One* 13, e0206679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206679>
- Winnicka, A., Klucinski, W., Kawiak, J., Hoser, G., Sikora, J., 2000. Effect of Baypamun on blood leucocytes in normal and dexamethasone treated goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47, 385–394. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00298.x>
- Witkowski, P.T., Schuenadel, L., Wiethaus, J., Bourquain, D.R., Kurth, A., Nitsche, A., 2010. Cellular impedance measurement as a new tool for poxvirus titration, antibody neutralization testing and evaluation of antiviral substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.003>
- Yamagishi, H., Nagamine, T., Shimoda, K., Ide, S., Igarashi, Y., Yoshioka, I., Matumoto, M., 1982. Comparative measurement of equine influenza virus antibodies in horse sera by single radial hemolysis, neutralization, and hemagglutination inhibition tests. *J Clin Microbiol* 15, 660–662. <https://doi.org/10.1128/jcm.15.4.660-662.1982>
- Yamanaka, T., Cullinane, A., Gildea, S., Bannai, H., Nemoto, M., Tsujimura, K., Kondo, T., Matsumura, T., 2015. The potential impact of a single amino-acid substitution on the efficacy of equine influenza vaccines. *Equine Veterinary Journal* 47, 456–462.

- <https://doi.org/10.1111/evj.12290>
- Youngner, J.S., Whitaker-Dowling, P., Chambers, T.M., Rushlow, K.E., Sebring, R., 2001. Derivation and characterization of a live attenuated equine influenza vaccine virus. *Am J Vet Res* 62, 1290–1294. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1290>
- Zarski, L.M., Giessler, K.S., Jacob, S.I., Weber, P.S.D., McCauley, A.G., Lee, Y., Soboll Hussey, G., 2021. Identification of Host Factors Associated with the Development of Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy by Transcriptomic Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Horses. *Viruses* 13, 356. <https://doi.org/10.3390/v13030356>
- Zhang, Y., Smith, P.M., Tarbet, E.B., Osterrieder, N., Jennings, S.R., O'Callaghan, D.J., 1998. Protective immunity against equine herpesvirus type-1 (EHV-1) infection in mice induced by recombinant EHV-1 gD. *Virus Research* 56, 11–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(98\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(98)00054-9)
- Zhao, J., Poelaert, K.C.K., Van Cleemput, J., Nauwynck, H.J., 2017. CCL2 and CCL5 driven attraction of CD172a⁺ monocytic cells during an equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in equine nasal mucosa and the impact of two migration inhibitors, rosiglitazone (RSG) and quinacrine (QC). *Vet Res* 48, 14. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0419-4>
- Zhao, Y., Chang, J., Zhang, B., Tong, P., Wang, C., Ran, D., Su, Y., 2019. TLR-5 agonist *Salmonella abortus equi* flagellin FliC enhances FliC-gD-based DNA vaccination against equine herpesvirus 1 infection. *Arch Virol* 164, 1371–1382. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04201-4>
- Ziebell, K.L., Steinmann, H., Kretzdorn, D., Schlapp, T., Failing, K., Schmeer, N., 1997. The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4-10 month old horses. *Zentralbl Veterinarmed B* 44, 529–536. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1997.tb01004.x>

Chapitre 6 :
Annexes

Annexe1 : Publications scientifiques

Acceptées :

Flora Carnet, Romain Paillot, Christine Fortier, Erika Hue, Laurie Briot, Frédéric de Geoffroy, Pierre-Olivier Vidalain, Stéphane Pronost. Immunostimulating Effect of Inactivated Parapoxvirus Ovis on the Serological Response to Equine Influenza Booster Vaccination. *Vaccines*, 2022, 10 (12), pp.2139. <10.3390/vaccines10122139>.

Flora Carnet, Laure Perrin-Cocon, Romain Paillot, Vincent Lotteau, Stéphane Pronost and Pierre-Olivier Vidalain. An inventory of the adjuvants used for vaccination in horses: the past, the present and the future. *Vet Research*, 2023.

Nick Vereecke, Flora Carnet, Stéphane Pronost, Katleen Vanschandevijl, Sebastiaan Theuns, et al.. Genome Sequences of Equine Herpesvirus 1 Strains from a European Outbreak of Neurological Disorders Linked to a Horse Gathering in Valencia, Spain, in 2021. *Microbiology Resource Announcements*, 2021, 10, <10.1128/mra.00333-21>.

