HAL
open science

# Développement d'un vaccin à ADN optimisé contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez le mouton

Tiphany Chrun

**To cite this version:**

Tiphany Chrun. Développement d'un vaccin à ADN optimisé contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez le mouton. Immunologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA004 . tel-02074153

**HAL Id: tel-02074153**

**https://theses.hal.science/tel-02074153**

Submitted on 20 Mar 2019

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

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

université PARIS-SACLAY

NNT : 2018SACLA004

AgroParisTech

# Développement d'un vaccin à ADN optimisé contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez le mouton

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

Préparée à AgroParisTech (institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement)

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat: Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 20 mars 2018, par

**Tiphany Chrun**

Composition du Jury :

**Karim Benihoud** — Président
Pr, Université Paris-Sud et Institut Gustave Roussy
(UMR 8203, Laboratoire de vectorologie et thérapeutiques anticancéreuses)

**Isabelle Dimier-Poisson** — Rapporteur
Pr, UFR des Sciences Pharmaceutiques
(UMR Université-INRA 1282, Infectiologie et santé publique)

**Nolwenn Jouvenet** — Rapporteur
CR, Institut Pasteur (Génomique virale et vaccination)

**Frédéric Martinon** — Examinateur
CR, CEA (U1184, Département immunologie des maladies virales infectieuses et auto-immunes)

**Bertrand Dubois** — Examinateur
DR, CRCL (INSERM U1052, Département immunité virus et inflammation)

**Isabelle Schwartz-Cornil** — Directeur de thèse
DR, DVM, INRA UR892, Virologie et immunologie moléculaires)

**Philippe Marianneau** — Co-encadrant de thèse
Ph.D, Chef d'unité Anses Lyon (Unité virologie)

Thèse de doctorat

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail et pour le temps précieux qu'ils y ont passé. Merci au Professeur **Karim Benihoud** d'avoir accepté de présider ce jury, au Professeure **Isabelle Dimier-Poisson** et au Docteur **Nolwenn Jouvenet** d'avoir accepté d'être rapportrices de ma thèse. Enfin je remercie les Docteurs **Bertrand Dubois** et **Frédéric Martinon** d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie Frédéric Martinon, également membre de mon comité de thèse, pour tous les échanges enrichissants que nous avons eus. Je remercie également les autres membres du comité, les Docteurs **Nicolas Aubrey**, **Sandrine Henri** et **François Lefèvre**.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de mes deux directeurs de thèses, **Isabelle Schwartz-Cornil** et **Philippe Marianneau**. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et de m'avoir accueillie dans vos équipes. J'ai pu travailler avec des personnes très compétentes. Vous m'avez guidée et soutenue tout au long de cette thèse que ce soit pour les expérimentations au laboratoire, ainsi que la rédaction des articles et du mémoire. Isabelle, je te remercie tout particulièrement pour ta disponibilité malgré ton emploi du temps très chargé, pour ton investissement à ma formation et pour ton aide durant les manipes (Jouy, Tours et Lyon). Je n'oublierai jamais nos réunions biblio qui étaient très enrichissantes. Philippe, je te remercie également pour ta disponibilité, ton aide pour les expérimentations animales, ta patience et tes précieux conseils (notamment les deux pas de recul et l'histoire du musée…). Grâce à vous j'ai pu gagner en maturité aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Je vous suis infiniment reconnaissante à tous les deux pour tout ce que vous m'avez appris.

Un grand merci aux membres de l'équipe $V_2I$ de l'INRA de Jouy-en-Josas, **Sabine Riffault, Nicolas Bertho, Delphyne Descamps** pour les échanges qu'on a eus et vos conseils durant ces trois années de thèse (et un peu plus).

**Céline**, je te tire mon chapeau pour ta force et ton professionnalisme sans faille quelles que soient les difficultés. Je te remercie pour m'avoir formée, aidée et soutenue tout au long de cette thèse. Ton aide a été plus qu'indispensable et travailler avec toi a été un réel plaisir. Nos périples à Tours et Barcelone resteront gravés dans ma mémoire.

**Edwige** je te remercie pour ton aide précieuse durant les expériences à Barcelone et de m'avoir formée pour les coupes au cryostat.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de l'unité VIM de l'INRA pour votre accueil chaleureux, pour tous les échanges scientifiques et autres que nous avons eus. Merci à **Charles-Adrien Richard** et **Mohamed Moujou** pour m'avoir aidée à la purification des protéines. Merci à **Jenna Fix** pour les manipulations de biologie moléculaire. Au bout de 4 mois je n'avais toujours pas réussi à insérer un gène dans un vecteur…tu l'as fait en un essai. Merci ! Je remercie l'équipe Influenza de la VIM, **Ronan Le Goffic, Christophe Chevalier, Bruno Da Costa** et **Laura Sedano** pour leur soutien moral. Nos séances apicultures entre midi et deux étaient géniales.

Je remercie également les membres de l'unité virologie de l'Anses Lyon pour vos conseils, votre aide et votre soutien. Travailler avec vous a été très enrichissant. Nos déjeuners à l'ENS vont me manquer…

**Sandra (Lacôte)**, je te remercie pour ton aide et pour m'avoir formée. Ton organisation presque infaillible m'impressionnera toujours. Ta positivité et tes encouragements m'ont aidée à être un peu moins stressée durant la fin de thèse. Merci pour ta relecture de ce mémoire !

**Séverine et Johann ~~Joann~~**, je vous remercie pour vos conseils, votre aide et pour tous les échanges scientifiques et autres que nous avons eus. Vous n'aurez plus à supporter mes blagues… !

Un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail. Merci au personnel de la plateforme d'expérimentation animale de Nouzilly (PFIE): **Céline Barc, Dany Leguere, Guillaume Martin**, **Olivier Boulesteix** et **Sylvain Breton**. Merci au personnel de l'animalerie IERP de l'INRA de Jouy-en-Josas: **Jérôme Pottier, Marlène Héry** et **Charline Pontlevoy**. Je n'oublie pas **Noémie Perrot** de l'UCEA du Domaine de Bressonvilliers. Merci au personnel de la plateforme d'expérimentation animale de l'Anses Lyon (PFEA) : **Coralie Pulido**. Merci au personnel de l'IRTA-CReSA de Bacelone **Davis Solanes**, **Joan Pujols, Jordy Charles** et **Nuria Navarro**. Malgré la barrière de la langue, vous m'avez accueillie chaleureusement dans votre labo. Travailler avec vous a été une expérience enrichissante. Je remercie également **Christophe Peyrefitte** et **Audrey Ferrier** de l'IRBA pour nos échanges scientifiques et votre soutien tout au long de cette thèse.

Je remercie **Vanessa Contreras** pour m'avoir aidée à lire les plaques ELISPOT.

A **Sandra (Martin-Latil),** avec qui j'ai beaucoup appris lors de mon stage de master. Je te remercie pour ton soutien moral et tes conseils bienveillants. **Coralie Coudray**, tu es arrivée à Lyon au bon moment ! Tu étais une doctorante et moi une ~~petite~~ stagiaire de M2 quand on s'est quittée. On se retrouve à Lyon, toi en Post-doc et moi doctorante. Merci pour ton soutien et tes encouragements.

Merci aux futurs Docteurs, **Elise, Cindy et Sarah (Madrières)** pour votre soutien. Je vous dis bon courage et vous allez y arriver ! Merci aussi à **Aline Potiron** et **Augustine,** votre soutien a été précieux. Je vous souhaite bonne chance pour la suite de vos aventures ! Je n'oublie pas **Christophe** et **Lucile.** Merci pour votre soutien moral. Je suis contente de vous avoir appris à faire des nems…

Un énorme merci à mes anciens collègues **Pauline, Charlotte, Daphnée** et **Pierre-Louis**. La VIM sans vous, ce n'est plus pareil. Un grand merci à mes copines de la fac, **Sarah (Chouffane), Audrey, Cécile, Cyrielle** et mes copines depuis toujours **Isabelle** et **Siao leu.** Vous m'avez toujours encouragée et soutenue tout au long de cette thèse malgré mon caractère difficile par moments. Merci !

A mes plus belles rencontres, **Emmanuel**, **Carole** et **Léa**. Ces quelques lignes ne seraient pas suffisantes pour vous témoigner ma gratitude mais je vais tâcher de le faire au mieux. Sans vous je ne serais pas parvenue jusqu'au bout. On a parcouru ce chemin ensemble et cette thèse je vous la dédie.

Et pour finir, je remercie ma famille pour m'avoir toujours soutenue. **A mes parents, mes frères, Céline, Pascal, Jimmy, Aurélie, Elisa,** sans qui cette thèse n'aurait pu aboutir**.** Vous êtes mes piliers dans la vie et votre soutien moral n'a pas de prix. Je vous dédie cette thèse.

# Table des matières


I. Liste des abbrévations ..... 9
II. Liste des figures et des tableaux ..... 10
III. Préambule ..... 11
IV. Introduction ..... 13
A. La fièvre de la vallée du Rift ..... 13
1. Historique ..... 13
2. La transmission ..... 13
3. La pathologie chez les hôtes naturels ..... 16
4. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift ..... 19
5. Epidémiologie ..... 29
B. Les stratégies vaccinales contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift ..... 31
1. Les vaccins contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift ..... 31
2. Les modèles d'études ..... 38
3. Les réponses immunes impliquées dans la protection ..... 39
C. Les cellules dendritiques et leurs potentiels vaccinaux ..... 42
1. Le rôle des cellules dendritiques dans la mise en place de la réponse immunitaire ..... 42
2. Les cellules dendritiques ..... 52
3. Les récepteurs endocytotiques d'intérêt pour le ciblage des DCs ..... 62
4. Les outils pour le ciblage des DCs ..... 68
D. La vaccination à ADN ..... 71
1. Contexte général sur la vaccination à ADN ..... 71
*2.* Les méthodes de transfection *in vivo* ..... 74
3. Les adjuvants géniques ..... 76
4. Le ciblage des DCs par vaccination à ADN ..... 76
V. Objectifs des travaux de thèse ..... 79
VI. Résultats ..... 83
A. Article 1 ..... 83
..... 89
1. Résultats principaux ..... 97
2. Résultats supplémentaires ..... 97
B. Article 2 ..... 104
1. Résultats principaux ..... 139

VII. Discussion et perspectives ..... 140
1. La vaccination à ADN, une stratégie prometteuse contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez le mouton ..... 141
2. L'efficacité du ciblage des DCs en vaccination à ADN contre le vFVR ..... 143
3. L'étude des réponses immunes impliquées dans la protection médiée par peGn chez la souris ..... 148
VIII. Conclusion ..... 150
IX. Bibiographie ..... 151
X. Annexes ..... 186
A. Annexe 1 - Liste des congrès nationaux et internationaux ..... 186
B. Annexe 2 - The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin ..... 186

# I. Liste des abbrévations

ADN *: Acide désoxyribonucléique*
AIM2 *: Interferon-inducible protein AIM2*
ANSM *: Agence national de sécurité du médicament et des produits de santé*
APC *: Antigen-presenting cell*
ARN *: Acide ribonucléique*
AUC *: Area under the curve*
Baft3 *: basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3*
BCR *: B-cell receptor*
BHK-21 *: Baby hamster kidney cell*
CCL *: Chemokine (C-C motif) ligand*
CCR7 *: : C-C chemokine receptor type 7*
CD *: Cluster of differenciation*
cDC *conventional dendritic cell*
CDP *: Common dendritic precursor*
CHO *: Chinese hamster ovary cell*
CLIP *: Class II-associated invariant chain peptide*
CLR *: C-type lectin receptor*
CRD *: Carbohydrate-recognition domain*
Csf-1 *: Colony stimulating factor 1*
CTAB *: Cetyltrimethylammonium bromide*
CTL *: Lymphocyte T cytotoxique*
DAMP *: Damage associated molecular pattern*
DC *Dendritic cell*
eGn *: ectodomaine de la glycoprotéine Gn*
EHV *: Equine herpesvirus*
EP *: Electroporation*
FDA *: Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments*
FDC *: Follicular dendritic cells*
Flt3-L *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*
GM-CSF *: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HA *: Hemagglutinin*
HLA *: Human leukocyte antigen*
ICOS-L *: Human inducible costimulator-ligand*
ICTV *: International Committee on Taxonomy of Viruses*
IFNAR *: Interferon α/β receptor*
Ig *: Immunoglobulin*
IL *: Interleukin*
infDC *: Inflammatory DCs*
IRF *: Interferon Regulatory Factor*
ITAM *: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*
LC *: Langerhans cell*
LPS *: Lipopolysaccharide*
MDP *: Monocyte and dendritic cell progenitor*
MERTK *: Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*
MHC *: Major histocompatibility complex*
moDC *: Monocyte derived dendritic cells*
MOT *: Micro-organismes et toxines hautement pathogènes*
MVA *: Modified vaccinia Ankara*
NK *: Natural Killer*
Notch2 *: Neurogenic locus notch homolog protein 2*
OMS *: Organisation mondiale de la Santé*
ORF *: Open reading frame*
OVA *: Ovalbumin*
PAMPs *: Pathogen associated molecular patterns*
pDC *: Plasmacytoid dendritic cell*
PD-L1 *: Programmed death-ligand 1*
PEI *: Polyéthylèneimine*
pfu *: Plaque forming unit*
PKR *: Protein kinase RNA-activated*
PLGA *: Poly(lactic-co-glycolic acid*
PNN *: Polynucléaires neutrophiles*
PRR *: Pattern recognition receptor*
RBP/J *: Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J*
RdRp *: RNA-dependent RNA polymerase*
RE *: Reticulum endoplasmique*
RNP *: Ribonucléocapside*
scFv *: Single chain fragment variable*
STING *: Stimulator of interferon genes*
TAP *: Transporter associated antigen*
TCR *: T cell receptor*
Tfh *: T follicular helper cell*
TLR *: Toll-like receptor*
TNF-α *: Tumor necrosis factor alpha*
Tregs *Lymphocytes T régulateurs*
Vero *: African Green Monkey Kidney Epithelial Cells*
VH *:* Variable domain of a heavy-chain
VIH *: Virus de l'immunodéficience humaine*
VL *: Variable domain of a light-chain*
VLP *: Virus like particle*

# II. Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Cycle d'infection d'un arbovirus chez le moustique ..... 14
Figure 2: Les cycles de transmissions du virus de la fièvre de la vallée du Rift..... 16
Figure 3: Structure du virus de la fièvre de la vallée du Rift ..... 20
Figure 4: Représentation schématique du génome viral ..... 21
Figure 5: Polyprotéines NSm-Gn-Gc et Gn-Gc ..... 24
Figure 6: Représentation schématique du cycle de réplication ..... 25
Figure 7: Arbre phylogénétique du virus de la fièvre de la vallée du Rift ..... 28
Figure 8 : Situation épidémiologique de la fièvre de la vallée du Rift (1994-2014)..... 30
Figure 9 : Les différentes voies de présentation antigénique MHC I et II ..... 45
Figure 10: Structure d'un organe lymphoïde secondaire ..... 47
Figure 11: Les trois signaux d'activation..... 48
Figure 12: Les différents formats utilisés pour le ciblage des DCs in vivo ..... 69
Figure 13: Les réponses cellulaires IFNγ induites par peGn délivré par ID + EP ou par ID + EP + IM ..... 98
Figure 14: Les réponses humorales induites par peGn délivrées par ID+EP ou par ID + EP + IM ..... 99
Figure 15: Réponses cellulaires IFNγ induites par peGn, pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn chez les moutons adultes ..... 100
Figure 16: Les réponses humorales induites par peGn, pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn dans des moutons adultes ..... 101
Figure 17: Réponses cellulaires IFNγ induites par DNA + boost MVL-eGn ..... 102
Figure 18: Comparaison des réponses humorales induites par une vaccination à ADN versus un prime DNA + boost MVL-eGn ..... 103

Tableau 1: les différentes sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ 49
Tableau 2: comparaison des cDCs trans-espèces 58

# III. Préambule

Les arbovirus (« arthropod-borne virus »), transmis par les arthropodes hématophages tels que les moustiques, les tiques, les phlébotomes sont responsables d'infections graves en santé humaine et vétérinaire. Les plus connus appartiennent à différentes familles de virus incluant les *Flaviridae* (virus de la dengue, virus du Nil occidental, virus de la fièvre jaune, virus Zika), les *Togaviridae* (virus Chikungunya, virus de l'encéphalite équine vénézuelienne) et les *Phenuiviridae* (virus de la fièvre de la vallée du Rift) (Agarwal 2017, revue). Les arboviroses sont généralement endémiques dans les pays tropicaux. Cependant, on assiste depuis quelques années à une émergence de ces maladies dans les pays tempérés qui est étroitement liée aux changements climatiques, à la globalisation des échanges commerciaux et des mouvements de population.

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (vFVR), endémique en Afrique et au Moyen-Orient affecte les ruminants et l'Homme, et présente une menace biologique. L'introduction intentionnelle ou fortuite de ce pathogène en Europe aurait des conséquences néfastes pour l'économie et en santé publique humaine et vétérinaire. De plus, à l'heure actuelle il n'existe ni de traitement efficace ni de vaccins sûrs contre le vFVR et il fait partie de la liste des pathogènes prioritaire pour le développement de vaccin (R&D Blueprint, OMS 2017).

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse dont l'objectif est de développer un vaccin à ADN optimisé contre le vFVR par l'utilisation d'une méthode de délivrance de l'ADN, d'un adjuvant génique et de la stratégie de ciblage des cellules dendritiques. Ce projet a été financé par un projet ANR ASTRID coordonné par Isabelle Schwartz-Cornil de l'INRA de Jouy-en-Josas en collaboration avec Philippe Marianneau de l'Anses Lyon, Christophe Peyrefitte et Audrey Ferrier de l'IRBA de Brétigny-sur-Orge, Pierre Sarradin de l'INRA de Tours (PFIE) et Joan Pujols de l'IRTA-CReSA de Barcelone.

L'utilisation de ce pathogène est strictement réglementée en Europe et nécessite la manipulation dans des laboratoires de sécurité biologique de niveau 3. De plus en France, il est classé parmi les MOTs (Micro-organismes et toxines hautement pathogènes) par l'ANSM (agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé). Des autorisations sont nécessaires pour l'ensemble des activités liées à l'utilisation du vFVR et les matériels génétiques dérivés de ce virus (stockage, détention, transport, manipulation). Ces contraintes

réglementaires ont fortement affecté le démarrage du projet et conditionné la mise en place des expériences dans les différents centres de recherches.

Ce mémoire, divisé en plusieurs parties débutera par une synthèse bibliographique sur la fièvre de la vallée du Rift et les stratégies vaccinales qui ont été mises en place dans les pays endémiques, le potentiel des cellules dendritiques pour la vaccination et enfin l'intérêt de la vaccination à ADN contre les maladies infectieuses. Une seconde partie décrira les objectifs de cette thèse et dans la suivante, les résultats obtenus seront présentés sous forme d'articles. Enfin, l'ensemble des résultats obtenus sera discuté et une conclusion finale apportera des réponses sur les problématiques soulevées au cours du travail de thèse.

# IV. Introduction

## A. La fièvre de la vallée du Rift

### 1. Historique

A partir des années 1910, une maladie mortelle affectant les agneaux et causant des fièvres ainsi que des avortements chez les brebis gestantes a été rapportée dans des fermes situées dans la vallée du Rift au Kenya (Murithi et al., 2011). C'est en 1930, lors de l'investigation d'une épidémie similaire que l'équipe de R. Daubney et J.R. Hudson a identifié l'agent responsable de cette maladie (R. Daubney and J.R. Hudson, 1930). A cette période, d'autres maladies virales affectant les ovins ont été identifiées telles que la maladie du mouton de Nairobi (Nairobi sheep disease virus) et le virus de la fièvre catarrhale ovine (Bluetongue virus). Cependant les symptômes observés chez les moutons malades étaient différents de ceux causés par ces virus déjà connus. Afin d'établir une relation causale entre la maladie et l'agent pathogène, R. Daubney et J.R. Hudson ont injecté du sang prélevé dans des moutons malades à des moutons sains. Après l'inoculation, les moutons ont développé des symptômes identiques à ceux observés chez des moutons naturellement infectés. Ce pathogène extrait par filtration présente une taille inférieure à celui du virus de la fièvre aphteuse (Foot-and-mooth-disease). C'est ainsi que l'agent étiologique responsable de fièvre chez les moutons adultes, d'avortement de femelles gestantes et d'une mortalité élevée chez les agneaux a été identifié et a été nommé « virus de la fièvre de la vallée du Rift ».

### 2. La transmission

#### a) Les hôtes naturels

Le vFVR affecte principalement le bétail (bovins, ovins, caprins, camélidés) et les ruminants sauvages (impalas, gazelles, gnous) en Afrique (Pepin et al., 2010). Parmi les ruminants domestiques, les ovins sont les plus susceptibles au virus et les critères déterminant cette susceptibilité restent inconnus. Le rôle des rongeurs sauvages en tant qu'hôte n'a pas été confirmé à ce jour mais ils pourraient contribuer à la circulation du pathogène dans l'environnement (Olive et al., 2012; Rostal et al., 2017). L'Homme peut également être

infecté par le virus et représente l'hôte terminal (ou accidentel), c'est-à-dire qu'il ne participe pas au maintien du virus.

### b) Les réservoirs

Par définition, un réservoir au sens épidémiologique est un être vivant qui assure la survie d'un agent pathogène et sa transmission à un autre organisme (adaptée du dictionnaire Larousse). Le rôle des moustiques dans la transmission de la maladie a été mis en évidence par l'équipe de Smithburn en 1948 dans la souris et le primate non humain (Smithburn et al., 1948). Bien que ce virus puisse infecter plusieurs arthropodes (tiques, mouches, phlébotomes), les moustiques sont les principaux réservoirs actifs du virus (Lumley et al., 2017). En effet, la compétence vectorielle est liée à la capacité du virus à surmonter plusieurs barrières anatomiques pour se répliquer, se maintenir dans le moustique et être ensuite transmis dans l'hôte (Figure 1). Classiquement, les virus transmissibles par les moustiques se répliquent dans les cellules épithéliales intestinales du moustique suite à la prise alimentaire (« midgut infection barrier »), se disséminent dans l'organisme (« midgut escape barrier »), atteignent les glandes salivaires (« salivary gland infection barrier ») et pour certains virus les ovaires. Les virus sont ensuite transmis dans l'hôte par piqûre (« salivary gland escape barrier ») (Franz et al. 2015). Les espèces compétentes pour véhiculer le vFVR appartiennent principalement à la famille des *Culicinae*, des genres *Aedes* et *Culex*. Alors que les moustiques *Aedes* sont impliqués dans le maintien du virus dans l'environnement par la transmission trans-ovarienne du pathogène, les moustiques *Culex* semblent jouer un rôle plus important dans le déclenchement d'une épidémie (Lumley et al., 2017).

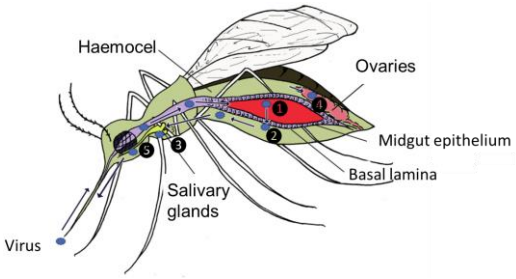



**Figure 1 : Cycle d'infection d'un arbovirus chez le moustique**

Après son entrée durant la prise alimentaire, le virus (représenté par un cercle bleu) doit se répliquer dans les cellules l'épithélium intestinal de l'hémocèle ou l'estomac (1); traverser l'épithélium intestinal (2) et se propager dans l'organisme; migrer vers les glandes salivaires (3) ou vers les ovaires (4) et s'y répliquer; infecter l'hôte lors d'une piqûre (5). *Adaptée Lumley et al., Journal of General Virology 2017;98:875–887.*

### c) Cycles de transmission

#### i. Cycle enzootique

Les moustiques femelles du genre *Aedes* infectés sont associés à la persistance du virus dans l'environnement durant les périodes enzootiques. Ils peuvent transmettre le virus à leurs descendants par transmission trans-ovarienne (Lumley et al., 2017). Les œufs potentiellement infectés sont capables de résister à la dessiccation et de rester à l'état quiescent pendant de longues périodes. A la survenue des pluies, les œufs éclosent et les moustiques adultes infectés par le vFVR infectent les ruminants sauvages et/ou domestiques par piqûre créant ainsi des foyers d'infection locaux (Figure 2).

#### ii. Cycle épidémique

Lors des périodes d'inondations qui sont propices à l'éclosion des œufs infectés, un grand nombre de moustiques *Aedes* infectés par le vFVR initie alors la dissémination du virus par piqûre chez les ruminants sauvages et le bétail. Ces derniers sont à leur tour des hôtes pour d'autres moustiques compétents, notamment du genre *Culex* déclenchant ainsi des épidémies.

Chez les ruminants, l'infection a également lieu par contact du sang, des fœtus avortés et des tissus (membranes placentaires) provenant d'animaux infectés (Pepin et al., 2010). Une transmission verticale du pathogène a lieu chez les femelles gestantes (Antonis et al., 2013; Makoschey et al., 2016).

L'infection chez l'Homme s'effectue principalement par contact directe lors de la manipulation d'animaux ou de carcasses infectées. La consommation d'aliments provenant d'animaux infectés tels que le lait non pasteurisé est également un autre mode d'infection (Sissoko et al., 2009). Les infections par piqûres de moustiques sont possibles bien qu'elles soient difficiles à mettre en évidence. Aucune transmission horizontale (interhumaine) et verticale du virus chez l'Homme n'a été confirmée à ce jour.

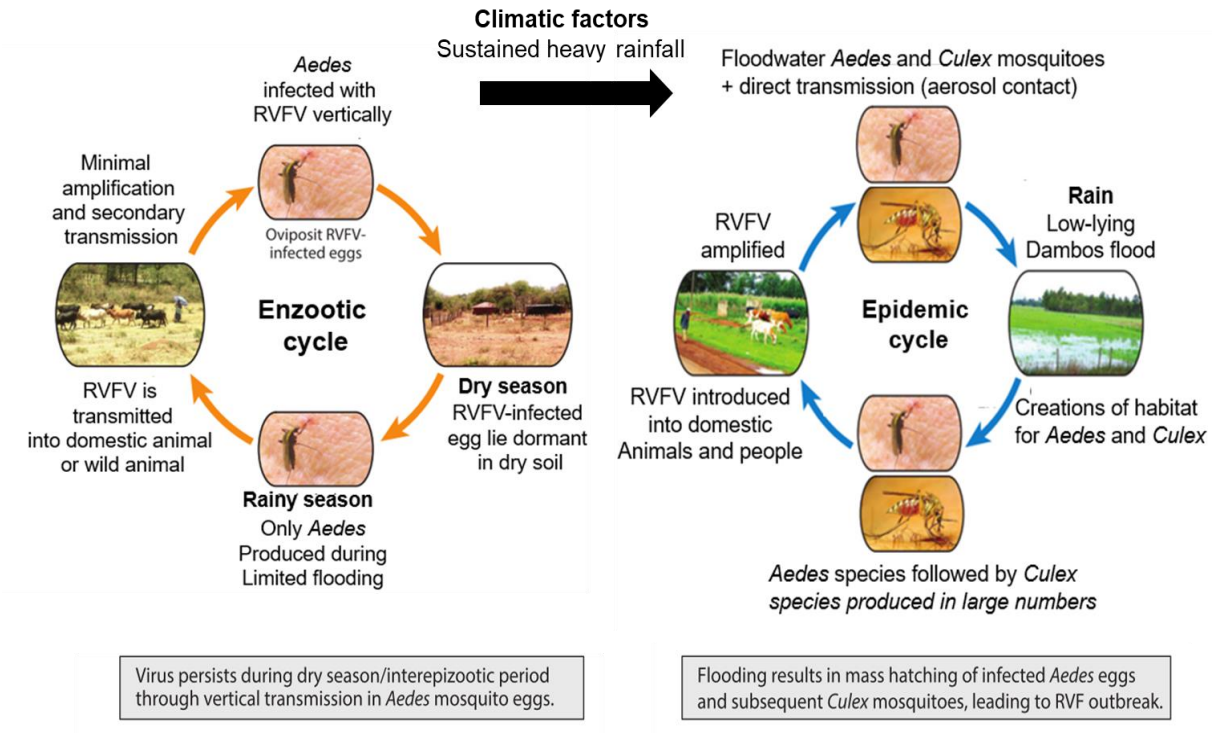



**Figure 2: Les cycles de transmissions du virus de la fièvre de la vallée du Rift**

Lors des périodes de précipitations normales, le virus se maintiendrait dans l'environnement par transmission verticale chez les moustiques du genre *Aedes*, créant ainsi des foyers d'infection locaux (cycle enzootique, gauche). Le passage d'une enzootie à une épidémie (cycle épidémique, droite) est fortement associé à des périodes de fortes précipitations qui sont favorables au développement de nombreux moustiques compétents des genres *Aedes* et *Culex*. *Adaptée d'après, Linthicum et al., Annu. Rev. Entomol. 2016. 61:395–415.*

## 3. La pathologie chez les hôtes naturels

### a) Les Hommes

Après une infection par le vFVR, l'Homme peut développer des symptômes de sévérités différentes (Ikegami and Makino, 2011). Dans la grande majorité des cas, des formes bénignes avec rémission sont observées tandis que seulement 1 à 2% des patients infectés vont développer des formes graves (Nguku et al., 2010).

**- Les formes bénignes:**

La plupart des patients atteints de FVR développent un syndrome pseudo-grippal et la maladie est spontanément résolutive. Une période d'incubation variant de 4 à 6 jours est généralement observée. Les symptômes débutent avec des frissons, des vertiges, de l'asthénie, des maux de tête sévères et des nausées. Très rapidement les patients sont en hyperthermie et peuvent contracter des myalgies, des vomissements et des diarrhées. Dans certains cas, des complications ont été observées avec une récurrence des fièvres pouvant durer 10 jours puis les patients entrent en phase de convalescence.

**-Les formes graves:**

L'infection par le vFVR peut conduire à des infections oculaires avec une baisse de l'acuité visuelle qui peut perdurer plusieurs mois après la rémission. Dans de nombreux cas cette cécité partielle est définitive.

Des méningo-encéphalites avec des troubles neurologiques persistant pendant plusieurs mois ont été observés chez des patients infectés par le vFVR. Après une période de rémission (de l'ordre de semaines en mois) des fièvres, des céphalées, une perte de la vision, des difficultés dans les mouvements apparaissent et persistent pendant plusieurs semaines. Une infiltration de leucocytes dans le liquide céphalo-rachidien a été observée chez ces patients et témoigne d'une infection des méninges.

Des cas avec syndrome hémorragique ont été observés avec un taux de létalité élevé. Le début de l'infection se caractérise par de la fièvre, des ecchymoses, des vomissements, un ictère, des douleurs abdominales, des diarrhées avec une atteinte hépatique mise en évidence par l'élévation des transaminases dans le sang (alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase et lactate déshydrogénase).

Un cas rare de thrombose fatale a été observé chez un patient infecté par le vFVR. Après une période de rémission, le patient a contracté des embolies pulmonaires à répétition et qui auraient entrainé le décès du patient.

Enfin, une étude a mis en évidence un nombre élevé de cas d'avortements chez des patientes soudanaises infectées par le vFVR (Baudin et al., 2016). Il reste cependant très difficile de confirmer le rôle du vFVR dans des avortements par transmission verticale chez les femmes infectées.

### b) Les ruminants

Chez les moutons, les hôtes les plus susceptibles au vFVR, les symptômes révélateurs d'une infection par le vFVR sont caractérisés par des fièvres, une perte d'appétit, des avortements massifs (ou « abortion storm ») estimés à 40% au sein d'un cheptel (Barnard and Botha, 1977) et une létalité élevée proche de 100% chez les nouveau-nés (Ikegami and Makino, 2011). Les infections expérimentales ont permis de mieux comprendre la pathogénicité et ont montré des résultats similaires entre une infection naturelle et expérimentale. Des létalités de 20% et >90% ont été observées suite à une infection expérimentale par le vFVR, chez des moutons adultes et nouveau-nés respectivement (R. Daubney and J.R. Hudson, 1930). Des fièvres pouvant atteindre 42°C apparaissent entre 2 à 3 jours post-infection, avec une perte d'appétit, des diarrhées, des écoulements nasaux, des conjonctivites et des prostrations ont été observés chez des jeunes adultes (Busquets et al., 2010; Tomori and Schmitz, 1996). Des œdèmes pulmonaires, des nécroses hépatiques et des lésions cérébrales ont été observés chez des moutons expérimentalement infectés après analyses post mortem (Ikegami and Makino, 2011). Le vFVR est capable de traverser la barrière placentaire et d'induire une nécrose des cotylédons et des villosités choriales causant des avortements (Antonis et al., 2013; Baskerville et al., 1992). L'infection entraine soit la mortalité du fœtus, soit des malformations du nouveau-né (Makoschey et al., 2016).

Les chèvres sont également des hôtes du virus et développent des symptômes similaires à ceux observés chez les moutons infectés (fièvre, avortement, léthargie, mortalité chez les nouveau-nés) (Bird and Ksiazek, 2009). Un pic de fièvre a été mesuré à 2 jours après une infection expérimentale sur des chèvres de 4 mois par une souche sauvage ZH501 du vFVR (Nfon et al., 2012).

Les bovins infectés présentent des symptômes similaires (fièvre, avortement chez les femelles, léthargie, mortalité chez les nouveau-nés) mais sont moins susceptibles que les moutons (Bird and Ksiazek, 2009). La létalité est estimée entre 5% à 10% chez les adultes infectés par le vFVR alors qu'elle varie de 10 à 70% chez les nouveau-nés. Des analyses post-mortem de veaux ou vaches infectés lors d'une épidémie survenue en Afrique du Sud entre 1974 et 1975 ont montré des atteintes hépatiques (nécroses des cellules hépatiques) (Coetzer, 1982).

Chez les camélidés, deux formes cliniques ont été décrites lors d'une épidémie survenue en Mauritanie en 2010. L'infection par le vFVR peut conduire à une forme hyper-aiguë qui est caractérisée par une mort subite, et la forme aiguë qui est caractérisée par des fièvres, une ataxie, des œdèmes à la base du cou, des difficultés respiratoires, des ictères, des conjonctivites sévères qui entraînent une cécité, des hémorragies gingivales, des lésions au niveau des pieds et des avortements chez les chamelles (Ould El Mamy et al., 2011).

Les symptômes contractés par les ruminants sauvages ont été peu étudiés et n'ont pas été clairement définis à ce jour.

## 4. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Le vFVR est un virus enveloppé qui appartient à l'ordre des *Bunyavirales*, à la famille des *Phenuiviridae* et au genre *Phlebovirus* (classement ICTV 2016).

### a) Structure du virion

Les virions sont de forme sphérique et ont une taille qui varie de 90 à 110 nm de diamètre. A leur surface, l'enveloppe est recouverte par deux glycoprotéines, Gn et Gc qui forment des capsomères disposés selon une symétrie icosaédrique (Freiberg et al., 2008). A l'intérieur, les virions renferment 3 segments d'ARN recouverts par la protéine N et chaque segment est associé à une polymérase virale ARN-dépendant (ou RdRp, « RNA-dependent RNA polymerase ») formant ainsi la ribonucléocapside (RNP) (Figure 3).

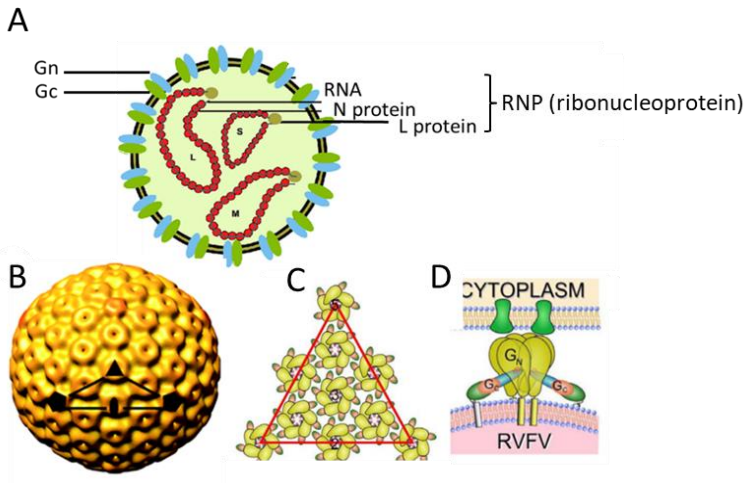



**Figure 3: Structure du virus de la fièvre de la vallée du Rift**

**A.** Le virion contient à sa surface deux glycoprotéines (Gn et Gc) ancrées dans la membrane. Les trois segments d'ARN (S, M et L) sont recouverts de nombreuses copies de la protéine N. Chaque brin d'ARN est associé à une polymérase virale ARN-dépendante.

**B.** Modélisation de la structure tridimenstionnelle du virion. Une triangluation est indiquée en noir (B) et est représentée schématiquement en **C**.

**D.** Représentation schématique de l'interaction entre le vFVR et la cellule hôte. La protéine d'attachement Gn se lie à un récepteur de la cellule hôte (vert).

*Adaptée d'après Natasha L. Tilson-Lunel et al., Viruses, 2017, 9, 220 ; Alexander N. Freiberg et al., Journal of Virology, Nov. 2008, p. 10341–10348 et Mirabela Rusu et al., Front Microbiol. 2012 Jul 19;3:254.*

### b) Description du génome viral

Le vFVR possède un génome à ARN simple brin négatif tri-segmenté (Figure 4). Les segments S (« small »), M (« medium ») et L (« large »), nommés en fonction de leur taille, mesurent respectivement 1.7 kb, 3.8 kb et 6.4 kb (Pepin et al., 2010). Le segment S est ambisens et possède 2 cadres de lecture. La nucléoprotéine N est synthétisée dans le sens génomique tandis que la protéine NSs en anti-génomique. Le segment M code des protéines non structurales (NSm) et structurales (Gn/Gc). Il possède 5 cadres de lecture ouverts (ORFs) potentiels. Tandis que la protéine NSm (ou NSm2) est synthétisée à partir d'une polyprotéine codée par l'ORF 2, et sa forme tronquée (ou NSm') à partir de l'ORF 3, la protéine Gn peut être synthétisée à partir d'une polyprotéine codée par toutes les ORFs, hormis l'ORF 1. Ce dernier code une polyprotéine nommée « 78 kDa-Gc » qui, après clivage aboutit à la formation d'une protéine 78 kDa (ou NSm1) et Gc (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014). L'ORF 2 code une polyprotéine qui sera clivée par des protéases cellulaires aboutissant à la formation des protéines NSm, Gn et Gc (Gerrard and Nichol, 2007). Des mutagenèses

dirigées dans les séquences codant les cadres de lecture 1 et 2 du segment M ont mis en évidence l'expression de la protéine Gn à partir des ORFs 3, 4 et 5 (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014; Phoenix et al., 2016a). Deux peptides signaux sont localisés dans les ORFs 1 et 4 permettent l'adressage des protéines NSm1 et Gn dans le réticulum endoplasmique (Pepin et al., 2010). Enfin, le segment L code l'ARN polymérase virale.

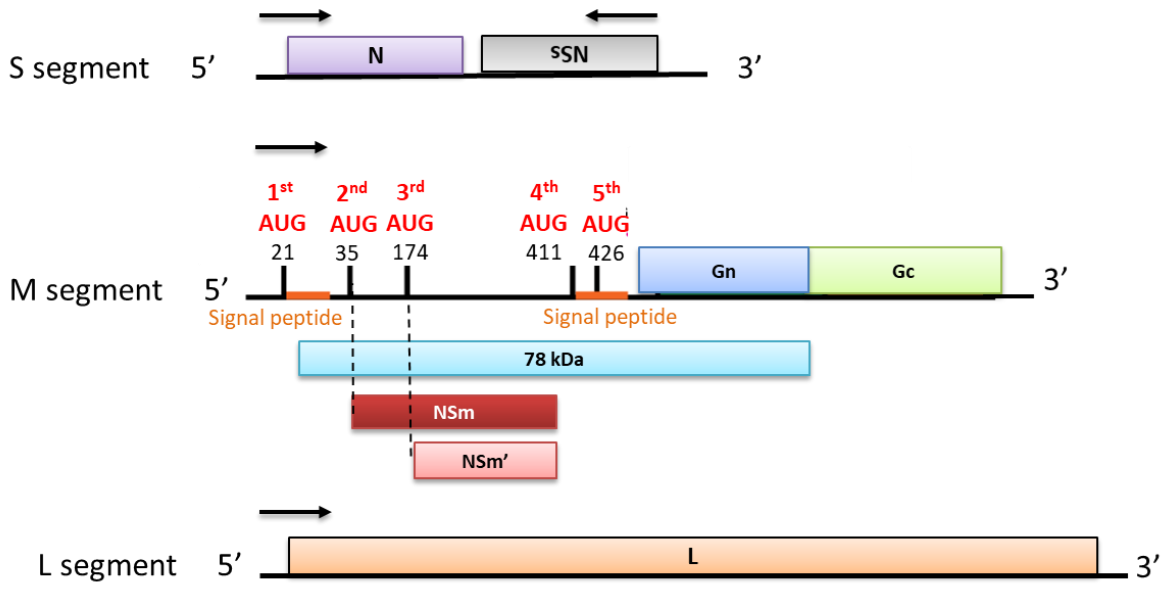



**Figure 4: Représentation schématique du génome viral**

Les 3 segments du génome viral ainsi que les protéines codées par chaque segment sont représentés. Les 5 cadres de lectures sont indiqués sur le segment M. Les peptides signaux (orange), les codons d'initiation (rouge) et leurs positions dans la séquence du segment M sont indiqués. Les flèches indiquent le sens l'orientation des phases ouvertes de lectures. *D'après Kaori Terasaki et al., J Innate Immun 2015;7:450–458 et Inaia Phoenix et al., Viruses 2016, 8, 151.*

### c) Les rôles des protéines virales

**Protéine N**

L'encapsidation du génome viral par la nucléoprotéine N le protège contre les dégradations par des nucléases (Osborne and Elliott, 2000). Cette protéine est l'antigène majeur du vFVR.

**Protéines Gn et Gc**

Les glycoprotéines de surface Gn et Gc jouent un rôle essentiel dans l'infection des cellules hôtes. La protéine Gn est impliquée dans l'attachement à la cellule (Besselaar and Blackburn, 1992; Ikegami, 2012). La protéine Gc est impliquée dans la fusion des membranes virales et cellulaires. Lors de l'endocytose du virus dans la cellule hôte, un changement conformationnel s'opère par le biais du pH acide et catalyse la fusion des membranes (de Boer et al., 2012; Filone et al., 2006; Liu et al., 2008). Exposées à la surface, ces glycoprotéines induisent la production d'anticorps neutralisants essentiels pour la protection (Faburay et al., 2016) et sont des candidates privilégiées pour des stratégies vaccinales contre le vFVR.

**Protéine NSs**

La protéine NSs est un facteur de virulence majeur. En effet, une diminution de la mortalité a été observée dans des souris déficientes pour le récepteur IFN de type I ($IFNAR^{-/-}$) après l'infection par le clone 13, une souche atténuée du vFVR qui présente une délétion de 549 nucléotides dans le gène codant la NSs (Bouloy et al., 2001). Les protéines NSs s'agrègent entre elles pour former des filaments dans le noyau des cellules infectées et modulent ainsi l'expression des gènes de l'hôte (Ly and Ikegami, 2016). NSs est impliquée dans l'inhibition de la réponse antivirale de l'hôte. Elle réprime la transcription générale dans la cellule infectée, incluant l'expression des facteurs impliqués dans la réponse IFN de type I (IFN-α, β). La protéine NSs est capable de séquestrer la sous-unité p44 et promeut la dégradation de p62, composante importante du complexe de pré-initiation de la transcription, TFIIH. NSs promeut également la dégradation de la protéine kinase ARN-dépendante (PKR) impliquée dans la défense cellulaire antivirale.

**Protéines NSm1, NSm, NSm'**

Le rôle des protéines non structurales NSm1, NSm et NSm' codées par le segment M n'a pas été complètement élucidé. Les protéines NSm et NSm' semblent avoir des propriétés anti-apoptotiques. La complémentation de la souche atténué MP-12 du vFVR déficiente pour les protéines non structurales (NSm1, NSm et NSm') du segment M par un plasmide qui code pour les protéines NSm et NSm' induit la diminution de l'activité des caspases (Won et al., 2007). Ces protéines ne seraient pas essentielles pour l'infection dans les cellules de mammifères puisque l'infection de cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain (Vero E6) par une souche recombinante MP-12 déficiente pour la région codant NSm1, NSm et

NSm' n'affecte pas la réplication du virus (Won et al., 2007). Les protéines NSm et NSm' semblent être des facteurs de virulence contrairement à la protéine NSm1 (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014). L'infection par une souche sauvage ZH548 du vFVR déficiente pour la synthèse de la protéine NSm1 chez des souris n'a aucun effet sur la virulence par rapport à la souche sauvage. La mutagenèse dirigée pour les ORFs codant seulement NSm ou NSm' n'a pas d'impact sur la virulence du virus après infection. En revanche, lorsque les ORFs permettant la synthèse de ces deux protéines sont mutés, la mortalité est fortement diminuée. La protéine NSm1 serait essentielle pour l'infection du virus dans les vecteurs. En effet, l'infection par la souche sauvage ZH548 déficiente pour la protéine NSm1 diminue l'infection et empêche sa dissémination dans les moustiques (Kreher Felix, Guillemot et al., 2014).

### d) Le cycle de réplication

La réplication virale des virus appartenant à l'ordre des *Bunyavirales* s'effectue dans le cytoplasme de la cellule hôte (Pepin et al., 2010) (Figure 6). Après l'attachement du virus à la cellule hôte, via la protéine Gn, et son endocytose, la protéine de fusion Gc change de conformation dans les endosomes sous l'influence du pH acide et induit la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. La ribonucléocapside est ainsi libérée dans le cytoplasme et subit une décapsidation.

Chaque segment d'ARN génomique viral est alors transcrit en ARNm par capture de coiffe d'ARNm cellulaire (« cap-snatching ») et sert de matrice pour la synthèse de brin d'ARN complémentaire (ARNc) (Pepin et al., 2010). Ce dernier sert à la fois pour la réplication de l'ARN viral génomique et la transcription d'ARNm codant la protéine NSs à partir du segment S ambisens.

Après traduction des ARNm par les ribosomes de la cellule hôte, les protéines N synthétisées dans le cytoplasme se lient spécifiquement aux segments des ARN viraux génomiques et aux ARNc. Le mécanisme impliqué dans la distinction entre les ARNm cellulaires et les ARN viraux génomiques ou complémentaires n'a pas été élucidé pour le vFVR. Cependant, pour d'autres virus de l'ordre des *Bunyavirales*, les Orthohantavirus, les protéines N reconnaissent spécifiquement une structure secondaire en manche (ou « panhandle ») dans les régions non codantes en 5' et 3' (Mir and Panganiban, 2005).

La traduction des ARNm viraux du segment M en polyprotéine a lieu dans les ribosomes associés à la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines Gn et Gc obtenues par clivage via des protéases cellulaires (Figure 5) s'associent en hétérodimère dans la lumière du RE et sont ensuite adressées vers l'appareil de Golgi grâce à un signal d'adressage présent au niveau de la queue cytoplasmique de la protéine Gn pour subir des modifications post-traductionnelles (Gerrard and Nichol, 2002) de type N-glycosylation (Phoenix et al., 2016b).

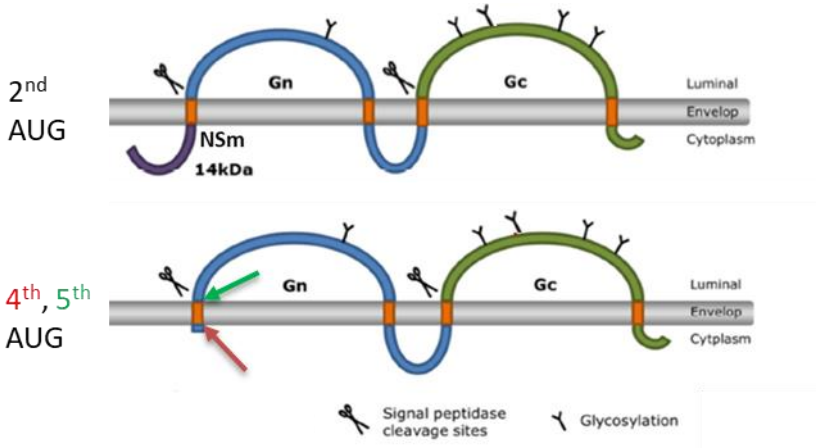



**Figure 5: Polyprotéines NSm-Gn-Gc et Gn-Gc**

Représentation schématique des polyprotéines générées à partir du codon d'initiation 2, 4 et 5. Les protéines NSm (violet), Gn (bleu) et Gc (vert) sont générés lors du clivage des précurseurs de polyprotéines. Les domaines transmembranires (rectangles orange), les sites de clivages (ciseaux) par des protéases et les sites de glycosylations (« Y ») sont indiqués. D'après Steffen Matthijn de Boer (2013). "General introduction" (chap. 1), dans *Rift valley virus glycoproteins, key to entry and control* », Pays-Bas: Proefschriftmaken.nl. p 21.

Les glycoprotéines virales s'accumulent dans les membranes des saccules golgiens et l'interaction des RNP avec les glycoprotéines Gc déclenche l'assemblage des virions à la membrane de l'appareil de Golgi (Pepin et al., 2010). Des particules détectives ou infectieuses bourgeonnent à travers le réseau trans-golgien et sont ensuite transportées vers le milieu extracellulaire via des vésicules d'exocytoses (Wichgers Schreur and Kortekaas, 2016).

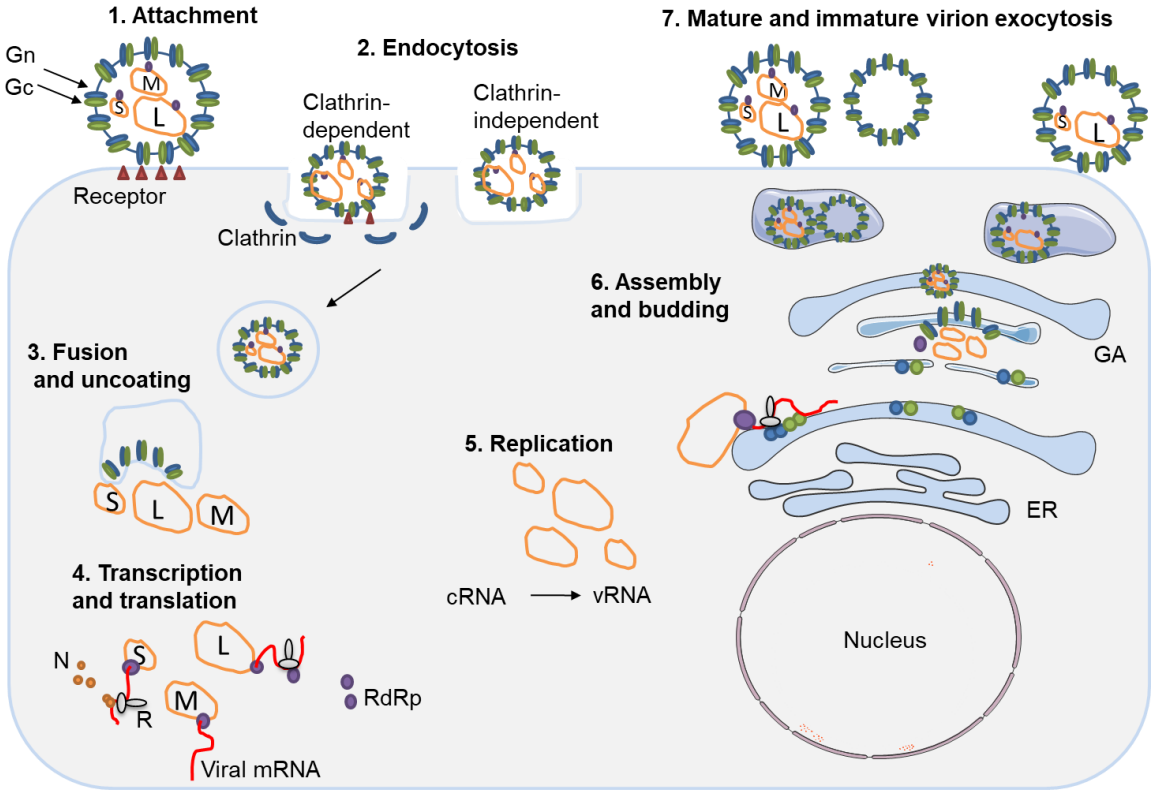



**Figure 6: Représentation schématique du cycle de réplication**

Après l'attachement du virus à la cellule hôte (1), les particules virales sont internalisées par un mécanisme clathrine-dépendant ou -indépendant (2). Sous l'acidification du pH, la protéine Gc change de conformation entrainant la fusion des membranes et la libération du génome viral suite à la décapsidation (3). Les segments L et S sont transcrits en ARNm et traduits (4) par les ribosomes (R) dans le cytoplasme aboutissant à la formation respectivement à l'ARN polymérase viral ARN-dépendante (RdRp) et la nucléoprotéine (N). Le segment M est transcrit en ARNm et la traduction aboutit à la formation de la polyprotéine dans le réticulum endoplasmique (ER). Les protéines Gn et Gc obtenues après clivage par des protéases sont adressées vers l'appareil de Golgi (GA). Suite à la réplication des segments d'ARN viraux génomiques (5), l'assemblage et le bourgeonnement des virions s'effectuent au niveau de l'appareil de Golgi (6). Les virions immatures et matures sont relargués dans le milieu extracellulaire par exocytose (7). *Adaptée de Paul J. Wichgers Schreur et al.*, PLoS Pathog 12(8): e1005800.

### e) Les récepteurs cellulaires impliqués dans l'attachement

Les récepteurs de type C-lectine DC-SIGN et L-SIGN ainsi que l'héparane sulfate semble être impliqués dans l'attachement. Le récepteur DC-SIGN, exprimé sur les DCs dermiques ainsi que sur les macrophages, possède un domaine de reconnaissance de motifs glucidiques (« carbohydrate domain recognition ») et est donc un candidat potentiel pour la reconnaissance des protéines virales hautement glycosylées du vFVR. Pour montrer son implication dans l'attachement, des cellules cancéreuses d'origine humaine (HeLa) et des cellules dérivées d'un lymphome de Burkitt (Raji) surexprimant le récepteur DC-SIGN ont été infectées par le vFVR. Le pourcentage de cellules infectées était drastiquement augmenté dans ces cellules et l'infection était significativement diminuée en présence d'un anticorps anti-DC-SIGN (Lozach et al., 2011). Le rôle du récepteur L-SIGN a été mis en évidence de façon similaire. Exprimé sur les cellules endothéliales et les hépatocytes, il partage 77% d'homologie au niveau de sa séquence en acides aminés avec celle du récepteur DC-SIGN (Léger et al., 2016). Le pourcentage de cellules infectées était augmenté dans ces cellules Raji surexprimant L-SIGN (Léger et al., 2016). L'héparane sulfate, un polysaccharide présent à la surface des cellules contribuerait aussi à l'infection dans les cellules hôtes. L'infection de cellules d'ovaires d'hamster de Chine (CHO) par le vFVR était abolie lorsque ces dernières sont rendues déficientes en héparanes sulfates par traitement enzymatique (Boer et al., 2012).

### f) La diversité génétique vFVR

A ce jour, il existe 416 souches du vFVR selon la banque de données Virp (« Virus Pathogen Resource ») et qui sont regroupées en un seul sérotype. En général, les virus à ARN possèdent une ARN polymérase peu fidèle par rapport aux virus à ADN (Sanjua, 2016). Cependant les analyses phylogénétiques du vFVR ont montré une bonne conservation du génome viral. L'alignement des différents segments de 33 souches sauvages du vFVR isolées à partir de patients ou de ruminants infectés en Afrique et en Arabie Saoudite lors des épidémies survenues entre 1944 et 2000 a montré une faible divergence entre les segments S, M et L de 4%, 5% et 4% respectivement au niveau des séquences nucléotidiques et de 1%, 2% et 1% respectivement au niveau des séquences en acides aminés (Bird et al., 2007). Le mécanisme par lequel cet arbovirus maintient une stabilité de son génome au cours de l'évolution reste à élucider. Une étude a montré l'apparition de mutations et délétions dans le génome viral

(gène codant NSs) du vFVR après des passages successifs dans des cellules d'insectes ou de mammifères, contrairement à des passages successifs alternés entre les deux types de cellules (Moutailler et al., 2011). Ces résultats soulèvent des questions sur la pertinence des modèles *in vitro*, la représentativité du nombre de passages par rapport à une situation écologique et restent à être confirmés dans des modèles *in vivo*. Ils suggèrent que le vFVR doit se maintenir à bas bruit par infection entre les moustiques, les rongeurs et les ruminants sauvages. Des questions sur l'adaptation du vFVR face à la pression évolutive pour cet arbovirus restent en suspens.

Des réassortiments possibles entre différentes souches ont été mis en évidence à travers différentes analyses phylogénétiques. Une analyse réalisée à partir d'une portion du segment M issue de 203 souches sauvages a montré 15 lignées distinctes (Figure 7) (Grobbelaar et al., 2011). Cette analyse a également mis en évidence des réassortiments possibles entre une souche vaccinale et sauvage. L'alignement des séquences du génome viral d'une souche isolée (SA184/10, lignée K) chez un patient accidentellement infecté lors d'une immunisation par le vaccin atténué Smithburn (lignée K) a montré une similitude entre les séquences nucléotidiques entre une portion du segment M de la souche vaccinale et une portion des segments S et L de la souche sauvage SA54/10 (lignée H) (Grobbelaar et al., 2011). D'autres études ont mis en évidence des réassortiments possibles en alignant des séquences NSs, Gn et L entre 18 souches sauvages (Sall et al., 1999). L'établissement d'arbres phylogénétiques a montré le regroupement des souches en 2 clusters majoritaires nommés I (Ia et Ib) et II. Le cluster I regroupe des souches isolées en Afrique Sub-Saharienne et le II regroupe des souches isolées dans d'autres régions (Egypte, Madagascar). La distribution des souches dans un cluster est similaire entre ces différents alignements. Pour certaines d'entre elles, les analyses ont montré un groupement dans un cluster différent selon les gènes comparés, suggérant des réassortiments de segments possibles entre elles.

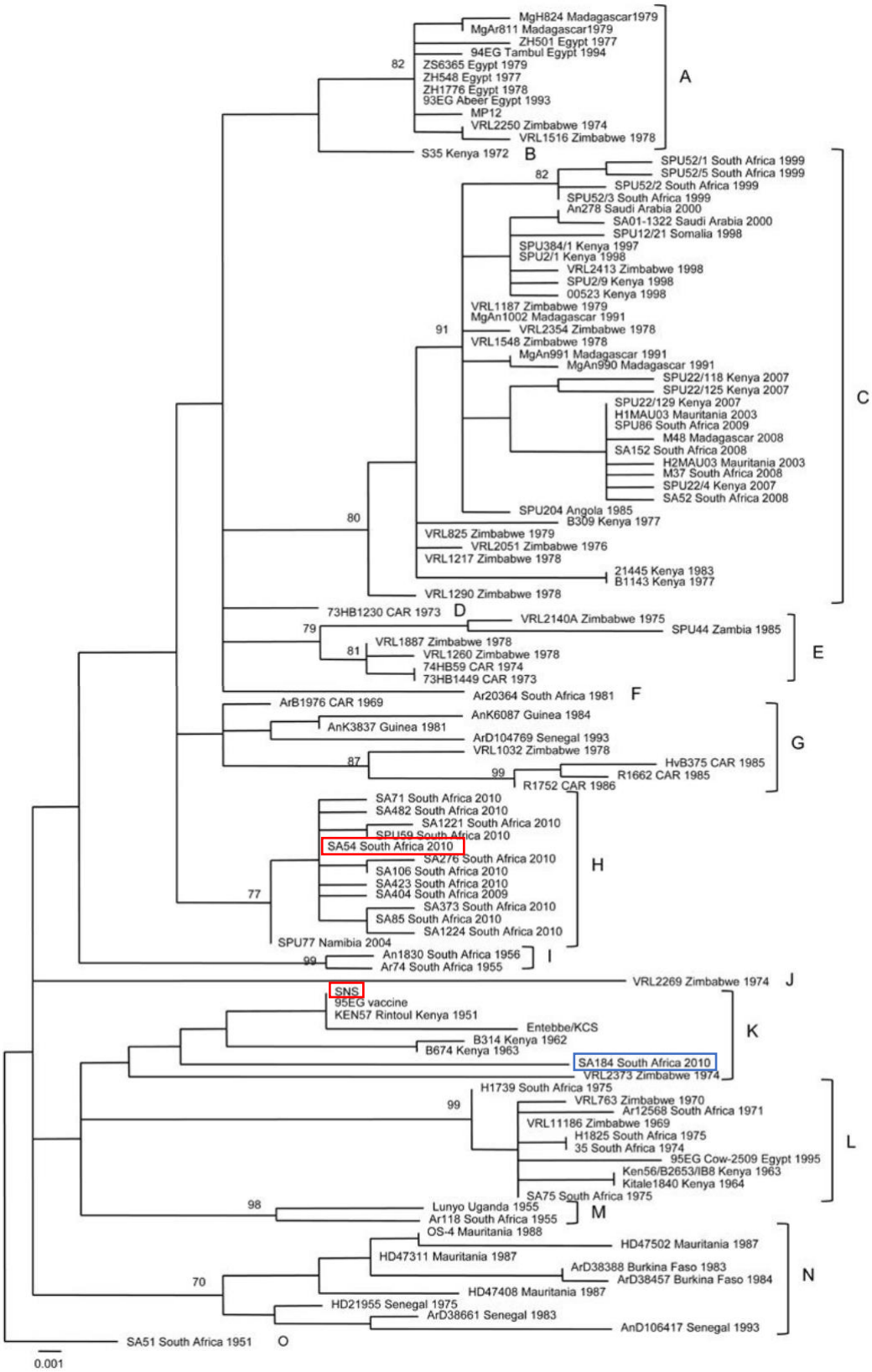



**Figure 7: Arbre phylogénétique du virus de la fièvre de la vallée du Rift**

Les lignées génétiques (A à O) de 111 isolats du vRVF, basées sur une portion du gène codant Gn (490-nt). Les noms, pays d'origine et date d'isolement sont indiqués. Les souches Smithburn (SNS), SA54 (rouge) et la souche réassortie SA184 (bleu) sont encadrées. L'échelle indique le pourcentage de substitutions par site. D'après *Grobbelaar et al., Emerging Infectious Diseases Vol. 17, No. 12, December 2011.*

## 5. Epidémiologie

Depuis sa caractérisation au Kenya en 1930, le vFVR s'est propagé dans les pays de l'Afrique du Sud-Est (Zimbabwe, Tanzanie, Namibie et Zambie) jusqu'en Afrique du Sud puis dans l'ensemble du continent africain jusqu'en Afrique du Nord (Mauritanie, Sénégal et Egypte) et en dehors du continent africain, au Moyen-Orient (Yémen, Arabie Saoudite). Il s'est également introduit dans certaines îles de l'océan Indien (Comores, Madagascar et Mayotte) (Nanyingi et al., 2015). Cette distribution géographique du pathogène serait liée aux échanges commerciaux intracontinentaux de bétails et à la circulation des espèces de moustiques compétentes. La fièvre de la vallée du Rift est maintenant considérée comme une zoonose endémique en Afrique avec une occurrence tous les 5 à 10 ans liée à la survenue de fortes précipitations conduisant à l'éclosion en masse de moustiques. Les épidémies occasionnent des pertes économiques importantes estimées de l'ordre du million de dollars (Nanyingi et al., 2015). Bien que la distinction n'ait pas été faite entre la mortalité chez des animaux infectés et abattus, les épidémies les plus graves ont été enregistrées en Afrique du Sud en 1951 avec des pertes estimées à 100 000 moutons et 500 000 avortements, au Kenya entre 2006-2007 avec 375 décès humains, en Egypte entre 1977-1978 avec 600 décès humains. Les épidémies étaient confinées au continent africain jusque dans les années 2000 puis des épidémies ont été rapportées en Arabie Saoudite et au Yémen avec plus de 300 décès humains et des pertes estimées à 7000 têtes de bétail. L'introduction du vFVR dans d'autres continents et la présence de patients et/ou de ruminants séropositifs pour le vFVR dans certains pays non-endémiques du Maghreb (Tunisie (Ayari-Fakhfakh et al., 2011), Maroc (Shari et al., 2011)) suscitent des inquiétudes sur une potentielle introduction dans les pays du bassin méditerranéen de l'Europe, où se trouvent des moustiques du genre *Aedes* et *Culex* compétents pour la propagation du virus (Moutailler et al., 2008). En effet, bien que le risque d'introduction en Europe soit faible par l'interdiction réglementaire d'importation de bétail provenant des pays endémiques, les échanges illégaux de bétail infecté vers l'Europe ne peuvent pas être exclus (Chevalier et al., 2010).

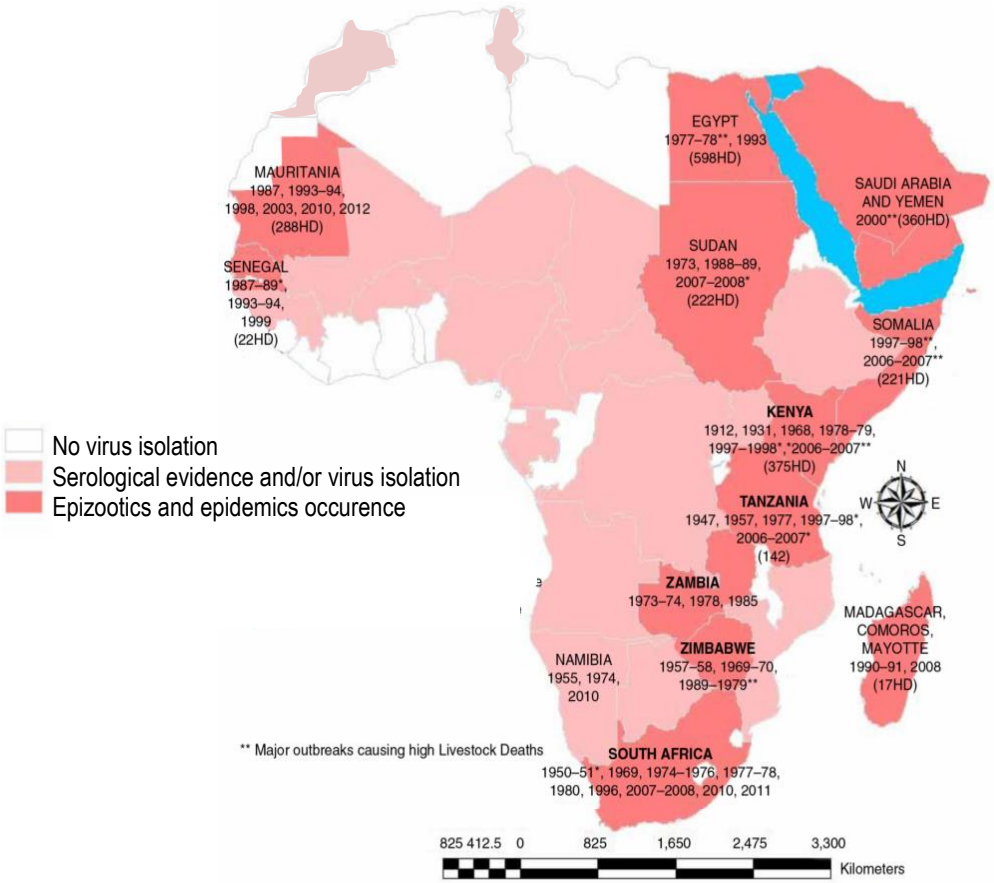



**Figure 8 : Situation épidémiologique de la fièvre de la vallée du Rift (1994-2014)**

Carte de l'Afrique et de la péninsule arabique illustrant la distribution spatiale et temporelle de la fièvre vallée du Rift depuis les premiers cas suspects en 1912 jusqu'en 2014. Le nombre total de décès humains (HD) est indiqué durant les épidémies. D'après Nanyingi et al., Infection Ecology and Epidemiology 2015, 5: 28024

## B. Les stratégies vaccinales contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Pour prévenir l'infection par le vFVR, des vaccins à usage vétérinaire et pour l'Homme ont été développés. Seuls les vaccins à usage vétérinaire sont commercialisés dans les pays endémiques à l'heure actuelle. Dans les pays non-endémiques, aucun vaccin n'est disponible. Nous verrons dans cette partie les différents types de vaccins utilisés en zone endémique, leur efficacité et les nouvelles stratégies vaccinales développées contre le vFVR qui pourraient être à la fois utilisées en zones endémiques et non endémiques.

### 1. Les vaccins contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift

#### a) Les vaccins conventionnels

##### i. Les virus inactivés

Les vaccins inactivés sont produits à partir d'agent pathogène rendu inactif ou « tué » par traitement thermique ou chimique. Les vaccins inactivés à la formaline ont été les tout premiers développés contre le vFVR (Faburay et al., 2017; Ikegami, 2017).

Deux vaccins ont ainsi été développés et testés chez l'Homme mais n'ont pas été commercialisés. Ils ont été utilisés pour protéger les professionnels (principalement les personnels de laboratoire et les militaires) qui étaient exposés au vFVR en Afrique. Le premier vaccin, appelé NDBR 103, a été produit à partir de la souche sauvage Entebbe du vFVR isolée chez le moustique en Ouganda. Dans un premier temps, le virus a été atténué par 184 passages par voie intrapéritonéale ou intraveineuse chez la souris, puis amplifié en cellules Vero. Il a ensuite été inactivé à la formaline pour obtenir le vaccin. Des vaccinations ont été réalisées chez 963 militaires et ont montré l'induction d'une réponse humorale neutralisante à long terme après 3 injections sous-cutanées. L'innocuité de ce vaccin semblait satisfaisante mais un des sujets a développé un syndrome de Gulllain-Barré (Niklasson, 1982; Niklasson et al., 1985). Un autre vaccin appelé TSI GSD 200 à partir de la même souche mais avec deux passages supplémentaires dans des fibroblastes pulmonaires de singe (FRhL-2) (Ikegami and Makino, 2010). Un essai a été réalisé chez l'Homme et a montré des résultats similaires. Après 3 injections sous-cutanées, le vaccin a induit des anticorps neutralisants à long terme et aucun effet secondaire grave n'a été observé (Rusnak et al., 2011).

En revanche à ce jour, il existe trois vaccins inactivés commercialisés à usage vétérinaire. Ils ont été produits à partir de :

- La souche sauvage ZH501 isolée chez un patient durant l'épidémie de 1977 en Egypte et amplifiée en cellules rénales de hamster (BHK-21) puis inactivée à la formaline (Veterinary Serum and Vaccine Research Institute) (Botros et al., 2006).
- La souche sauvage Menya/sheep/258 isolée chez un mouton infecté, inactivée à la formaline (VACSERA) (Ahmed Kamal and Kamal, 2011).
- Une souche sauvage isolée chez une vache infectée, atténuée après 6 passages par voie intracérébrale chez la souris puis amplifiée en BHK-21 et inactivée à la formaline (Onderstepoort Biological Products) (Barnard and Botha, 1977).

Des études ont montré que les vaccins inactivés étaient capables d'induire des anticorps neutralisants chez les ruminants sans entraîner des effets secondaires (Lagerqvist et al., 2012). Toutefois ces vaccins inactivés n'ont pas conféré une immunité stérilisante et ne protégeait pas contre les avortements. Après 3 immunisations avec le vaccin inactivé chez des brebis gestantes, des avortements ont été observés durant une épidémie. Malgré la présence d'anticorps neutralisants circulants induits par le vaccin, une virémie a été mesurée et pourrait entrainer l'infection des tissus placentaires conduisant à des avortements (Barnard and Botha, 1977). De plus, plusieurs immunisations sont nécessaires pour conférer une bonne protection et ils présentent un coût élevé pour les éleveurs aux ressources limitées.

### i. Les virus atténués

Des vaccins atténués ont été créés pour conférer une réponse immunitaire protectrice en une seule injection. Le pathogène dit « atténué » est capable de se répliquer et possèdent une virulence diminuée suite à des passages successifs dans des cellules *in vitro*, dans des œufs embryonnaires de poulet ou chez la souris.

Le vaccin atténué Smithburn a été le premier développé et utilisé en Egypte, en Arabie Saoudite, au Kenya, Zimbabwe et en Namibie (Faburay et al., 2017). Cette souche a été isolée à partir d'un pool de moustiques en Ouganda en 1944, amplifiée dans des embryons de poulet puis atténuée par passages successifs soit dans des souris par injection intracérébrale et embryons de poulet, soit dans des souris par injection intracérébrale et dans des cellules BHK-

21. Bien qu'il a montré une protection avec une seule immunisation chez des ruminants adultes (Warimwe et al., 2016), il a entrainé des avortements chez les vaches gestantes (Botros et al., 2006). Son utilisation serait également associée à un réassortiment possible avec une souche sauvage (Grobbelaar et al., 2011) comme évoqué dans les parties précédentes (cf. partie IV.A.4.f).

Un autre vaccin atténué, la souche MP-12, a été créé pour une utilisation potentielle à la fois chez les ruminants et l'Homme. Cette souche a été obtenue à la suite de plusieurs passages successifs de la souche sauvage ZH548, isolée chez un patient infecté durant l'épidémie de 1977 en Egypte, dans des cellules épithéliales humaines du poumon (MRC-5) en présence d'agent chimique mutagène (5-fluorouracil). Les immunisations par voie orale, intranasale ou intramusculaire chez le primate non humain à différentes doses ($10^3$ ou $10^4$ pfu) ont montré l'induction d'anticorps neutralisants et l'absence d'effets secondaires (Morrill and Peters, 2011a, 2011b). Un essai clinique chez l'Homme a montré des résultats encourageants suite à la vaccination par MP-12. Des anticorps neutralisants ont été induits et étaient détectables 5 ans après l'immunisation (Pittman et al., 2016). Chez les brebis et vaches gestantes (Morrill et al., 1997) et chez les agneaux nouveau-nés (Morrill et al., 1991), qui sont des cibles prioritaires à protéger, le vaccin atténué MP-12 a induit la production d'anticorps neutralisants et a protégé contre une infection expérimentale. Malgré ces résultats encourageants, d'autres études ont observé des effets secondaires chez des femelles gravides en début de gestation suite à la vaccination (Hunter et al., 2002).

L'innocuité de ce vaccin atténué est donc discutable, d'autant plus que des risques de réversions sont possibles. L'alignement des séquences nucléotidiques de la souche atténuée par rapport à la souche originale ZH548 a montré 23 mutations réparties dans les 3 segments du génome viral. Trois mutations critiques localisées sur les gènes codant les protéines structurales Gn/Gc et l'ARN polymérase étaient suffisante pour conduire à une réversion de la souche atténuée (Ikegami et al., 2015).

### b) Les vaccins de nouvelle génération

Face aux inconvénients des vaccins conventionnels, de nouveaux vaccins ont été développés. Les progrès en génie génétique, une meilleure compréhension de la virulence du vFVR et des réponses immunitaires impliquées dans la protection ont permis l'élaboration de nouvelles approches vaccinales contre le vFVR basées sur les propriétés suivantes : une immunogénicité à long terme et une protection idéalement en une seule vaccination, une innocuité, un coût de production abordable, une grande stabilité et la possibilité de distinguer un individu vacciné d'un individu infecté (DIVA, « Differentiating Infected from Vaccinated Animals »).

#### i. Les vaccins recombinants sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires sont constitués par une ou plusieurs protéines du pathogène utilisée(s) comme antigène. On distingue les vaccins sous-unitaires géniques, protéiques ou des pseudo-particules virales exprimant les antigènes d'intérêts (ou virus like particle « VLP ») (Faburay et al., 2017). Les glycoprotéines structurales Gn, Gc ont été les antigènes les plus utilisés dans cette stratégie.

**-Les vaccins sous-unitaires géniques**

Chez la souris, l'efficacité de la vaccination à ADN contre le vFVR est mitigée. L'injection d'un plasmide codant Gn et Gc par voie intramusculaire n'a pas induit d'anticorps neutralisants et n'a pas conféré de protection chez la souris (Wallace et al., 2006). La vaccination à ADN délivrée par « gene gun » contre le vFVR a montré des résultats prometteurs chez la souris. Cette méthode consiste à transfecter les cellules par propulsion de billes microscopiques sur lesquelles est adsorbé l'ADN (cf. partie IV.D.2.b). Trois immunisations avec un plasmide codant pour les glycoprotéines structurales Gn et Gc délivré par « gene gun » a induit des anticorps neutralisants et une protection totale chez la souris (100% de survie) (Spik et al., 2006). Une autre étude a montré la capacité d'un plasmide codant l'ectodomaine de la glycoprotéine Gn (eGn) délivré par la même méthode à induire de faible niveaux d'anticorps neutralisants et une protection partielle après 3 immunisations (80% de survie). Le potentiel vaccinal de la nucléoprotéine N a également été testé par « gene gun ». Quatre immunisations avec un plasmide codant la protéine N a induit la production

d'anticorps spécifiques et semblent conférer une protection partielle chez la souris (Lagerqvist et al., 2009). En effet, le nombre de souris présentant des signes cliniques après une infection expérimentale était diminué par rapport aux souris immunisées par un plasmide contrôle. Cependant dans cette étude, l'infection par la souche ZH548 n'a pas entraîné de mortalité contrairement à d'autres études (do Valle et al., 2010; Kreher Felix, Guillemot et al., 2014) et ce résultat ne nous permet pas de confirmer l'efficacité du plasmide vaccinal testé.

La vaccination à ADN contre le vFVR a été testée chez le mouton. Trois immunisations par un plasmide codant les protéines NSm-Gn-Gc mélangé avec de la lipofectin par voie intradermique et intramusculaire n'a induit aucune réponse cellulaire ni de production d'anticorps détectables (Lorenzo et al., 2008).

**-Les vaccins sous-unitaires protéiques**

L'immunisation par l'ectodomaine de la glycoprotéine Gn (eGn) produite en cellules d'insectes en présence d'adjuvant a induit des anticorps neutralisants et a conféré une protection contre une infection expérimentale chez la souris (100% de survie) (de Boer et al., 2010). Des résultats similaires ont été confirmés chez l'agneau. La protéine eGn a conféré une protection clinique (absence de fièvre) mais une virémie résiduelle était détectable, bien qu'elle était significativement diminuée par rapport aux agneaux non vaccinés (Kortekaas et al., 2012). Une autre étude a également montré l'induction d'anticorps neutralisants et une protection complète (absence de virémie et de fièvre) médiée par l'immunisation concomitante des protéines eGn et Gc chez le mouton (Faburay et al., 2016). De manière similaire à la vaccination par un plasmide codant la protéine N, l'immunisation par la protéine N a induit une protection partielle chez la souris (60% de survie) (Wallace et al., 2006).

**-Les VLPs**

Les VLPs exemptes de matériel génétique sont produites par transfection ou transformation de plasmide codant les protéines virales d'intérêt dans des systèmes d'expressions eucaryotes ou bactériens (Vicente et al., 2011). Les protéines recombinantes s'auto-assemblent et forment des VLPs qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Elles possèdent l'avantage d'être inoffensives et de présenter une morphologie similaire au virus. L'immunisation par des VLPs portant les glycoprotéines Gn et Gc (VLP-GnGc) en l'absence ou en présence

d'adjuvant a induit des anticorps neutralisants (Boer et al. 2010). Les souris immunisées avec des VLP-GnGc en présence d'adjuvant étaient totalement protégées contre une infection expérimentale (100% survie, ARN viral non détectable dans le cerveau et le foie). L'ensemble des études indique le potentiel vaccinal prometteur des VLPs contre le vFVR mais une limite majeure de cette stratégie vaccinale est son coût de production élevé à grande échelle (Faburay et al., 2017).

### ii. Les vecteurs viraux

Cette stratégie consiste à réaliser une expression hétérologue d'un antigène d'intérêt dans un virus par génie moléculaire. Des essais chez le mouton ont montré l'induction d'anticorps neutralisants contre le vFVR suite à l'immunisation par le virus recombinant de l'herpès équine (EHV-1-GnGc) (Said et al., 2017). Les études ont montré des résultats mitigés sur la protection contre le vFVR selon le vecteur viral employé. L'immunisation par le virus de la dermatose contagieuse exprimant Gn et Gc (LSDV-GnGc) (Wallace et al., 2006) ou le virus recombinant de la maladie de Newscastle exprimant également ces deux glycoprotéines (NDV-GnGc) (Kortekaas et al., 2012) a induit une protection clinique (absence de fièvre) chez des moutons. Une autre étude a montré une protection et l'induction de titres élevés d'anticorps neutralisants ($\geq 10^3$) chez les bovins, caprins et ovins par l'utilisation d'un adénovirus simien exprimant Gn et Gc (ChAdOx1-GnGc) (Warimwe et al., 2016). Des titres anticorps neutralisants plus modestes ont été mesurés chez les camélidés vaccinés par ce vecteur. Il pourrait être un candidat potentiel pour un essai clinique chez l'Homme. Enfin, une étude n'a montré aucune protection chez des agneaux immunisés par le poxvirus Vaccinia Ankara exprimant Gn et Gc (MVA-GnGc) suite à une infection expérimentale (Busquets et al., 2014).

### iii. Les virus génétiquement atténués

Le clone 13 fut le premier virus génétiquement atténué et il est utilisé comme vaccin en santé vétérinaire depuis 2010 (Faburay et al., 2017). Isolé chez un cas humain non fatal infecté par le vFVR, l'analyse de son génome a montré une délétion de 69% du gène codant pour le facteur de virulence NSs (Muller et al., 1995). Cette souche naturellement atténuée a montré son innocuité (absence de fièvre, d'avortement ou de malformation du fœtus) et sa capacité à

induire des anticorps neutralisants chez des ruminants (moutons, chèvres, bovins) non gestantes et gestantes à différents temps de gestation (Dungu et al., 2010; Njenga et al., 2015). Cependant, une autre étude a montré la capacité de la souche atténuée à traverser la barrière placentaire et à induire des avortements et des malformations chez des brebis gestantes suite à la vaccination par le clone 13 à des doses élevées (~7 log10 TCDI50) (Makoschey et al., 2016). Plus récemment une souche clone 13 thermostable a montré son efficacité et son innocuité chez des chamelles gestantes (Daouam et al., 2016).

D'autres souches atténuées ont été créées par l'introduction de délétions dans le génome viral à partir de la souche sauvage virulente ZH501 ou de la souche atténuée MP-12. L'immunisation par la souche ZH501 présentant une double délétion des gènes codant NSs et NSm induit des anticorps neutralisants, n'entraine pas d'avortement et confère une protection complète chez les brebis gestantes suite à une infection expérimentale (absence virémie et de fièvre) (Bird et al., 2011). Des résultats encourageants ont été obtenus avec les souches MP-12 déficientes pour le gène NSm (arMP-12-ΔNSm21/384) et NSs (arMP-12ΔNSs16/198). Leur innocuité a été montrée chez des brebis gestantes et la souche arMP-12ΔNSs16/198 a montré une plus faible immunogénicité que la souche arMP-12-ΔNSm21/384 (Morrill et al., 2013). Après une injection de la souche arMP-12-ΔNSm21/384, des anticorps neutralisants sont induits chez des moutons (Weingartl et al., 2014) et protège contre une infection expérimentale chez le mouton (Weingartl et al., 2014).