Gabrielle Sutton, Camille Normand, Flora Carnet, Anne Couroucé, Marie Garvey, et al.. Equine Herpesvirus 1 Variant and New Marker for Epidemiologic Surveillance, Europe, 2021. *Emerging Infectious Diseases*, 2021, 27 (10), pp.2738-2739. <10.3201/eid2710.210704>.

En révision ou en cours de rédaction :

Flora Carnet, Gabrielle Sutton, Côme Thieulent, Stéphane Pronost, Romain Paillot. Measurement of neutralizing serum antibodies against equine influenza virus by impedancemetry.

Flora Carnet, Romain Paillot, Christine Fortier, Erika Hue, Laurie Briot, Frédéric de Geoffroy, Pierre-Olivier Vidalain, Stéphane Pronost. Booster effect of inactivated parapoxvirus ovis on EHV-1 neutralising antibodies when co-injected with equine herpesvirus 1/4 vaccine

Annexe 2 : Communications orales : congrès internationaux

2019, European Meeting of Equine Infectious Diseases, Caen, France: Measurement of the neutralisation of equine influenza virus by impedancemetry. Carnet F., Sutton G., Thieulent C., Pronost S., Paillot R.

2019, 37th Annual VCRS Symposium, Caen, France : Impedance & other original tools for cellular models. Pronost S.*, Thieulent C., Hue E., Sutton G., Carnet F., Fortier C., Brotin E., Poulain L., Paillot R., Denoyelle C.

2021, 11th International Equine Infectious Diseases Conference, Online, France : Development of real-time cell analysis methods applied to equine influenza virus: proof of concept. Flora Carnet, Gabrielle Sutton, Côme Thieulent, Stéphane Pronost, Romain Paillot.

2021, 11th International Equine Infectious Diseases Conference, Online, France : Development of an assay using real time cell analysis for the measurement of equid herpesvirus 1 specific neutralizing antibody in horses after experimental infection or field vaccination. Gabrielle Sutton, Flora Carnet, Camille Normand, Côme Thieulent, Erika Hue, et al.

2021, 11th International Equine Infectious Diseases Conference, Online, France : Major Equine Herpesvirus - 1 epizootic in Europe: Identification of a marker for epidemiological surveillance. Gabrielle Sutton, Camille Normand, Flora Carnet, Anne Couroucé, Marie Garvey, et al.

Annexe 3 : Communications orales : congrès nationaux

Communications orales:

2021, Thèse en 180s Journée des Doctorants de la Filière Équine, IFCE, INRAE, On line, France : Mécanismes d'action et activités d'adjuvants vaccinaux innovants: utilisation du modèle équin pour preuve du concept. Flora Carnet.

2022, 3^e meeting ResaFlu, Strasbourg, France : RTCA : proof of concept of a new method for serum and antiviral analysis of Equine Influenza Virus. Flora Carnet, Gabrielle Sutton,

Côme Thieulent, Christine Fortier, Loïc Legrand, Pierre-Olivier Vidalain, Romain Paillot, Stéphane Pronost.

2022, 4^e meeting ResaFlu, Tours, France : Immunostimulating effect of co-injection of inactivated parapoxvirus ovis with an equine influenza vaccine on SRH antibodies. Flora Carnet, Romain Paillot, Christine Fortier, Erika Hue, Laurie Briot, Frédéric de Geoffroy, Pierre-Olivier Vidalain, Stéphane Pronost.

2023, Journées sciences et innovations équine, IFCE - Cadre noir, Saumur, France : Vaccin grippe équine : Vers une meilleure protection ? Flora Carnet, Romain Paillot, Christine Fortier, Erika Hue, Laurie Briot, Frédéric de Geoffroy, Pierre-Olivier Vidalain, Stéphane Pronost.

2023, ISWAVLD, Lyon, France : ImpedanCELL: a core facility to screen and evaluate antiviral compounds against Equid alphaherpesviruses. Stéphane Pronost, Camille Normand, Côme Thieulent, Gabrielle Sutton, Flora Carnet, Agathe Guenoux, Emilie Brotin, Christine Fortier, Christophe Denoyelle et Erika Hue.