Une autre souche atténuée particulière, qui présente une délétion pour le gène codant NSs et contenant 4 segments, nommée « RVFV-4s », a été créée en séparant le segment M en 2 segments (l'un code une polyprotéine NSm-Gn et l'autre Gc) (Schreur et al., 2017). A haute dose ($10^{7.1}$ TCID50), ce vaccin induit des anticorps neutralisants, n'induit pas d'effet secondaire chez des brebis gestantes et n'est pas capable de traverser la barrière placentaire.

Enfin, une souche réassortie nommée R566 et qui possède le segment S du clone 13 et les segments L et M de la souche MP-12 a été créée par co-infection *in vitro* dans des cellules Vero (Kortekaas et al., 2014). Chez des agneaux expérimentalement infectés, une seule injection de ce réassortant induit une protection partielle (virémie détectée) par rapport à celle observée avec le clone 13.

Bien que ces vaccins atténués, plus sûrs que les vaccins de première génération, semblent être prometteurs, le risques de réversion, qui ne peut pas être totalement exclu, représente leur inconvénient majeur.

## 2. Les modèles d'études

Deux modèles principaux ont été utilisés pour l'étude de l'efficacité des vaccins contre le vFVR : la souris et le mouton, l'hôte naturel le plus susceptible du virus.

### a) La souris

La souris est un modèle d'étude qui a été largement utilisé pour l'étude de l'efficacité de candidats vaccins contre le vFVR. En effet, la souris est sensible à l'infection par le vFVR et les symptômes qu'elle développe sont assez similaires à ceux observés chez l'Homme (Smith et al., 2010). Selon le fond génétique (BALB/c, C57BL/6, MBT/Pas), le sexe (Tokuda et al., 2016), la voie d'infection, la dose (létale, sub-létale) (Dodd et al., 2014), et la souche virale utilisée, 4 issues possibles ont été observées suite à l'infection: une infection asymptomatique, une infection résolutive, une infection avec atteinte hépatique fulminante ou une évolution lente et progressive vers des troubles neurologiques (encéphalite, paralysie des membres).

L'infection aigüe par le vFVR est caractérisée une phase aiguë associée à une léthargie (Ikegami and Makino, 2011), une atteinte hépatique caractérisée par une augmentation d'enzymes du foie dans le sang et une mortalité qui survient entre 3 et 5 jours post-infection (Lathan et al., 2017; Smith et al., 2010). Une étude a montré que l'infection par le vFVR a une atteinte majoritairement hépatique (Gommet et al., 2011). Des analyses post mortem ont montré des nécroses des hépatocytes ainsi que des lésions dans les organes lymphoïdes (rate, thymus) (Smith et al., 2010).

Pour les souris infectées ayant survécu à cette phase aigüe, l'infection est soit résolutive (Lathan et al., 2017) soit des troubles neurologiques apparaissent. Une infection des cellules neuronales est observée à des temps d'infection plus tardifs (≥ 8 jours) (Smith et al., 2010) qui s'accompagne d'une réaction inflammatoire avec une infiltration de lymphocytes T dans le cerveau (Dodd et al., 2014).

Les différences de sensibilité observées entre les lignées suite à l'infection par le vFVR ont été associées à des facteurs génétiques de l'hôte. La susceptibilité a été comparée entre une souris sauvage issue d'un ancêtre *Mus musculus musculus* appelée MBT/Pas capturée en 1980 et une souris consanguine classique BALB/c (do Valle et al., 2010). L'infection de souris MBT/Pas entraine une mortalité de 100% à des temps précoces avec une virémie élevée (do

Valle et al., 2010; Lathan et al., 2017) tandis que l'infection des souris BALB/c entraine une virémie plus faible, une mortalité plus tardive ou une infection résolutive/asymptomatique (20% de survie). Cette sensibilité contraste avec la résistance des souris MBT/Pas au virus de la grippe ou au virus de la fièvre de West Nile. La comparaison des réponses immunitaires suite à l'infection a montré la mise en place d'une réponse antivirale interféron de type I plus faible et tardive chez des souris MBT/Pas qui serait à l'origine de cette sensibilité. Enfin, une autre étude a également montré une résistance plus élevée chez des femelles BALB/c par rapport aux mâles indiquant une susceptibilité en fonction du sexe (Tokuda et al., 2016).

#### b) Le mouton

Le mouton est un modèle idéal pour l'étude de l'efficacité des vaccins contre le vFVR puisqu'il figure parmi les hôtes naturels les plus sensibles. Les infections expérimentales de moutons de races européennes (Busquets et al., 2010; Faburay et al., 2016; Kortekaas et al., 2012) ou africaines (Tomori and Schmitz, 1996) et d'âges différents par différentes souches sauvages du vFVR ont montré des symptômes similaires à une infection naturelle (cf. partie IV.A.3.c).

### 3. Les réponses immunes impliquées dans la protection

#### a) Les réponses humorales

La production d'anticorps neutralisants est un critère déterminant qui est systématiquement recherché lorsque des vaccins sont testés chez les ruminants. Les études pionnières réalisées par Baesselar et Blackburn ont montré le rôle protecteur des anticorps monoclonaux neutralisants anti-Gn et anti-Gc contre le vFVR par transfert passif chez la souris (Besselaar and Blackburn, 1991). Ainsi l'immunisation par les vaccins sous-unitaire basés sur eGn, Gn et Gc induit des anticorps neutralisants. Les sites de liaisons reconnus par certains anticorps monoclonaux neutralisants protecteurs anti-Gn sont exposées à la surface de la partie globulaire de Gn (eGn) (Rusu et al., 2012). Des analyses structurales ont identifié deux domaines particuliers situés dans cette partie globulaire reconnue par des anticorps neutralisants. L'un d'entre eux présente une structure conservée parmi les virus du genre

*Phlebovirus* et serait potentiellement ciblé par des anticorps à spectre large tandis que l'autre domaine présente une structure spécifique au vFVR (Wu et al., 2017). L'ensemble de ces études indique que la protéine Gn et plus particulièrement eGn est une cible vaccinale pertinente.

De manière intéressante, l'immunisation par le clone 13 chez des veaux a induit de faibles titres d'anticorps neutralisants (1/32 à 1/64) par rapport à ceux observés chez les veaux vaccinés par la souche atténuée Smithburn (1/192 à ≥1/562) et a conféré une protection contre une infection expérimentale (Von Teichman et al., 2011). Des anticorps non neutralisants pourraient être induits par la vaccination et leurs rôles ainsi que ceux des LTs restent à être étudiés dans la protection. Une autre étude a mis en évidence une protection partielle médiée par des anticorps anti-eGn faiblement neutralisants par transfert passif chez la souris, suggérant leur rôle substantiel durant l'infection (Bhardwaj et al., 2010). A l'heure actuelle, le mécanisme d'action des anticorps neutralisants et non neutralisants n'a pas été élucidé.

Les anticorps dirigés contre la nucléoprotéine N ne sont pas neutralisants et n'ont probablement pas un rôle majeur dans la protection. Toutefois, une étude a montré que l'immunisation des souris par la protéine N purifiée a induit des anticorps non neutralisants et les souris ont été partiellement protégées après une infection expérimentale. Le rôle des anticorps et la contribution de la réponse cellulaire anti-N n'ont pas été analysés dans cette étude (Wallace et al., 2006).

### b) Les réponses cellulaires

Le rôle des réponses cellulaires dans la protection contre une infection par le vFVR a été peu exploré. Pour identifier les rôles respectifs des LTs $CD4^+$ et LTs $CD8^+$, une expérience de déplétion des LTs a été réalisée par injection d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 chez des souris naïves avant une épreuve virale (Dodd et al., 2013). Classiquement, l'infection par une souche sauvage ZH501 induit une mortalité rapide dès 2 à 4 jours post-infection chez des souris naïves (Dodd et al., 2012; Mandell et al., 2010). Dans cette étude de déplétion des LTs, les auteurs ont choisi d'utiliser une souche atténuée ZH501 qui possède une délétion pour le gène NSs (ZH501ΔNSs) comme modèle pour l'infection pour comprendre l'importance des réponses cellulaire et humorale mises en place au cours de l'infection. La déplétion les LTs

$CD8^+$ n'a pas impacté pas la survie suite à une infection expérimentale avec la souche ZH501ΔNSs. En revanche, la déplétion des LT $CD4^+$ a affecté la production d'anticorps neutralisants, la clairance virale, a diminué la survie (60%) et a induit des lésions neurologiques plus sévères après infection par la souche ZH501ΔNSs par rapport aux souris naïves contrôles. Ces résultats suggèrent que les LT $CD4^+$ ont un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire anti-vFVR et la clairance virale dans les tissus périphériques.

D'autres études ont mis en évidence des réponses anti-N et anti-Gn/Gc générées après vaccination chez la souris. L'immunisation par la souche atténué MP-12 a induit des réponses T $CD8^+$ IFNγ anti-N robustes (Xu et al., 2013). L'injection d'un poxvirus MVA (Modified vaccinia virus Ankar) exprimant Gn et Gc (MVA-GnGc) a induit des réponses T $CD8^+$ IFNγ anti-Gn et Gc (López-Gil et al., 2013). L'immunisation par un plasmide codant l'eGn délivré par « gene gun » en présence d'adjuvant a induit des réponses T IFNγ anti-eGn (Bhardwaj et al., 2010). Toutefois le rôle des réponses cellulaires anti-N, Gn et Gc dans la protection n'a pas été déterminé et reste à être élucidé.

## C. Les cellules dendritiques et leurs potentiels vaccinaux

Les cellules dendritiques (DCs) forment un réseau complexe de sentinelles réparties dans divers tissus stratégiques (organes lymphoïdes, tissus périphériques et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) et sont des acteurs-clefs pour la mise en place du système immunitaire adaptatif. Les DCs sont classées en 2 populations majeures : les cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) et les plasmacytoïdes (pDCs). Elles possèdent chacune leurs spécificités et ont un rôle complémentaire lors d'une infection. Parmi les cellules professionnelles présentatrices d'antigènes (APCs), les DCs sont les seules à pouvoir effectuer la présentation croisée et elles activent à la fois les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ naïfs (« priming ») (Delamarre et al., 2003; Jung et al., 2002). D'autre part, elles sont également capables de moduler la réponse immunitaire et d'induire une réponse tolérogène. Le ciblage des DCs ou autrement dit, l'adressage d'un antigène donné vers les DCs, offre la possibilité d'orienter le système immunitaire vers un type de réponse immunitaire particulier pour lutter contre des maladies infectieuses, des tumeurs ou contre des maladies auto-immunes (Alvarez et al., 2013; Kastenmüller et al., 2014). Nous verrons dans les parties suivantes les différentes étapes qui aboutissent à l'activation des DCs, l'apprêtement des antigènes et l'induction d'une réponse immunitaire effectrice.

### 1. Le rôle des cellules dendritiques dans la mise en place de la réponse immunitaire

Historiquement, les cellules de Langerhans (LCs) ont été le premier type de cellules DCs décrites par Paul Langerhans en 1868 dans l'épiderme de la peau humaine. Il observa des cellules ayant une morphologie particulière caractérisée par des prolongements cytoplasmiques similaires à des dendrites, d'où ils tirent leur nom. En 1973, les DCs présentes dans les organes lymphoïdes secondaires ont été observées pour la première fois par Ralph Steinman et Zanvil Cohn (Steinman, 1973). Cependant, leur rôle en tant que APCs n'a été mis en évidence qu'à partir de 1978. En effet, le groupe de Steinman a montré que les DCs isolées dans la rate expriment de manière constitutive le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC II) et stimulent efficacement les lymphocytes T naïfs *in vitro* (Nussenzweig et al., 1980; Steinman et al., 1979; Steinman and Witmer, 1978).

### a) L'activation de la DC

#### i. La reconnaissance du pathogène

Les cellules expriment une batterie de récepteurs leur permettant de reconnaitre une diversité de pathogènes. Ces récepteurs ou PRRs (« pattern recognition receptor ») lient des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (« pathogen associated molecular patterns »), et des motifs associés aux dégâts cellulaires ou DAMPs (« damage associated molecular pattern ») (Brubaker et al., 2015). Les récepteurs Toll-like (TLRs), RIG-I-like (RLRs), NOD-like (NLRs), récepteurs de type C-lectine (CLRs) et les AIM2-like (ARLs) constituent les familles des PRRs et sont présents à la membrane mais également dans les compartiments intracellulaires. La reconnaissance des PAMPs induit une réaction inflammatoire locale par la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, permettant le recrutement des cellules de l'immunité innée telles que les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PNNs) et des DCs au point d'infection.

#### ii. La capture des antigènes

Les antigènes sont capturés par phagocytose impliquant les récepteurs FcRγ de type I et II, de type C-lectine, CD36, récepteur scavenger, et par endocytose via des récepteurs de type CLR (Roche and Furuta, 2015). Une fois internalisés, les antigènes sont apprêtés ou autrement dit, dénaturés et fragmentés dans les phagosomes ou dans le cytosol par digestion enzymatique pour être présentés aux lymphocytes T naïfs.

### b) L'apprêtement des antigènes et la présentation antigénique

Selon la source de l'antigène (exogène ou endogène) et la molécule MHC engagée, la présentation antigénique donne lieu à l'activation des lymphocytes $CD4^+$ ou $CD8^+$ (Figure 9) (Gutiérrez-Martínez et al., 2015).

### i. La voie de présentation antigénique MHC I

-Antigènes endogènes

Le MHC I est exprimé de manière ubiquitaire à la membrane des cellules nucléées et est constitué de deux hétérodimères, une chaine lourde de 45 kDa comportant 3 domaines extracellulaires (α1, α2 et α3) et une chaîne légère de 12 kDa (β2-microglobuline). Les domaines α1 et α2 correspondent au domaine de fixation du peptide, capable de charger des peptides de 8 à 10 acides aminés. Les antigènes endogènes présents dans le cytosol sont transportés vers le protéasome pour être dégradés en peptides. Ceux-ci sont ensuite transloqués dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) par des transporteurs TAP ATP-dépendants (« transporter associated antigen »), où est synthétisé le complexe MHC I. Le peptide est ensuite chargé sur le complexe MHC I et exporté à travers l'appareil de Golgi à la membrane de la DC, puis présenté aux lymphocytes T $CD8^+$.

-Antigènes exogènes

Les travaux de Bevan ont mis en évidence l'induction de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) à partir des antigènes d'origine exogène et présentés par le MHC I (Bevan 1976). Ce phénomène appelé présentation croisée (« cross-presentation ») est une fonction essentielle des DCs permettant de lutter efficacement contre des virus, des pathogènes intracellulaires. Parmi les APCs, les DCs sont les seules cellules à pouvoir exercer la présentation croisée. Plusieurs voies ont été décrites à ce jour : la voie TAP indépendante et dépendante. Dans le premier cas, les antigènes sont dégradés en peptides dans les compartiments endosomaux par des enzymes lysosomales et sont ensuite chargés sur les complexes MHC I, également présents dans ces compartiments. Dans le second cas, les antigènes endocytés sont relargués dans le cytosol. Le translocon Sec61 serait responsable de l'export des peptides des endosomes vers le cytosol (Gutiérrez-Martínez et al., 2015), toutefois son rôle a été récemment remis en question (Grotzke et al., 2017). Après leur acheminement vers le protéasome pour y être dégradés, les peptides dérivés des antigènes sont transloqués via TAP vers la lumière du RE ou dans les endosomes et chargés sur le MHC I.

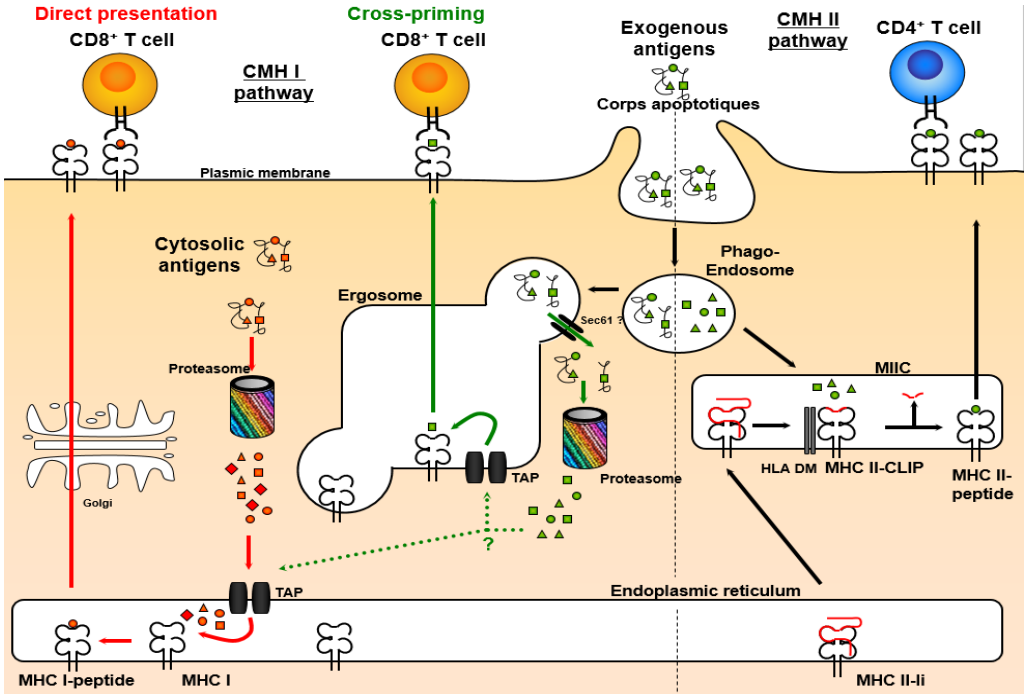



**Figure 9 : Les différentes voies de présentation antigénique MHC I et II**

Les antigènes endogènes présents dans le cytosol sont dégradés dans le protéasome, transloqués dans le RE puis chargés sur les MHC I pour être présentés aux lymphocytes T CD8$^+$ (flèche rouge). Les antigènes exogènes dégradés dans les phagosomes sont chargés soit sur des MHC I recyclés pour être présentés aux lymphocytes T CD8$^+$ ou cross-présentés (flèche verte) ou sur les MHC II (flèches noires) pour être présentés aux lymphocytes T CD4$^+$. *Adaptée de Heath and Carbone, Nature Reviews Immunology* 1, 126-134, (November 2001).

### ii. La voie de présentation antigénique MHC II

Le MHC II présente les peptides dérivés d'antigènes d'origine exogène (Roche and Furuta, 2015). Ce complexe est constitué de deux dimères formant 4 domaines (α1, α2 et β1, β2). Les domaines α1 et β1 constituent le domaine de fixation du peptide, pouvant charger des peptides de 13 à 25 acides aminés. Dans le RE, le MHC II est associé à la chaîne li qui bloque le site de fixation du peptide. Lors de son trafic vers les compartiments acides riches en MHC II, la chaîne est partiellement dégradée sous l'action du pH laissant une partie dans le site de fixation, appelé CLIP (« Class II-associated invariant chain peptide »). Celle-ci sera par la suite échangée à l'aide de la protéine chaperonne HLA-DM avec les peptides dérivés de l'antigène exogène qui auront été au préalable endocytés et dégradés dans les lysosomes puis acheminés vers le compartiment où demeure le MHC II. Le complexe peptide-MHC est ensuite exporté à la membrane de la DC et présenté aux lymphocytes T CD4$^+$.

### c) L'activation des lymphocytes T naïfs

Suite à l'apprêtement de l'antigène, les DCs subissent un changement phénotypique et fonctionnel appelé « maturation » (Thaiss et al., 2011). La capacité de phagocytose est diminuée tandis que l'expression du récepteur d'adressage CCR7 vers les organes lymphoïdes secondaires, du complexe MHC I et II, ainsi que les molécules de co-stimulation activatrices (CD80, CD86, CD40) est augmentée. Les DCs chargées en peptides migrent vers les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques en réponse au chimiotactisme exercé par les ligands du CCR7, les chimiokines CCL21 et CCL19, sécrétées par les cellules stromales et endothéliales des vaisseaux lymphatiques et veinules depuis les organes lymphoïdes secondaires (Figure 10). Elles exercent alors leur fonction première de présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs au niveau de la zone T para-corticale. Trois signaux d'activation sont nécessaires pour une expansion clonale et la mise en place d'une réponse effectrice et mémoire (Figure 11) :

**- Le signal 1 : l'engagement du récepteur des cellules T (TCR)**

La reconnaissance spécifique du complexe MHC-peptide par le récepteur transmembranaire TCR du lymphocyte T constitue le premier signal d'activation. La fixation du TCR au MHC-peptide induit une transduction du signal médiée par les molécules CD3, associées aux TCR à la membrane lymphocytaire. Une série de cascade de phosphorylations des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) aboutissent à l'activation de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. La fixation des co-récepteurs CD4 et CD8 sur le MHC II et I respectivement participerait à l'engagement du récepteur TCR (Koretzky, 2010).

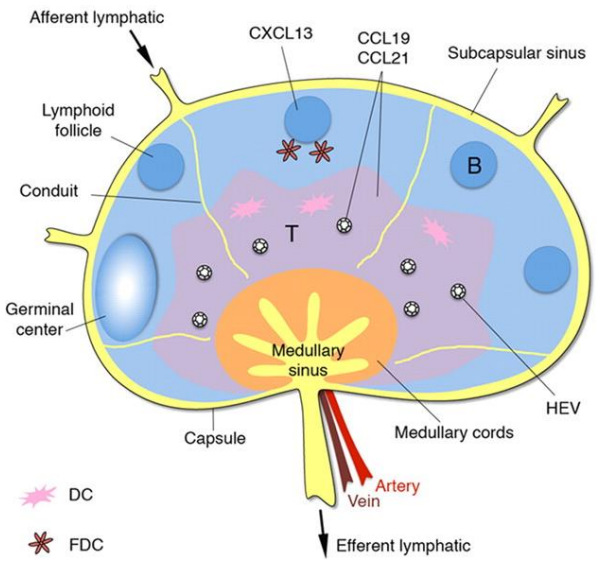



**Figure 10: Structure d'un organe lymphoïde secondaire**

Les organes lymphoïdes secondaires comprennent des vaisseaux lymphatiques et sanguins. Les lymphocytes T et lymphocytes B sont localisés dans des zones particulières appelées respectivement zones T situées en paracorticale de l'organe et zones B situées à la périphérie. Les DCs migrent vers les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques et interagissent avec les lymphocytes T. Après activation des lymphocytes T, les lymphocytes B de hautes affinités se développent à l'aide des cellules dendritiques folliculaires (FDCs) aboutissant à la formation de centres germinatifs. *Adaptée de Nancy H. Ruddle et Eitan M. Akirav, J Immunol (August 15, 2009).*

**- Le signal 2 : les signaux de co-stimulation**

Le second signal nécessaire pour l'activation lymphocytaire est l'interaction entre les molécules de co-stimulation présentes à la surface de la DC et leurs partenaires sur le lymphocyte T. Les molécules de co-stimulation activatrices à la surface de la DC telles que le CD40, CD80/86, CD70, ICOS-L interagissent avec leurs partenaires à la surface du LT, le CD40L, CD28, CD27 et ICOS, respectivement. A l'inverse, l'interaction les molécules de co-stimulation inhibitrices empêche l'activation du lymphocyte T et aboutit à une réponse tolérogène (Koretzky, 2010). Les molécules de co-stimulation inhibitrices à la surface du lymphocyte T sont PD-1 qui lie PD-L1/L2 sur la DC, et CTLA-4 qui lie CD80/86 sur la DC.

**- Le signal 3 : la sécrétion de cytokines**

Le troisième signal d'activation correspond à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par la DC qui ont un rôle dans la polarisation des lymphocytes T CD4$^+$, comme l'IL-12 qui participe à l'induction de lymphocyte T CD4$^+$ au profil Th1.

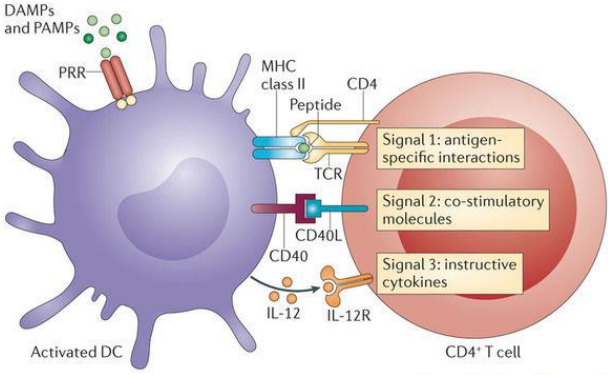



**Figure 11: Les trois signaux d'activation**

*D'après Kambayashi et Terri M. Laufer, Nature Reviews Immunology 14, 719–730 (2014).*

### d) La réponse cellulaire : différenciation des lymphocytes T

L'activation d'un clone lymphocyte T CD8$^+$ spécifique conduit à sa prolifération et à sa différentiation en CTL. La reconnaissance spécifique par les CTLs des complexes MHC-peptides présents sur les cellules infectées conduit à la sécrétion d'une part des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ et TNF-α, et d'autre part, des molécules cytotoxiques telles que les perforines (protéines induisant la formation de pores à la membrane cellulaire) et les granzymes (sérines-protéases capables d'activer les caspases) dans le but d'induire l'apoptose des cellules infectées ou tumorales (Laidlaw et al., 2016).

La polarisation d'un lymphocyte T CD4$^+$ activé en lymphocyte T auxiliaire (Th « helper ») effecteur ou folliculaire est régulée par des facteurs de transcriptions qui sont dépendant des signaux cytokiniques reçus et de l'affinité de la liaison TCR-MHC-peptide (DuPage and Bluestone, 2016). Les lymphocytes T CD4$^+$ effecteurs sont caractérisés par le profil de cytokines qu'ils sécrètent (Tableau 1). Chaque lymphocyte T CD4$^+$ effecteur est spécialisé dans une fonction donnée : la lutte contre un type de pathogène, le soutien du développement

des CTLs et lymphocytes T CD8$^+$ mémoires, le développement des lymphocytes B, de lymphocytes T régulateurs (Tregs) et le recrutement de cellules de l'immunité innée.

**Tableau 1: Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4$^+$**

| Profils | Facteurs induisant la différenciation | Cytokines produites | Fonctions |
|---|---|---|---|
| **Th1** | IL-12, IL-27 | IFN$\gamma$, IL-2, TNF-$\alpha$ | -Réponse inflammatoire<br>-Réponse cellulaire<br>-Lutte contre les pathogènes intracellulaires |
| **Th2** | IL-4<br>Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) | IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 | -Réponse anticorps<br>-Réponse allergique<br>-Lutte contre les pathogènes extracellulaires (bactéries et parasites) |
| **Th9** | IL-4, TGF$\beta$ | IL-9, IL-10 | -Lutte contre les infections parasitaires |
| **Th17** | IL-6, IL-23<br>Faible quantité de TGF$\beta$ | IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22, TNF$\alpha$, IL-10 | -Lutte contre les infections bactériennes et fongiques<br>-Recrutement des éosinophiles et neutrophiles |
| **Th22** | IL-10R$\beta$, IL-6, TNF-$\alpha$ | IL-22, IL-13, FGF, CCL15, CCL17, TNF$\alpha$ | -Immunité mucosale |
| **Th25** | IL-4, IL-25 | IL-25, IL-4, IL-5, IL-13 | -Immunité mucosale |
| **Tfh** | Fort signal TCR, IL-12, IL-21, IL-4 | IL-21 | -Soutien au développement de lymphocytes B |
| **Treg** | IDO<br>Forte quantité de TGF$\beta$ | IL-10, TGF$\beta$ | -Régule la réponse immunitaire<br>-Maintien de la tolérance |

*Adaptée de Tiffany Caza et Steve Landas, Biomed Res Int. 2015 ; Moon et al, Journal for ImmunoTherapy of Cancer (2015) 3:51*

### e) La réponse anticorps

La génération d'anticorps spécifiques de haute affinité est un processus complexe qui nécessite la reconnaissance spécifique de l'antigène par le récepteur membranaire BCR du lymphocyte B et la coopération des lymphocytes T folliculaires helper (Tfh) (Heesters et al., 2016). L'engagement du BCR via la reconnaissance d'antigène soluble ou par la présentation par les APCs (DCs migratoires, les DCs résidentes, les DCs folliculaires ou par les macrophages présents dans la zone marginale de la rate ou tapissant le sinus sous capsulaire du ganglion) conduit à la migration du lymphocyte B vers la bordure de la zone B/T. L'interaction entre le lymphocyte B et un Tfh via la reconnaissance du complexe MHC-peptide-TCR entraine son activation, sa migration vers le centre germinatif pour une expansion clonale. Dans le centre germinatif, le BCR subit plusieurs cycles d'hypermutations somatiques (ou maturation d'affinité). Les lymphocytes B ayant hypermutés leur BCR sont sélectionnés par interaction avec les cellules dendritiques folliculaires (FDCs) du centre germinatif sur le critère d'affinité vis-à-vis de l'antigène qui leur est présenté par la FDC. Les lymphocytes B les moins affins entrent en apoptose tandis que les lymphocytes B les plus affins reçoivent un signal de survie. Ces derniers commutent la classe de leur immunoglobline (IgM→IgG/E/A) et se différencient en lymphocyte B mémoire et en plasmocyte avec l'aide des Tfh, avant de quitter le centre germinatif (De Silva and Klein, 2015).

### f) La régulation de la réponse immunitaire

#### i. Réponse tolérogène : DC à l'état basal versus activée

La tolerance périphérique est essentielle pour le maintient de l'homéostasie immunitaire. Elle est orchestrée par les DCs, et plus particulièrement par les DCs migratoires présentes dans les tissus périphériques (Idoyaga et al., 2014). A l'état basal (« steady state »), les DCs matures exercent une tolérance périphérique. En effet, une étude a montré que les DCs matures du thymus peuvent présenter un peptide du soi contrairement aux DCs immatures du thymus (Ardouin et al., 2016). Enfin, le ciblage des DCs à l'état basal via un anticorps dirigé contre un récepteur de surface et sans adjuvant induit des Tregs (Idoyaga et al., 2014), stratégie intéressante contre les maladies auto-immunes. En revanche, l'activation des DCs par l'utilisation d'adjuvant (anti-CD40, LPS, poly :IC) génère une réponse immunitaire effectrice

suite à son ciblage par un anticorps dirigé contre un récepteur de surface de DC (Hawiger et al., 2001).

### ii. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) jouent un rôle essentiel contre l'exacerbation de l'inflammation, les maladies auto-immunes et les réponses allergiques (Caridade et al., 2013; Zhang et al., 2014). Le champ d'action des Tregs est varié. Ils interagissent avec les DCs, lymphocytes T effecteurs, les lymphocytes B, les éosinophiles et les mastocytes. Elles surexpriment le récepteur de l'IL-2, le CD25, permettant de séquestrer l'IL-2 et empêche ainsi la prolifération des Th effecteurs. Ils sont également capables d'exercer une action immunosuppressive par contact direct via l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices (CTLA-4, OX40) ou d'autres molécules ayant des fonctions immunosuppressives (LAG-3, GITR, CD39, CD73). Ils peuvent également sécréter des cytokines régulatrices telles que l'IL-10, le TGF-β ou des composants lytiques, les granzymes et les perforines. Plusieurs sous-populations de Tregs ont été décrites (Zhang et al., 2014):

-les Tregs naturels (nTreg) $CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ sont présents dans le thymus

-les Tregs induits par les DCs (iTregs) $CD4^+$ $CD25^+$ sécréteurs d'IL10 et TGF-β et les Tr1 $CD4^+$ $CD25^+$ sécréteurs d'IL-10 uniquement, se différencient à partir des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs dans les tissus périphériques et ont une action similaire aux nTregs

-les T suppresseurs $CD8^+$ $FoxP3^+$ $CD25^{hi}$ $CD28^{hi}$ sont générés à partir de lymphocyte T $CD8^+$ en présence de l'IL-12 et l'IL-4 et produisent une grande quantité d'IFNγ, TNF-α, de granzymes et perforines induisant l'apoptose des cellules cibles

## 2. Les cellules dendritiques

Les connaissances générées à partir des différentes populations de DCs localisées dans les organes lymphoïdes secondaires et dans les différents tissus périphériques chez la souris, modèle d'étude de référence, ont permis d'étendre l'identification des DCs conservées dans l'évolution chez l'Homme et dans d'autres espèces ayant un intérêt biomédical, notamment le porc ou ayant un intérêt économique, vétérinaire et sanitaire. Une meilleure compréhension du système immunitaire chez l'Homme et dans ces modèles grands mammifères offre la possibilité d'établir des stratégies vaccinales « one health » contre des zoonoses (Crozat et al., 2010b; Vu Manh et al., 2015). La difficulté principale pour la caractérisation des populations de DCs réside dans l'identification de critères communs pour caractériser une population spécifique au travers des espèces. De plus, les marqueurs présents sur les DCs peuvent varier en fonction de leur localisation tissulaire pour une même sous-population de DCs ($CD8\alpha^+$ spléniques et les $CD103^+$ tissulaires chez la souris). La plasticité des cellules du système immunitaire ajoute une difficulté supplémentaire sur la caractérisation des populations de DCs. A titre d'exemple, les monocytes peuvent se différencier en DCs en condition inflammation (appelés DCs dérivées de monocyte, moDCs). Les analyses de transcriptomes ont mis en évidence des signatures transcriptomiques propres à chacune des sous-populations de DCs (Miller et al., 2012). La combinaison de l'ensemble de ces données ont permis d'établir une nomenclature qui est généralement admise par la communauté scientifique (Guilliams et al. 2014; Murphy et al. 2016; Vu Manh et al. 2015).

### a) Les cellules dendritiques conventionnelles

Les cDCs excellent dans la présentation antigénique et dans l'activation des lymphocytes T naïfs, et sont des candidates prometteuses pour la stratégie de ciblages des DCs. Elles sont divisées en 2 sous-populations: les cDC1 qui sont efficaces pour la présentation croisée et l'activation des lymphocytes T $CD8^+$, tandis que les cDC2 sont plus efficaces dans l'activation des lymphocytes T $CD4^+$. On distingue les cDCs résidentes présentes dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, les ganglions) et les cDCs migratoires dans les tissus périphériques et tissus non lymphoïdes (peau, muqueuses, poumon) qui migrent constitutivement vers les ganglions et acquièrent un phénotype mature (augmentation de l'expression des molécules de MHC II, de co-stimulation et la sécrétion de cytokine).

### i. Les cDCs chez la souris

Les cDCs sont générées à partir de précurseurs hématopoïétiques communs aux monocytes et macrophages (MDP, « monocyte and dendritic cell progenitor »). Ces précurseurs se différencient ensuite en précurseurs hématopoïétiques communs aux DCs (CDP, « common dendritic precursor »). Le développement des cDCs dépend du facteur de croissance Flt3-L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) (Murphy et al., 2016). Elles sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription *zbtb46* contrairement aux pDCs et monocytes/macrophages (Satpathy et al., 2012).

**-Les cDC1**

Parmi les cDC1, on distingue les CD8a$^{+}$ dans la rate et les ganglions et leur équivalent dans les tissus périphériques, les CD103$^{+}$ CD11b$^{-}$ (Miller et al., 2012). Leur développement est principalement gouverné par le facteur de transcription IRF8 (« interferon regulatory factor 8 ») et Baft3 (« basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3 ») (Edelson et al., 2010). Elles sont caractérisées par la surexpression de certains récepteurs tels que le XCR1, marqueur spécifique des cDC1 trans-espèces par excellence, le CLEC9A, le TLR3 (détection d'ARN double brin viraux) et d'autres récepteurs qui permettent de les distinguer par rapport aux autres DCs et macrophages (Dutertre et al., 2014) (Tableau 2).

Ces cDC1 sont capables de cross-présenter des antigènes exogènes et des corps apoptotiques (den Haan et al., 2000; Iyoda et al., 2002) et stimulent plus efficacement les lymphocytes T CD8$^{+}$ par rapport aux cDC2 (Pooley et al., 2001; Seillet et al., 2013). Elles ont un rôle majeur dans la lutte contre des maladies infectieuses. Après une infection expérimentale avec *Leishmania major* ou *Toxoplasma gondii* chez des souris Baft3$^{-/-}$, la parasitémie est plus élevée et une réponse T CD8$^{+}$ spécifique est déficiente (Martínez-López et al., 2015; Mashayekhi et al., 2011). La présence d'un grand nombre de récepteurs endocytiques impliqués dans la présentation croisée (cf chapitre suivant) ainsi qu'une machinerie cellulaire adaptée pour cette fonction contribueraient à cette spécialisation observée chez les cDC1 (Diana Dudziak et al., 2007). Par ailleurs, elles sont capables de maintenir un pH phagosomal alcalin, crucial pour une présentation croisée optimale (Savina and Amigorena, 2007). Les cDC1 sécrètent l'IL-12p40 lors d'une infection (Martínez-López et al., 2015; Mashayekhi et al., 2011) et elles promeuvent une réponse de type Th1 (Edelson et al., 2010; Hildner et al.,

2008; Martínez-López et al., 2015). Elles sécrètent également l'interféron de type I (IFN-α) et III (IFN-λ) après stimulation par les agonistes du TLR 3 (Lauterbach et al., 2010).

**-les cDC2**

La genèse des cDC2 dépend de l'IRF4, Notch2, RelB, l'IFR-4, Klf4, RBP/J (Murphy et al. 2016). Leur caractérisation a été plus complexe que celle des cDC1 puisqu'elles partagent certaines caractéristiques communes aux monocytes/macrophages. En effet, elles expriment toutes le CD11b, récepteur également présent sur les macrophages, les monocytes et les moDCs, et expriment le récepteur au Csf-1, marqueur aussi présent sur les monocytes/macrophages (Ginhoux et al., 2009). La distinction des cDC2 des moDCs et macrophages s'effectue par l'expression d'autres marqueurs tels que le CD64 (Schlitzer et al., 2013) et MAR-1 (Plantinga et al., 2013). Les moDCs sont $CD11b^+$ $MAR\text{-}1^+$ $CD64^+$ et les cDC2 sont $CD11b^+$ $CD64^-$. On distingue les cDC2 résidentes qui sont $CD11b^+$ $CD64^-$ $CD4^+$ $MAR\text{-}1^-$ des cDC2 migratoires qui sont $CD11b^+$ $CD64^-$ $CD4^-$. Les cDC2 expriment le TLR4 contrairement aux cDC1 (Kastenmüller et al., 2014). Par ailleurs, les cDC2 expriment communément le récepteur SIRPα, récepteur dont l'expression conservée au cours de l'évolution à travers les espèces phylogénétiquement éloignées a été mis en évidence par notre équipe (Manh et al., 2015).

Les cDC2 sont capables d'effectuer la présentation croisée dans certaines conditions d'activation mais stimulent plus efficacement les lymphocytes T $CD4^+$ (D. Dudziak et al., 2007) par rapport aux cDC1. Elles sont caractérisées par la capacité à sécréter l'IL-6 (Persson et al., 2013) et l'IL-23 (Schlitzer et al., 2013) lors d'une stimulation. Elles peuvent induire des réponses de type Th2 lors d'une réaction allergique (Plantinga et al., 2013) et Th17 après stimulation par le (lipopolysaccharide) LPS, agoniste du TLR4, lors d'une infection pulmonaire (*Aspergilus fumigatus*) (Persson et al., 2013; Schlitzer et al., 2013).

### ii. Les cDCs chez l'Homme

La majorité des études chez l'Homme ont été réalisées à partir de DCs isolées du sang et de la peau. La genèse des cDCs serait liée à au facteur de transcription IRF8 et de croissance Flt3-L, également impliqués dans le développement des cDCs chez la souris, et

enfin du facteur de transcription GATA2. En effet, les patients portant des mutations sur les gènes codant pour l'IFR8 (Breton et al., 2015) et GATA2 (Dickinson et al., 2014) sont dépourvus de DCs dans le sang et l'injection de Flt3-L sur des volontaires sains induit une augmentation de DCs dans le sang. Comme chez la souris, les cDCs sont divisées en deux sous-populations : les BDCA3$^+$/CD141$^+$ (cDC1), qui sont l'équivalent des CD8a$^+$ murines et les BDCA1$^+$/CD1c$^+$ (cDC2), qui sont l'équivalent des CD11b$^+$ murines (Tableau 2).

**-les cDC1**

Les cDCs CD141$^+$ présentes dans le sang, dans les organes lymphoïdes et dans les tissus périphériques sont caractérisées par l'expression les récepteurs XCR1 et CLEC9A (Jongbloed et al., 2010; Murphy et al., 2016). Elles expriment de nombreux TLRs dont le TLR 3 et les facteurs Baft3, l'IFR8 mais pas l'IFR4, comme chez la souris. Les cDC1 présentes dans la peau et dans le sang exercent plus efficacement la présentation croisée que les cDC2 après stimulation (poly :IC ou LPS) (Bachem et al., 2010; Haniffa et al., 2012). Cependant cette spécialisation des cDC1 à réaliser la cross-présentation est moins fréquemment observée chez l'Homme par rapport à la souris dans les différentes études et serait dépendant de la nature des antigènes (Segura et al., 2013a). Les cDC1 induisent une meilleure réponse de type Th1 par rapport aux cDC2 *in vitro* (Jongbloed et al., 2010). Les CD141$^+$ dermiques sont capables d'induire une réponse de type Th2 (Yu et al., 2013), Th17 (Segura et al., 2012) et Tregs (Chu et al., 2012) dans certains contextes. Elles sécrètent l'IL-12p70 et l'IFN-λ après stimulation (Lauterbach et al., 2010), caractéristiques également retrouvées chez les cDC1 murines.