Annexe 4 : Posters

2022, XXIV^{èmes} Journées Francophones de Virologie, Strasbourg, France : Développement d'un test de neutralisation en temps réel utilisant la technologie xCELLigence® (Real Time Cell Analysis, RTCA) pour titrer les anticorps neutralisant l'herpèsvirus équin 1 chez les chevaux après infection et/ou vaccination. Gabrielle Sutton, Flora Carnet, Camille Normand, Côme Thieulent, Erika Hue, Christine Fortier, Alexis Pléau, Alain Deslis, Edouard Guitton, Barbara Buisson, Romain Paillot, Stéphane Pronost.

2023, XXV^{èmes} Journées Francophones de Virologie, Paris, France : The humoral response to equine influenza vaccine is boosted by an approved immunostimulant based on inactivated parapoxvirus ovis. Flora Carnet, Romain Paillot, Christine Fortier, Erika Hue, Laurie Briot, Frédéric de Geoffroy, Pierre-Olivier Vidalain, Stéphane Pronost.

Effet immunostimulant du Parapoxvirus ovis inactivé (iPPVO) administré en co-injection avec un vaccin contre la grippe équine: mesure de la réponse humorale.

Flora Carnet^{1,2*}, Romain Paillot^{1,2,3}, Christine Fortier^{1,2}, Erika Hue^{1,2}, Laurie Briot⁴, Frédéric de Geoffroy⁴, Pierre-Olivier Vidalain^{5,†}, Stéphane Pronost^{1,2,6,7}.

¹ LABÉO, 14280 Saint-Contest France; ² Université de Caen-Normandie, UNICAEN, BIOTARGEN, UR7450, 14000 Caen, France; ³ School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, United Kingdom; ⁴ Haras National du Pin La Jumenterie, 61310 Gouffern en auge, France; ⁵ CIRI Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon-1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, 69007, Lyon, France; ⁶ Université de Caen Normandie, ImpedanCELL, 14280 Saint-Contest, France. [†] The authors have contributed equally to this work; ^{*} Correspondence: Flora.carnet@laboratoire-labeo.fr.



Introduction

- La grippe équine (EI) est une maladie hautement contagieuse décrite sur tous les continents. Les souches décrites actuellement sont H3NB (clade 1 et 2).
- Si l'infection ne présente pas un risque majeur chez les chevaux adultes, la survenue d'épizooties entraîne des pertes économiques majeures pour la filière équine (arrêt des courses).
- La vaccination existe depuis les années 80 et constitue le moyen de lutte le plus efficace; un boost semi annuel (SAB) est aujourd'hui instauré dans le protocole de vaccination annuel (AV).
- Comparativement au vaccin contre la grippe humaine, les mises à jour sont plus espacées mais la surveillance des souches est réalisée annuellement (OMSA).



Recommandé pour le traitement prophylactique et métaphylactique de maladies infectieuses. (Ziebell et al., 1997)

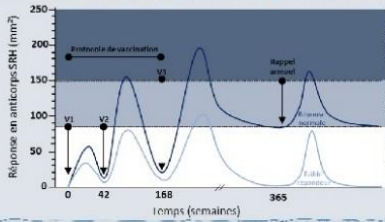
L'injection de l'iPPVO entraîne une stimulation non spécifique de la réponse immunitaire innée. (Rush et al., 2000)

L'iPPVO est un immunostimulant autorisé en médecine vétérinaire. Le but de cette étude est de mesurer l'effet des injections d'iPPVO sur la réponse humorale des chevaux lors d'un rappel vaccinal contre l'EI.



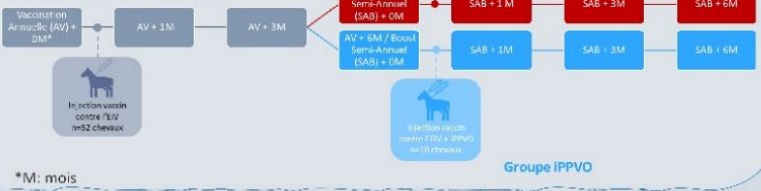
Matériels & Méthodes

Suivi de la réponse humorale par le test d'hémolyse radiale simple (SRH), méthode pour laquelle il existe des corrélats de la protection (Munford et al., 1994).