**-les cDC2**

Dans le sang et la peau, les cDC2 correspondant aux cDCs BDCA1$^+$ expriment communément les récepteurs CD11b, SIPRα (Durand and Segura, 2015). Les cDC2 présentes dans le sang expriment les TLRs 1, 2, 4, 6, 8. Une étude suggère que les cDC2 issues d'organes lymphoïdes sont capables de réaliser la présentation croisée aussi efficacement que les cDC1 (Segura et al., 2013a). Les cDC2 spléniques, sanguines, pulmonaires induisent une réponse type Th17 suite à une exposition du pathogène *Aspergilus fumigatus* et peuvent sécréter de haut niveau d'IL-17, d'IL-23 (Schlitzer et al., 2013) comme les cDC2 murines.

Elles sont capables de sécréter l'IL-12p70 après stimulation par des ligands TLRs (LPS, R488) (Nizzoli et al., 2013).

L'ensemble des études montrent qu'il existe une spécialisation fonctionnelle des cDC1 et des cDC2 humaines mais qui est moins nette que chez les cDC murines.

### iii. Les cDCs les moutons

Les premiers essais de caractérisation des DCs chez le mouton ont été réalisés à partir des cellules issues de la lymphe pseudo-afférente collectées par la technique de cannulation lymphatique mise au point par l'équipe de MacConnell au niveau du ganglion poplité (Bujdoso et al., 1989). Cette technique consiste à faire une résection d'un ganglion lymphatique drainant, dans une région anatomique définie. La cicatrisation du vaisseau lymphatique afférent et efférent aboutit à la formation d'un vaisseau unique appelé vaisseau pseudo-afférent. Grâce à un cathéter inséré dans ce vaisseau nouvellement formé relié à un récipient de collection, il est possible de collecter les leucocytes enrichis en cellules dendritiques issus des tissus périphériques dans un état le plus physiologique possible (Bujdoso et al., 1989; Schwartz-Cornil et al., 2006). Ces DCs expriment le MHC II et le CD1b et sont capables de capturer des antigènes exogènes et d'induire la prolifération des lymphocytes T (Bujdoso et al., 1989). Les DCs collectées à partir de la lymphe pseudo-afférente constituent un puissant modèle pour la caractérisation des populations de DC. Leur caractérisation a été réalisée dans la lymphe drainant la région intestinale (cannulation mésentérique, jéjunum) (Pernthaner et al., 2002), la région oro-nasale (cannulation cervicale) (Epardaud et al., 2004) et drainant la peau (cannulation précapsulaire ou poplitée) (Contreras et al. 2010).

**-Les cDC1 et les cDC2**

Les études pionnières sur la caractérisation des cDCs chez le mouton menées par notre équipe ont permis l'identification des sous-populations de cDCs homologues de la souris, de l'Homme et du mouton qui sont résumées dans le tableau 2.

Deux populations distinctes dans la lymphe drainant la peau ont été mises en évidence: une population minoritaire les $CD26^+$ $SIRP\alpha^-$ $CD1b^+$ et une population majoritaire les $CD26^-$

SIRPα$^{+}$ CD1b$^{+}$ (Contreras et al. 2010; Epardaud et al. 2004). Pour vérifier si ces deux populations sont homologues des cDC1 et des cDC2 humaines et murines, les transcriptomes des populations ont été comparés. Les résultats ont montré que les CD26$^{+}$ SIRPα$^{-}$ CD1b$^{+}$ correspondent à des cDC1 et les CD26$^{-}$ SIRPα$^{+}$ CD1b$^{+}$ à des cDC2 humaines et murines (Contreras et al., 2010). Par ailleurs, notre équipe a également montré l'expression sélective du gène codant XCR1 sur les CD26$^{+}$ SIRPα$^{-}$ CD1b$^{+}$ (cDC1) et dont l'expression est exclusive sur les cDC1 chez des mammifères phylogénétiquement éloignés (Homme, mouton et souris) (Crozat et al., 2010a). Le marqueur CADM1 a  également été mis en évidence sur les cDC1 ovines lors de ces études et est devenu très utilisé pour caractériser les cDC1 dans d'autres espèces telles que le singe et le porc (Dutertre et al., 2014).

Dans la lymphe, les cDC1 sont CD26$^{+}$ SIRPα$^{-}$ CD1b$^{+}$ CLEC9A$^{+}$ CADM1$^{+}$ DEC205$^{high}$ MHCII$^{+}$ CD11c$^{+}$ et les cDC2, CD26$^{-}$ SIRPα$^{+}$ CD1b$^{+}$ CADM1$^{-}$ DEC205$^{lo}$ MHCII$^{+}$ CD11c$^{+}$. Les cDC1 sont capables de sécréter une plus grande quantité  d'IL12p40 par rapport au cDC2 comme chez la souris. Par rapport au cDC2, elles stimulent plus efficacement les lymphocytes T CD8$^{+}$ par la sécrétion d'IFNγ. Elles sont également plus efficaces par rapport au cDC2 pour la présentation croisée aux lymphocytes T CD8$^{+}$ (Contreras et al. 2010). Toutefois, les cDC1 et les cDC2 sont toutes les deux capables de stimuler les lymphocytes T CD4$^{+}$. Enfin, les cDC1 ovines sont spécialisées dans la capture des corps apoptotiques, caractéristique également retrouvée chez les cDC1 murines (Contreras et al. 2010; Epardaud et al. 2004).

Les cDCs dans les tissus périphériques ont été moins bien caractérisées par rapport aux cDCs de la lymphe. Dans la peau et les ganglions, les cDCs partagent un profil similaire avec les cDCs de la lymphe (Contreras et al. 2010). D'autres études ont essayé de caractériser les DCs dans l'intestin et les poumons mais les cDCs n'ont pas été formellement identifiées. Dans l'intestin, les DCs putatives majoritairement présentes au niveau de la *lamina propria* co-expriment le MHCII, DEC205, CD209, CD11c mais pas le CD1b, récepteur pourtant présent sur les cDCs de la lymphe (Åkesson et al., 2008). Dans les poumons, les DCs putatives présentes au niveau du parenchyme co-expriment le MHCII, DEC205 et CD11c (Fach et al., 2006).

**Tableau 2: Comparaison des cDCs trans-espèces**

| | cDC1 | cDC2 |
|---|---|---|
| ***Souris*** | | |
| Nom | **CD8a$^+$ (OL)**<br>**CD103$^+$ CD11b$^-$ (ONL)** | **CD11b$^+$ CD4$^+$ (OL)**<br>**CD103$^-$ CD11b$^+$ (ONL)** |
| Autres marqueurs | CADM1$^+$, XCR1$^+$, CLEC9A$^+$, TLR3$^+$ | SIRPα$^+$ |
| Facteur de transcription ou de croissance | Flt3-L, Baft3, IRF8, Id2 | Flt3-L, IRF4, Notch, RelB, Csf-1r, Klf4, RBP/J |
| ***Homme*** | | |
| Nom | **CD141 (BDCA3)$^+$** | **CD1c (BDCA1)$^+$** |
| Autres marqueurs | CADM1$^+$, XCR1$^+$, CLEC9A$^+$, DEC205$^{hi}$ , CD162$^{hi}$, TLR3$^+$ | SIRPα$^+$, CD11b$^{+/lo}$, CD11c$^+$ |
| Facteur de transcription ou de croissance | Flt3-L, Baft3, IRF8 | Flt3-L, IRF4 |
| ***Mouton*** | | |
| Nom | **CD26$^+$ SIRPa$^-$** | **CD26$^-$ SIRPa$^+$** |
| Autres marqueurs | Cadm1$^{hi}$, CD26$^+$, XCR1$^+$, CLEC9A$^+$, TLR3$^+$ | CD11c$^+$, DEC205 $^{lo}$ |
| Facteur de transcription ou de croissance | - | - |
| **Fonctions spécialisées communes** | Présentation croisée efficace<br>Activation des lymphocytes T CD8$^+$<br>Réponse type Th1<br>Sécrétion d'IL-12 et IFN-λ | Activation des lymphocytes T CD4$^+$<br>Réponse type Th2/Th17<br>Sécrétion IL-23, IL-6 |

OL: Organes lymphoïdes secondaires ; ONL : Organes non lymphoïdes

*Adaptée de C. Dutertre et al, Cell Immunology, 2014 ; T. Vu Manh et al, Frontiers in Immunlogy, 2015*

### b) Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs)

Les pDCs ont été d'abord identifiées chez l'Homme (Facchetti et al., 1988; Siegal, 1999). Présentes dans le sang, la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes, elles sont capables de migrer vers les tissus périphériques lors d'une inflammation. Les pDCs se différencient à partir du progéniteur commun aux cellules dendritiques (CDP), et leur genèse est dépendante du Flt3-L et du facteur de transcription E2-2 (Durand and Segura 2015). Les pDCs expriment le TLR 7 reconnaissant des ARN simples brin et le TLR 9 reconnaissant les dinucléotides CpG non méthylés. Les TLR 7 et 9 sont localisés dans les endosomes. Les pDCs possèdent la particularité de sécréter une grande quantité d'IFN de type I (l'IFN-α,β), essentielle dans l'immunité antivirale (Swiecki and Colonna, 2015). Cette particularité est attribuée à l'expression constitutive du facteur 7 de régulation de l'interféron (IRF7) (Reizis et al. 2011).

A l'état basal, les pDCs expriment faiblement le MHC II, ainsi que les molécules de co-stimulation, et sont peu efficaces dans la capture d'antigène. En revanche, une fois stimulées par des acides nucléiques ou par des virus, elles subissent une maturation (augmentation du MHCII, CD80, CD86 et du CD40) et acquièrent la capacité d'activer les lymphocytes T $CD4^+$ et des lymphocytes T $CD8^+$ naïfs (Nakano et al., 2001; Reizis et al., 2011). A la différence des cDCs, le complexe MHC II est continuellement synthétisé et renouvelé à la surface après l'activation de la pDC. De façon surprenant elle demeure moins efficace pour activer les lymphocytes T $CD4^+$ (Young et al., 2008). Néanmoins, le ciblage des antigènes vers les pDCs *ex vivo* induit l'activation des lymphocytes T (Tel et al., 2013). Elles ont également la possibilité d'induire une réponse tolérogène en fonction du contexte. *In vitro*, elles peuvent induire les Tregs. Par ailleurs, une étude a rapporté que la déplétion des pDCs de souris qui suivent un régime riche en protéine a pour conséquence une inflammation hépatique associée à une réponse T (Goubier et al., 2013).

### c) Les autres phagocytes mononucléées : les moDCs et les Langerhans

**-Les moDCs**

En condition basale et plus favorablement en condition d'inflammation, les monocytes présents dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes peuvent acquérir un phénotype ainsi que des fonctions similaires à ceux des cDCs, d'où leur dénomination de cellules dendritiques dérivées de monocyte (moDC) ou cellules dendritiques inflammatoires (infDC) (Mildner and Jung, 2014). Chez la souris, elles sont $CD11b^+$ $CD11c^+$ $CD14^+$ $Ly6C^+$ $CD64^+$ $MERTK^{-/low}$ (Malissen, Tamoutounour, and Henri 2014). Les moDCs chez l'Homme ont été identifiées, notamment les $CD14^+$ du derme, les $CD103^-$ $CD172^+$ de l'intestin et les $CD1c^+$ $CD14^+$ $CD1a^+$ présents dans les tissus suite à une inflammation (Guilliams et al., 2014).

Elles ont un rôle dans la mise en place d'une réponse inflammatoire locale lors d'une infection chez l'Homme et chez la souris. Chez l'Homme, les moDCs prélevées à partir d'ascites chez des patients atteints d'arthrite induisent la sécrétion d'IL-17 des lymphocytes T $CD4^+$ autologues (Segura et al., 2013b). Chez la souris, les moDCs induisent une réponse cellulaire IFNγ robuste lors d'une infection cutanée par *Leshmania major* dans le derme (León et al., 2007). Elles induisent une réponse de type Th2 par la sécrétion l'IL-5 et l'IL-10 lors d'une réaction allergique chez la souris (Plantinga et al., 2013). Les $CD1c^+$ du derme semblent être spécialisées dans l'activation des Tfh pour l'induction des réponses anticorps.

**- Les Langerhans**

Les cellules de Langerhans sont les seules APCs présentes dans l'épiderme à l'état basal et sont considérées comme la première ligne de défense contre des pathogènes (Collin and Milne, 2016). Elles sont capables de capturer des antigènes à la surface de l'épiderme par extension de leurs dendrites au travers des jonctions serrées entre les kératinocytes (Ouchi et al., 2011). Chez la souris elles sont caractérisées par l'expression du MHCII, CD11c, DEC205, EpCAM, E-cadhérine, SIRPα, DC-SIGN et le CD207. Chez l'Homme, elles sont caractérisées par l'expression du MHC II, CD1a, CD11b, EpCAM, BDCA1 et CD207 (Elodie Segura, 2010).

Elles possèdent des marqueurs communs aux cDCs et sont capables de présenter des antigènes, toutefois les analyses transcriptomiques ont montré qu'elles s'apparentent plus aux

macrophages qu'aux cDCs (Miller et al., 2012). Chez la souris, elles se renouvellent et se différencient à partir d'un pool de précurseurs originaires du sac vitellin et également à partir de précurseurs issus du foie fœtal qui ont colonisé l'épiderme embryonnaire avant la naissance (Malissen et al., 2014). Cependant, lors d'une inflammation sévère, les LCs peuvent se renouveler à partir des précurseurs monocytaires originaire de la moelle osseuse circulant dans la sang (Romani et al., 2010).

Les LCs sont capables d'activer une réponse mais également de la réguler selon le contexte. Chez la souris, les LCs induisent une réponse Th17 *in vivo* lors d'une infection par *Candida albicans* et ont un rôle dans la mise en place d'une réponse humorale (Igyártá et al., 2012; Ouchi et al., 2011) ou régulatrice durant une infection par *Leishmania major* (Kautz-neu et al., 2011). Chez l'Homme, les LCs extraites à partir de biopsies de peau, cultivées *in vitro* avec les lymphocytes T sont capables de stimuler des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ naïfs et d'induire une réponse de type Th2, Th17, Treg (Fujita et al., 2009; Haniffa et al., 2012; Klechevsky et al., 2008; Seneschal et al., 2012). Toutefois, les LCs ne sont pas capables de polariser ces lymphocytes T naïfs en Tfh (Klechevsky et al., 2008).

## 3. Les récepteurs endocytotiques d'intérêt pour le ciblage des DCs

De nombreux récepteurs de surface ont été utilisés (Alvarez et al., 2013; Kastenmüller et al., 2014). Les récepteurs dont l'expression est conservée sur les DCs entre espèces et qui ont montré une amélioration de la réponse immunitaire suite à leur ciblage seront décrits précisément dans cette partie.

### a) Les principaux récepteurs utilisés pour le ciblage des DCs

#### i. DEC205

Le récepteur d'endocytose DEC205 (CD205 ou « lymphocyte antigen Ly 75 ») appartient à la famille des C-lectines de type I (Figdor et al., 2002). Il est constitué d'un domaine riche en cystéine et de 10 domaines de reconnaissance de motifs glucidiques (« carbohydrate domain recognition ») consécutifs dans la partie extracellulaire. Le récepteur DEC205 est capable de fixer des corps apoptotiques (Shrimpton et al., 2009). Son ciblage permet la présentation croisée de l'antigène. En effet, les cDC1 issues d'une souris DEC205$^{-/-}$ préalablement immunisée par un anti-DEC205-OVA (ovalbumine) ne sont plus capables d'induire la prolifération des lymphocytes OT-I *in vivo* (lymphocytes T CD8$^{+}$ transgéniques reconnaissant spécifiquement OVA) (Reuter et al., 2015).

Le profil d'expression de DEC205 sur les DCs diffère selon l'espèce. Il est exprimé de manière prédominante sur les cDC1 chez la souris (Diana Dudziak et al., 2007; Lahoud et al., 2012). Son expression n'est pas restreinte aux DCs. Il est également présent sur les cellules épithéliales thymiques, les lymphocytes T et les lymphocytes B chez la souris (Inaba et al., 1995; Witmer-Pack et al., 1995). Chez l'Homme, son expression est encore plus pléiotropique. DEC205 a été mise en évidence sur les lymphocytes T, les lymphocytes B les monocytes et les Natural Killer (NK) (Kato et al., 2006).

Les études pionnières démontrant l'efficacité du ciblage des DCs ont été réalisées chez la souris par l'utilisation d'un anticorps anti-DEC205. Quelle que soit la voie d'administration, l'injection d'un anti-DEC205 chez la souris était capable de fixer les DCs présentes dans les organes lymphoïdes secondaires (Hawiger et al., 2001; Mahnke et al., 2003). L'injection d'un anti-DEC205 fusionné à l'OVA et d'un adjuvant (anti-CD40) par la voie sous-cutanée ou

intrapéritonéale induit une prolifération des OT-I et OT-II naïfs *in vivo*, la différenciation en lymphocytes T effecteurs aboutissant à une réponse cellulaire IFNγ robuste dans la rate et dans les ganglions par rapport à l'OVA non adressé (Bonifaz et al., 2002, 2004; D. Dudziak et al., 2007). Ces résultats suggèrent que les peptides dérivés de l'OVA ont été présentés via le MHC I et II suite à l'endocytose, l'internalisation et la dégradation du complexe. Un autre paramètre important qui a été mis en évidence durant ces études est le rôle primordial de l'adjuvant dans l'induction d'une réponse effectrice dans le ciblage des DCs via DEC205. En effet, le ciblage des DCs en absence d'adjuvant induit une réponse tolérogène (Hawiger et al., 2001; Mahnke et al., 2016, 2003).

DEC205 fait partie des récepteurs les plus utilisés dans la stratégie de ciblage des DCs et a été testé dans plusieurs espèces. Différents types (protéiques, géniques) et différents formats (anticorps, fragment scFv) de vaccins ont été utilisés pour le ciblage de DEC205 avec des modes d'administrations, des doses et des adjuvants variés. La majorité des études ont montré son efficacité dans l'amélioration des réponses immunes contre divers pathogènes tels que le VIH (Nchinda et al., 2008; Ngu et al., 2017) ou le virus respiratoire syncytial (Hua et al., 2017) et le cancer (Demangel et al., 2005; Johnson et al., 2008). Des études ont montré l'amélioration des réponses cellulaires IFNγ et humorales contre le parasite *Anaplasma marginale* chez le veau (Njongmeta et al., 2012), et l'induction d'une meilleure réponse humorale contre la grippe chez le poulet (Jáuregui-zúñiga et al., 2017). Récemment, une étude clinique en phase I (NCT01834248) a montré à la fois l'induction d'une réponse humorale spécifique et cellulaire IFNγ chez des patients atteints de différents cancers après l'injection d'un anti-DEC205 fusionné à l'antigène NY-ESO-1 présent sur une majorité de cellules tumorales, en présence d'adjuvants (Dhodapkar et al., 2014). De manière intéressante, la stratégie de ciblage des DCs via DEC205 en absence d'adjuvant, est également une approche vaccinale prometteuse contre les maladies inflammatoires et auto-immunes. Des études ont montré l'augmentation des Tregs suite à l'injection d'un anti-DEC205 couplé à des auto-antigènes associée à un effet bénéfique vis-à-vis de maladies auto-immunes dans le modèle murin (Ring et al., 2017; Spiering et al., 2017).

### ii. CD11c

Le récepteur CD11c fait partie de la famille des intégrines. Il est formé d'une chaîne α et β. Il interagit avec la molécule d'adhésion ICAM-1, des protéines de la matrice extracellulaire (fibrinogène, collagène) et la protéine du complément iC3b impliquée dans la phagocytose de particules opsonisées (Sadhu et al., 2007). Il est exprimé sur un large spectre de cellules du système immunitaire, notamment sur les monocytes, les macrophages, les NKs chez l'Homme et la souris. Il est également exprimé sur les différentes sous-populations de DCs chez l'Homme, la souris et le mouton et est donc une cible attractive pour le ciblage des DCs (Kurts, 2008).

L'injection d'un anticorps anti-CD11c fusionné à l'OVA avec un adjuvant (anti-CD40) par la voie intraveineuse chez la souris induit une prolifération des OT-I et OT-II et une réponse cellulaire IFNγ supérieure par rapport à l'injection d'un anti-DEC205-OVA, un anti-MHC II-OVA ou un anti-CD40-OVA (Castro et al., 2008). Une autre étude a montré l'effet d'un anti-CD11c-OVA dans l'induction de la réponse humorale plus efficace par rapport aux autres candidats existants utilisés pour le ciblage des APCs (anti-DEC205, DCIR2, MHC II, CD40), et même en l'absence d'adjuvant (White et al., 2010). De manière intéressante, l'injection d'un anti-CD11c-OVA favorise la formation de centres germinatifs contrairement à l'OVA non adressé (White et al., 2010).

L'immunisation des souris par un vaccin à ADN codant pour un scFv anti-CD11c fusionné à un antigène tumoral (scFv CD11c-HER2) et administré par une électroporation (Wang et al., 2015) ou l'injection d'une protéine de fusion anti-CD11c-HER2 (Wei et al., 2009) en présence d'adjuvant induit une réponse cytotoxique anti-tumorale, améliore la survie et retarde significativement la croissance tumorale. Chez le porc, l'injection d'un anticorps anti-CD11c biotinylé couplé aux antigènes NP, M2e et HA2 du virus Influenza par voie intramusculaire avec l'adjuvant CpG, n'améliore pas la protection anti-grippale malgré l'augmentation de la réponse cellulaire IFNγ, en comparaison à l'injection des antigènes non ciblés (Bernelin-Cottet et al., 2016).

### iii. CLEC9A

Aussi appelé DNGR-1, CLEC9A est un récepteur de la famille des C-lectines de type II, composé d'un seul domaine CRD extracellulaire. Il a un rôle essentiel dans la présentation croisée de corps apoptotiques par interaction avec les filaments d'actines (actine F) (Sancho et

al., 2009; Zelenay et al., 2012). Chez l'Homme, il est sélectivement exprimé sur les cDC1. Chez la souris, il est exprimé sur les cDC1 et les pDCs.

L'adressage d'un antigène au récepteur CLEC9A induit l'activation des lymphocytes T et une production d'anticorps avec et sans adjuvant. Plusieurs études ont montré que l'injection d'un anti-CLEC9A fusionné à l'OVA en absence d'adjuvant par voie intraveineuse conduit à une prolifération des OT-I et OT-II *in vivo* (Caminschi et al., 2008; Joffre et al., 2010; Lahoud et al., 2011). L'immunisation de souris avec un anti-CLEC9A-gag-p24 du VIH en présence d'adjuvant (anti-CD40) induit l'activation des lymphocytes T anti-gag-p24 $CD8^+$ et $CD4^+$ ayant un profil Th1 (Idoyaga et al., 2010). De plus, le profil des lymphocytes T $CD4^+$ activés est modulable en fonction de l'adjuvant utilisé. L'immunisation d'une souris par un anti-CLEC9A-OVA avec le poly :IC induit une réponse de type Th1 tandis que l'injection d'un anti-CLEC9A-OVA avec le curdlan induit une réponse de type Th17 (Joffre et al., 2010).

Plusieurs études ont montré l'induction d'une réponse humorale robuste lorsque l'antigène est adressé vers CLEC9A dans le modèle murin et primate non humain, avec ou sans adjuvants (Caminschi et al., 2008; Joffre et al., 2010; Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011; Li et al., 2015; Park et al., 2013, 2017). Ces observations ont amenés les auteurs à investiguer les mécanismes impliqués. Les études ont rapporté la persistance de l'anti-CLEC9A dans le sang et sur les $CD8\alpha^+$ (cDC1) dans la rate de souris (détectable jusqu'à 4 jours) après son injection par voie intraveineuse (Lahoud et al., 2011). L'anti-CLEC9A induit le développement de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en Tfh et une augmentation de lymphocytes B mémoires dans la rate au niveau des centres germinatifs *in vivo,* même en l'absence d'adjuvant (Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011; Li et al., 2015).

L'ensemble des résultats suggèrent que le ciblage des DCs via CLEC9A permettrait une présentation antigénique prolongée des cDC1 aux lymphocytes T naïfs. La différenciation de ces derniers en Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires favoriserait le développement de centres germinatifs et donc l'induction d'une réponse humorale robuste.

#### iv. XCR1

XCR1 est le récepteur de la chimiokine XCL1 sécrétée par les NK et les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ activés chez la souris. Chez l'Homme deux autres ligands ont été identifiés, appelés huXCL1 et huXCL2 (Yoshida et al., 1998). XCL1, sécrété par les lymphocytes T $CD8^+$ activés, attire les cDC1, ce qui favorise le développement des CTLs (Dorner et al., 2009). XCR1 est le seul récepteur sélectivement exprimé de manière conservée sur les cDC1 de mammifères phylogénétiquement éloignés(Crozat et al., 2010b; Vu Manh et al., 2015). Il constitue donc un candidat idéal pour le ciblage sélectif des cDCs.

Chez la souris, l'injection de faibles doses anticorps anti-XCR1 fusionné à l'OVA ou le ligand XCL1 fusionné à l'OVA par voie intraveineuse avec du LPS induit une prolifération des OT-I et OT-II *in vivo* contrairement à l'injection d'OVA non ciblée chez la souris (Fossum et al., 2015). Dans cette même étude, le ciblage de l'OVA vers des DCs via XCR1 induit la polarisation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en Th1 et des lymphocytes T $CD8^+$ naïfs en CTL, conduisant à un effet anti-tumoral sur des tumeurs exprimant OVA.

L'induction d'une réponse immunitaire et protectrice a été observée dans des études utilisant des « vaccibodies » (cf partie D.3) dirigés contre le virus la grippe (Fossum et al., 2015) et contre des antigènes tumoraux chez la souris (Terhorst et al., 2015). L'immunisation des souris avec des plasmides codant pour des vaccibodies XCL1-HA par voie intradermique combinée à l'électroporation induit une augmentation de la réponse T cellulaire IFNγ et de la réponse humorale, et elle protège contre une infection expérimentale létale par le virus Influenza, par rapport à l'HA non adressée (Fossum et al., 2015). L'immunisation des souris avec une protéine XCL1-OVA par voie intradermique confère une meilleure réponse cellulaire IFNγ par rapport à l'immunisation avec l'OVA non adressée et protège contre la progression tumorale après l'injection d'un mélanome exprimant OVA (Terhorst et al., 2015).

### b) Les critères clés déterminant la présentation antigénique suite au ciblage des DCs

Plusieurs études ont essayé d'étudier si l'efficacité de présentation antigénique pouvait être influencée par le routage intracellulaire entrepris par l'antigène suite à son adressage vers un récepteur d'endocytose particulier. Il a été généralement admis qu'une protéolyse limitée et

donc un adressage des antigènes vers des endosomes précoces était favorable à la présentation croisée (Cohn et al., 2013). A l'inverse, un adressage des antigènes vers des endosomes tardifs favorise la présentation par le MHC II. Cependant ce concept fait débat puisque DEC205, récepteur impliqué dans la présentation croisée des antigènes, les adresse vers les endosomes tardifs *in vitro* (Kastenmüller et al., 2014).

Une autre étude a montré que le niveau d'expression, le taux de recyclage, la capacité et la vitesse d'internalisation de différents récepteurs utilisés pour le ciblages des APCs, tels que l'anti-DEC205, l'anti-CLEC9A, l'anti-CD11c et l'anti-CD11b et l'anti-CD40, n'étaient pas des facteurs déterminant l'efficacité de présentation antigénique par le MHC I et II (Reuter et al., 2015). L'efficacité du ciblage résiderait dans une combinaison entre 1) les propriétés intrinsèques des sous-populations de DCs ciblées, 2) le type de récepteur ciblé et les caractéristiques de son routage intracellulaire et 3) l'activation de la DC, et possiblement du microenvironnement tissulaire.

### 4. Les outils pour le ciblage des DCs

Il existe différents formats utilisés dans les études de la stratégie de ciblage des DCs (Lehmann et al. 2016).

#### a) Les anticorps fusionnés aux antigènes

L'anticorps dirigé contre un récepteur spécifique à la surface des DCs directement fusionné à l'antigène d'intérêt via un espaceur (« linker ») produit par clonage moléculaire a été le plus utilisé dans l'approche de ciblage des DCs (Figure 12.A) (Lehmann et al. 2016). Il est également possible de coupler l'anticorps à l'antigène d'intérêt de manière non covalente via le système biotine-streptavidine (Bernelin-Cottet et al., 2016) ou de manière covalente par liaison chimique via un agent chimique de couplage (Hesse et al., 2013).

#### b) Les « single-chain fragment variable »

Les progrès dans l'ingénierie des anticorps ont permis l'explosion de nouvelles approches thérapeutiques en cancérologie. Les fragments scFvs (« single chain fragment variable ») correspondant aux régions variables lourdes et légères des anticorps sans la partie cristallisable (Fc) liée entre elles par un espaceur flexible et hydrophile sont produits par clonage moléculaire (Figure 12.B) (Lehmann et al. 2016). Cette forme de plus petite taille qu'un anticorps présente l'avantage d'être plus facilement produite et évite une interférence via la partie Fc avec d'autres cellules possédant le récepteur au Fc telles que les macrophages. En revanche, les scFvs ont une avidité plus faible par rapport aux anticorps complets car ils sont monomériques.

#### c) Les plateformes vaccinales ou « vaccibodies »

Plus récemment, des complexes protéiques appelées « vaccibodies » ont été développés par l'équipe de Bjarne Bogen. Ce complexe présente 3 modules : une unité servant au ciblage des DCs (ligand d'un récepteur ou scFv), un module de dimérisation et l'antigène d'intérêt (Gudjonsson et al., 2017; Terhorst et al., 2015). Cette molécule confère une meilleure avidité par rapport à un scFv (Figure 12.C).

### d) Les liposomes et nanoparticules

D'autres approches prometteuses ont été développées pour améliorer la délivrance de l'antigène, notamment via des liposomes et des nanoparticules adressés vers les DCs (Figure 12.D et E). L'objectif est de délivrer de façon concomitante l'antigène et l'adjuvant à la même DC permettant une optimisation des réponses (Schlosser et al., 2008). L'adressage est assuré par des scFvs (Van Broekhoven et al., 2004), des anticorps (Cruz et al., 2014) ou des ligands (glycoconjugués, Cruz et al., 2012) fixant des récepteurs à la surface des DCs, et liés de façon covalentes à la surface de nanoparticule ou de liposome contenant un antigène et un adjuvant.

Une étude a montré que des liposomes décorés de molécules scFvs dirigées contre des récepteurs des DCs et transportant l'antigène (OVA) et l'adjuvant (LPS) induisaient des CTLs présentant une activité cytotoxique chez la souris (Van Broekhoven et al., 2004). L'injection de nanoparticules biodégradables (PLGA) présentant à leur surface des anticorps dirigés contre des récepteurs de surface des DCs dans lesquelles sont encapsulés l'antigène et l'adjuvant améliore la réponse cellulaire T $CD8^+$ par rapport à des nanoparticules non adressées vers les DCs chez la souris (Cruz et al., 2014).

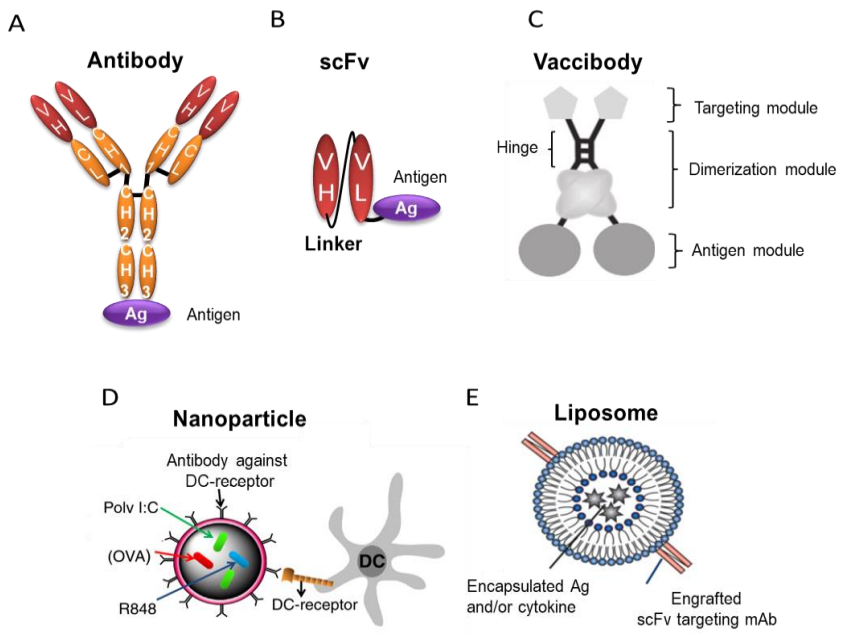



**Figure 12: Les différents formats utilisés pour le ciblage des DCs *in vivo***

**A**. Il existe plusieurs formats anticorps anti-récepteur de DC-antigène : l'anticorps dirigé contre un récepteur à la surface des DCs donné est lié avec l'antigène d'intérêt par un espaceur produit par clonage moléculaire, par couplage chimique ou par couplage non covalent.

**B**. Les scFv (« single chain fragment variables ») sont constitué des domaines VH et VL d'un anticorps spécifique d'un récepteur à la surface des DCs liés entre eux par un espaceur. L'antigène vaccinal est lié au scFv par un second espaceur. **C**. Les plateformes vaccinales protéiques (« vaccibody ») sont constituées d'une unité de ciblage (ex : scFv ou ligand d'un récepteur de DC) lié avec les antigènes par l'intermédiaire d'un domaine de dimérisation (ex : région charnière d'un anticorps + région CH3 d'un anticorps IgGγ3 humain).

**D et E**. Les nanoparticules (<100nm) biodégradables (ex : PLGA) ou les liposomes renferment l'antigène (ex : OVA) avec un ou plusieurs adjuvants (ex : poly :IC et R848). Des ligands spécifiques (glycoconjugués) de récepteurs de DCs, des anticorps ou des scFv spécifiques contre un récepteur à la surface des DCs sont greffés. *Adaptée d'après Irina Caminschi et al, Frontiers in Immunology, 2012 ; Even Fossum et al, European Journal of Immunology, 2012 ; L.Cruzt et al, Journal of Controlled Release, 2014.*

## D. La vaccination à ADN

La vaccination à ADN consiste à transfecter les cellules de l'hôte *in vivo* par un plasmide codant un antigène vaccinal d'intérêt ou une molécule à visée thérapeutique, dans le but de générer une réponse immunitaire et protective. Cette stratégie vaccinale est prometteuse contre des maladies infectieuses en santé humaine ou vétérinaire grâce aux avantages qu'elle possède. En effet, le plasmide est stable, sûre, sa synthèse est rapide à grande échelle et leur production présente un coût abordable. Ces critères sont avantageux pour la constitution de réserves mondiales de vaccins dont l'utilisation est réservée en situation d'émergence d'épidémies. Toutefois l'obstacle majeur est l'induction d'une réponse immunitaire effectrice. Nous verrons dans cette partie les différents moyens employés (les méthodes de transfection, les adjuvants, la stratégie de ciblage des DCs) pour améliorer l'immunogénicité de la vaccination à ADN.

### 1. Contexte général sur la vaccination à ADN

#### a) Historique

Les études pionnières en génie génétique ont montré que l'injection d'un plasmide codant une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur pouvait conduire à la synthèse de la protéine *in vivo* chez la souris (Dubensky et al., 1984; Wolff et al., 1990) et dans un modèle de primate non humain (Hans Will, Roberto Cattaneo, Hans-Georg Koch, Gholamreza Darai, 1982). Ces résultats ont permis l'émergence de la vaccination contre les maladies infectieuses. La preuve de concept a été montrée par l'équipe de Stephen A. Johnston après une immunisation de souris par biolistique (ou « gene gun ») de plasmides codant l'hormone de croissance humaine (hGH) adsorbés sur des particules d'or (De-chu Tang, Michael DeVit, 1992). Plusieurs vaccins à ADN contre des maladies infectieuses ont été développés par la suite et ont conduit à des résultats encourageants chez la souris (Khan 2013).

### b) L'expression du plasmide et son immunogénicité

Le mécanisme d'entrée dans la cellule diffère selon les voies d'administration et la méthode de transfection d'ADN. Une fois dans le milieu intracellulaire, le plasmide doit franchir plusieurs obstacles pour pouvoir être exprimé, notamment éviter la fragmentation par les nucléases présents dans le cytosol et traverser les membranes dont celle du noyau cellulaire. En effet une étude a estimé que moins de 0.1% de la quantité initiale du plasmide entre dans le noyau. Son entrée s'effectue via les pores nucléaires ou durant une brèche créée lors de la division cellulaire (Tregoning and Kinnear, 2014). Le plasmide ne se réplique pas et se maintient dans le noyau sous la forme d'un épisome. Il est transcrit en ARNm puis traduit dans le cytosol par la machinerie cellulaire de la cellule hôte.

L'acheminement du plasmide vers le noyau cellulaire conduit à l'activation du complexe pro-inflammatoire Aim2-inflammasome, et des voies de signalisations STING-TBK1-IRF3, impliquées dans l'immunogénicité des vaccins à ADN. En effet, les souris présentant une invalidation de gènes codant pour Aim2, STING et TBK1 ont un défaut dans la sécrétion des cytokines de l'immunité innée (IFN de type I, TNF-α), et dans la mise en place d'une réponse cellulaire et humorale spécifique suite à une immunisation par un plasmide (Ishii et al., 2008; Ishikawa, 2015; Suschak et al., 2016, 2015).

Plusieurs voies d'apprêtement et de présentation antigénique sont envisageables selon les types de cellules transfectées. Dans le cas des cellules somatiques transfectées, les peptides dérivés des antigènes sécrétés dans le milieu extracellulaire, libérés lors de l'apoptose de la cellule ou issus de la phagocytose des cellules transfectées sont internalisés par les APCs qui les présentent par le MHC I (présentation croisée) aux lymphocytes T $CD8^+$ et par le MHC II aux lymphocytes T $CD4^+$. Dans le cas des APCs transfectées directement, les antigènes synthétisés dans le cytosol sont apprêtés et présentés via le MHC I aux lymphocytes T $CD8^+$ (Tregoning and Kinnear 2014).

### c) Les succès et les échecs de la vaccination à ADN

Les premiers essais de vaccination à ADN ont montré l'efficacité d'un plasmide pour l'induction d'une réponse immunitaire protectrice chez la souris. L'injection intramusculaire d'un plasmide codant l'hémagglutinine du virus Influenza a induit une réponse cellulaire cytotoxique, une réponse humorale et a conféré une protection lors d'une infection

expérimentale létale par rapport aux souris non vaccinées (Fynan et al., 1993). Une autre étude a également mis en évidence l'induction d'une réponse CTL robuste suite à l'injection d'un plasmide codant la nucléoprotéine du virus Influenza et la protection contre une infection par une souche hétérologue du virus de la grippe (Ulmer et al., 1993). Ces résultats prometteurs ont conduit au développement exponentiel de vaccins à ADN contre divers pathogènes chez la souris tels que la malaria, le VIH et la tuberculose (Khan 2013).

La majorité des études a montré que l'immunogénicité induite demeure modeste. A ce jour, aucun vaccin à ADN n'a été enregistré pour l'Homme (Tregoning and Kinnear 2014). Outre les différences d'efficacité de transfection et d'expression *in vivo* qu'il peut y avoir entre les hôtes suite à l'inoculation de l'ADN, un paramètre pouvant expliquer ces différences d'efficacités entre les rongeurs et les grands mammifères est la quantité de plasmide injectée. En effet, chez la souris, les immunisations sont réalisées avec des quantités de plasmide qui varie entre 50µg-200µg. Tandis que chez l'Homme, la quantité varie entre 2mg-8mg. Or, il faudrait injecter l'équivalent d'environ 0.5g de plasmide, en prenant comme poids moyen : 20g pour une souris, 63kg pour une femme et 77kg pour un homme. Néanmoins, 3 vaccins à ADN à usage vétérinaire ont été commercialisés en 2005 contre le virus du West Nile chez les chevaux, en 2010 contre la nécrose pancréatique infectieuse chez le saumon et pour traiter le mélanome du chien (M. A. Liu 2011).

### 2. Les méthodes de transfection *in vivo*

Un paramètre clé en vaccination à ADN est l'expression de l'antigène. Il existe différentes méthodes de délivrance pour optimiser la transfection des cellules de l'hôte et par conséquent son expression.

#### a) Les formulations

Les liposomes et les polymères cationiques sont les deux types de formulation les plus utilisés qui permettent de stabiliser l'ADN dans le milieu extracellulaire et de véhiculer efficacement l'ADN vers les compartiments endosomaux (Tregoning and Kinnear 2014). Le liposome cationique constitué d'une bicouche lipidique, adsorbe l'ADN et forme un complexe capable de fusionner avec la membrane cellulaire permettant ainsi l'entrée de l'ADN dans les cellules. Les polymères cationiques tels que la polyéthylèneimine (PEI) ou les nanoparticules poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) rendues cationiques par couplage avec du CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), s'associent à l'ADN grâce aux interactions électrostatiques et aboutissent à la formation d'un complexe qui entre dans la cellule par endocytose. Les formulations induisent une immunogénicité finalement modérée (Ramamoorth and Narvekar, 2015).

#### b) Tatouage

La délivrance de l'ADN par la technique du tatouage consiste à injecter le plasmide par voie cutanée à l'aide d'aiguilles oscillant à une haute fréquence et perçant à plusieurs reprises la peau. Cette méthode nécessite de délivrer le plasmide sur une très grande surface, et le taux de transfection des cellules semble faible (van den Berg et al., 2009). Des études ont montré l'induction d'une réponse immunitaire chez la souris (Pokorna et al., 2008) mais les résultats sont plutôt mitigés chez le primate non humain (Grunwald et al., 2014; Verstrepen et al., 2008).