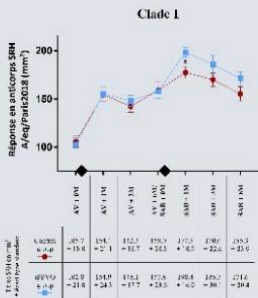
Pré-sélection d'une population de 20 chevaux présentant un taux d'anticorps homogène (mesuré par SRH)

Sélection n=20 chevaux

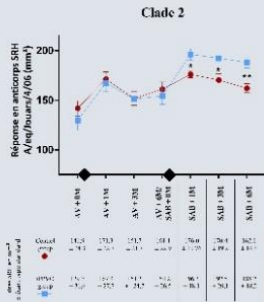


Résultats

Mesure de la réponse en anticorps suite à la vaccination annuelle contre le VIE et au rappel semi-annuel ± iPPVO :



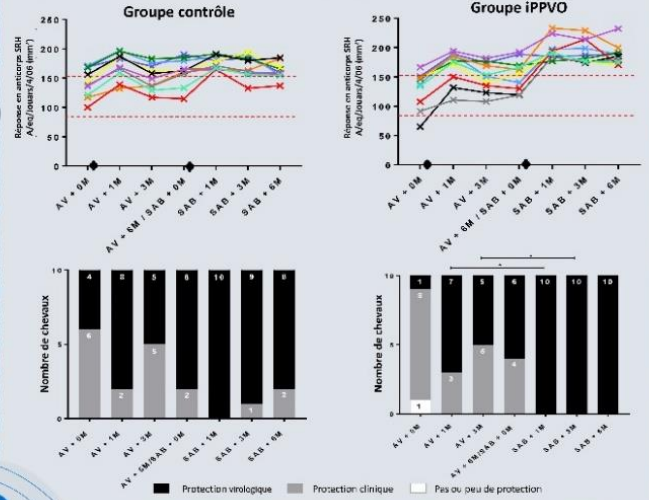
Réponse humorale significativement plus importante pour le groupe iPPVO par rapport au groupe contrôle 1 mois après le boost semi annuel pour la souche Clade 1.



Réponse humorale plus importante en amplitude et dans la durée pour le groupe iPPVO par rapport au groupe témoin à 1 mois, 3 mois et 6 mois après le boost semi-annuel pour la souche Clade 2.

Résultats

Mesure de la réponse individuelle en anticorps suite à la vaccination contre le VIE ± iPPVO et niveaux de protection :



Un nombre significativement plus élevé de chevaux passent le seuil de protection virologique après un boost semi annuel en présence d'iPPVO (mesures à 1 et 3 mois) comparé à la vaccination annuelle (1 et 3 mois) pour la souche de clade 2. Des résultats similaires sont observés pour la souche appartenant au clade 1.



Conclusion

- Ces résultats suggèrent que l'iPPVO co-administré avec le vaccin contre la grippe équine pourrait améliorer le niveau de protection des chevaux en augmentant le taux d'anticorps anti-EIV.
- La réponse mesurée est plus importante avec la souche de clade 2.

→ Permettre d'améliorer l'immunité de troupeau et réduire les risques associés à une épizootie d'EI.

Perspectives:

- Tester l'effet de l'iPPVO sur une population de chevaux faibles répondeurs.
- Mesurer l'effet de l'iPPVO au-delà de 6 mois.
- Evaluer les effets de l'iPPVO lorsqu'il est associé à d'autres technologies vaccinales contre l'EI mais également avec d'autres vaccins équins (herpèsvirus équins 1 ou 4).

Financiers:



Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet CENTAURE co-financé par la Région Normandie et l'Union Européenne dans le cadre du programme opérationnel FIFR H2020 2014-2020.

Contact:

flora.carnet@laboratoire-labeo.fr



Gabrielle Sutton^{1,2}, Flora Carnet^{1,2}, Camille Normand^{1,2}, Côme Thieulent^{1,2}, Érika Hue^{1,2,3}, Christine Fortier^{1,2,3}, Alexis Pléau⁴, Alain Desjais⁴, Edouard Guitton⁴, Barbara Buisson⁵, Romain Paillet^{1,2,3}, Stéphane Pronost^{1,2,3}
¹LABÉO, 14280 Saint-Contest, France. ²Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN, 14000 Caen, France. ³Normandie Univ, UNICAEN, ImpedanCELL, 14280 Saint-Contest, France. ⁴INRAE, UR-1277 Plateforme d'Infectiologie expérimentale (PIE), Centre de Recherche Val de Loire, 97380 Nouzilly, France. ⁵SEL EQUIN VET 27300 Bernay, France. ⁶School of Equine and Veterinary Physiotherapy, Writtle University College, Lordship Road, Writtle, Chelmsford CM1 3RR, UK.

Introduction

Il existe 9 herpèsvirus des équidés identifiés à ce jour. L'herpèsvirus équin 1 (HVE-1) est l'un des agents pathogènes les plus importants chez le cheval, provoquant des maladies respiratoires, neurologiques et/ou oculaires, des avortements ou la naissance de poulains morts-nés. L'impact de l'HVE-1 sur la santé équine a été largement illustré lors d'épizooties décrites à travers le monde, dont deux récentes, l'une en Europe et l'autre aux États-Unis.



Latence au niveau des ganglions trigéminals principalement.



Pas de traitement commercialisé à ce jour.



Les vaccins actuels protègent partiellement contre la forme respiratoire et la forme abortive.

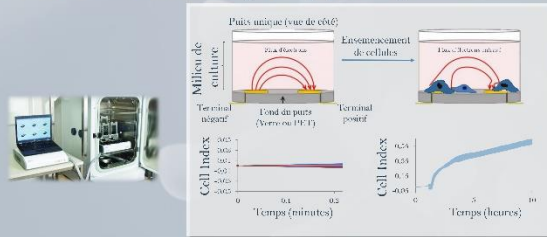


Pas de corrélat de protection établi à ce jour ni de méthode quantitative de mesure des anticorps neutralisants.

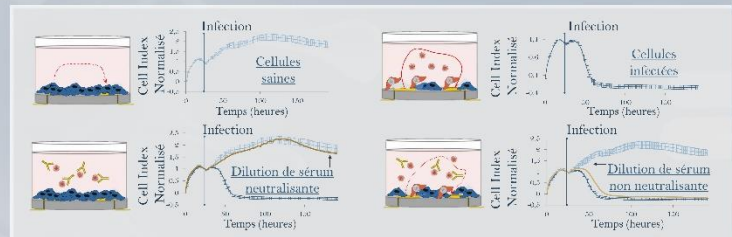
Objectif: développer un test de séroneutralisation quantitatif en temps réel utilisant la technologie xCELLigence®

Matériels & Méthodes

- ❖ **Cellules et virus** :
 - cellules dermiques équinnes (E. Derm, CCL-57™, ATCC®, France), cellules de rein de lapin (RK13, CCL-37™, ATCC®).
 - souche HVE-1 KyD (VR-700™, ATCC®).
- ❖ **Real Time Neutralising Assay (RTNA)**



Real Time Cell Analysis (RTCA) – Principe.



RTNA : Réponse en fonction de la quantité d'anticorps anti-HVE-1 dans le sérum.

❖ Sérums

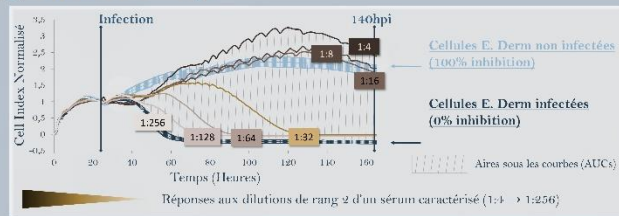
Set#1 → Sérums collectés sur quatre poneys de 10 mois infectés expérimentalement avec la souche HVE-1 FR-56628 (C₂₂₅₃/H₇₃₂₉, Sutton *et al.*, *Viruses*, 2020). Collecte des sérums de J0 à J18 post-infection expérimentale. N=61 sérums analysés dans cette étude. **Set#2** → Sérums collectés chez 13 chevaux tout au long d'une campagne de vaccination employant le vaccin Equip® 1,4 (Zoetis, USA) et organisée avec trois protocoles de vaccination différents. Protocole de primo-vaccination : n=5 chevaux, 6 prélèvements par cheval; protocole pour juments gestantes : n=3 chevaux, 6 prélèvements par cheval; protocole classique de rappel : n=5 chevaux, 3 prélèvements par cheval. N=63 sérums analysés dans cette étude.