### c) Gene gun

Cette méthode consiste à transfecter les cellules par propulsion de billes microscopiques (particules d'or dans la plupart des cas) sur lesquelles est adsorbé l'ADN (Tregoning and Kinnear 2014). Elle présente l'avantage de requérir une quantité faible de plasmide (Tregoning and Kinnear 2014) et induit une réponse humorale et cellulaire dans différentes espèces dont les primates non humains (Fuller et al., 2006).

### d) Injection sous pression sans aiguille ou « needle-free jet injector »

La vaccination par pression est une méthode de délivrance sans aiguille qui consiste à injecter un liquide sous haute pression à l'aide d'un ressort ou d'un gaz à haute pression comprimé au travers d'un petit orifice de 0.1 à 0.5mm dans la peau ou le muscle. Récemment, une étude a mis en évidence l'induction d'une réponse humorale robuste après inoculation du virus de la grippe inactivé par le dispositif «jet injector» chez l'Homme (McAllister et al., 2014), et a été approuvé par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA) pour la vaccination contre le virus de la grippe (https://pharmajet.com/fda-approves-afluria-influenza-vaccine-pharmajets-needle-free-injector/). En vaccination à ADN, des études ont montré l'induction efficace d'une réponse humorale chez le porc contre la grippe (Grodeland et al., 2016) et est actuellement en phase I d'étude clinique contre le virus Zika (NCT02996461). Cette méthode de vaccination peut cependant générer des douleurs et des réactions locales plus intenses qu'une injection par une aiguille (McAllister et al. 2014).

### e) Electroporation

L'électroporation (EP) est une méthode de transfection qui consiste à appliquer un champ électrique à la surface de la peau ou dans le muscle grâce à des électrodes adaptées après l'injection du plasmide nu. Le mécanisme de transfection de l'ADN dans les cellules n'a pas été clairement défini, mais l'impulsion électrique générée par l'electroporateur induirait une instabilité temporaire de la membrane cellulaire qui conduirait à la formation de pore permettant ainsi l'entrée du plasmide dans les cellules (Rols et al., 2002; Tregoning and Kinnear, 2014). Bien que plusieurs paramètres différents ont été utilisés (le nombre de répétitions et la durée de l'impulsion, l'intervalle de temps entre chaque impulsion et le

voltage appliqué) et la plupart des études ont montré que l'EP augmente significativement l'expression du transgène *in vivo* (Roos et al., 2009; Todorova et al., 2017; Wang et al., 2014), et améliore l'immunogénicité chez la souris (Mann et al., 2014; Widera et al., 2000) et le primate non humain (Martinon et al., 2009). Chez l'Homme, l'EP associée à un vaccin à ADN anti-VIH en phase d'étude clinique améliore son immunogénicité (Vasan et al., 2011). Indépendamment de la présence d'ADN, l'EP de surface chez le primate non humain induit une infiltration de lymphocytes T, de DCs, de macrophages, de granulocytes et la sécrétion locale de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-12, favorable à la mise en place de la réponse adaptative (Todorova et al. 2017). Ainsi l'EP a un effet adjuvant.

### 3. Les adjuvants géniques

Dans le contexte de la vaccination à ADN, les adjuvants tels que le GM-CSF, l'IL-2, l'IFNγ, l'IL-12 et l'IL-15 peuvent être utilisés sous forme génique (Saade and Petrovsky 2012). Le GM-CSF a un rôle pléiotropique dans le système immunitaire incluant l'activation des lymphocytes T, l'induction de lymphocyte T $CD8^+$ mémoires, le recrutement d'APCs (Kaufman et al., 2014). Chez l'Homme, cette cytokine a été utilisée dans de nombreux essais cliniques réalisés chez des patients atteints de mélanome à un stade avancé. Les études ont montré qu'elle pouvait améliorer la réponse anti-tumorale et la survie (Kaufman et al., 2014). De plus, de nombreuses études ont rapporté l'amélioration de l'immunogénicité de la vaccination à ADN en présence d'un plasmide codant le GM-CSF dans le modèle murin et primate non humain (Saade and Petrovsky 2012). Un essai clinique en phase I/II a évalué l'utilisation d'un plasmide codant le GM-CSF chez des patients atteints de mélanome à un stade avancé, et a montré une réponse cellulaire améliorée (Perales et al., 2014). Enfin chez le mouton, de bonnes réponses humorales ont été obtenues avec l'utilisation du GM-CSF sous sa forme génique en vaccination à ADN contre le virus de la fièvre aphteuse (Niborski et al., 2006).

### 4. Le ciblage des DCs par vaccination à ADN

Le potentiel de la vaccination à ADN peut être amélioré par le ciblage des antigènes vers les DCs. En effet, l'immunisation par un plasmide codant pour un scFv dirigé contre DEC205

fusionné à l'OVA administré par EP chez la souris induit une prolifération des lymphocytes T OT-I et OT-II *in vivo,* et améliore la production spécifique d'anticorps anti-OVA (Nchinda et al., 2008). L'amélioration des réponses cellulaires et humorales a été confirmée dans d'autres études chez la souris par l'utilisation de plasmides codant pour 1) un scFv DEC205 fusionné à l'antigène gp41 du VIH (Nchinda et al., 2008) ou fusionné à l'antigène tumoral (Cao et al., 2013), 2) pour un scFv CD11c fusionné à l'antigène tumoral (Wang et al., 2015), 3) pour un «vaccibody» ciblant un antigène tumoral au complexe MHC II (Fredriksen et al., 2006) ou un vaccibody ciblant l'hémagglutinine du virus de la grippe à XCR1 (Gudjonsson et al., 2017) ou MHC II (Grodeland et al., 2016). Cette stratégie a été testée dans des modèles non murins. L'immunisation avec un plasmide codant pour un scFv ciblant le récepteur DEC205 chez le veau fusionné à un antigène MSP1a du parasite *Rickettsia Anaplasma marginale* améliore la réponse cellulaire IFNγ par rapport à un plasmide codant un scFv irrelevant fusionné à MSP1a (Njongmeta et al., 2012). Cependant, d'autres études ont montré que le ciblage des DCs en vaccination à ADN n'améliorait pas l'immunogénicité et induisait une réponse tolérogène même en présence d'adjuvant génique (Niezold et al., 2015; Tenbusch et al., 2012). En effet, chez le primate non humain, l'immunisation par un plasmide codant un scFv DEC205 fusionné à l'antigène p27 du SIV n'améliore pas l'immunogénicité du vaccin (Tenbusch et al., 2012). L'administration d'un plasmide codant pour un scFv DEC205-HA par voie intramusculaire avec EP a conduit à une induction de Tregs dans les ganglions de souris immunisées et à une réduction des réponses cellulaires par rapport à celles induites par un plasmide codant l'HA non ciblé (Niezold et al., 2015). De plus, la co-injection d'un adjuvant génique codant l'IL-12 n'améliore pas l'immunogénicité. Le mécanisme expliquant les différences d'immunités induites par les vaccins à ADN codant les antigènes ciblés vers DEC205 n'a pas été étudié.

# V. Objectifs des travaux de thèse

Le développement de nouveaux vaccins plus sûrs, efficaces et à coût abordable contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift (vFVR) est une priorité de l'OMS en raison du risque d'introduction de cet arbovirus dans d'autres continents indemnes. La vaccination à ADN est une stratégie vaccinale adaptée contre des pathogènes émergents pour plusieurs raisons: la production de plasmide est rapide à grande échelle, le plasmide est sûr et stable. Cette stratégie a été appliquée contre le vFVR chez les moutons en les immunisant avec un plasmide codant les protéines NSm-Gn-Gc (Lorenzo et al., 2008). Cependant ce vaccin n'a pas induit d'anticorps anti-vFVR détectables.

Dans ce projet, nous avons cherché à améliorer l'immunogénicité de cette stratégie dans l'hôte naturel et à mieux comprendre les mécanismes de protection chez la souris qui n'ont pas été clairement défini à ce jour. Nous avons choisi l'ectodomaine de la glycoprotéine Gn du virus (eGn) comme antigène vaccinal. En effet, les épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux neutralisants anti-Gn protecteurs sont localisés sur l'ectodomaine de la protéine Gn (Besselaar et al., 1991; Besselaar and Blackburn, 1992; Rusu et al., 2012). De plus, des études ont montré que l'immunisation par la protéine eGn en présence d'adjuvant a induit une immunité stérilisante chez le mouton (Kortekaas et al., 2012). En vaccination à ADN, l'administration d'un plasmide codant l'eGn en présence d'un adjuvant par « gene-gun » a induit une protection partielle chez la souris.

Dans ce projet, nous avons développé une vaccination à ADN optimisée contre le vFVR qui consiste à co-administrer un plasmide adjuvant codant le GM-CSF avec le plasmide codant l'eGn, suivie d'une étape d'électroporation (EP) et de tester l'adressage de l'eGn vers les cellules dendritiques (DC). En effet, comme évoqué précédemment, de nombreuses études ont rapporté l'amélioration de l'immunogénicité de la vaccination à ADN en présence d'un plasmide codant le GM-CSF dans le modèle murin et le mouton (Niborski et al., 2006; Saade and Petrovsky, 2012). L'EP augmente l'expression du transgène *in vivo* chez la souris et le primate non humain (Martinon et al., 2009; Roos et al., 2009; Todorova et al., 2017), et a un effet adjuvant (Todorova et al. 2017). Enfin, des plasmides codant des antigènes tumoraux ou viraux fusionnés avec des fragments d'anticorps scFv dirigés contre les récepteurs DEC205 (Cao et al., 2013; Nchinda et al., 2008) et CD11c (Wang et al., 2014) ont montré l'induction de fortes réponses cellulaires T $CD4^+$ et $CD8^+$ et humorales protectrices dans le modèle murin. Cette stratégie vaccinale prometteuse doit être examinée dans des modèles grands

mammifères. Les plasmides qui codent l'eGn seul ou fusionné à des fragments d'anticorps scFv dirigés contre les récepteurs DEC205 et CD11c ovins, ou contre le récepteur DEC205 murin ont été ainsi synthétisés. Les deux questions majeures soulevées dans ce projet sont alors les suivantes:

**- La vaccination à ADN codant l'eGn, optimisée pour sa délivrance et avec un adjuvant génique, est-elle immunogène et protège-t-elle contre une infection par le vFVR ?**

**- En vaccination à ADN, l'adressage d'eGn vers les récepteurs d'endocytoses DEC205 et CD11c améliore-t-il l'immunogénicité et la protection contre une infection par le vFVR ?**

Pour répondre à ces questions, mes travaux de thèse se sont articulés autour de deux axes:

**-Etudier l'immunogénicité et l'efficacité des vaccins à ADN contre le vFVR chez le mouton**

L'immunogénicité des plasmides codant l'eGn ou fusionné aux fragments d'anticorps scFv anti-DEC205 et anti-CD11c a été évalué chez des agneaux et des moutons adultes. Enfin, l'efficacité des différents candidats vaccins à ADN a été testée par une infection expérimentale avec une souche sauvage du vFVR chez des agneaux. Ce travail a abouti à une première publication qui a été acceptée dans le journal *npj Vaccines - Nature*. Ces résultats ont fait l'objet de deux communications orales et deux affichées à des congrès (cf. Annexe 1).

**-Etudier l'immunogénicité, la protection et les mécanismes impliqués dans la protection contre une infection par le vFVR dans le modèle murin**

Les réponses cellulaires et humorales ont été analysées suite à la vaccination. L'efficacité des différents plasmides vaccinaux a été testée par une infection expérimentale avec une souche virulente du vFVR. Suite à l'utilisation d'une stratégie de ciblage des DCs via DEC205, des réponses immunitaires différentes ont été observées chez l'hôte naturel et le modèle murin. Ces résultats nous ont conduits à examiner l'effet du plasmide adjuvant GM-CSF et l'implication de la nature de l'antigène sur les réponses immunitaires induites par le ciblage via le récepteur DEC205. Enfin, nous avons étudié les rôles des anticorps et des lymphocytes T dans la protection suite à la vaccination par le plasmide codant l'eGn seul qui s'est révélé

protecteur dans nos deux modèles d'étude. Les résultats issus de cette seconde partie font l'objet d'une seconde publication qui est actuellement en cours de préparation.

**Autres travaux**

J'ai également participé à des travaux d'un autre projet ANR de notre équipe. Ce dernier porte sur l'étude du ciblage de l'ectodomaine de la protéine M2 (M2e) du virus de la grippe vers les cDC1 chez le porc via le récepteur XCR1 (Annexe 2). Les résultats issus de ces travaux seront discutés par la suite.

# VI. Résultats

## A. Article 1

**Un vaccin à ADN codant l'ectodomaine de la protéine Gn du virus de la fièvre de la vallée du Rift induit une protection partielle qui n'est pas améliorée par le ciblage des cellules présentatrices d'antigènes**

Je décris dans cet article comment nous avons synthétisé nos différents plasmides vaccinaux qui sont : les plasmides qui codent l'eGn (peGn), un scFv anti-DEC205-eGn, (pscDEC-eGn) et un scFv anti-CD11c-eGn (pscCD11c-eGn). Le plasmide peGn contient à la séquence codant l'eGn du vFVR contenant un peptide signal. Les séquences codant les fragments scFv ont été obtenues à partir des ARN totaux extraits d'hybridomes murins sécrétant des anticorps anti-DEC205 ovin et anti-CD11c ovin dont on dispose dans l'équipe. Les plasmides codants les scFv-eGn contiennent le peptide signal de la région VH de l'anticorps monoclonal parental, les fragments scFvs et la séquence eGn dépourvue du domaine transmembranaire pour une meilleure sécrétion de la protéine de fusion.

Nous avons évalué la fixation des protéines scFv-eGn créées par génie moléculaire sur les cellules de la lymphe cutanée ovine enrichies en DCs congelées obtenues par cannulation lymphatique.

Nous avons réalisé des immunisations dans une cohorte de 32 agneaux âgés de 2 mois et comparé l'immunogénicité conférée par nos différents plasmides en analysant la réponse cellulaire IFNγ issue des PBMC et la réponse humorale. Enfin, nous avons testé l'efficacité des vaccins à ADN par une infection expérimentale avec une souche sauvage du vFVR. Un suivi clinique et la quantification de la virémie au cours de l'infection ont été réalisés pour évaluer la protection. Les expérimentations animales ont été réalisées en collaboration avec le centre de recherche CReSA-IRTA en Espagne. Les immunisations ont été réalisées dans une ferme expérimentale (IRTA, Lérida) et les infections en animalerie confinée niveau 3 (CReSA, Barcelone).

npj | Vaccines

www.nature.com/npjvaccines

ARTICLE OPEN

# A Rift Valley fever virus Gn ectodomain-based DNA vaccine induces a partial protection not improved by APC targeting

Tiphany Chrun[1,2], Sandra Lacôte[2], Céline Urien[1], Luc Jouneau[1], Céline Barc[3], Edwige Bouguyon[1], Vanessa Contreras[4], Audrey Ferrier-Rembert[5], Christophe N. Peyrefitte[5], Nuria Busquets[6], Enric Vidal[6], Joan Pujols[6], Philippe Marianneau[2] and Isabelle Schwartz-Cornil[1]

Rift Valley fever virus, a phlebovirus endemic in Africa, causes serious diseases in ruminants and humans. Due to the high probability of new outbreaks and spread to other continents where competent vectors are present, vaccine development is an urgent priority as no licensed vaccines are available outside areas of endemicity. In this study, we evaluated in sheep the protective immunity induced by DNA vaccines encoding the extracellular portion of the Gn antigen which was either or not targeted to antigen-presenting cells. The DNA encoding untargeted antigen was the most potent at inducing IgG responses, although not neutralizing, and conferred a significant clinical and virological protection upon infectious challenge, superior to DNA vaccines encoding the targeted antigen. A statistical analysis of the challenge parameters supported that the anti-eGn IgG, rather than the T-cell response, was instrumental in protection. Altogether, this work shows that a DNA vaccine encoding the extracellular portion of the Gn antigen confers substantial—*although incomplete*—protective immunity in sheep, a natural host with high preclinical relevance, and provides some insights into key immune correlates useful for further vaccine improvements against the Rift Valley fever virus.

*npj Vaccines* (2018)3:14 ; doi:10.1038/s41541-018-0052-x

## INTRODUCTION

The Rift Valley Fever Virus (RVFV) is a zoonotic phlebovirus *(Phenuiviridae)* transmitted by mosquitoes, causing serious diseases in humans and ruminants. In humans, RVFV usually induces a febrile illness, and sometimes hepatitis, hemorrhagic fever, retinitis or encephalitis, leading to death. In ruminants, RVFV is responsible for abortions in pregnant ewes and a high die-off rate in young sheep (see ref. [1] for review). RVFV has caused recurrent outbreaks in Sub-Saharan Africa since 1931 and later spread to the Arabian Peninsula, raising awareness of the potentiality for introduction to other continents where a large array of competent insects would embed the virus in the ecosystem with devastating health, social and economic consequences. Attenuated and inactivated RVFV vaccines are commercialized for ruminants in enzootic countries. However, the risk of reversion of attenuated vaccines renders their registration unlikely in Europe and the United States and the need for repeated injections of inactivated vaccines is not compatible with herd management in most countries. The 2017 WHO Blueprint list cites RVFV as one of the 10 priority pathogens for which a low-cost, safe, stable and highly effective vaccine is urgently needed (http://www.who.int/blueprint/priority-diseases/en/).

The M segment of the tripartite negative stranded RVFV RNA genome encodes for a polypeptide generating the Gn and Gc glycoproteins which are involved in viral attachment and fusion, respectively. Neutralizing antibodies (NAbs) are directed to both Gn and Gc.[2] Gc is located within the glycoprotein shell whereas Gn is exposed on the outside, indicating that Gn is a major target of NAbs.[3] Importantly, anti-Gn and Gc NAbs can confer protection by passive transfer.[4] Expression of the Gn ectodomain allowed production of a secreted form (eGn) that, after injection as a protein vaccine in mice, conferred full protection against RVFV,[5] indicating that eGn is a promising antigen candidate for a subunit vaccine. Furthermore a DNA vaccine encoding eGn was found to be partially protective in mice, despite low levels of NAbs.[6] Finally, $CD8^+$ T-cell responses against the Gn/Gc proteins were identified in the context of protective immune responses,[7] but their role in protection is unclear.

DNA vaccines present many of the qualities desired for a new RVFV vaccine: they show good stability outside cold chain, they can be prepared for emergency vaccine banks, they are noninfectious and safe, they allow differentiation of infected from vaccinated animals (DIVA), they are easy to construct, their manufacture is feasible at large scale and they have the potential to be cost effective to produce, especially when compared to recombinant proteins.[8,9] However, whereas DNA vaccines induce high T-cell and Ab responses in rodent models, they usually display low immunogenicity properties in other mammals including ruminants and humans.[10] Improvement of DNA vaccine immunogenicity has been achieved by enhancing the in vivo delivery with electroporation in skin and muscle,[11] by adding genetically encoded adjuvants such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF),[8] as well as by fusing the encoded vaccine antigen to a single chain fragment variable

[1]VIM-INRA-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France; [2]ANSES-Laboratoire de Lyon, Unité Virologie, Lyon, France; [3]UE1277-INRA, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale - PFIE, 37380 Nouzilly, France; [4]CEA-Université Paris Sud-INSERM, U1184, Immunology of Viral Infections and Auto Immune Diseases, IDMIT Department, IBFJ, 92260 Fontenay-aux-Roses, 94270 Kremlin-Bicêtre, France; [5]Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA). Unité de Virologie-UMR190, Brétigny sur Orge, France and [6]IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
Correspondence: Isabelle Schwartz-Cornil (isabelle.schwartz@inra.fr)

Received: 4 October 2017 Revised: 26 February 2018 Accepted: 28 March 2018
Published online: 20 April 2018

Published in partnership with the Sealy Center for Vaccine Development

nature partner journals

utmb Health Sealy Center for Vaccine Development

(scFv), or a chemokine, for targeting a receptor expressed on antigen-presenting cells (APCs).[12–16] Among APCs, conventional dendritic cells (cDCs) appear as the key cell type involved in APC-targeting efficacy.[17] In mice cDCs have been classified in two major subsets, the cDC1 and cDC2, with the cDC1 subset excelling in $CD8^+$ T and T helper cell type 1 (Th1) $CD4^+$ T-cell activation and the cDC2 subset promoting the T helper cell type 2 and 17 (Th2 and Th17) $CD4^+$ T-cell differentiation.[18] Homologous cDC1 and cDC2 subsets have been identified in other species, i.e., in humans, monkey, sheep and pig, and they can be distinguished based on a conserved trans-species phenotype with cDC1 being $CADM1^{hi}$-$SIRP^{lo}$ and cDC2 being $CADM1^{lo}SIRP^{hi}$.[19,20] A large number of studies, primarily conducted in mice, revealed that targeting antigens to cDCs using protein or DNA vaccines results in enhancing and even biasing the type of immune responses, depending on both the targeted cDC subset and the nature of the targeted receptor (see refs.[21,22] for reviews). The most comprehensively studied molecule for APC targeting is DEC205[22] which is expressed on cDCs in many species including ruminants[23] and is overexpressed on cDC1s at least in mice. The targeting of different antigens to DEC205 in DNA vaccination of mice[12,13,24,25] resulted in enhanced Ab, $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell responses. In addition in a study comparing different targeted receptors using chimeric protein vaccines, CD11c, the general marker of DC, revealed to be a particularly suitable receptor for inducing high humoral responses[26] and was also efficient at enhancing both Ab and T-cell responses with DNA vaccines in mice.[14] Despite the spectacular promises from mouse models, the improvement of protective immunity by APC-targeting remains to be documented in large mammals in order to translate this approach to humans and veterinary applications.[27]

Based on this context, we constructed DNA vaccines encoding the RVFV eGn in fusion with a scFv anti-ovine DEC205 and a scFv anti-ovine CD11c and compared them to a DNA vaccine encoding untargeted eGn for their capacity to induce protective immunity in sheep. The vaccines were delivered in the dermis, a tissue densely inhabited with DCs, together with an adjuvant plasmid encoding for ovine GM-CSF.[28] Surface electroporation (SEP) was used to promote DNA transfection in skin cells and immunogenicity.[29] Interestingly, we found that the DNA encoding eGn targeted to DEC205 and not to CD11c promoted the interferon-γ (IFNγ) T-cell responses as compared to DNA encoding untargeted eGn, thus indicating that APC targeting can improve T-cell responses outside the mouse species. However, DNA encoding untargeted eGn was the most efficient at inducing anti-eGn immunoglobulin G (IgG) responses, although not neutralizing. This latter plasmid was efficient at inducing significant protection against infectious challenge to a higher extent than the one encoding DEC205- and CD11c-targeted eGn. Furthermore, the anti-eGn IgG levels correlated with protection, suggesting that IgG responses rather than T-cell responses are important in the protective immunity conferred by eGn encoding DNA vaccines.

## RESULTS

### Generation and validation of scFvs for targeting RVFV eGn to ovine DEC205 and CD11c receptors

In order to construct DNA vaccines encoding RVFV eGn targeted to sheep APCs, we derived scFv sequences from two murine hybridomas secreting monoclonal antibodies (mAbs) against ovine DEC205 or CD11c. The scFv sequences were fused to mCherry and the fusion proteins were expressed in HEK293 cells. We evaluated the binding capacities to sheep cDC subsets of scDEC-mCherry and scCD11c-mCherry fusion proteins relatively to a scCtlr-mCherry control, and we compared their staining profiles to the ones of their parental mAb. For that purpose, we collected lymph-draining sheep skin at steady state using the pseudo-afferent lymph cannulation technique[23] and we isolated low-density cells; these cells are strongly enriched in skin-migrated cDCs which are physiologically relevant cell targets in the context of skin vaccination and which include the cDC1 and cDC2 subtypes, identified as $FSC^{hi}$ $CD1b^+$ $CADM1^{hi}$ and $FSC^{hi}$ $CD1b^+$ $CADM1^{lo}$ cells respectively (Fig. 1a).[20,23] A staining with the parental anti-DEC205 mAb shows that cDC1s express slightly more DEC205 than cDC2s, relatively to an isotype control (Fig. 1b), as we previously published.[23] This finding is in agreement with the slightly higher expression of DEC205 on mouse skin-migrated cDC1s than on cDC2s.[30] The staining of cDC1s with the parental anti-CD11c mAb appears heterogeneous and presented two peaks, whereas the staining of cDC2 is homogenous. The scDEC-mCherry and scCD11c-mCherry fusions presented a similar staining pattern as the one obtained with the parental mAbs (Fig. 1c). Thus, the anti-DEC205 and CD11c scFvs can be used to create constructs to target RVFV eGn to the corresponding sheep molecules.

### Construction, characterization and expression of anti-DEC205 and anti-CD11c scFvs fused to RVFV eGn

Synthetic genes were designed in order to generate vaccine plasmids encoding untargeted eGn (peGn) and eGn targeted to DEC205 or to CD11c using the validated scFv sequences (pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn). As shown in Fig. 2a, peGn includes the eGn sequence (nt 411 to nt 1763 of the RVFV M segment, ZH501 strain) beginning with its natural signal peptide (nt 411 to 477) whereas the plasmids encoding APC-targeted eGn include the VH signal peptide of the original mAb, the scFv sequence and the eGn sequence from nt 477 to nt 1763 which is devoid of transmembrane domains for allowing the fusion protein secretion.

The plasmids were transfected in HEK293 cells and the cell lysates and supernatants were collected for assessing eGn protein expression in vitro. Bands corresponding to untargeted eGn (48.8 kDa) and to scDEC-eGn and scCD11c-eGn protein fusions (76.3 and 78.6 kDa respectively) were detected at their expected predicted size in western blot using an anti-RVFV hyperimmune mouse ascitic fluid (HMAF, Fig. 2b). We could not detect the three proteins in the concentrated supernatants by western blot, possibly due to too limited amounts of eGn that could be detectable by the anti-RVFV HMAF on the nitrocellulose membrane. However, in a dot plot assay where 25 times more volume was loaded, the three supernatants from the eGn-expressing plasmid reacted with the anti-RVFV HMAF (Fig. 2c). Furthermore, when low-density skin lymph cells were incubated with the concentrated supernatants, the binding of scDEC-eGn and scCD11c-eGn could clearly be detected by the anti-RVFV HMAF on $FSC^{hi}$ cells, which mainly correspond to cDCs (Fig. 2d). This experiment indicates that our scFv-based construct can target eGn to sheep skin DCs.

Finally, we assessed whether peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn can be expressed in vivo, and to what relative levels, in the sheep host species. We chose to deliver the plasmids into sheep skin by injection in the dermis followed by SEP, as done previously to successfully immunize mice and pigs with DNA encoding for APC-targeted vaccines.[15,16] After having determined the optimal plasmid delivery parameters using a firefly luciferase expressing plasmid and escalating electric field values (supplementary material 1), we detected the expression of peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn delivered in sheep skin, using the sensitive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique, 48 h post administration (Fig. 2e). eGn messenger RNA (mRNA) could be detected in all injected biopsies (from Cq 26 to Cq 32.8, data not shown) and no signal could be detected in the non-transfected skin. After normalization with the RPS24 reference gene, we found that eGn mRNA expression was quite variable for

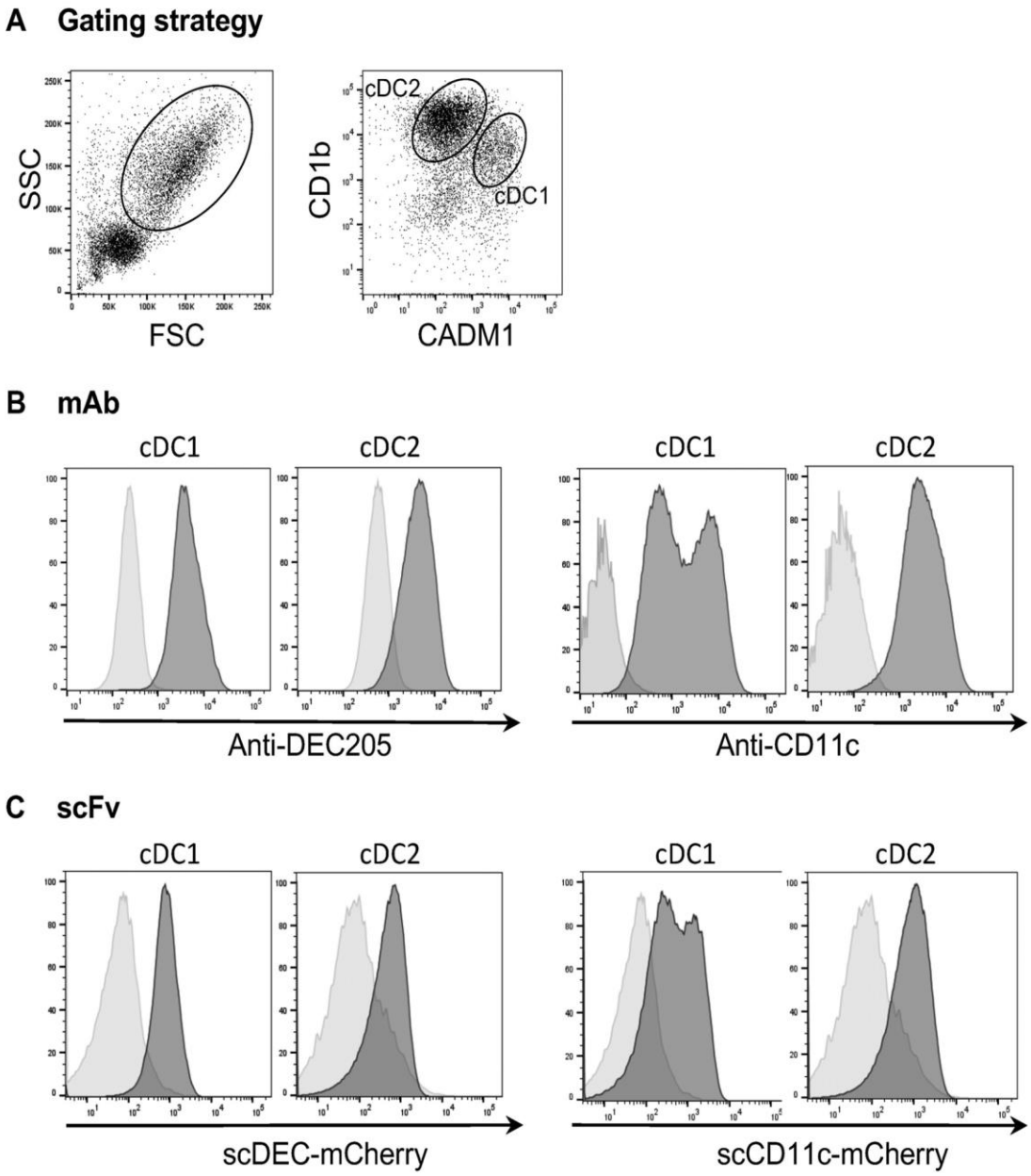



**Fig. 1** Binding of anti-DEC205 mAb, anti-CD11c mAb, scCD11c-mCherry and scDEC-mCherry on sheep skin lymph DC subsets. **a** Sheep skin lymph low-density cells were gated to select $FSC^{hi}$ cells which were further separated as $CD1b^{+}$ $CADM1^{hi}$ and $CD1b^{+}$ $CADM1^{lo}$ cells, corresponding mainly to cDC1s and cDC2s respectively. **b** The staining of the cDC1 and cDC2 subsets with the parental anti-DEC205 and anti-CD11c mAbs is depicted (dark gray) compared to an isotype control (pale gray). **c** The staining of the cDC1 and cDC2 subsets with scDEC-mCherry and scCD11c-mCherry is depicted (dark gray) compared to a scCtrl-mCherry (pale gray). The shown data are representative of two independent experiments

the same plasmid, precluding any statistical analysis. Nevertheless, pscDEC and pscCD11c-eGn tended to be less expressed or were at least not more expressed than peGn in sheep skin (Fig. 2e).

In conclusion, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn express functional fusion proteins capable of targeting eGn to sheep APCs and the mRNA expression of peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn is detectable in pig skin upon electroporation in vivo.

### Immunization with pscDEC-eGn promotes the eGn-specific IFNγ T-cell responses

The three RVFV DNA vaccines, i.e., peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn, were compared for their immunogenicity in sheep. Each DNA vaccine was combined to pGM-CSF as an adjuvant and was inoculated 3 times intradermally+SEP in 2-month-old Lacaune lambs (Fig. 3a). At week 12 after the prime, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were re-stimulated in vitro with two pools of overlapping peptides covering the entire eGn sequence (a N-ter and a C-ter peptide pool) in an IFNγ Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) assay. Cultures with an irrelevant peptide were used as controls (see Materials and methods section). eGn-specific IFNγ responses were observed upon re-stimulation with both the eGn N-ter and C-ter pool peptides in the all-vaccinated groups versus the control sheep groups (Fig. 3b). The most significant difference of response versus the control group was obtained with the cells from the pscDEC-eGn vaccinated sheep ($p < 0.01$ with the N-ter pool and $p = 0.05$ with the C-ter pool). The IFNγ spot number induced by the eGn N-ter pool was significantly higher with the PBMCs from the pscDEC-eGn- than from the peGn vaccinated sheep (Fig. 3b). Although not more expressed than peGn at the RNA level in sheep skin, pscDEC-eGn appears more potent than pscCD11c-eGn and peGn to induce IFNγ T-cell responses.

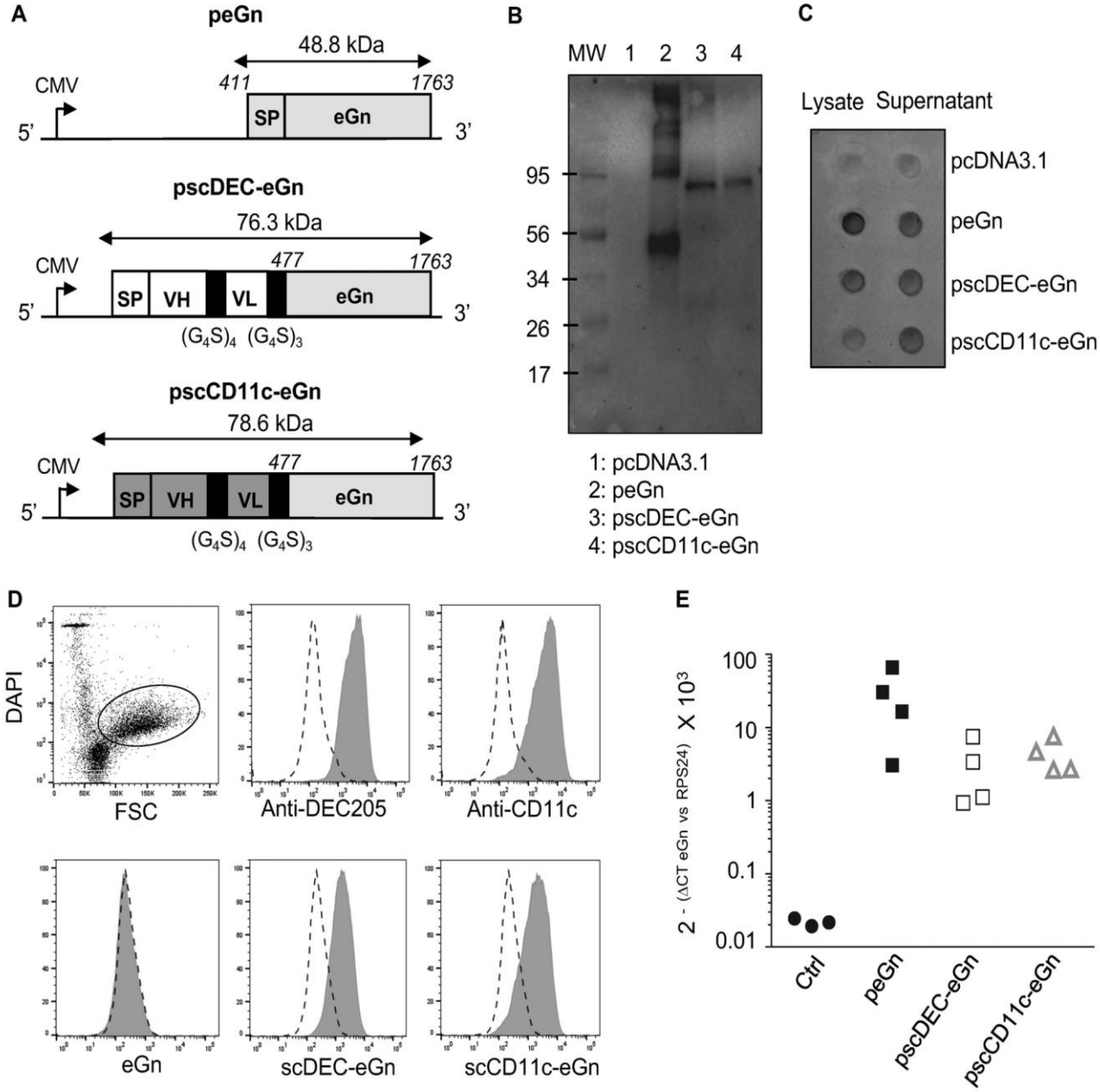



**Fig. 2** Design and expression of peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn. **a** Schematic representation of peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn. peGn includes the codon-optimized eGn sequence with its intrinsic signal peptide (SP, RVFV M segment from nt 411 to nt 1763) and cloned in the pcDNA4-V5His expression vector. pscDEC-eGn and pscCD11c include the signal peptide (SP) of the VH chain of the parental mAb sequence, the scFv (VH and VL) sequence and the nt 477 to nt 1763 portion of the codon-optimized eGn sequence. The VH and VL sequences are connected together with a $(G_4S)_4$ linker and the scFv and eGn sequences are connected with a $(G_4S)_3$ linker. These chimeric sequences were cloned in a pcDNA3.1 vector. **b, c** HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1, peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn. In (**b**), the cell lysates (10 µl) were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and eGn was revealed with anti-RVFV HMAF followed by a HRP-GAM IgG. The predicted sizes of the expressed untargeted and chimeric eGn proteins are 48.8 kDa for untargeted eGn, 76.3 kDa for the scDEC-eGn protein and 78.6 kDa for the scCD11c-eGn protein. All samples were gathered from the same experiment and were processed in parallel (1 repeated experiment). In (**c**) the cell lysates (100 µl) and the concentrated cell supernatants (500 µl) gathered from the same experiment were spotted onto the same nitrocellulose membrane and the eGn protein was revealed as in (**b**) (1 repeated experiment). **d** Sheep skin lymph low-density cells were reacted with the parental anti-DEC205, anti-CD11c or isotype control mAbs (top panel) or with the concentrated supernatant from HEK293 cells transfected with peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn and a negative control pcDNA3.1 (bottom panel). The staining of the $DAPI^{neg}$ $FSC^{hi}$ cells, which include dominantly cDCs, is depicted (dark gray) compared to control (dash line). Bound mAbs were revealed with A488-DAM IgG and bound eGn with anti-RVFV HMAF followed by A488-DAM IgG. **e** Relative expression of peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn in sheep skin. peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn (100 µg) were injected intradermally in 100 µl saline in inner front leg sites of two sheep followed by SEP (532 V/cm). After 48 h, RNA was extracted from skin biopsies. eGn mRNA levels were measured using qRT-PCR, normalized with RPS24 ribosomal RNA and expressed as $2^{-\Delta CT}$ values (1 repeated experiment). Absence of residual plasmid in the RNA preparations was controlled using qPCR without reverse transcription

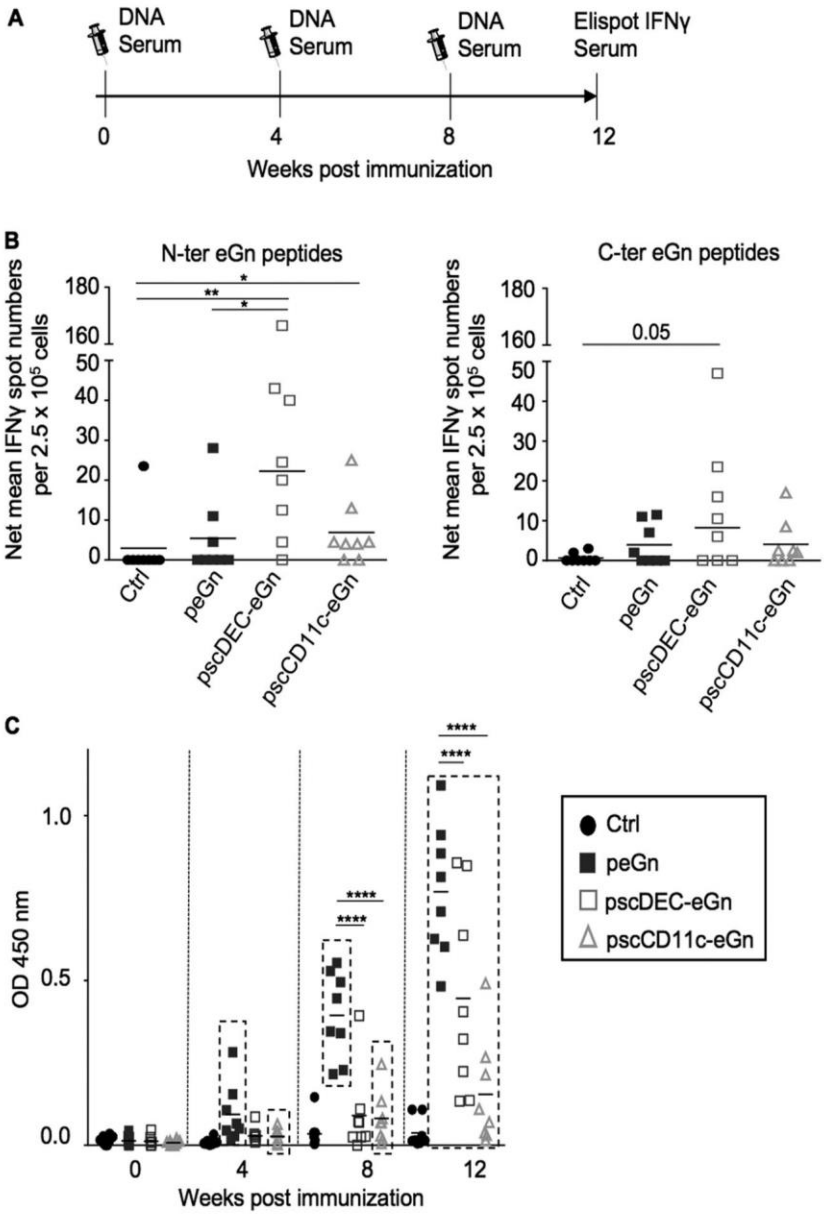



**Fig. 3** IFNγ T-cell and Ab responses induced by peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn in lambs. **a** Schematic representation of the immunization protocol. The 2-month-old lambs were immunized at weeks 0, 4 and 8 with 400 µg of peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn and 400 µg of pGM-CSF as adjuvant. Control lambs received pGM-CSF only. The plasmids were injected intradermally and the injection was immediately followed by SEP (532 V/cm). Sera were collected and the IFNγ T-cell responses were assessed by ELISPOT at the indicated time points. The syringe drawing is from Servier Medical Art which provides open source illustrations. **b** PBMCs ($2.5 \times 10^5$) were plated in Multiscreen plates coated with a capture anti-ovine IFNγ mAb (duplicated wells) and re-stimulated for 18 h with overlapping eGn peptides covering the N- and C-terminal parts (5 µg/ml), or with an irrelevant peptide (5 µg/ml). IFNγ spot counts were considered eGn specific when both duplicated well values from cells stimulated with eGn peptides were strictly superior to the duplicated well values from cells stimulated with the irrelevant peptide. The mean spot numbers in stimulated wells minus the ones stimulated with irrelevant peptides are shown (net mean values). Each symbol in the graphs represents an individual animal and the mean is indicated. *P* values between the two groups were determined according to the Mann–Whitney test (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$). **c** The serum of the lambs immunized with peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn and of control lambs were assayed for the detection of eGn-specific IgG using indirect ELISA. A lysate from HEK293 cells transfected with peGn was used as coating (see Materials and methods section) and the individual sera were tested in a 1:100 dilution. The OD signals at 450 nm from the sera collected at weeks 0, 4, 8 and 12 are shown in 3 C (1 repeated experiment). Each lamb serum is shown as a distinct symbol and the mean OD value is represented as an horizontal bar. *P* values were determined using the two-way ANOVA with Bonferroni's correction to evaluate the statistical significance of the OD value differences between vaccinated groups (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ****$p < 0.0001$) and the significance of the differences between the OD values measured at the different weeks versus at day 0 was evaluated for each vaccinated group using paired *t*-test and the groups with statistically significant differences are indicated by a box

Immunization with peGn promotes the anti-eGn IgG responses in sheep sera

Anti-eGn IgGs were measured in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The OD450 nm results from 1:100 diluted sera are reported in Fig. 3c. Significant detection of anti-eGn IgG levels was obtained after one injection in the peGn and pscCD11c-eGn-vaccinated group ($p < 0.05$ in comparisons versus week 0, Fig. 3c). The induction of significant anti-eGn IgG levels was reached for all groups after three inoculations (Fig. 3c). The levels of anti-eGn IgG were higher in the sera from peGn- versus pscCD11c-eGn-

and pscDEC-eGn-vaccinated sheep at weeks 8 and 12, and they tended to be higher in the pscDEC-eGn- than in the pscCD11c-eGn-vaccinated sheep at week 12 (Fig. 3c). End-point titers were calculated from serially diluted sera and gave similar differences between groups (Supplementary material 3). The ELISA-positive sera were tested for their capacity to neutralize RVFV in a reduction plaque assay. None of the sera were neutralizing at the difference with positive control sera from infected sheep (data not shown). Overall, there was a graded capacity of our RVFV DNA vaccines for induction of anti-eGn IgG, with peGn being the most potent and pscCD11c-eGn being least potent, and the anti-eGn IgGs were not capable of neutralizing RVFV in vitro.