L'ensemble des sérums a été analysé selon la méthode de séroneutralisation OIE (OIE Terrestrial Manual 2018 – Chapter 3.5.9).

Résultats

1 Preuve de concept



Réponses aux dilutions de rang 2 d'un sérum caractérisé (1:4 > 1:256)

Détermination du pourcentage d'inhibition de l'effet du virus à partir de l'aire sous les courbes de Cell Index entre l'infection et 140 heures post-infection pour chaque dilution de sérum.

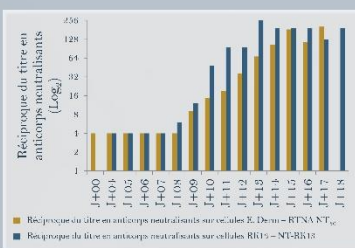
$$\text{Réciproque du RTNA NT}_{50} = 1/IC_{50}$$

Figure 1: Mesure d'impédance en temps réel de cellules E. Derm infectées par HVE-1 KyD (3.65 10³ DECF₅₀/mL) en présence d'une dilution de rang 2 d'un sérum caractérisé (LFD50101).

2 Validation de la méthode RTNA sur 2 cohortes de sérums

Set#1 : sérums issus d'une infection expérimentale par l'HVE-1.

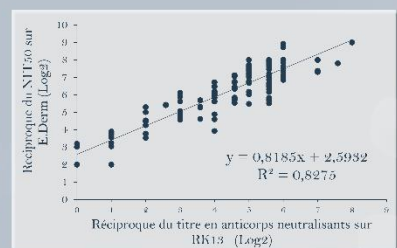
Figure 2 : Corrélation entre la réciproque du RTNA NT₅₀ sur les cellules E. Derm et la réciproque du titre obtenu avec la séroneutralisation classique (méthode OIE) sur les cellules RK13.



Mesure de la séroconversion pour un poney.

Set#2 : sérums issus des protocoles de vaccination.

Figure 3 : Corrélation entre la réciproque du RTNA NT₅₀ sur les cellules E. Derm et la réciproque du titre obtenu avec la séroneutralisation classique (méthode OIE) sur les cellules RK13, N=63.



Coefficient de corrélation: 0,8275.

La méthode RTNA NT₅₀ est appropriée pour la mesure des anticorps neutralisants.

Conclusion

- ❖ La méthode RTNA NT₅₀ HVE-1 sur les cellules E. Derm est fortement corrélée avec la séroneutralisation classique sur les cellules RK13.
- ❖ Cette méthode permet une mesure quantitative des anticorps neutralisant l'HVE-1, et a été validée dans des conditions de terrain.
- ❖ Elle pourrait ouvrir des perspectives dans différents domaines d'application, notamment les essais d'efficacité des vaccins.
- ❖ Elle est transposable à d'autres modèles virus-cellules, dès lors que les cellules sont suffisamment permmissives au virus pour observer des variations de Cell Index sur xCELLigence®.



Contact: Gabrielle Sutton
gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr
Les XXIèmes Journées Francophones de Virologie
Strasbourg - 11 et 12 Avril 2022

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre du projet CENITARE co-financé par la Région Normandie et l'Union Européenne dans le cadre du programme opérationnel FEDER/FSE 2014-2020.



Annexe 5 : Réalisations en parallèle des travaux de recherche

Membre du **Comité de Suivi Individuel** de Gabrielle Bouet, doctorante (ANSES, Unité PhEED, Laboratoire de Santé Animale de Normandie, Goustranville) et Diane Soussan, Doctorante (Unité de Recherche Risques Microbiens, Université de Caen Normandie, Caen).

Membre du **Conseil de Laboratoire** de l'unité BIOTARGEN.

Enseignements de cours de culture cellulaire avec la technologie iCELLigence® aux étudiants de l'IUT de Caen en tant qu'agent temporaire vacataire durant les années universitaires 2019-2020 et 2020/2021 (total de 45 heures).

Participation aux **EQUIDAYS** organisés du samedi 23 au jeudi 28 octobre 2021, pour présenter de manière vulgarisée mon projet de thèse et la plateforme « Normandie Equine Vallée ».