### peGn and to a lesser extent pscDEC-eGn induce partial protection against infectious RVFV challenge in sheep

Sheep were challenged at week 12 with the RVFV 56/74 strain, a previously demonstrated virulent strain in sheep.[31] The infected sheep were monitored for clinical symptoms and temperature, and sera were collected regularly for viral RNA and infectious particle detection (see Materials and methods). Two sheep died in the control group at 6 and 8 days post challenge (dpc), and none in the vaccinated groups (Table 1). The post-mortem lesions included severe pulmonary edema, hemorrhages in multiple organs, generalized lymphadenopathy and multifocal liver necrosis. The mean body temperature reached a peak over 41 °C in the control, pscCD11c-eGn and pscDEC-eGn vaccinated groups (41.06, 41.23 and 41.33 °C respectively), whereas the mean body temperature was significantly reduced to 40.05 °C in the peGn vaccinated sheep ($p < 0.0001$) (Fig. 4a). The total clinical score (Table 1), reflecting the severity of the disease (see supplementary material 2 for scoring), was the highest in the control group (92), slightly reduced in the pscCD11c-eGn group (44) and much decreased in the pscDEC-eGn (29) and peGn (22) vaccinated group (Table 1). The main symptoms were nasal mucus discharges, decreased activity, anorexia and conjunctive redness. The viral RNA copies per ml serum were measured on 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10 dpc for each sheep, except for the two dead sheep in which copies were monitored up to 6 dpc (Fig. 4b). The mean integrated value of the viral RNA copies per ml serum (viral RNA area under the curve (AUC), see Materials and methods) reached $3.87 \times 10^{12}$ in the control sheep and was significantly decreased in the pscDEC-eGn and peGn vaccinated sheep ($6.39 \times 10^{10}$, $p < 0.05$ and $4.41 \times 10^{9}$, $p < 0.01$ respectively, Fig. 4c). The viral RNA AUC mean value of the pscCD11c-eGn group was slightly but not significantly reduced compared to the one of the control group ($3.89 \times 10^{11}$). The peGn vaccinated sheep cleared the viral RNA copies in serum on 6 dpc, the pscDEC-eGn vaccinated sheep on 8 dpc and the pscCD11c-eGn vaccinated and control group on 10 dpc. The particle-forming units (pfu) per ml serum were measured over 8 days (Fig. 4d); the mean integrated values (pfu AUC, see Materials and methods) were calculated and followed the same trend as the viral RNA ones (Fig. 4e). The peGn vaccinated sheep cleared the infectious particles in serum on 5 dpc, the pscDEC-eGn vaccinated sheep and the pscCD11c-eGn vaccinated on 4 dpc and control group on 8 dpc. Finally, the IgG responses directed to eGn, to total RVFV antigens, and to N antigens and the neutralizing Abs (NAbs) were monitored following infection (supplementary material 4). The anti-eGn IgG response was boosted between 5 and 6 dpc in the vaccinated groups, reached the highest levels in the peGn vaccinated sheep ($p < 0.05$), whereas the control sheep developed detectable responses only from 10 dpc, reaching much lower levels than in the vaccinated sheep. The anti-RVFV total antigen IgG followed a similar trend. The titers of the NAbs at 10 dpc reached similar levels in all groups (supplementary material 4), indicating that the DNA vaccines did not induce a clear priming of NAbs, whereas they clearly primed the anti-eGn and anti-RVFV IgG responses which were boosted by the viral challenge. Notably, in agreement with an efficient control of infection by the DNA vaccines, the IgG response against the N immunodominant viral protein, to which all sheep were naive at the time of challenge, was lower in the vaccinated groups than in the control group ($p < 0.05$ at 10 dpc).

**Table 1.** Clinical scores upon infectious challenge in vaccinated lambs

| | Individual scores[a] | Total group score[b] | Death per group |
|---|---|---|---|
| Control | 21,6,2,13,39,1,1,9 | 92 | 2/8 |
| peGn | 4,2,4,2,0,8,2,0 | 22 | 0/8 |
| pscDEC-eGn | 0,11,4,2,7,3,2,0 | 29 | 0/8 |
| pscCD11c-eGn | 3,8,6,5,5,7,8,1 | 43 | 0/8 |

[a]The individual score was calculated by adding the daily clinical score over 20 days. The daily clinical score was established by monitoring anorexia, eye aspect, activity/movement, lack of rumination, nasal mucus, prostration, respiratory movement, tremor (1 to 3 was attributed depending of severity) and death (15 was arbitrarily attributed)
[b]The total group score was calculated by adding the individual scores of the group

So far, our data show that peGn was efficient at inducing significant levels of protective immunity, reducing by about 3 log10 the RNA viral loads and accelerating viral clearance, in association with a strong decrease in the clinical symptoms severity. pscDEC-eGn, which induced higher T-cell responses and lower anti-eGn IgG responses than eGn, revealed to be less protective than peGn, suggesting that the IFNγ T-cell response is less critical than the Ab response in the protective immunity induced by these vaccines. Finally, pscCD11c-eGn, which was the least efficient at triggering anti-eGn IgG responses, did not induce significant protection.

### The anti-eGn IgG levels at challenge correlate with virological and clinical protection

In order to get further insight into the immune parameter(s) associated with protection against RVFV induced by our DNA vaccines, we took advantage of the fact that the three DNA vaccines induced a relatively wide range of values of immune, virological and clinical parameters. These parameter values were loaded in a principal component analysis (PCA) in order to identify the main axes of the data variance as well as the key variables. In a first analysis where we used the data of the control and vaccinated groups, the PC1 axis, which explains 36.82% of the variance, clearly separates the data from the control and the vaccinated group, with the peGn vaccinated group data being the most distant from the control group data (Fig. 5a). In a second analysis using the vaccinated group data, the PCA loading from each parameter shows that the clinical scores, the viral RNA and the pfu cluster together and oppose the anti-eGn and anti-RVFV IgG levels at 0 dpc and less so at 6 and later dpc (Fig. 5b). The T-cell responses, materialized by a short arrow, do not generate any significant pattern (Fig. 5c). Finally, we performed one to one correlation analyses (Spearman's test) and found that the best negative correlation index was obtained between the pfu AUC and the anti-eGn IgG levels at 0 dpc ($r = -0.6$, $p < 0.01$, Fig. 5c and supplementary material 5), and the correlation significance was lost at later time points. A similar negative correlation was obtained between the clinical scores and the anti-eGn IgG levels. No correlation could be found between the T-cell responses and the virological or clinical parameters.

Altogether, the global analysis of the immune, virological and clinical data of sheep vaccinated with peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn indicate that anti-eGn IgG levels at the time of challenge are associated with protection and suggest that these

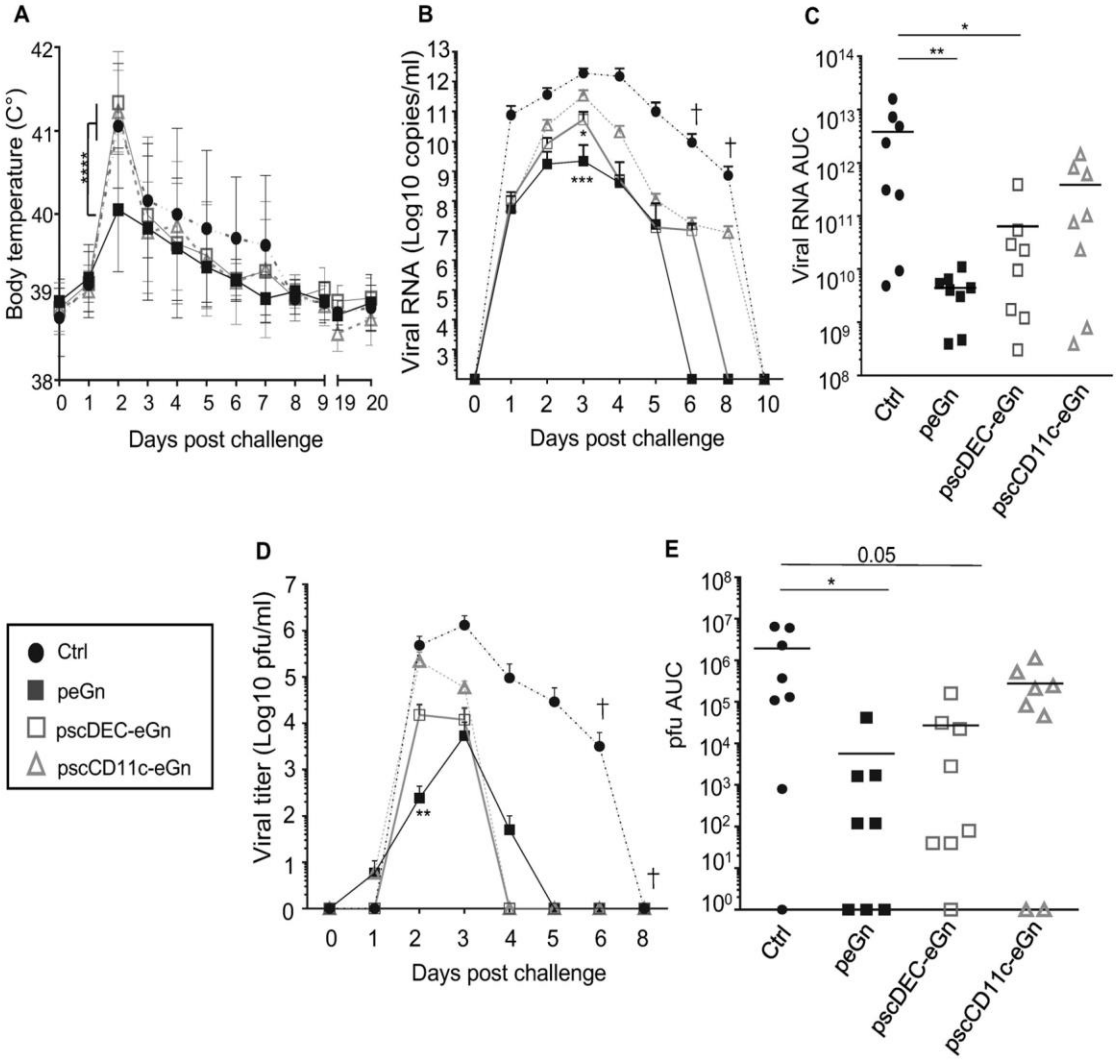



**Fig. 4** Body temperature and viremia upon RVFV challenge in lambs vaccinated with peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn. The vaccinated and control sheep were challenged with the RVFV 56/74 strain ($10^6$ $TCID_{50}$) 3 weeks after the last immunization. **a** The rectal temperature was measured daily. Data are mean ± SD of individual values ($n = 8$ sheep per experimental group). The $p$ values were determined according to a two-way ANOVA test with Bonferroni's correction (****$p < 0.0001$). **b** The viral RNA copy numbers/ml in serum were quantified by qRT-PCR and the mean values for each group with the top standard error of mean are shown over times. **c** The viral RNA area under the curve (viral RNA AUC) was calculated over 10 days for each animal. **d** The plaque-forming unit load (pfu/ml) were quantified in viral RNA-positive sera and the mean values for each group with the top standard error of mean are shown over times. **e** The pfu area under the curve (pfu AUC) was calculated over 8 days. Each symbol represents an individual animal and the mean is indicated by a horizontal line ($n = 8$ per experimental group). In (**b**–**d**), the $p$ values between the vaccinated and control groups were determined with the Mann–Whitney test (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$). A cross symbol indicates death

Abs, although not neutralizing in plaque assay, were instrumental in the protective immunity induced by our DNA vaccines.

## DISCUSSION

In this work, we showed that a DNA vaccine encoding untargeted eGn conferred significant protection against a RVFV challenge in sheep. Our finding suggested that the anti-RVFV protective immunity relied on antibodies, although not neutralizing, and not on IFNγ-producing T cells. However, polyfunctional cytokine secretion by T cells and cytotoxicity, which were not assessed here, could also play a role. Importantly, our results indicate that targeting antigens to DEC205 can be used to improve the T-cell response in ruminants when this type of response would be beneficial.

The formalin-inactivated and live-attenuated vaccines have been licensed in African countries where RVFV is endemic (see ref. [32] for recent review on RVFV vaccines). However, inactivated vaccines require a booster and annual revaccinations, the live-attenuated Smithburn vaccine is teratogenic and the live-attenuated clone 13, which has a higher safety profile associated to a large deletion in the small segment, can nevertheless induce abortion during the first trimester of gestation.[33] With the goal to improve safety, next-generation live-attenuated vaccines, such as a reassortant between clone 13 and the MP-12 chemically attenuated strain[34] or MP-12-derived clone with silent mutations,[35] have been developed. However, there is resistance of many countries to authorize live-attenuated vaccines, due to the risk of reversion to virulence. Therefore, other vaccine candidates were generated and demonstrated promising results in sheep and include subunit vaccines,[36,37] virus-like particles,[36] virus replicon particle vaccines,[34] virus-vectored vaccines[36,38,39] and DNA.[40] In contrast to our results, a DNA vaccine encoding for the glycoprotein precursor Nsm/Gc/Gn did not induce T- or B-cell response in sheep, using 3 injections of 400 µg DNA in lipofectin as a delivery method.[40] Several of these novel candidates were compared to a commercial vaccine, either to an inactivated vaccine[36] or to clone 13.[34] In the first study, the inactivated

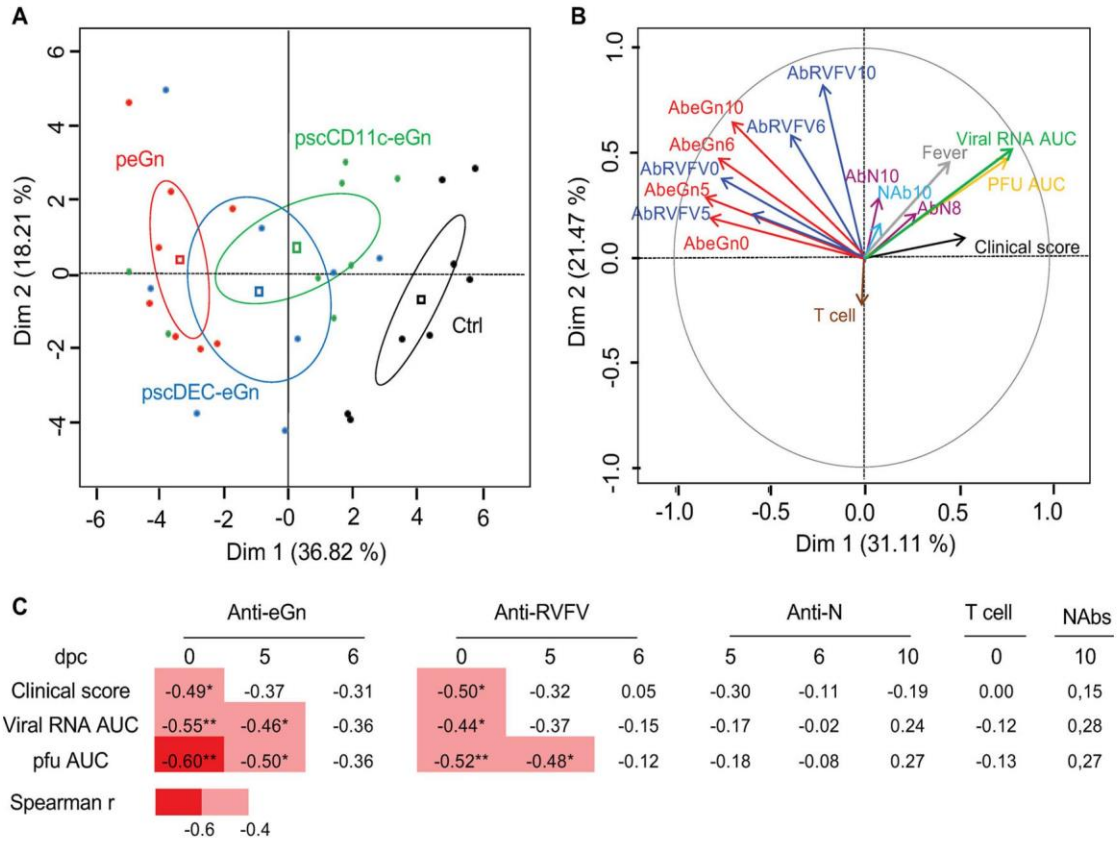



**Fig. 5** PCA and correlation analysis of the clinical, virological and immune response data of the lambs vaccinated with peGn, pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn. **a** A PCA plot of the clinical, virological and immune response data (=PCA variables) of vaccinated and non-vaccinated sheep is depicted, with each sheep represented as a dot in a specific color according to its group assignment: PC1 explains 36.82% of the total variation of the data between sheep and PC2 explained a further 18.21% of the variation. The vaccination regimen is indicated by a distinct color (red for peGn, blue for pscDEC-eGn, green for pscCD11c-eGn). **b** Thirty-one individual input variables were loaded (see Materials and methods) and the most relevant ones are indicated on the figure for clarity: viral RNA AUC, pfu AUC, individual clinical scores, integrated temperature measurements, T-cell responses at week 12, anti-eGn IgG OD signals (AbeGn) at 0, 5, 6 and 10 dpc, anti-N IgG OD signals (AbN) at 8 and 10 dpc, NAb titers (NAb) at 10 dpc and anti-RVFV IgG OD signals (AbRVFV) at 0, 5, 6 and 10 dpc. **c** Correlation analyses between the immune response data versus the clinical and virological data. For each vaccinated lamb, the anti-eGn and anti-RVFV IgG OD signals at 0, 5 and 6 dpc, the NAb titers at 10 dpc and the anti-N IgG OD signals at 5, 6 and 10 dpc were subjected to bilateral Spearman's correlation analysis against the individual clinical scores, the viral RNA AUC and the pfu AUC data. The statistically significant negative correlations are indicated in red (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$) and the $r$ coefficient is indicated

vaccine decreased by 4 log10 the peak of viral RNA levels in serum and was less efficient than purified eGn in oil-in-water adjuvant or than a viral replicon encoding for Gn/Gc.[36] In the second study, clone 13 and the viral replicon induced full protection without detectable viral RNA in serum.[34] However, it should be pointed out that the mean RNA copies per ml serum at the peak of infection of control sheep was close to 8 log10 copies in the first study[36] and to 10 log10 copies in the second one,[34] whereas it was above 12 log10 copies in our study, suggesting that our challenge conditions were more severe. We can speculate that a milder challenge would have improved the reduction of viral RNA load induced by our DNA vaccine (about 3 log10 here). Nevertheless, caution should be taken to compare these studies which were performed with different sheep breeds and different viral strains. Therefore, efforts should be made to better standardize across labs challenge experiments that should include a commercial vaccine as a reference to identify promising vaccines.

Higher levels of anti-eGn IgG were reached with peGn than with pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn and correlated to protection. The higher Ab quantity could result from a higher expression of peGn in vivo, a hypothesis which is supported by the tendency for higher mRNA expression from peGn in skin; however, an analysis of protein expression from a large number of transfected skin biopsies would be necessary to further validate this hypothesis. In addition, untargeted eGn may be available to B cells for a longer time than the DC-targeted eGn fusions which are likely to be rapidly secreted and readily internalized by the targeted receptor, a feature which has been proposed to reduce Ab responses while promoting T-cell responses.[15]

Besides quantity, the quality of the antibodies generated by our different DNA vaccines may also play a role in protection. In that respect, the fact that the anti-eGn antibodies induced by all three DNA vaccines were not neutralizing in vitro is puzzling. In addition, our DNA vaccines did not appear to prime for neutralizing antibody production since the DNA vaccinated sheep and control sheep showed similar levels at 10 dpc. In contrast, soluble eGn produced by drosophila cells and delivered in a oil-in-water adjuvant could induce neutralizing antibodies in sheep[36] but in line with our finding, a DNA vaccine encoding untargeted eGn administered to mice using gene gun in skin conferred significant protection with weak induction of neutralizing antibodies.[6] The eGn protein, related to its mode of expression by skin cells, may not be in an optimal conformation to induce neutralizing antibodies. Alternatively, the capacity of antibodies to neutralize the infectivity of RVFV may be different in the gold standard assay using VeroE6 cells and in the in vivo conditions, due to the likely difference of viral receptor engagement, as proposed in the case of flaviviruses.[41] The anti-eGn antibodies induced by DNA vaccines may display anti-RVFV properties such as complement-dependent inhibition or Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or

phagocytosis. The ADCC efficacy depends on the Ab isotype and on the nature of the recognized epitope on the viral protein, as shown in the case of influenza.[42] Untargeted eGn and eGn fused with scFv may differ in their respective capacities to generate such anti-viral antibodies. Assessment of the anti-RVFV Ab functions will require the development of suitable in vitro tests which would help to potentially identify better correlates of protection than anti-eGn Ab levels.

pscDEC-eGn did promote the IFNγ T-cell responses in sheep, although it tended to be less expressed than peGn in sheep skin. In the context of DNA vaccination, DEC205 targeting appeared to have a positive effect on T-cell responses in several instances such as in mice[12,13] and even cattle,[43] but in other cases DEC205 targeting rather decreased the IFNγ-producing T-cell response with regulatory T-cell induction.[44,45] Here, the targeting of eGn to CD11c did not promote T-cell responses, although pscCD11c-eGn was at least as expressed as pscDEC-eGn. This is in contrast with results in mice where CD11c targeting strongly enhanced the IFNγ T-cell responses.[14] Therefore, the outcome of DEC205 and CD11c targeting of antigens expressed by DNA plasmids is inconsistent and difficult to predict for T-cell as well as for B-cell responses,[12,44] in a given species and throughout species, and could depend on several parameters. Firstly, DC activation by the DNA delivery method is a prerequisite to induce strong T-cell responses, as the targeting of steady-state DC induce regulatory T cells and tolerance;[46] therefore, the DNA delivery method, the combination with adjuvants and the duration of plasmid expression could all affect the efficacy of DC targeting. In the present work, we combined electroporation which has been proposed to have a strong adjuvant effect through inflammatory cytokine release and APC mobilization in skin,[29] with a plasmid encoding ovine GM-CSF, a largely used cytokine adjuvant in DNA vaccination including in sheep.[8,28] Secondly, the nature of the targeted vaccine antigen, by its content in self-mimicking epitopes expanding regulatory T-cell responses, may affect effector T-cell priming.[47] Thirdly, the same targeted orthologous receptor may have different sub-cellular routing pathways with variable kinetics in different species, impacting on the efficacy of major histocompatibility complex (MHC) class I or class II antigen presentation,[17,48] and even in the same species, Ab targeted to different epitopes on the same molecule were shown to induce different responses.[49] Finally, the distribution of expression of the targeted receptor among cell types and mononuclear phagocyte subsets in different species may affect the immune response, given the functional specialization of the different subsets. Indeed, in humans and ruminants, DEC205 expression on leukocyte populations is much broader than in mice and is found on B, T and NK lymphocytes.[50,51] In mice, CD11c is expressed primarily on DCs and also on some macrophages and natural killer (NK) cells, whereas in sheep CD11c is widely expressed on macrophages and B cells.[52]

To the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate that a plasmid encoding for eGn induces a significant protection in sheep, indicating that an effective vaccine against RVFV could be produced based on DNA. However, our strategy needs to be further optimized. Indeed, for application in the field and especially in Africa, the minimum number of administrations and the plasmid dose to achieve protection should be established with downscaling experiments, and the mode of delivery should be adapted to mass vaccination, such as with a high pressure needle-free delivery system which has been shown to be as efficient as electroporation in pigs[16] or possibly with new portable electroporation-based systems.[53] The level of protection that we achieved is incomplete and complete immunity is desirable to protect the highly sensitive fetuses; however, a strong decrease in viral load would also decrease the risk of transmission to mosquito vectors. The immunity triggered by peGn might be further improved by adding other RVFV antigens such as by adding Gc (or eGc) and/or N proteins. While the T-cell response against eGn did not seem to impact protection, T-cell responses against other RVFV antigens may be of value. Better vectors driving higher antigen expression would be also desirable: indeed, differences in expression between vectors, as suggested by Fig. 2e, may have masked a positive effect of the targeting. Finally, as our results support the importance of anti-eGn IgG in protection, strategies to further improve this type of response should be privileged. In that respect, eGn could be targeted to receptors such as CLEC9A which is a particularly suitable targets for Ab response induction.[54,55] CLEC9A is selectively expressed on cDC1s in different species including in sheep,[23] and its targeting results in the prolonged antigen presentation favoring follicular helper T-cell development, strong germinal center formation, leading to high Ab responses of strong affinity.[54] However, despite the existence of a CLEC9A ortholog in sheep and high expression of mRNA by cDC1s,[23] we were unable to generate any anti-CLEC9A mAb reacting with sheep cDC1s. Alternatively, XCR1 targeting, another receptor exclusively expressed by cDC1s across species, could also be used to successfully induce high anti-eGn IgG responses in sheep, as recently showed by us in pigs for promoting anti-influenza M2e IgG responses.[56]

In conclusion, we showed that DNA vaccination is a very promising control strategy against RVFV in sheep. In addition, by using CD11c and DEC205 targeting which was detrimental to protection, we found that Ab responses against eGn, and not IFNγ T-cell responses, are significant correlates of protection in sheep. This outcome of DC targeting related to its capacity to modulate immune responses could be extended to other pathogens for identifying immune correlates of protection in application species where mechanisms are difficult to investigate. In the case of RVFV, this DC-targeting strategy guides us towards the development of future vaccines optimized for induction of high levels of anti-eGn IgG whose anti-viral functions remain to be deciphered.

## MATERIALS AND METHODS

### Abs and hydridomas

The hybridomas producing the anti-ovine CD11c (mouse IgG1, OM1) and the anti-ruminant DEC205 (mouse IgG2b, CC98) mAbs were developed by INRA and the Pirbright Institute (former Institute for Animal Health (Compton, UK)) respectively. The mAbs used in this study are the anti-CD1b (mouse IgG2a, Th97, WSU (USA)), the anti-CADM1 (chicken IgY, 3E1, CliniScience, #CM004-3), the anti-bovine IFNγ (CC330, Bio-Rad, #MCA2112) and the biotinylated (biot)-anti-bovine IFNγ (CC302, Bio-Rad, catalog #MCA1783). The conjugated antibodies are the Alexa 647-conjugated (A647)-donkey anti-chicken IgY (Jackson ImmunoResearch, #703-606-155) and the A488-donkey anti-mouse IgG (DAM) (Jackson ImmunoResearch, #715-546-150), the A488-goat anti-mouse (GAM) IgG2a (Fisher Scientific, #10114282), the phycoerythrin (PE)-GAM IgG1 (Fisher Scientific, #10246642) and PE-GAM IgG2b (Fisher Scientific, #10012802), and the horseradish peroxidase (HRP)-rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, #A9044) and HRP-mouse anti-sheep IgG (Sigma-Aldrich, #A9452). The anti-RVFV HMAF production was approved by the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur under the number 02518.2 and was conducted at ANSES, Lyon, France. Balb/c mice were inoculated intraperitoneally with inactivated RVFV-infected mouse brain suspension in Freund's complete adjuvant on days 0 and 1, in Freund's incomplete adjuvant on days 7 and 14, and with a virulent suspension in Freund's incomplete adjuvant on days 21 and 28. On day 25, the mice were inoculated intraperitoneally with TG180 sarcoma cells. After 1 week, ascitic fluid was harvested.

### Cell lines

Human embryonic kidney cells (HEK293, ATCC® CRL-1573) and African green monkey kidney cells (VeroE6, provided from Pierre Russo, Anses, Sophia-Antipolis Laboratory, Ruminant Pathology Unit, 06902, France) were maintained in culture with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies), supplemented with 5% decomplemented fetal bovine serum (FBS) and antibiotic solution at 37 °C. Cell lines were checked

to be free of mycoplasma contamination using a mycoplasma detection Kit (MycoAlert™, Lonza, Switzerland).

### RVFV strains

The virulent strain RVFV 56/74, provided by Alejandro Brun (CISA-INIA), originally isolated from an infected cow,[31] was amplified on C6/36 insect cells and titrated on VeroE6 cells according to the Reed–Muench method. The attenuated RVFV virus MP-12 strain,[57] provided by Michèle Bouloy (Paris Pasteur Institute), was amplified and titrated on VeroE6 cells.

### Construction and production of plasmids

Genes encoding for the variable region of the murine heavy (VH) and light (VL) chains of the anti-ruminant DEC205 and the anti-ovine CD11c mAb were amplified by PCR and subcloned in the pSK vector for sequencing (Synogene). The sequences were deposited on Bankit (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) under the ID 2070859 (release on 1 September 2018). For each mAb, the original VH signal peptide was fused to the VH and the VL fragments joined by a sequence encoding for a flexible linker $(G_4S)_4$ to generate the scFv sequences. A sequence encoding for the ectodomain of the Gn glycoprotein (eGn) of the ZH501 strain was codon-optimized for expression in eukaryotic cells (Genecust, Luxembourg) and was fused in frame to the carboxy terminus of the scFv sequence with a $(G_4S)_3$ linker. The eGn sequence spans from nucleotide (nt) 477 to nt 1763 (DQ380202.1) of the RVFV M segment, and is devoid of transmembrane domains. The fusion constructs encompassing the VH signal peptide, scFv and eGn were cloned into a pcDNA3.1 expression vector (InvitroGen) and the resulting plasmids are designated as pscDEC-eGn and pscCD11c-eGn. In addition, fusion constructs with mCherry replacing eGn sequences were built as well as a construct including a control scFv, provided by Synogene (pscDEC-mCherry, pscCD11c-mCherry and pscCtrl-mCherry). A plasmid encoding for untargeted eGn was generated (peGn). peGn includes the nt 411 to nt 1763 codon-optimized sequence of the M segment with the natural signal peptide of Gn[58] cloned into a pcDNA4-V5His expression vector (InvitroGen) (Genecust). The plasmid encoding for ovine GM-CSF (pGM-CSF) has been previously described.[28] A firefly luciferase expression plasmid (pLuc) was kindly provided by Stéphane Biacchesi (INRA, France). The sequence encoding the RVFV N nucleoprotein was cloned into the expression vector pMT/BiP/SNAP-His. Plasmid productions for immunization were prepared using Endofree® Plasmid Giga Kits (Macherey-Nagel) and were stored at −20 °C until use.

### Plasmid transfection in vitro

HEK293 cells ($5 \times 10^6$ cells) were transiently transfected with JetPRIME® (Polyplus, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10 µg of peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn or pcDNA3.1 (negative control) were mixed with 20 µl of polymer reagent and added to the cells. The supernatants and cells were harvested at 72 h post transfection.

### Cell lysate and supernatant preparation

Cell pellets of transfected HEK293 cells or MP-12-infected VeroE6 cells were lysed in borate lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM borate, 150 mM NaCl, pH 9)+protease inhibitors at a 1:9 volume ratio (pellet/buffer), the lysates were sonicated, aliquoted and kept frozen. The transfected cell supernatants were concentrated 20 to 40 times with Amicon® Ultra centrifugal filter 30 K (Millipore) and a protease inhibitor cocktail was added.

### Western blots and dot blots

Cell lysates were analyzed by western blot following a 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions and cell supernatants were analyzed by dot blot under nonreducing conditions. Blots were incubated overnight at 4 °C with anti-RVFV HMAF in a 1:1000 dilution in phosphate-buffered saline (PBS) +10% fat-free milk (w/v) followed by HRP-rabbit anti-mouse IgG Ab. Immunoreactive bands were visualized with ECL substrate (SuperSignal™ West Femto, Thermofisher) and dots were visualized with 3,3′-diaminobenzidine substrate (Sigma-Aldrich). Image acquisitions were done with Chemidoc imaging system (Bio-Rad). The blot experiment was performed with respect to the ethical guidelines and the technical protocols conducted at ANSES laboratory in Lyon, France.

### Lymph duct cannulation and low-density lymph cell collection

The prescapular lymph duct of Prealpes sheep was cannulated to collect pseudo-afferent lymph cells draining from the skin, as previously described.[59] The cannulated sheep were housed at the Unité Commune d'Expérimentation Animale in Jouy-en-Josas, France. This protocol was done under compliance with national legislation on animal experimentation and was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the INRA research center in Jouy-en-Josas (COMETHEA) under the number 11–019.

### Assessment of plasmid transfection efficacy in sheep skin

Plasmid administration in sheep skin was performed on Prealpes sheep (2 to 12 months old) under general anesthesia (2 mg/kg xylazine and 10 mg/kg ketamine, intramuscular route). Immediately after intradermal injection of DNA in the left and right inner front leg zones, SEP was performed on the site of injection using the CUY 21 EDIT system (BEX, Tokyo, Japan). Disk electrodes (10 mm) were loaded with conductive gel (Alcyon, France) and 6 electric pulses were applied during 10 ms with 90 ms interval. In order to evaluate the V/cm parameter leading to optimal transfection in sheep skin, a pLuc reporter vector (100 µg) was injected intradermally and the injected skin areas were subjected to SEP with escalating pulses from 0 to 1331 V/cm. After 2 days, skin punch biopsies were harvested and lysed with 150 µl of lysis reagent (Luciferase Assay System E1500, Promega). Bioluminescence was measured using the In Vivo Imaging System (IVIS-200, Xenogen, UK) after adding 100 µl luciferine substrate. The optimal V/cm was found to be 532 V/cm and was used in all subsequent experiments (supplementary material 1). This experiment was approved by the COMETHEA ethic committee under the number 201504211534406 (APAFIS#520) in accordance with national guidelines on animal use and performed at the Unité Commune d'Expérimentation Animale UCEA-INRA in Bressonvilliers, France. In order to compare the expression of the different vaccine plasmids in sheep skin in vivo, plasmids (100 µg) were injected intradermally and subjected to SEP (532 V/cm). After 2 days, sheep were killed, 4 skin biopsies were collected from each injection site and frozen in liquid nitrogen. This experiment was approved by the French ethical committee CEEA Val de Loire, received the authorization number 04150.02 in accordance with national guidelines on animal use and was conducted at the Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale PFIE-INRA, Nouzilly, France.

### Immunizations and RVFV challenge

The experiment was approved by the Spanish ethical committee Department Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya CE-8820 and was conducted at IRTA-CReSA, Barcelona, Spain, under compliance to Spanish biosafety and ethic rules. Lambs (2 months old) were equally distributed in both sexes and were housed in the IRTA-CReSA experimental farm in Lerida, Spain, under A-BSL1. Lambs were randomly divided into 4 groups of 8 lambs and the vaccination was performed 3 times at 4 week intervals (0, 4, 8) under general anesthesia (2 mg/kg zoletil, intramuscular route); 8 animals per group is classically used in vaccine studies. Then, 400 µg of peGn, pscDEC-eGn or pscCD11c-eGn were injected intradermally together with 400 µg of plasmid adjuvant (pGM-CSF), followed by SEP as described above. A non-vaccinated control group (PBS plus pGM-CSF) was included. Sera were collected at weeks 0, 4, 8 and 12 post immunization and PBMCs were harvested at week 12 to analyze the T-cell response. The immunized sheep were moved to a A-BSL3 to perform the challenge at day 91 after the first immunization with $10^6$ $TCID_{50}$ of the RVFV 56/74 strain in 2 ml volume by subcutaneous route. After challenge, the clinical signs were daily monitored in a blinded manner. The daily clinical score per sheep was established by monitoring anorexia, eye aspect, gait, lack of rumination, mucosa aspect, prostration, respiratory movement, tremor (1 to 3 depending of severity) and death (15) (supplementary material 2). An individual clinical score per sheep was obtained by adding the daily values over 20 days. The final global score per group was the addition of each individual score. Serum was collected at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 dpc. At the end of the study, the animals were killed by an overdose of sodium pentothal.

### Low-density lymph cells and PBMC isolation

Low-density lymph cells were enriched over an optiprep gradient as previously described by our group,[59] frozen in FCS+10% DMSO using a Nalgene Mr. Frosty Cryo 1 °C Freezing Container and kept in liquid nitrogen. PBMCs were isolated in the A-BSL3 IRTA-CReSA's facility using

8 ml Vacutainer® CPT™ (BD Bioscience) by centrifugation at 1800 × *g* for 35 min at 25 °C. Tubes were shipped overnight at 4 °C to INRA, Jouy-en-Josas, France. Upon arrival, PBMCs were washed with PBS+1.3 mM citrate and re-suspended in X-vivo medium (Ozyme, France) supplemented with 50% FBS for overnight recovery at 4 °C.

### Staining of lymph dendritic cell and flow cytometry analysis

Low-density lymph cells were thawed and incubated on ice with PBS supplemented with 4% horse serum for 30 min. To analyze DEC205 and CD11c expression on DC subsets, lymph cells were labeled with a mix of primary mAbs (2 µg/ml) for 30 min, being either anti-CD1b+anti-CADM1 +anti-DEC205 mAbs, or anti-CD1b+anti-CADM1+anti-CD11c mAbs. Appropriate isotype control mAbs were used. Cells were washed and finally incubated with a mix of secondary Abs (1:200) being respectively A488-GAM IgG2a+A647-anti-chicken IgY+PE-GAM IgG2b or A488-GAM IgG2a+A647-anti-chicken IgY+PE-GAM IgG1. To analyze the binding of scDEC-mCherry and scCD11c-mCherry, the fusion proteins (50 µg/ml) +anti-CD1b+anti-CADM1 mAbs were incubated with lymph cells on ice for 30 min. A scCtrl-mCherry provided by Synogene was used as control. Cells were washed and incubated with PE-GAM IgG1+A488-GAM IgG2a. To analyze the binding of scDEC-eGn and scCD11c-eGn on low-density lymph cells, the concentrated supernatants of HEK293 transfected cells with peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn and pcDNA3.1 (negative control) were incubated with cells for 2 h at 4 °C. Cells were then incubated with anti-RVFV HMAF (1:1000) and finally with A488-DAM IgG (1:200). Dead cells were excluded by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Flow cytometry acquisitions were done with a LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and results were analyzed using FlowJo 10.0.6 software.

### Evaluation of eGn-specific T-cell responses by ELISPOT

IFNγ-secreting T cells were detected using polyvinylidene difluoride membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen®$_{HTS}$, Millipore) coated with 15 µg/ml anti-bovine IFNγ (capture mAb) in PBS. PBMCs ($2.5 \times 10^5$) were added to wells and re-stimulated with 5 µg/ml overlapping peptides (20 mers, offset 8, Mimotopes, Australia) covering the N-terminal (AEDPHL […] LLPDSF) and C-terminal (VCFEHK […] NYQCHT) amino-acid sequence of the eGn protein in X-vivo medium (Ozyme, France) supplemented with 2% FBS and antibiotic solution at 37 °C for 18 h. The overlapping peptides were divided in 2 pools initially diluted in $H_2O$/acetonitril (5 mg/ml) and distributed in 5 µl per well to have 1 µg of each peptide per well and avoid any toxicity of the $H_2O$/acetonitril diluent. In addition, cells incubated with 5 µl of $H_2O$/acetonitril peptide diluent (1:1 volume) and with an irrelevant peptide derived from the HIV polymerase (IKDFHVYFRESRDALWKGPG) were used as negative controls. Cells cultured with ConA (25 µg/ml) were used as positive controls. Each condition was tested in duplicated wells. IFNγ-secreting T cells were revealed using biot-anti-bovine IFNγ mAb at 0.5 µg/ml followed by alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (Mabtech, Sweden) and BCIP/NBT reagent (Life Technologies). Plates were automatically counted using the iSPOT AID ELISPOT reader. IFNγ spot counts were considered eGn specific when both duplicated well counts from cells stimulated with eGn peptides were strictly superior to the duplicated well counts from cells stimulated with irrelevant peptide. The net mean of the IFNγ spot counts were obtained by subtracting the mean counts from wells stimulated with irrelevant peptides out of the mean counts from wells stimulated with eGn peptides.

### Evaluation of anti-eGn, anti-N and anti-RVFV responses by ELISA

High-binding 96-well plates Nunc Maxisorp™ (ThermoFisher) were coated overnight at 4 °C either with 100 µl lysates from MP-12-infected VeroE6 cells or from HEK293 cells transfected with peGn or with SNAP-tag purified N protein, which was produced using a Drosophila expression system and kindly provided by Philippe Despres (Paris Pasteur Institute, France). The same lysates and protein batch was used in all experiments. The same positive and negative sheep sera were used to validate each plate. Sera were diluted 1:100 in PBS+2% fat-free milk (w/v) and incubated on the coated plates at 37 °C for 1 h. The plates were subsequently incubated with HRP-mouse anti-sheep IgG in a 1:4000 dilution at 37 °C for 1 h. HRP enzymatic activity was revealed using TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine) substrate. Optical density was measured at 450 nm using a TECAN microplate reader. Corrected OD values were obtained by subtracting the signal of wells coated with lysates from uninfected VeroE6 cells, from HEK293 cell transfected with pcDNA3.1, or coated with SNAP-tag. To calculate anti-eGn IgG end-point titers, 1:100 diluted sera were serially diluted 1:1 and the ELISA was processed as described above. End-point titers were calculated with a regression analysis plotting dilution versus $A_{450}$ as the highest dilution giving twice the absorbance of the mean of negative control wells.

### RNA extraction from serum and transfected skin samples

Total RNA was extracted from post-infection sera with QIAMP kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and eluted in 60 µl RNase-free water using QIACube (Qiagen). Total RNA was extracted from skin biopsies collected from the inoculation sites (about 250 mg per site) using 10 ml TRIzol LS reagent (Thermo Fisher Scientific) and homogenization with Ultra-Turrax T8. The first RNA extract was purified using a RNeasy MinElute cleanup column. The 1 µg purified RNA was treated twice with 5 µl of RNAse-free DNAse (30 Kunitz units, Qiagen) in order to remove any residual DNA plasmid from the injection and subjected to a final purification on column.

### Gn RNA quantification by qRT-PCR

For quantification of viral RNA copies per ml sera, a one-step qRT-PCR was performed using the SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen) as previously described.[60] Primers were designed to amplify a nt 1164 to nt 1258 Gn sequence of the M segment: forward primer 5′-AAA GGA ACA ATG GAC TCT GGT CA–3′, reverse primer 5′- CAC TTC TTA CTA CCA TGT CCT CCA AT-3′. A fluorescent probe was designed that hybridizes to the specific PCR product: FAM 5′- AAA GCT TTG ATA TCT CTC AGT GCC CCA A-3′ TAMRA. A standard corresponding to nt 1135 to nt 1286 of the M segment was synthetized using the Riboprobe® In Vitro Transcription Systems (Promega). The qRT-PCR was done on 3 µl of the serum elution and the program was 45 °C for 30 min, 95 °C for 5 min, linked to 45 amplification cycles of 95 °C for 5 s and 57 °C for 35 s, and cooling at 37 °C for 30 s. TaqMan run of experimental samples contained at least two replicates, a known positive control (RVFV ZH501 strain), a negative control (an other Phlebovirus RNA) and nuclease-free water. The number of viral RNA copies/ml in each serum sample was determined using the Gn RNA standard calibration curve. For each animal, the AUC of the viral RNA copies per ml over 10 days (viral RNA AUC) was calculated. For the detection of Gn mRNA in transfected skin biopsies, a two-step qRT-PCR was performed. The reverse transcription was done using the TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). In order to check that the transfected skin RNA did not include detectable residual plasmids, reverse-transcribed (3 ng estimated cDNA) and non-reverse transcribed RNA (3 ng RNA) were subjected to PCR reaction with the iTaq UniverSYBR Green (Bio-Rad) for amplifying a Gn fragment with forward primer 5′ – AGT GCG ATG GGC AGT TGT C–3′ (M segment, codon-optimized sequence) and reverse primer 5′ – TTC TTG AAC ACG GCA AAT GG–3′. The PCR cycling conditions were 95 °C for 10 min, linked to 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. No residual plasmid could be detected in any of the RNA samples. The relative expression of Gn mRNA in transfected skin samples was normalized using the qRT-PCR signals obtained with the ovine *ribosomal protein 24* (*RSP24*) gene which is a stably expressed reference gene in sheep cells.[61]

### Virus titration by plaque assay

The sheep sera were serially diluted in DMEM medium and inoculated onto VeroE6 cells in 12-well plates for a plaque assay over 5 days. The pfu were revealed by 1% (w/v) violet crystal and counted. For each animal, the integrated pfu load corresponding to the AUC of the number of pfu per ml serum over 8 days was calculated (pfu AUC).

### Plaque reduction assay

Neutralizing antibody was measured using plaque reduction and neutralization test. Sera were diluted 1:10 to $1:10^4$ in DMEM and incubated with 100 pfu of MP-12 virus at 37 °C for 1 h to enable neutralization to occur. Next, the virus and the serum mix (500 µl) were added to VeroE6 cell monolayers for a plaque assay. The neutralizing antibody titers were established as the last dilution which inhibited 50% of the foci number per well compared to virus-only control titration.

### Statistical and correlation analysis

Data were analyzed with the GraphPad Prism 6.0 software. To compare the T-cell responses, the anti-eGn IgG titers, the NAb titers at day 10, the viral

RNA at day 3, the pfu at day 2, the viral RNA AUC, the pfu AUC values and the luciferase signals between the two groups, we used the unpaired non-parametric Mann–Whitney test, as the data did not pass the normality test (Kolmogorov–Smirnov test). The paired parametric *t*-test was used to compare the antibody responses at different time points versus at day 0 within the same group. A two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Bonferroni's correction was used to compare the OD values of the Ab responses and the body temperature between immunized groups each day after infection, as the data distribution passed normality test. In most cases the standard deviations of the data were statistically similar between vaccinated groups (Brown–Forsythe test) but they were different between the vaccinated and the non-vaccinated groups. The correlation analysis between the immune response data versus the individual clinical scores, the viral RNA AUC and the pfu AUC was done with the bilateral Spearman's non-parametric test. The PCA was done with 31 factors and included the individual viral RNA copies/ml at 2, 3, 4, 5 and 6 dpc, the viral RNA AUC, the individual pfu/ml at 2, 3 and 4 dpc, the pfu AUC, the individual clinical scores, the integrated temperature measurements, the T-cell responses at week 12, the anti-eGn IgG OD signals at 0, 5, 6, 8, 10 and 12 dpc, the anti-N IgG OD signals at 5, 6, 8, 10 and12 dpc, the anti-RVFV IgG OD signals at 0, 5, 6, 8, 10 and 12 dpc and the NAb titers at 10 dpc. PCA graphics has been produced using FactoMineR R package (http://factominer.free.fr/).

### Data availability

All datasets and tools developed by the authors are available to readers. Samples for RVFV-infected sheep and vaccinated sheep will require legal authorization from the Agence Nationale de la Sécurité du Médicament (ANSM), as RVFV is a "select agent" in this country. The ScFv sequences were deposited on Bankit (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) under the ID 2070859 (release on 1 September 2018).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dany Leguere, Guillaume Martin, Olivier Boulesteix and Sylvain Breton for their efficient participation in the experiments conducted at the PFIE and to Pierre Sarradin for managing the regulatory aspects. We are grateful to Noémie Perrot for the experiment conducted at UCEA. We thank the personnel of the IRTA Experimental farm, i.e., Jordi Charles (IRTA-CReSA) as the coordinator in charge, Rafel Martos Sánchez (Freevet Bienestar Animal, C/ Jose Marco 15 Bajo B, 22500 Binefar, Spain) as the veterinary surgeon in charge and Miquel Molins (Laboratorio de Sanidad Animal de Catalunya (LSA, Avinguda de l'Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain), the laboratory director, who kindly ceded its facilities to process recently taken samples from the experimental farm. We thank the personnel of the IRTA-CReSA facilities, i.e., Raquel Rivas who was in charge of the RVFV stock preparation, Nuria Navarro who processed sheep samples at under strict biosafety measures, the personnel of bio-containment unit and David Solanes as the Biosafety Officer and Head Coordinator of Technical Services. We are grateful to Alejandro Brun (CISA-INIA, Centro de Investigación en Sanidad Animal, 28130 Madrid, Spain) who kindly agreed to use the RVFV strain at IRTA-CReSA for this study. We thank Michèle Bouloy (Paris Pasteur Institute, France) for the MP-12 strain, Stéphane Biacchesi (VIM-INRA-Université Paris-Saclay, France) for the pLuc plasmid and Philippe Desprès (Paris Pasteur Institute, France) for the purified N protein. We thank the Synogene team for their excellent technical support and follow-up with the scFv constructs. The work was supported by the grant ANR ASTRID RIFTVAC ANR-12-ASTR-0006-01, financed by the Direction Générale de l'Armement (France). T.C. was supported by a joint INRA-ANSES fellowship.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.C.: performed most of the experiments, organized experiments, analyzed all results, prepared all the figures and tables and wrote parts of the manuscript. I.S.-C.: designed and directed the study, coordinated the financial support and the experiments, wrote the request to the ethic committee, performed experiments, analyzed results, wrote parts and supervised the writing of the manuscript. P.M.: designed and directed the study and analyzed results. A.F.-R. and C.N.P.: designed and contributed to experiments. S.L. and C.U.: performed experiments (ELISA and qRT-PCR). L.J.: performed statistical analyses. C.B., E.B., E.V., J.P. and N.B.: performed animal experiments. V.C. performed analyses (ELISPOTS).

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** accompanies the paper on the *npj Vaccines* website (https://doi.org/10.1038/s41541-018-0052-x).

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## REFERENCES

1. Pepin, M., Bouloy, M., Bird, B., Kemp, A. & Paweska, J. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet. Res.* **41**, 61–66 (2010).
2. Schmaljohn, C. S. et al. Baculovirus expression of the M genome segment of Rift Valley fever virus and examination of antigenic and immunogenic properties of the expressed proteins. *Virology* **170**, 184–192 (1989).
3. Wu, Y. et al. Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E7564–E7573 (2017).
4. Besselaar, T. G. & Blackburn, N. K. Topological mapping of antigenic sites on the Rift Valley fever virus envelope glycoproteins using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* **121**, 111–124 (1991).
5. de Boer, S. M. et al. Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge. *Vaccine* **28**, 2330–2339 (2010).
6. Bhardwaj, N., Heise, M. T. & Ross, T. M. Vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or alphavirus replicons expressing Gn protects mice against Rift Valley fever virus. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **4**, e725 (2010).
7. Lopez-Gil, E. et al. A single immunization with MVA expressing GnGc glycoproteins promotes epitope-specific CD8+-T cell activation and protects immune-competent mice against a lethal RVFV infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2309 (2013).
8. Saade, F. & Petrovsky, N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert. Rev. Vaccin.* **11**, 189–209 (2012).
9. Redding, L. & Weiner, D. B. DNA vaccines in veterinary use. *Expert. Rev. Vaccin.* **8**, 1251–1276 (2009).
10. Tregoning, J. S. & Kinnear, E. Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases. *Microbiol. Spectr.* **2**, https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0028-2014 (2014).
11. Gothelf, A. & Gehl, J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Human. Vaccin. Immunother.* **8**, 1694–1702 (2012).
12. Nchinda, G. et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **118**, 1427–1436 (2008).
13. Cao, J. et al. DNA vaccines targeting the encoded antigens to dendritic cells induce potent antitumor immunity in mice. *BMC Immunol.* **14**, 39 (2013).
14. Wang, Q., Cao, W., Yang, Z. G. & Zhao, G. F. DC targeting DNA vaccines induce protective and therapeutic antitumor immunity in mice. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 17565–17577 (2015).
15. Gudjonsson, A. et al. Targeting influenza virus hemagglutinin to Xcr1+dendritic cells in the absence of receptor-mediated endocytosis enhances protective antibody responses. *J. Immunol.* **198**, 2785–2795 (2017).
16. Grodeland, G. et al. Antigen targeting to human HLA class II molecules increases efficacy of DNA vaccination. *J. Immunol.* **197**, 3575–3585 (2016).
17. Reuter, A. et al. Criteria for dendritic cell receptor selection for efficient antibody-targeted vaccination. *J. Immunol.* **194**, 2696–2705 (2015).
18. Schlitzer, A., McGovern, N. & Ginhoux, F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* **41**, 9–22 (2015).
19. Guilliams, M. et al. Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. *Immunity* **45**, 669–684 (2016).
20. Vu Manh, T. P. et al. Defining mononuclear phagocyte subset homology across several distant warm-blooded vertebrates through comparative transcriptomics. *Front. Immunol.* **6**, 299 (2015).
21. Macri, C., Dumont, C., Johnston, A. P. & Mintern, J. D. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, e66 (2016).
22. Caminschi, I., Maraskovsky, E. & Heath, W. R. Targeting dendritic cells in vivo for cancer therapy. *Front. Immunol.* **3**, 13 (2012).
23. Contreras, V. et al. Existence of CD8{alpha}-like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J. Immunol.* **185**, 3313–3325 (2010).
24. Apostolico, J. S. et al. Dendritic cell targeting effectively boosts T cell responses elicited by an HIV multiepitope DNA vaccine. *Front. Immunol.* **8**, 101 (2017).

25. Hua, Y. et al. Enhanced humoral and CD8+T cell immunity in mice vaccinated by DNA vaccine against human respiratory syncytial virus through targeting the encoded F protein to dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* **46**, 62–69 (2017).
26. White, A. L. et al. Ligation of CD11c during vaccination promotes germinal centre induction and robust humoral responses without adjuvant. *Immunology* **131**, 141–151 (2010).
27. Alvarez, B. et al. Antigen targeting to APC: from mice to veterinary species. *Dev. Comp. Immunol.* **41**, 153–163 (2013).
28. Niborski, V. et al. Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. *Vaccine* **24**, 7204–7213 (2006).
29. Todorova, B. et al. Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. *Sci. Rep.* **7**, 4122 (2017).
30. Flacher, V. et al. Skin langerin+dendritic cells transport intradermally injected anti-DEC-205 antibodies but are not essential for subsequent cytotoxic CD8+T cell responses. *J. Immunol.* **188**, 2146–2155 (2012).
31. Busquets, N. et al. Experimental infection of young adult European breed sheep with Rift Valley fever virus field isolates. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**, 689–696 (2010).
32. Faburay, B., LaBeaud, A. D., McVey, D. S., Wilson, W. C. & Richt, J. A. Current status of Rift Valley fever vaccine development. *Vaccines (Basel)* **5**, pii: E29 (2017).
33. Makoschey, B. et al. Rift Valley fever vaccine virus clone 13 is able to cross the ovine placental barrier associated with foetal infections, malformations, and stillbirths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004550 (2016).
34. Kortekaas, J. et al. Comparative efficacy of two next-generation Rift Valley fever vaccines. *Vaccine* **32**, 4901–4908 (2014).
35. Ly, H. J. et al. Attenuation and protective efficacy of Rift Valley fever phlebovirus rMP12-GM50 strain. *Vaccine* **35**, 6634–6642 (2017).
36. Kortekaas, J. et al. Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep. *Vaccine* **30**, 3423–3429 (2012).
37. Faburay, B. et al. A recombinant Rift Valley fever virus glycoprotein subunit vaccine confers full protection against Rift Valley fever challenge in sheep. *Sci. Rep.* **6**, 27719 (2016).
38. Warimwe, G. M. et al. Chimpanzee adenovirus vaccine provides multispecies protection against Rift Valley fever. *Sci. Rep.* **6**, 20617 (2016).
39. Busquets, N. et al. Efficacy assessment of an MVA vectored Rift Valley Fever vaccine in lambs. *Antivir. Res.* **108**, 165–172 (2014).
40. Lorenzo, G., Martin-Folgar, R., Rodriguez, F. & Brun, A. Priming with DNA plasmids encoding the nucleocapsid protein and glycoprotein precursors from Rift Valley fever virus accelerates the immune responses induced by an attenuated vaccine in sheep. *Vaccine* **26**, 5255–5262 (2008).
41. Mukherjee, S. et al. Mechanism and significance of cell type-dependent neutralization of flaviviruses. *J. Virol.* **88**, 7210–7220 (2014).
42. He, W. et al. Epitope specificity plays a critical role in regulating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 11931–11936 (2016).
43. Njongmeta, L. M. et al. CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4(+) T cell responses following DNA vaccination of outbred animals. *Vaccine* **30**, 1624–1635 (2012).
44. Niezold, T. et al. DNA vaccines encoding DEC205-targeted antigens: immunity or tolerance? *Immunology* **145**, 519–533 (2015).
45. Tenbusch, M. et al. Immunogenicity of DNA vaccines encoding simian immunodeficiency virus antigen targeted to dendritic cells in rhesus macaques. *PLoS One* **7**, e39038 (2012).
46. Hawiger, D. et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* **194**, 769–779 (2001).
47. Losikoff, P. T. et al. HCV epitope, homologous to multiple human protein sequences, induces a regulatory T cell response in infected patients. *J. Hepatol.* **62**, 48–55 (2015).
48. Macri, C. et al. Antibody-mediated targeting of antigen to C-type lectin-like receptors Clec9A and Clec12A elicits different vaccination outcomes. *Mol. Immunol.* **81**, 143–150 (2016).
49. Dakappagari, N. et al. Internalizing antibodies to the C-type lectins, L-SIGN and DC-SIGN, inhibit viral glycoprotein binding and deliver antigen to human dendritic cells for the induction of T cell responses. *J. Immunol.* **176**, 426–440 (2006).
50. Kato, M. et al. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int. Immunol.* **18**, 857–869 (2006).
51. Gliddon, D. R., Hope, J. C., Brooke, G. P. & Howard, C. J. DEC-205 expression on migrating dendritic cells in afferent lymph. *Immunology* **111**, 262–272 (2004).
52. Chevallier, N. et al. B-1-like cells exist in sheep. Characterization of their phenotype and behaviour. *Immunology* **95**, 178–184 (1998).
53. McCoy, J. R. et al. A multi-head intradermal electroporation device allows for tailored and increased dose DNA vaccine delivery to the skin. *Hum. Vaccin. Immunother.* **11**, 746–754 (2015).
54. Lahoud, M. H. et al. Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype. *J. Immunol.* **187**, 842–850 (2011).
55. Park, H. Y. et al. Evolution of B cell responses to Clec9A-targeted antigen. *J. Immunol.* **191**, 4919–4925 (2013).
56. Deloizy, C. et al. The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin. *Sci. Rep.* **7**, 7639 (2017).
57. Caplen, H., Peters, C. J. & Bishop, D. H. Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development. *J. Gen. Virol.* **66**, 2271–2277 (1985). (Pt 10).
58. Phoenix, I., Lokugamage, N., Nishiyama, S. & Ikegami, T. Mutational analysis of the Rift Valley fever virus glycoprotein precursor proteins for Gn protein expression. *Viruses* **8**, pii: E151 (2016).
59. Hemati, B. et al. Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J. Virol.* **83**, 8789–8799 (2009).
60. Drosten, C. et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2323–2330 (2002).
61. Pages, N. et al. Culicoides midge bites modulate the host response and impact on bluetongue virus infection in sheep. *PLoS One* **9**, e83683 (2014).

**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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license 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 license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018

## 1. Résultats principaux

Pour résumer les travaux cet article, j'ai montré que les protéines scDEC-eGn et scCD11c-eGn se fixent sur les DCs de la lymphe ovine, ce qui valide leur utilisation pour le ciblage des DCs dans cette espèce. Nous avons observé une différence d'efficacité entre nos candidats vaccinaux à induire une immunogénicité. Le ciblage des DCs via DEC205 en vaccination à ADN a amélioré la réponse cellulaire IFNγ. L'analyse de l'expression des différents vecteurs *in vivo* par qPCR a montré que la réponse cellulaire induite n'était pas liée à une surexpression du plasmide pscDEC-eGn par rapport aux autres plasmides. Cependant la réponse humorale ainsi que la protection contre une infection par le vFVR n'étaient pas améliorées. Le ciblage des DCs via CD11c a induit une faible immunogénicité à la fois des réponses cellulaires et humorales. En revanche, le plasmide codant l'eGn a induit la meilleure réponse humorale et la meilleure protection, concernant à la fois les symptômes et la virémie. Les anticorps anti-eGn générés par nos vaccins ne neutralisent pas le virus *in vitro*. L'analyse par composante principale (PCA) et l'analyse des indexes de corrélations (Spearman) montrent que les anticorps anti-eGn non neutralisants sont associés à la protection contrairement à la réponse cellulaire IFNγ.

## 2. Résultats supplémentaires

Avant de tester l'immunogénicité et la protection de nos différents vaccins à ADN, nous avons déterminé une méthode d'administration induisant une immunogénicité anti-eGn. Comme mentionné dans l'article, nous avons dans un premier temps déterminé les paramètres d'électroporation optimaux (Figure supplémentaire 1). Ensuite, nous avons testé deux voies d'immunisation d'un plasmide: la voie intradermique (ID) et électroporation (EP) ou la voie ID et EP avec une injection intramusculaire supplémentaire (IM). En effet, la co-injection d'un plasmide par voie ID et IM induit une plus forte réponse humorale et cellulaire chez la souris par rapport à l'ID seule (Mann et al., 2014). Nous avons utilisé peGn comme plasmide modèle et un plasmide adjuvant pGM-CSF et réalisé des immunisations dans 14 moutons (7 moutons par groupe) en collaboration avec l'INRA de Nouzilly. Les réponses cellulaires IFNγ des cellules de rates congelées et des PBMCs fraîchement collectées ont été analysées. La réponse humorale a été déterminée par la détection d'anticorps anti-eGn par ELISA. Nos

résultats ont montré que les deux modes d'administration ont induit une réponse cellulaire IFNγ dans la rate (Figure 13) et humorale similaire (Figure 14).

En revanche les réponses IFNγ des PBMCs étaient meilleures lorsque la voie ID et EP était utilisée, bien qu'elles étaient plus faibles que celles des splénocytes (Figure 12). L'injection de plasmide par voie IM n'améliore pas l'immunogénicité par rapport à l'ID et EP. Nous avons donc choisi l'immunisation par voie ID et EP pour l'ensemble des travaux de thèse.

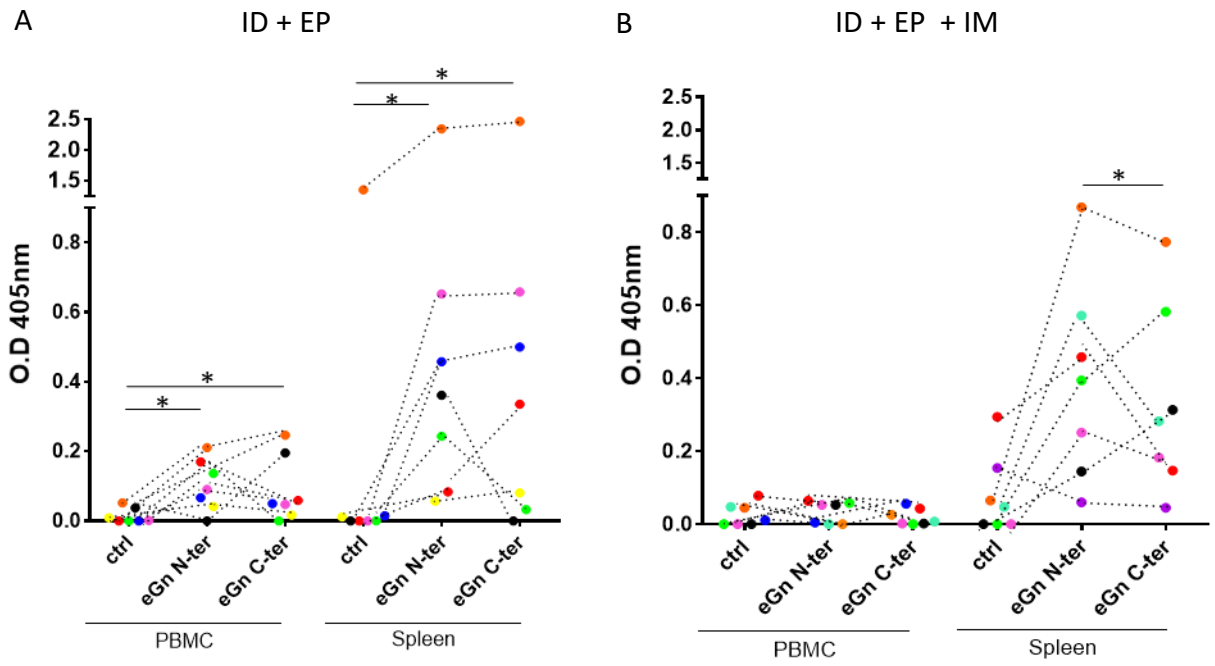



**Figure 13: Les réponses cellulaires IFNγ induites par peGn délivré par ID + EP ou par ID + EP + IM**

Des moutons (7 par groupe) ont été immunisés 3 fois à 3 semaines d'intervalle avec un mix de 400 µg peGn + 400 µg pGM-CSF par injection intradermique (ID) suivie d'une électroporation (EP, 532 V / cm) **(A)** ou par 200 µg peGn et 200 µg pGM-CSF par ID + EP et avec 200 µg peGn et 200µg pGM-CSF mélangé à la lipofectine injecté par voie intramusculaire (IM) **(B)**. Trois semaines après la dernière immunisation, les cellules spléniques ont été prélevées et congelées et PBMC fraîchement collectées. Les cellules ont été mises en culture et restimulées *in vitro* par les pools de peptides couvrant la partie N- et C-terminales de l'eGn (5 µg/ml) pendant 3 jours. Un pool de peptides chevauchants provenant d'une protéine mCherry (Ctrl) a été utilisé comme contrôle. L'IFNγ sécrété dans les surnageants a été détectée par un ELISA sandwich et les absorbances sont représentées (O.D 405 nm). Un anticorps de capture anti-IFNγ ovin et un anticorps de détection anti-IFNγ biotinylé ont été utilisés. Une streptavidine conjuguée à l'HRP et le substrat ATBS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) ont été utilisé pour la révélation. La p-value a été déterminée avec un test non paramétrique Mann-Whitney, non apparié pour la comparaison entre les groupes et avec un test non paramétrique Wilcoxon, apparié au sein d'un même groupe (*: $p<0.05$).

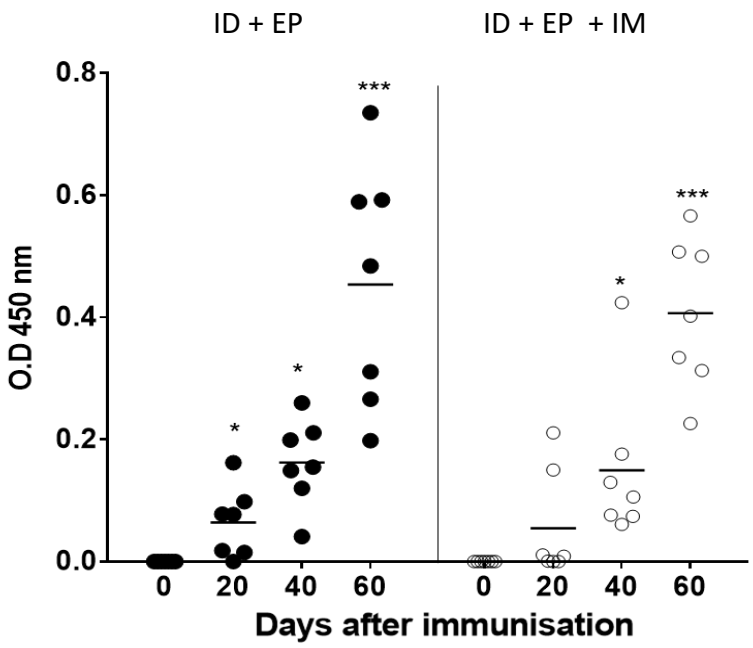



**Figure 14**: **Les réponses humorales induites par peGn délivrées par ID+EP ou par ID + EP + IM**

Les sérums des moutons immunisés avec peGn délivré par ID+EP ou ID+EP+IM ont été testés à la dilution 1 :100. La production d'anticorps anti-eGn a été analysée par ELISA en utilisant des cellules HEK293 transfectées par peGn. Les anticorps anti-eGn ont été révélés par un anticorps anti-IgG de mouton conjugué à l'HRP et le substrat TMB. Les absorbances (O.D à 450 nm) des sérums collectés à J0, 20, 40, 60 après l'immunisation sont représentés. La p-value a été déterminé avec un test non paramétrique, apparié Wilcoxon pour un même groupe entre les valeurs à J0 versus J20 à J60 (*$p<0.05$ ; ***$p<0.001$) et avec un test non paramétrique non apparié Mann-Whitney pour la comparaison entre groupe.

Avant de réaliser l'infection virale présentée dans l'article, nous avons testé l'immunogénicité induit par nos vaccins dans des moutons Préalpes âgés de 12 mois en collaboration avec l'INRA de Nouzilly. Les vaccins ont été injectés par voie ID + EP à 3 reprises avec 3 semaines d'intervalle. Les réponses cellulaires IFNγ ont été analysées à partir des splénocytes plutôt que qu'à partir des PBMCs au vu des résultats précédemment obtenu sur la comparaison des voies d'administrations d'un vaccin à ADN. Les réponses humorales ont été analysées par ELISPOT et par ELISA. Les trois vecteurs plasmidiques ont induit des réponses IFNγ, et avec un léger avantage pour le plasmide psDEC-eGn (Figure 15). Ainsi, pscDEC-eGn semble être le plus efficace pour induire des réponses cellulaires IFNγ à la fois dans cette expérience chez des moutons Préalpes de 12 mois et celle réalisée chez des Lacaunes de 2 mois (Article 1).

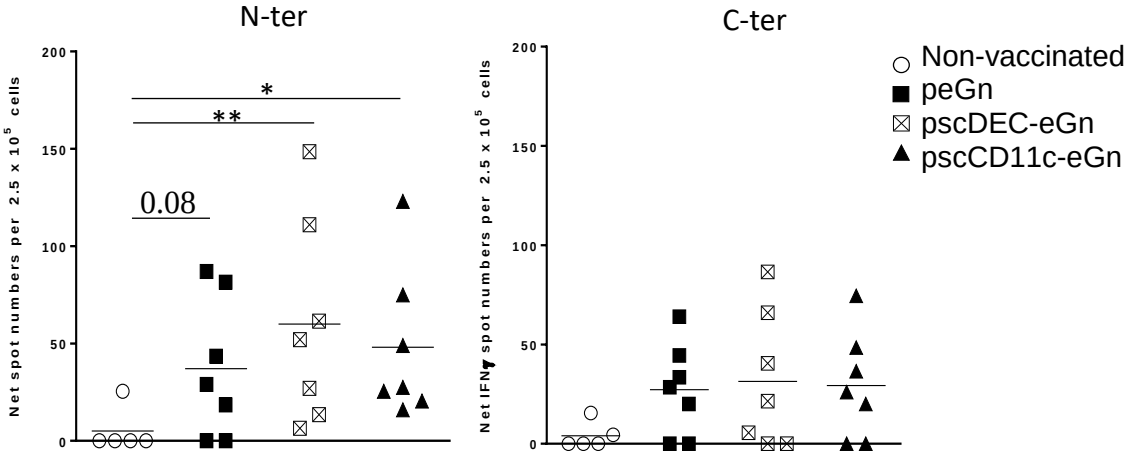



**Figure 15: Réponses cellulaires IFNγ induites par peGn, pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn chez les moutons adultes**

Les moutons (7 par groupe) ont été immunisés 3 fois avec 3 semaines d'intervalle avec 400 µg de peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn et 400 µg de pGM-CSF. Les plasmides ont été injectés par voie ID + EP. Les réponses cellulaires IFNγ ont été évaluées par ELISPOT à 3 semaines après la dernière immunisation. Les splénocytes de moutons immunisés et de moutons naïfs (ctrl) ont été collectés à 3 semaines après la dernière immunisation. Les splénocytes (2.5 X $10^5$) ont été mis en culture dans des plaques ELISPOT en duplicat par condition et re-stimulées pendant 18 h avec des peptides eGn couvrant les parties N- et C-terminales (5 µg/ml) ou avec un peptide contrôle (5 µg/ml). Les spots spécifiques ont été pris en compte lorsque le nombre de spots issue des puits en duplicat de cellules stimulées avec les peptides eGn étaient strictement supérieures aux nombres de spots issus des puits en duplicat de cellules stimulées avec le peptide contrôle. Les valeurs indiquées sur le graphe correspond à la moyenne de spots des puits stimulés avec les peptides eGn soustrait à la moyenne de spots des puits stimulés avec le peptide contrôle. La p-value a été déterminé avec un test non paramétrique, non apparié Mann-Whitney (*, p <0,05; **, p <0,01).

La réponse humorale était systématiquement plus élevée dans les sérums de moutons vaccinés par peGn par rapport au vecteur pscCD11c-eGn et du même ordre entre ceux vaccinés par peGn et pscDEC-eGn. Toutefois, peGn a induit une production d'anticorps plus précoce par rapport aux autres vecteurs (Figure 16). Nous avons également testé la capacité des anticorps anti-eGn présent dans les sérums positifs des moutons immunisés à neutraliser le vFVR. Les anticorps anti-eGn ne neutralisaient pas le virus contrairement à des sérums de mouton infectés expérimentalement par le vFVR qui neutralisaient le virus à une dilution ≥1/160 (témoins positifs). Ainsi, similairement à l'expérience réalisée avec les Lacaunes, les résultats de cette expérience ont montré que le plasmide peGn induit une réponse humorale plus

précoce que celle induite par les plasmides pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn. De plus, le ciblage des DCs via DEC205 et CD11c en vaccination à ADN n'améliore pas la réponse humorale.

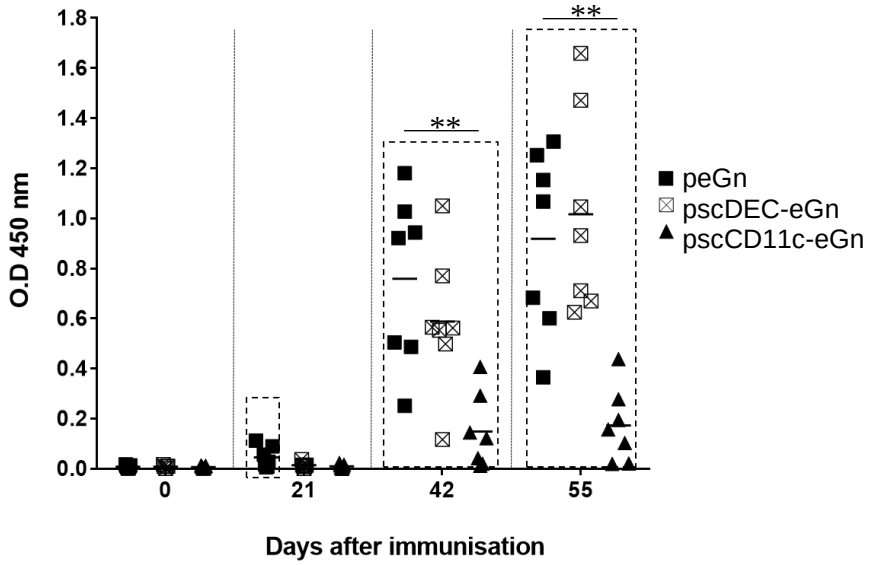



**Figure 16: Les réponses humorales induites par peGn, pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn dans des moutons adultes**

Les sérums des moutons immunisés avec peGn, pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn délivré par ID+EP ont été testés à la dilution 1 :100. La production d'anticorps anti-eGn a été analysée par ELISA en utilisant des cellules HEK293 transfectées par peGn. Les anticorps anti-eGn ont été révélés par un anticorps anti-IgG de mouton conjugué à l'HRP et le substrat TMB. Les absorbances (O.D à 450 nm) des sérums collectés à J0, 20, 40, 60 après l'immunisation sont représentés. La p-value a été déterminé avec un test non paramétrique, apparié Wilcoxon pour un même groupe entre les valeurs à J0 versus J20 à J60. Les valeurs significatives sont encadrées. Les réponses humorales ont été comparées entre les groupes avec un test non paramétrique non apparié Mann-Whitney (**$p<0.01$).

La stratégie de « prime-boost » qui consiste à combiner différents types de vaccin contre un même antigène a montré l'induction de réponses immunitaires robustes et à long terme chez l'Homme (Joachim et al., 2017). Nous avons optimisé notre stratégie vaccinale contre le vFVR par l'utilisation d'un « prime » avec les vaccins à ADN peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn et d'un « boost » avec un virus recombinant MVL-eGn (Modified Vaccinia Lister) qui exprime l'eGn chez des moutons Préalpes de 12 mois. Le virus de la vaccine (VACV-Lister) a été utilisé pour la vaccination contre la variole mais induit des effets secondaires chez des personnes immunodéprimées tels que des eczémas (Dimier et al., 2011). L'atténuation de cette souche par la délétion de 3 régions (II, III et V) a montré une

diminution de la virulence chez des souris immunodéprimées (nude et SCID) (Dimier et al., 2011). De plus, l'immunisation par cette souche atténuée induit une réponse immunitaire protectrice contre une infection expérimentale létale par le virus de la variole (cowpox, Brighton strain VR302) (Dimier et al., 2011). Le virus MLV-eGn a été obtenu par recombinaison homologue en insérant le gène codant l'eGn au niveau de la région de délétion III par l'IRBA. Les réponses cellulaires IFNγ de la rate (Figure 17) et les réponses humorales (Figure 16) ont été analysées. Les résultats ont montré une immunogénicité entre les différents groupes. Le boost semblait augmenter la réponse humorale induite par un prime par des vaccins à ADN, en particulier pour le plasmide pscCD11c-eGn (Figure 18). Nous étions limités par le nombre d'animaux pour cette expérience et nous n'avons pas pu inclure de groupe de moutons supplémentairse immunisés par le MLV-eGn seul pour montrer l'intérêt d'un prime avec un vaccin à ADN. De manière globale, les réponses humorales induites par deux injections ID+EP et cellules induites par une injection ID+EP et un boost MVL-eGn étaient similaires (Figure 18). Ainsi, le boost MLV-eGn ne permet pas de mettre en évidence une différence d'efficacité de priming entre les vecteurs utilisés et ne semble pas induire de réponses supérieures à celles induites par les injections à ADN seules.