Participation au dispositif **Apprentis chercheurs** (L'Arbre des Connaissances) en encadrant deux étudiants : Robin Molinier, élève de 3ème au Collège Dunois et Asafa Al Ameen, élève de 3ème au Collège Stephen Hawkin. *Expérience interrompue par la situation sanitaire liée à la pandémie de COVID-19.*

Suivi de plus de **100 heures de formation** durant toute la durée de ma thèse. Les formations suivies sont listées dans le tableau ci-après :

Fiche Bilan Formation doctorale

NOM, Prénom : CARNET Flora
Unité de recherche : EA 7450 BioTARGen
Directeur(s) de thèse : PRONOST Stéphane, VIDALAIN Pierre-Olivier
Date (jour/mois/année) de la 1^{ère} inscription : 1er octobre 2019

**Ne pas modifier ni compléter
les 2 dernières colonnes**

Formations transversales	Nombre d'heures suivies	Equivalence (h) attribuée par l'ED	Volume horaire retenu par l'ED (jan 2022)
Modules proposés par Normandie université (cf Livret "Offre de formation doctorale") :			
<i>lister les formations suivies + nb d'heures réellement suivies (colonne G)</i>		1h = 1h, 30h max.	
Protéger, valoriser et diffuser les résultats et produits de la recherche	3		3
Zotero, un outil libre pour stocker/organiser ses ressources numériques et créer/gérer des	6		6
Mener sa thèse comme un projet	12		12
Les normes AFNOR, EN, ISO... et influence	6		6
Règles et usage de publication d'un article scientifique	6		6
Connaitre le marché de l'emploi	6		6
Open access et dépôt dans Hal	3		3
Comprendre le fonctionnement d'une entreprise	6		6
Intégrité Scientifique	4		4
Séminaire organisé par Normandie université :			
Doctoriales		30	
Créer et innover		30	
Conseil en entreprise :			
<i>Contactez l'ED pour validation</i>			
Autres modules :			
Expérimentation animale		10	
Radioprotection		10	
<i>Lister les autres modules et contactez l'ED pour validation</i>			
Activité d'enseignement :			
Mission enseignement entre 16h et 32h		5	
Mission enseignement entre 33h et 48h	45	10	10
Mission enseignement supérieure à 48h		15	
Formations suivies à l'ESPE dans le cadre de la Mission	30	3h pour 10h de formation 10 h max. pour 30h ou + de formation	10
Autres activités :			
Membre du Conseil de l'ED nBISE		25	
Organisation JED		20	
Membre du Bureau d'association de doctorants		10	
Participation à "Ma thèse en 180 secondes" Ma thèse en 180 secondes spéciale filière équipe IFCE	10	10	10
Vulgarisation scientifique (<i>décrire l'action</i>) Mission "Apprentis Chercheurs" (encadrement	10	10 max.	10
Mission de diffusion et de médiation scientifique et techniques		10 max.	
Mission de valorisation		10 max.	
Mission de conseil ou d'expertise		10 max.	
TOTAL Formations transversales (50 h minimum) :			92
Formations scientifiques	Nombre d'heures suivies	Equivalence (h) attribuée par l'ED	Volume horaire retenu par l'ED (jan 2022)
Formations spécifiques proposées par l'ED nBISE :			
Hygiène et sécurité		Rouen: 12,5	
Imagerie cellulaire	13	Caen: 13 ; Rouen: 15	13
PCR quantitative		Caen: 6 ; Rouen: 6	
Spectrométrie		Caen: 5 ; Rouen: 8	
Séquençage haut débit		Caen: 6 ; Rouen: 6	
Biostatistiques		Caen: 12 ; Rouen: 12	
Autres modules :			
Expérimentation animale		25	
Chirurgie		15	
Radioprotection		25	
<i>Lister les autres modules et contactez l'ED pour validation au préalable des crédits</i>			
Participation à des écoles thématiques ou stages de formation :			
<i>Lister les autres modules et contactez l'ED pour validation au préalable des crédits</i>			
TOTAL formations scientifiques :			13
TOTAL Formations (100 h minimum) :			105

Amélioration des protocoles vaccinaux contre la grippe équine et la rhinopneumonie : apport de l'iPPVO en tant qu'adjuvant dans le modèle équin – nouvelle approche de la mesure des anticorps neutralisants

Mots Clés : *Equidés, EIV, EHV-1, iPPVO, anticorps neutralisants, vaccination, adjuvant, impédancemétrie, SRH.*

Résumé

Les virus influenza équin (EIV) et herpèsvirus équin-1 (EHV-1) sont fréquemment décrits dans de nombreux pays et sont deux pathogènes endémiques au sein de la population équine française. Ces maladies infectieuses ont d'importantes conséquences aussi bien au niveau santé et bien-être animal qu'en terme d'impact économique. La lutte contre ces virus repose essentiellement sur la mise en place de mesures préventives telles que la vaccination. Malgré cela, les épizooties d'EIV et d'EHV-1 sont régulièrement observées en France et dans le monde. Les anticorps neutralisants, synthétisés en réponse à l'infection ou après immunisation, représentent une ligne de défense majeure. L'amélioration des vaccins et l'enrichissement du panel d'outils de mesure des anticorps neutralisants peuvent constituer un apport stratégique dans la lutte contre ces virus. Afin d'améliorer l'efficacité de la réponse vaccinale en amplitude et dans le temps, l'utilisation d'adjuvants constitue une des voies de recherche prometteuse. Ce travail de thèse a consisté, dans un premier temps, à établir la preuve de concept de l'utilisation de l'iPPVO en tant qu'adjuvant innovant *in vivo* chez le cheval dans le cadre de la vaccination contre l'EIV. Pour cela, les anticorps ont été mesurés par SRH, méthode pour laquelle des corrélats de protection sont associés au taux d'anticorps mesuré. L'ajout d'iPPVO lors de la vaccination a permis d'augmenter significativement le niveau d'anticorps contre l'EIV ainsi que le niveau de protection des chevaux jusqu'à 6 mois après l'immunisation. Dans un second temps, une méthode de mesure des anticorps anti-EIV faisant appel à l'impédancemétrie a été développée afin d'enrichir les méthodes actuelles et faciliter l'analyse à haut débit. Cette méthode de séroneutralisation a présenté une bonne corrélation avec les valeurs de titres SRH. Une seconde étude a testé, le potentiel adjuvant de l'iPPVO *in vivo* chez le cheval dans un modèle de vaccination contre l'EHV-1,4. La réponse en anticorps mesurée par séroneutralisation a été augmentée jusqu'à 5 mois suivant l'immunisation. Enfin, des résultats préliminaires sur le mécanisme d'action de l'iPPVO sur les cellules mononucléées du sang périphérique a permis de mettre en évidence l'importance de la réponse interféron.

Improving vaccine protocols against equine influenza and rhinopneumonitis: contribution of iPPVO as an adjuvant in the equine model - new approach to measuring neutralising antibodies

Keywords: *Equids, EIV, EHV-1, iPPVO, neutralising antibodies, vaccination, adjuvant, impedancemetry, SRH.*

Abstract

Equine influenza virus (EIV) and equine herpesvirus-1 (EHV-1) are frequently described in many countries and are two endemic pathogens in the French equine population. These infectious diseases have important consequences both in terms of animal health and welfare and in terms of economic impact. The fight against these viruses is essentially based on the implementation of preventive measures such as vaccination. Despite this epizootics of EIV and EHV-1 are regularly declared in France and throughout the world. Neutralising antibodies, synthesised in response to infection or after immunisation, represent the main line of defence against these viruses. Improved vaccines and a wider range of tools to measure neutralising antibodies can be a valuable strategy in the fight against these viruses. In order to improve the efficacy of the vaccine response, both in magnitude and duration, the use of adjuvants is one way to improve immunogenicity. This thesis consisted, in the first instance, in establishing the proof of concept of the use of iPPVO as an innovative adjuvant *in vivo* in horses in the context of vaccination against EIV. For this purpose, antibodies were measured by SRH, a method for which the correlates of protection are well defined. The addition of iPPVO at vaccination significantly increased the antibody level to EIV and protection in horses up to 6 months after immunisation. In a second step, a new method for measuring EIV antibodies in serum based on impedancemetry was developed to improve on current methods and facilitate high throughput analysis. This neutralisation test correlated well with SRH test. Another study was performed, which demonstrated the adjuvant potential of iPPVO in horses during vaccination against EHV-1,4. The antibody response measured by serum neutralisation increased up to 5 months after immunisation. Finally, preliminary results on the mechanism of action of iPPVO on peripheral blood mononuclear cells demonstrated the importance of the interferon.