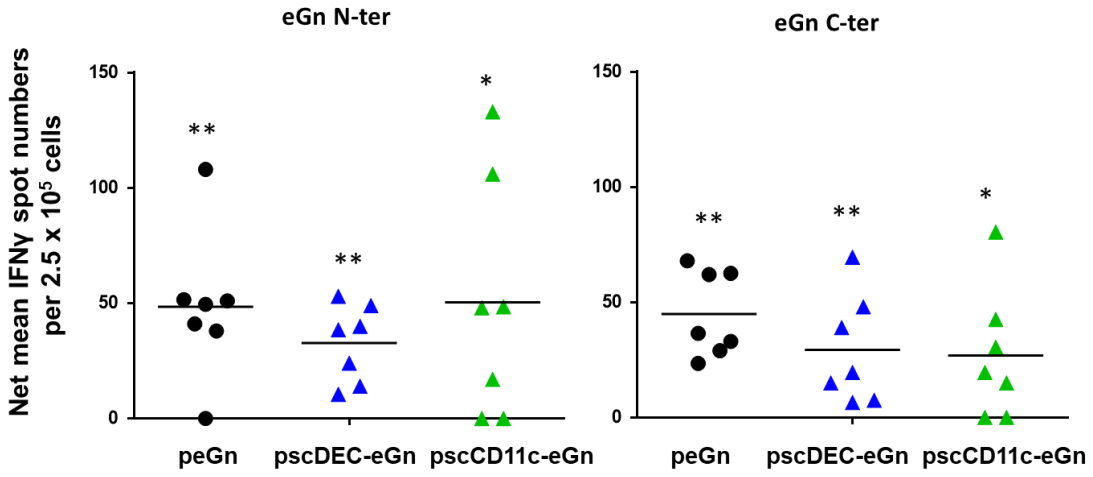



**Figure 17: Réponses cellulaires IFNγ induites par DNA + boost MVL-eGn**

Les moutons (7 par groupe) ont été immunisés 1 fois avec avec 400 µg de peGn, pscDEC-eGn, pscCD11c-eGn et 400 µg de pGM-CSF par voie ID + EP. Un boost a été réalisé avec $10^5$pfu MVL-eGn par voie sous-cutanée 3 semaines après le prime. Les réponses cellulaires IFNγ ont été évaluées par ELISPOT à 3 semaines après la dernière immunisation avec le même protocole que la figure 14. Les valeurs indiquées sur le graphe correspondent à la moyenne de spots des puits stimulés avec les peptides eGn soustrait à la moyenne de spots des puits stimulés avec le peptide contrôle. La sécrétion significative a été déterminée avec un test non paramétrique, apparié Wilcoxon entre la condition de stimulation avec le pepitdes eGn versus contrôle pour un même groupe (*, p <0,05; **, p <0,01). Un test non paramétrique,

non apparié Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les réponses entre les groupes et aucune différence significative n'a été observée.

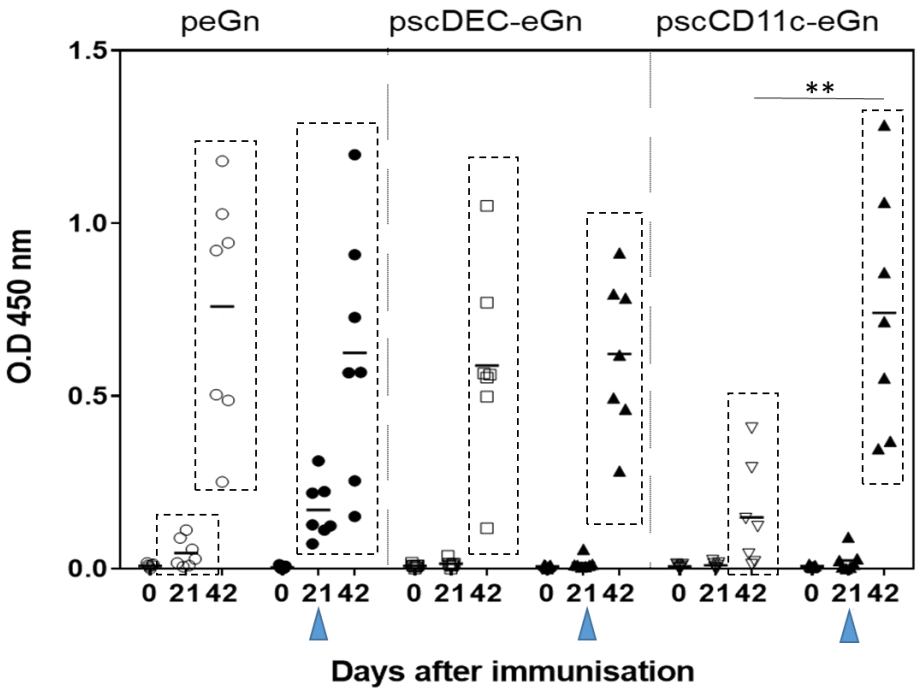



**Figure 18: Comparaison des réponses humorales induites par une vaccination à ADN versus un prime DNA + boost MVL-eGn**

Les sérums des moutons immunisés par ID+EP puis un boost avec MVL-eGn (indiqué par un triangle bleu) ont été testés à la dilution 1 :100. Les réponses des moutons immunisés par 2 injection ID+EP (valeurs de la figure 15, symboles claires) et 1 injection ID+EP +1 injection MLV-eGn (symboles noires) sont montrées sur cette figure. Les différences significatives entre les valeurs de DO mesurées aux différents jours par rapport au jour 0 sont encadrées et ont été déterminées par un test Wilcoxon. La p-value a été déterminé avec un test non paramétrique non apparié Mann-Whitney pour la comparaison entre groupe.

## B. Article 2

**Un vaccin à ADN codant l'eGn du vFVR est protecteur chez la souris via l'immunité humorale qui est réduite par le ciblage d'eGn vers le récepteur DEC205**

Dans cet article, nous avons évalué l'immunogénicité et la protection conférée par les plasmides peGn ou pscDEC-eGn chez la souris. Les séquences codant les fragments d'anticorps scFv anti DEC205 murin utilisées dans notre étude ont été publiées par l'équipe de Miguel A. Gómez-Lim en collaboration avec R. Steinman (Coconi-Linares et al., 2013). Nous avons cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la protection médiée par nos vaccins à ADN en réalisant des expériences de transferts passifs de sérum et adoptifs de lymphocytes T issue de souris vaccinées. Les immunisations, les transferts et les infections expérimentales ont été réalisées en animalerie confinée niveau 3 de l'Anses Lyon (PFEA).

L'étude de l'influence de l'antigène fusionné au scFv anti-DEC205 sur les réponses immunes a été réalisée avec un vecteur pscDEC-mCherry. Les immunisations ont été réalisées dans l'animalerie de l'INRA de Jouy-en-Josas (IERP).

**A DNA vaccine encoding Gn ectodomain of Rift Valley fever virus protects mice via a humoral response which is decreased by targeting of DEC205**

Tiphany Chrun[1, 2], Sandra Lacôte[2], Céline Urien[1], Jenna Fix[1], Jean-François Elouët[1], Matthias Tenbusch[3, 4], Coralie Pulido[2], Latifa Lakhdar[2], Isabelle Schwartz-Cornil[1] and Philippe Marianneau[2]

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

[2] ANSES-Laboratoire de Lyon, Unité Virologie, France.

[3] Department of Molecular and Medical Virology, Institute of Hygiene and Microbiology, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany.

[4] Institute of Clinical and Molecular Virology, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany.

**Keywords: Rift Valley fever virus, DNA vaccine, dendritic cell, DEC205**

## ABSTRACT

Rift valley fever virus (RVFV) is responsible of a serious mosquito-borne viral disease in human and ruminants. The development of new and safer vaccine is urgently needed due to the risk of introduction of this arbovirus to other RVF free-continents. We previously showed a higher protection induced by a DNA vaccine encoding the ectodomaine of the Gn antigen than the antigen targeted to antigen-presenting cells via the receptor DEC205 in sheep. While humoral immune response seemed to be important in protection, the contribution of T cell response remains unclear. In this study we show that DNA encoding non-targeted antigen and GM-CSF, administered in skin by electroporation, induced full clinical protection in mice against a RVFV challenge. By passive transfer of immune serum, we bring evidences supporting that antibodies, although not neutralizing *in vitro*, are important in protection. A plasmid encoding antigen targeted to DEC205 was less protective and induced lower antibody and T cell responses than the non-targeted antigen. When using a plasmid encoding a different antigen, mCherry, we found that DEC205 targeting also reduced the T cell responses but could promote an antibody response, indicating that the DEC205 targeting outcome depends on the fused antigen, and is not favorable in the case of the extracellular portion of Gn.

Altogether this work shows in the mouse model that ectodomaine of the Gn is a pertinent RVFV antigen to be included in a DNA vaccine and that next development should aim at increasing the anti-eGn antibody response.

## INTRODUCTION

Rift Valley Fever (RVF) is a mosquito-borne zoonotic viral disease that primarily affects ruminants. The etiologic agent Rift Valley Fever virus (RVFV) belongs to the *Phenuiviridae* family and is responsible of high abortion rate in gravid females, high mortality rate in newborn and fetal deformities in domestic ruminants resulting in economic burden (see 1 for review). Human infection with RVFV mainly occurs through contact with body fluid or organs from infected livestock. In human, self-limiting febrile illness is generally observed only a few develop severe symptoms such as blindness, encephalitis, hemorrhagic fever leading to the death. RVFV has spread outside its endemic areas in mainland Africa to Madagascar, the Comoros and the Arabian Peninsula, raising awareness the risk of introduction and further dissemination of this pathogen in other non-endemic continents where a large array of competent mosquitoes can transmit the virus. Commercial attenuated and inactivated veterinary vaccine are available in endemic countries, however to date, no safe and efficient vaccine for veterinary and human use in non-endemic continent is yet available (2).

Many RVFV candidates' vaccines have been developed and among them, recombinant proteins vaccines based on viral structural proteins showed promising results. Gn ectodomain (eGn) and Gc proteins confer protective immunity in sheep, the natural host (3). Indeed, Gn and Gc are involved in virus attachment and fusion to the host cell respectively, and contain the virus neutralizing epitopes (4). Furthermore, eGn subunit vaccine alone confers a protection in sheep (5) and eGn-based DNA vaccine confers a partial protection in mice (6).

DNA vaccination is a promising strategy against emerging infectious disease since it is safe, easy to manufacture at large scale and stable (7). Possibility to improve DNA vaccination include the targeting of dendritic cell (DC) by addressing the antigen to selected surface

receptors involved in efficient antigen presentation (8). Several studies reported the efficacy of antigen targeting to DEC205, a receptor expressed on DC in many species (9), including sheep (10) in DNA vaccine strategy to induce a strong $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses, and enhance the Ab response in mice (11–13), and even in cattle (14). Base on this context, we recently compared the efficacy of DNA vaccine encoding non-targeted eGn (peGn) or eGn fused to a single chain fragment variable (scFv) directed to ovine DEC205 receptor (pscDEC-eGn) in lambs (Chrun et al. 2018, in press npj Vaccines). DNA vaccine-candidates were co-delivered by intradermal injection with a plasmid encoding GM-CSF as genetic adjuvant (15), followed by surface electroporation (SEP) to enhance *in vivo* transfection (16). We have shown that pscDEC-eGn increases IFNγ T cell response and conferred partial protection in lambs. However, peGn induced a higher level of Ab and conferred the best clinical protection in lambs. Correlation analysis showed that anti-eGn level, rather than eGn specific T cell response, are important in this protection.

In the present study, we evaluated the efficacy of peGn and pscDEC-eGn in the mouse model and we got further insight in the mechanisms underlying the protective immunity. After the challenge, peGn-immunized mice were fully protected and passive transfer of serum from peGn-immunized mice conferred a protection. However, plasmid pscDEC-eGn only conferred a partial protection and strongly diminished IFNγ T cell response and anti-eGn IgG responses. A different immune response outcome was obtained with a DNA vector encoding another antigen (mCherry) targeted to DEC205, indicating that the efficacy of antigen targeting to DEC205 in DNA vaccination is antigen-dependent.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells lines.

Human embryonic kidney cells (HEK293) and African green monkey kidney cells (VeroE6) were maintained in culture with Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Life Technologies), supplemented with 5 % decomplemented fetal bovine serum (FBS) and antibiotic solution at 37 °C with 5 % $CO_2$. $CHO_{mDEC205}$ (CHO expressing murine DEC205) and $CHO_{neo}$ (negative control) cells lines were kindly provided by Matthias Tenbusch (Ruhr-University Bochum, Bochum, DE) and were maintained in DMEM supplemented with 5 % FBS at 37 °C with 5 % $CO_2$ without antibiotic solution.

### RVFV strains.

RVFV strains are classified into a single serotype and low genetic diversity among strains has been reported (17). The virulent strain RVFV ZH501, originally isolated from an infected patient (18) and the attenuated RVFV virus MP-12 strain (19) were provided by Michèle Bouloy (Paris Pasteur Institute). ZH501 strain was used in the challenge experiment and the MP-12 strain was used in the plaque reduction assay and for the preparation of viral antigens for ELISA. The virus was amplified on VeroE6 cells starting at a 0.01 MOI. The supernatant was harvested after 2 days, centrifuged for 10 min at 2000 rpm and stored at -80 °C until use.

### Production of anti-RVFV hyperimmune mouse ascitic fluid.

Anti-RVFV hyperimmune mouse ascitic fluid (HMAF) production was approved by the French Ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur under the number 02518.2 and was conducted at the Plateforme d'Expérimentation Animale de l'ANSES - Laboratoire de Lyon, France. HMAF was prepared from six to eight 20 female Balb/c mice purchase from Charles River's breeding center (L'arbresle, France) and were inoculated 6 times intraperitoneally with RVFV-infected mouse brain suspensions as follows: 250 µl of inactivated suspension in Freund's complete adjuvant on day 0 and 1 and in Freund's incomplete adjuvant on day 7 and 14 followed by 250 µl of virulent suspension in Freund's incomplete adjuvant on day 21 and 28. On day 25, the mice were inoculated intraperitoneally with TG180 sarcoma cells. One week later, mice were euthanized and the ascitic fluid was harvested.

**Construction and production of plasmids.**

Publicly available sequences of the variable region of the rat heavy (VH) and light (VL) chain of the anti-mouse DEC205 mAb were used to generate scFv anti murine DEC205 (20). ScFv recombinant vectors were constructed by SynoGene (USA). Plasmid encoding for the original VH signal peptide murine IgG, the scFv which corresponding to the VH and the VL fragments joined by a sequence encoding for a flexible linker $(G_4S)_4$ and a sequence encoding mCherry-6xHis-tag fused in frame to the carboxy terminus of the scFv sequence with a second $(G_4S)_3$ linker were cloned in mammalian expression vector (Synogene). Small scale productions of scFv-mCherry proteins, designated as scDEC-mCherry and a scFv control (scCtrl-mCherry provided by Synogene) were performed for validation of scFv interaction with target cells. A plasmid encoding for ectodomain of Gn glycoprotein (eGn) of the ZH501 strain was generated (peGn). peGn includes the nt 411 to nt 1763 codon-optimized sequence of the M segment (DQ380202.1) with the natural signal peptide of Gn cloned into a pcDNA4-V5His mammalian expression vector (InvitroGen) (Genecust). Plasmids encoding for scFv-eGn were generated. Sequence encoding eGn was fused in frame to the carboxy terminus of the anti-mouse DEC205 scFv or to an irrelevant scFv sequence with a $(G_4S)_3$ linker named pscDEC-eGn and pscCtrl-eGn respectively, were cloned in pCEP4 mammalian expression vector (Synogene). The plasmid encoding for murine GM-CSF (pGM-CSF) was purchased from InvivoGen (San Diego, CA). A firefly luciferase expression plasmid (pLuc) was kindly provided by Stéphane Biacchesi (INRA, France). The sequence encoding mCherry was cloned into the expression vector pGEXTEV-4T3. Plasmid productions for immunization were prepared using Endofree® Plasmid Giga Kits (Macherey-Nagel) and were stored at -20 °C until use.

**Plasmid transfection *in vitro*.**

HEK293 cells (5 x $10^6$ cells) were transiently transfected with JetPRIME® (Polyplus, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10 µg of pcDNA3.1 (negative control), peGn, pscCtrl-eGn, or pscDEC-eGn were mixed with 20 µl of polymer reagent and added to the cells. The supernatants and cells were harvested at 72 h post-transfection.

**Cell lysates and supernatants preparation.**

Transfected HEK293 cells or MP12-infected VeroE6 cells were washed with cold PBS and borate buffer (50 mM borate + 150 mM NaCl, pH 9). A lysis buffer (1 % Triton X-100, 50 mM borate, 150 mM NaCl, pH 9) + protease inhibitors was added at a 1:9 (pellet:buffer volume) at 4°C. Sonication was performed at 10 kHz and 500 W using Vibra cell™ VCX 500 (Sonics, USA). The transfected cell supernatants were concentrated 20 to 40 times with Amicon® Ultra centrifugal filter 30 K (Millipore) and a protease inhibitor cocktail was added.

**Production of mCherry, scFv-mCherry and purification.**

Mcherry protein used for coating in ELISA assay was produced in bacteria. Briefly, *E.coli* BL-21 was transformed with pGEXTEV-4T3-mCherry and grown at 37 °C for 6 h in LB medium containing 100 µg/ml of ampicillin. Protein expression was induced by adding 80 µg/ml of isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (IPTG) into the medium. Bacteria were further incubated overnight at 28 °C. After centrifugation, bacterial were incubated with a lysis buffer containing Tris 50 mM (pH 7.8), NaCl 350 mM, DTT 2 mM, benzamidine 4 mM, Triton X-100 0.2 % + lysozymes (10 mg/ml). GST-TEV-mCherry complexes were then purified on glutathione-sepharose 4B beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). To isolate mCherry, beads bound complexes were incubated with TEV protease overnight at RT. Supernatants were collected and store at -80 °C until use.

Supernatants from HEK293 cells transfected with pscCtrl-mCherry and pscDEC-mCherry provided by SynoGene (USA) were purified using Nickel chelating agarose columns. Briefly, after incubating the protein fractions with Nickel chelating agarose and washing the columns with washing buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 5 mM Imidazol). The scFv-mCherry proteins fractions were eluted with in elution buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 800 mM Imidazol). Elution fractions of the protein were pooled and dialyzed into buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl for 24 h and then stored at -80 °C until use.

**Western blots.**

Purified proteins scDEC-mCherry, scCtrl-mCherry and cell lysates from HEK293 transfected with pcDNA3.1, peGn, pscCtrl-eGn, or pscDEC-eGn were analyzed by Western Blot following a 12 % SDS-PAGE under reducing conditions. Blots were incubated overnight at 4 °C with polyclonal rabbit anti-mCherry (Rockland, USA) at a 1:2000 dilution in blocking buffer (PBS + 10 % fat-free milk (w/v)) or with anti-RVFV HMAF at a 1:1000 dilution blocking buffer. After washing, HRP-goat anti-rabbit (GAR) IgG (KPL, USA) or HRP-rabbit anti-mouse IgG (RAM) (Sigma) were used. Immunoreactive bands were visualized with ECL substrate (Thermofisher). Image acquisitions were done with Chemidoc imaging system (Bio-rad).

**Assessment of plasmid transfection efficacy in mouse skin.**

Six to eight week-old female Balb/c mice were purchased from Janvier's breeding center (Le Genest, St Isle, France) and housed under BSL-1 in the animal facility (IERP, INRA, Jouy-en-Josas, France). In order to evaluate the V/cm parameter leading to optimal transfection in mouse skin, a pLuc reporter vector (50 µg) was intradermally injected in the left and right flank. The injected skin areas were subjected to SEP with escalating pulses from 0 to 2162 V/cm. Two days later, skin punch biopsies were harvested and lysed with 150 µl of lysis reagent (Luciferase Assay System E1500, Promega). Bioluminescence was measured using the In Vivo Imaging System (IVIS-200, Xenogen, UK) after adding 100 µl luciferine substrate. The optimal V/cm was found to be 1730 V/cm and was used in all subsequent experiments (supplementary material 1). The experiment was approved by the COMETHEA ethic committee under the number 2015042719381737 (APAFIS#552) in accordance with national guidelines on animal use.

**Staining and flow cytometry analysis.**

$CHO_{mDEC205}$ or $CHO_{neo}$ cells were incubated on ice with RPMI supplemented with 4 % horse serum for 30 min. To analyze the expression of DEC205, cells were incubated with an anti-mouse DEC205-647 (rat IgG2a, NLDC-145 clone, Ozyme), or appropriate isotype control IgG2b-647 (RTK4530 clone, Ozyme) during 30 min on ice. To analyze the binding of recombinant scCtrl-mCherry and scDEC-mCherry, the scFv-mCherry proteins were incubated

with CHO cells line on ice for 45 min. To analyze the binding of scDEC-eGn and scCtrl-eGn on $CHO_{mDEC205}$ or $CHO_{neo}$, the concentrated supernatants of HEK293 transfected cells with and pcDNA3.1, peGn, pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn were incubated with cells for 2 h at 4 °C. Cells were then incubated with anti-RVFV HMAF (1:1000) and finally with A488-donkey anti-mouse (DAM) IgG (Jackson ImmunoResearch) (1:200). Dead cells were excluded by DAPI staining. Flow cytometry acquisitions were done with a LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and results were analyzed sing FlowJo 10.0.6 software.

**Immunizations.**

Six to eight week-old female Balb/c mice were purchased from Charles River's breeding center (L'arbresle, France) and housed under BSL-3 conditions in the animal facility (the Plateforme d'Expérimentation Animale (PFEA) - Anses in Lyon, France). Mice were vaccinated under general anesthesia (isoflurane inhalation) two or three times at 3 weeks intervals. One hundred µg of peGn, pscCtrl-eGn or pscDEC-eGn were injected intradermally in flank together with 20 µg of plasmid adjuvant (pGM-CSF) or without adjuvant, followed by SEP at 1730 V/cm. A non-vaccinated control group (PBS with pGM-CSF) was included. Sera were collected at day 0, 21, 42 and 60 post-immunization and splenocytes were harvested at day 42 or 60 to analyze the T cell responses. This experiment was approved by the ComEth Anses/ENVA/UPEC ethic committee under the number 08/12/15-8 in accordance with national guidelines on animal use.

The same immunization protocol was performed using pscCtrl-mCherry and pscDEC-mCherry. Six week-old female Balb/c mice were purchased from Janvier's breeding center (Le Genest, St Isle, France) and housed under BSL-1 in the animal facility (IERP, INRA, Jouy-en-Josas, France). Mice were vaccinated under general anesthesia (solution of ketamine and xylazine, 50 and 10 mg/kg respectively) 3 times at 3 weeks intervals. The experiment was approved by the COMETHEA ethic committee under the number 2015042719381737 (APAFIS#552) in accordance with national guidelines on animal use.

**Evaluation of eGn- and mCherry-specific T cell responses by ELISA**.

Spleens were collected three weeks after the last immunization and were mechanically dissociated through 100 µm nylon mesh strainers (BD). Splenocytes suspensions were treated

with red blood cell lysis buffer (10 mM $NaHCO_3$, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA). Then 2 x $10^6$ cells were added to wells and re-stimulated with 5 µg/ml overlapping peptides (20 mers, offset 8, Mimotopes, Australia) in X-vivo medium (Ozyme, France) supplemented with 2 % FBS and antibiotic solution at 37 °C with 5 % $CO_2$ for 72 h. Overlapping peptides covering the N-terminal (AEDPHL […] LLPDSF) and C-terminal (VCFEHK […] NYQCHT) amino-acid sequence of the eGn protein or overlapping peptides spanning the entire mCherry protein sequence (MVSKGE […] MDELYK) were used. Cells incubated with an irrelevant peptide as negative control that derived from the HIV polymerase (IKDFHVYFRESRDALWKGPG). Cells cultured with ConA (25 µg/ml) were used as positive controls. All supernatants were assayed for IFNγ, IL-2, and IL-5 by ELISA (RSG ELISA kit, eBioscience). OD was measured at 450 nm using a TECAN microplate reader. The specific cytokine concentration was obtained by subtracting OD 450nm values from wells stimulated with irrelevant peptides.

**Evaluation of anti-eGn and anti-mCherry responses by ELISA.**

For anti-eGn detection, 96-well plates Nunc Maxisorp™ (ThermoFisher) were coated overnight at 4 °C either with 100 µl lysates from HEK293 cells transfected with peGn or with pcDNA3.1 (control). Lysates were prepared by sonication as described above. Individual mouse sera were diluted 1:100 in PBS + 2 % fat-free milk (w/v) and incubated on the coated plates at 37 °C for 1 h. The plates were subsequently incubated with HRP-conjugated rabbit anti-mouse (RAM) IgG (Sigma) at a 1:4000 dilution at 37 °C for 1 h. HRP enzymatic activity was finally revealed using TMB substrate. OD was measured at 450 nm using a TECAN microplate reader. Corrected OD values were obtained by subtracting the signal of wells coated with lysates from HEK293 cell transfected with pcDNA3.1.

For anti-mCherry detection, Half Area Clear Polystyrene High Bind Microplate 96-well plates (Corning®) were coated overnight at 4 °C either with 2 µg/ml of recombinant mCherry protein produced in *E.coli* BL21. Plates were washed in PBS 0.05 % tween 20 (PBS-T) and saturated in diluent buffer (PBS-T 5 % FBS) for 1 h at 37 °C. Individual mouse sera were serially diluted fivefold in PBS-T-FBS starting at 1:100 and incubated on the coated plates at 37 °C for 2 h. Antigen-bound Abs were revealed with an HRP-conjugated goat anti-mouse (GAM) IgG (KPL, USA) at 1:4000 dilution in diluent buffer at 37 °C for 1 h. HRP enzymatic activity was finally revealed using TMB substrate. OD was measured at 450 nm using a TECAN microplate reader. Endpoint antibody titers were calculated by regression analysis,

plotting serum dilution versus the absorbance at 450nm using Microcal Origin (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts) (regression curve y = ((b + cx) / (1 + ax)). Endpoint titers were defined as the highest dilution resulting in an absorbance value twice that of blank realized with diluent buffer.

**Adoptive and passive transfer.**

Six to eight week-old female Balb/c mice were immunized 3 times at 3 weeks interval with PBS or peGn with adjuvant combined with SEP as described above. Spleen and blood were collected 3 weeks after the last immunization. Splenocytes suspensions were obtained by dissociating spleens through 100 µm nylon mesh strainers (BD) and treated with red blood cell lysis buffer (10 mM NaHCO3, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA). Splenocytes from PBS or peGn-immunized mice were pooled and T cell were isolated by negative selection using a commercially available murine Pan T cell isolation kit (Miltenyi, USA) according to the manufacturer's instruction. Evaluation of T cell isolation was performed by FACS and 99.14 % of non T cells were depleted (data not shown). Pooled sera of PBS or peGn-immunized mice were tested by ELISA before transfers (data not shown). Adoptive and passive transfers were performed with six week-old female Balb/c naïve mice. Three hundred microliters of serum or $10^7$ T cells in 200 µl of saline buffer with 2 % horse serum were intraperitoneally injected per mouse and mice were challenged the day after. The transfer experiment was approved by the COMETHEA ethic committee under the number 11/10/16-7 in accordance with national guidelines on animal use.

**Challenge.**

The immunized mice were challenged 3 weeks after the last immunization with $10^3$ or $10^4$ pfu of the RVFV ZH501 strain in 100 µl volume by intraperitoneal route. After the challenge, weight, body temperature and clinical signs were daily monitored over 21 days. Brain and liver from moribund mice were extracted before being euthanized and were immediately stored at -80 °C. At the end of the study, all animals were euthanized by cervical dislocation.

**RNA extraction from organs**

Brain and liver were weighed and were homogenized with a similar protocol. Tissues were shaked in 500µl of DMEM with stainless steel beads (ThermoFisher) 3 times for 30 s at 30 Hz (1800 oscillations/min) using TissueLyserII. After centrifugation at 2000 rpm for 5 min, supernatants were collected. One hundred microliters of homogeneate were used for RNA extraction. Total RNA was extracted with QIAMP viral RNA kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions and eluted in 60 µl RNase-free water using QIAcube (QIAGEN).

**Gn RNA quantification by qRT-PCR**

For quantification of viral RNA copies in organs from mice after challenge, a one-step qRT-PCR was performed using the SuperScript III Platinum One Step qRT-PCR kit (Invitrogen) as previously described (21). Primers were designed to amplify a nt 1164 to nt 1258 Gn sequence of the M segment: forward primer 5'- AAA GGA ACA ATG GAC TCT GGT CA -3', reverse primer 5'- CAC TTC TTA CTA CCA TGT CCT CCA AT-3'. A fluorescent probe was designed that hybridizes to the specific PCR product: FAM 5'- AAA GCT TTG ATA TCT CTC AGT GCC CCA A-3' TAMRA. A standard corresponding to a region of the Gn RNA (nt 1135 to nt 1286 of the M segment) was synthetized using the Riboprobe® In Vitro Transcription Systems (Promega). The qRT-PCR was done on 3 µl of sample elution and the cycling involved the following steps: reverse transcription at 45 °C for 30 min, denaturation at 95 °C for 5 min, amplification 45 cycles at 95 °C for 5 s and 57 °C for 35 s, cooling at 37 °C for 30 s. TaqMan run of experimental samples contained at least 2 replicates, a known positive control (RVFV ZH501 strain), a negative control (an other Phlebovirus RNA), and nuclease-free water. The reactions were carried out in a LightCycler 480 (Roche). The number of viral RNA copies/ml in each sample was determined using the Gn RNA standard calibration curve. For the detection of Gn mRNA in transfected skin biopsies, a two-step qRT-PCR was performed. The reverse transcription was done using the TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). The results were expressed as the copy number of viral RNA per g of tissue.

**Virus titration by plaque assay.**

The viral RNA-positive suspensions in qRT-PCR were serially diluted 1:10 to $1:10^6$ in DMEM medium and inoculated onto VeroE6 monolayer cells in 12-well plates ($2.5 \times 10^5$ per well). One hour after adsorption at 37 °C, 2 ml of diluted carboxymethylcellulose sodium salt with DMEM supplemented with 5 % FBS (1:1 volume) were added to each well and plates were incubated at 37 °C in 5 % $CO_2$ for 5 days. Next, the plaque forming units (pfu) were revealed by 1 % (w/v) violet crystal and the number of pfu/ml was calculated for each mouse serum.

**Plaque reduction assay.**

Sera were diluted 1:10 to 1:160 in DMEM and incubated with 100 pfu of MP-12 virus at 37 °C with 5 % $CO_2$ for 1 h to enable neutralization. Next, the virus and the serum mix (500 µl) were added to VeroE6 cell monolayers which were further processed as described under the virus titration by plaque assay.

**Statistical analysis.**

Data were analyzed with the GraphPad Prism 6.0 software. As data did no pass to a normality test (Kolmogorov-Smirnov test), the unpaired non parametric Mann-Whitney test was used to compare the T cell responses, the anti-eGn and anti-mCherry responses between different groups at the same time point. For anti-mCherry responses, a paired non parametric Wilcoxon test was used to compare the antibody response at different time points versus at day 0 within the same group. A non-parametric Kruskal Wallis test followed by Dunn's correction was used to compare the luciferase signals of transfected skin subjected to SEP versus transfected skin without SEP.

## RESULTS

### Characterization and expression of plasmids encoding non-targeted RVFV eGn and DEC205-specific scFv fused to mCherry or eGn.

To deliver eGn to DEC205, we generated plasmids encoding murine DEC205 specific scFv fused to eGn (pscDEC-eGn) or fused to an irrelevant scFv (pscCtrl-eGn), and non-targeted eGn (peGn). We also generated plasmids encoding the scFv sequence fused to mCherry in order to assess the binding ability to DEC205 (Fig. 1A). The plasmids were transiently transfected in HEK293 cells, and cells lysates and supernatants were collected for assessing protein expression *in vitro*. Western blot analysis reveals a band corresponding to scCtrl-mCherry (57.5 kDa) and two bands corresponding to scDEC-mCherry (57.6 kDa) close to their expected predicted size using an anti-mCherry (Fig. 1B). This result might suggests that the protein fusion expressed in HEK293 cells undergo different post-translational modifications resulting in two isoforms of scDEC-mCherry. For eGn protein fusions, bands corresponding to the non-targeted eGn (48.8 kDa), scDEC-eGn (76.3 kDa) and scCtrl-eGn fusions (78.6 kDa) were observed at their expected predicted size using an anti-RVFV hyperimmune mouse ascitis fluid (HMAF), and the native eGn appeared to be more expressed than scDEC and scCtrl fused with eGn (Fig. 1C).

### Binding of DEC205-specific scFv fused to mCherry or to RVFV eGn on DEC205 receptor.

To evaluate the binding capacity of the scDEC, CHO cells expressing murine DEC205 receptor ($CHOm_{DEC205}$) and negative control CHO cells ($CHO_{neo}$) were labelled with an anti-DEC205 mAb or purified scCtrl-mCherry and scDEC-mCherry protein fusions from the supernatants of transfected HEK293 cells. Anti-DEC205 strongly detects a fraction of $CHOm_{DEC205}$ cells, whereas $CHO_{neo}$ were not detected indicating that the stable CHO transfected cells express the DEC205 molecule, although in a heterogeneous manner (Fig. 1D). The scDEC-mCherry bound on $CHOm_{DEC205}$ contrary to the scCtrl-mCherry (Fig. 1E) showing the specific binding of scDEC on DEC205. Finally, in order to confirm whether the binding capacity was maintained when eGn is fused to scDEC, the concentrated supernatant from transfected HEK293 cells with pcDNA3.1 (control), peGn, pscCtrl-eGn and pscDEC-

eGn were incubated with $CHO_{DEC205}$. Similarly to scDEC-mCherry, scDEC-eGn binds on $CHO_{DEC205}$ contrary to the eGn and scCtrl-eGn controls (Fig. 1F). In conclusion, pscDEC-eGn and pscDEC-mCherry expresses functional fusion protein able to specifically bind on DEC205 receptor.

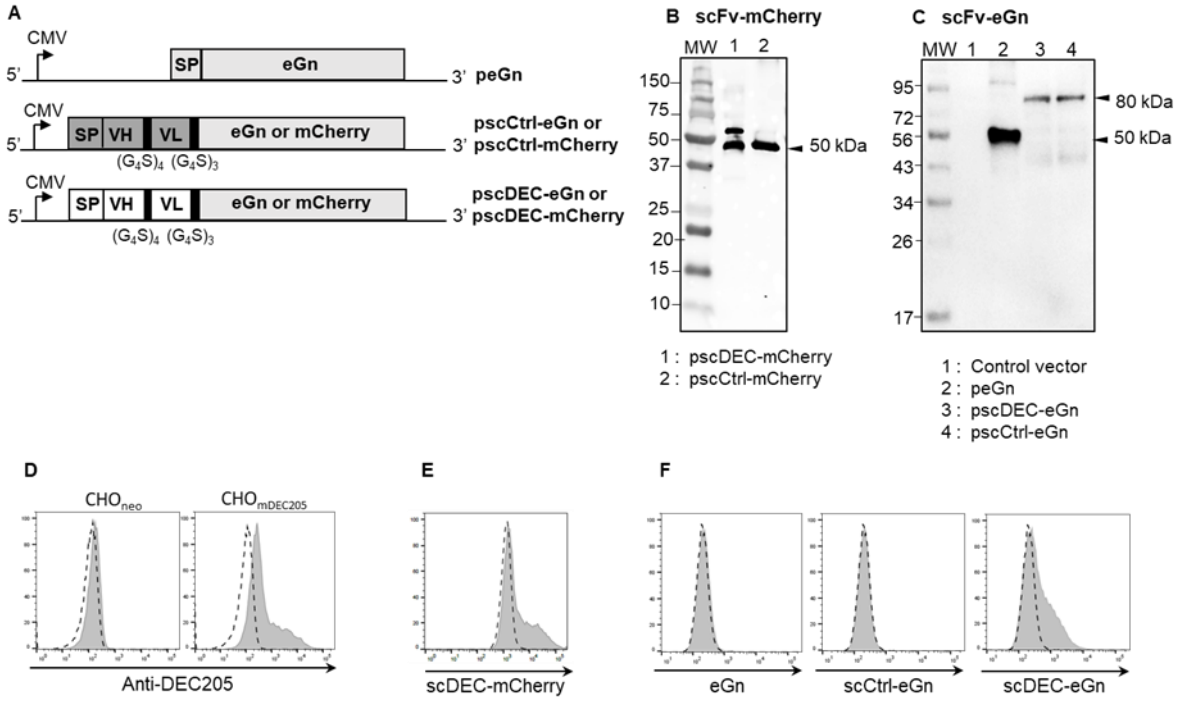



**Figure 1: Design and characterization of peGn and of pscCtrl or pscDEC with different fusion antigens.**

**A**. Schematic representation of peGn and of pscCtrl, pscDEC fused with eGn or mCherry sequence. peGn includes the codon-optimized eGn sequence of RVFV M segment with its intrinsic signal peptide (see Material and methods) and cloned in the pcDNA4-V5His expression vector. Constructions pscCtrl and pscDEC include the signal sequence (optimized signal peptide or sequence from VH of murine IgG respectively (SP)), the scFv (VH and VL) sequences and the codon-optimized eGn or the mCherry sequence. The VH and VL sequences are connected together with a $(G_4S)_4$ linker and the scFv and antigen sequences are connected with a $(G_4S)_3$ linker. These chimeric sequences were cloned in a pCEP4 vector. In **B**, HEK293 cells were transfected with pcDNA3.1 (control), peGn, pscCtrl and pscDEC fused with eGn. The cell lysates were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and eGn was revealed with an anti-RVFV mouse ascitis followed by and HRP-GAM IgG. The predicted sizes of the expressed native and chimeric eGn proteins are 48.8 kDa for native eGn, 78.8 kDa for the scCtrl-eGn and 79 kDa for the scDEC-eGn protein. In **C,** purified scCtrl-mCherry and scDEC-mCherry proteins collected from supernatant of transfected HEK293 were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and mCherry was revealed with an anti-mCherry followed by and HRP-GAR IgG. The predicted sizes of the expressed chimeric proteins are 57.6 kDa and 57.5 kDa for the scDEC-mCherry and scCtrl-mCherry respectively. In **D**, CHO cells expressing murine DEC205 receptor ($CHO_{mDEC205}$) or $CHO_{neo}$ (control) were labelled with an anti-DEC205-647 mAb (grey) and compared to an isotype control (dash line). In **E**, $CHO_{mDEC205}$ were labelled with purified scCtrl-mCherry and scDEC-mCherry protein from supernatants. The staining with scDEC-mCherry is depicted (grey) and compared to scCtrl-mCherry (dash line). In **F**, $CHO_{mDEC205}$ were labelled with the concentrated supernatants from transfected cells with peGn, pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn and eGn was revealed as in C. The staining is depicted (grey) compared to a control supernatant (dash line).

**peGn induces a better clinical protection than pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn against the RVFV challenge in mice.**

To investigate the protection confer by our DNA vaccine-candidates, Balb/c mice were immunized 2 times with peGn, pscCtrl-eGn, pscDEC-eGn or PBS combined with genetic adjuvant encoding GM-CSF (pGM-CSF). DNA vaccines were inoculated intradermally followed by surface electroporation (SEP) and immunized mice were subsequently challenged with 1 x $10^3$ pfu of RVFV ZH501 strain. The survival was daily monitored during 17 days and the results are depicted in Figure 2. Five days post-challenge, mice from control group start to succumbed upon the virulent ZH501 infection (6/7 death). All peGn vaccinated-mice survived whereas mice from pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn were partially protected (3/7 survival). To conclude, our results indicate that peGn confers the best protection against RVFV.

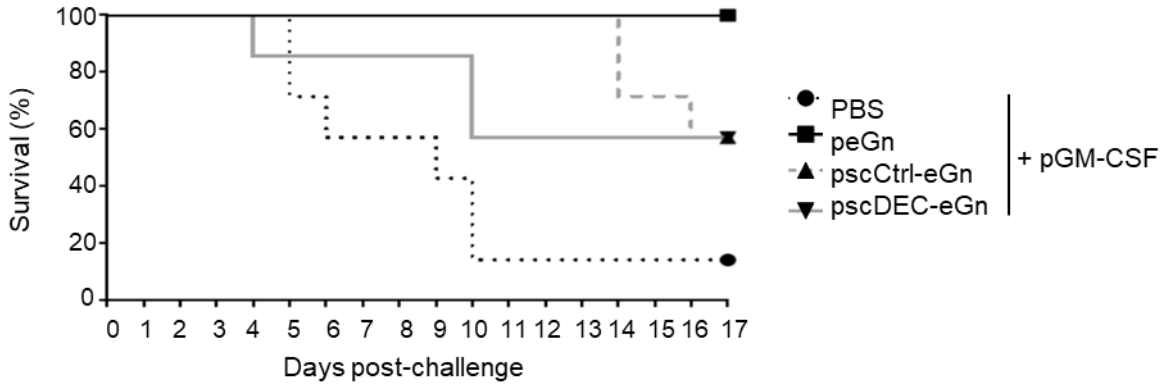



**Figure 2: Protection induces by peGn, pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn against RVFV infection.**

Six to eight week-old female Balb/c were immunized twice at day 0 and 21 with 100µg of peGn, pscCtrl-eGn, pscDEC-eGn or saline buffer (PBS) with 20µg of pGM-CSF as an adjuvant. The plasmids were intradermally injected in the flank and immediately followed by surface electroporation (1730 V/cm). Three weeks after the last immunization, mice were challenged with 1 x $10^3$ pfu of RVFV strain ZH501. The survival was daily monitored for 17 days and the percentage of survival is shown (n = 7 per group).

**Targeting eGn to DEC205 reduces the IFNγ and not the IL-2 responses in DNA vaccination.**

Next, we investigated the immunogenicity induce by our DNA vaccine-candidates in the presence or absence of pGM-CSF. Balb/c mice were immunized 2 times with peGn, pscCtrl-eGn, pscDEC-eGn or PBS combined with or without pGM-CSF as described above (Fig. 2).

To analyze the T cell responses, spleen were harvested three weeks after the last immunization and total splenocytes were restimulated *in vitro* with 2 pools of overlapping peptides covering the sequence of eGn (N-ter and C-ter peptides) or with an irrelevant peptide as control (see material and methods). Cytokines secretions in culture supernatants were measured by ELISA. None of the DNA vaccines alone induced significant IFNγ response in eGn-stimulated splenocytes (Fig. 3). However, co-injection of pGM-CSF with peGn or pscCtrl-eGn was able to trigger significant IFNγ secretion ($p<0.05$ versus PBS) whereas pscDEC-eGn with pGM-CSF did not trigger any significant IFNγ response. The IFNγ T cell response is higher with pGM-CSF in the peGn vaccinated mice, although not significantly increased with pscCtrl-eGn compared to pscDEC-eGn immunized-mice. Similar results were obtained with TNF-α response in restimulated splenocytes from mice immunized with peGn, pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn in combination with or without pGM-CSF (data not shown). All DNA vaccines were able to induce significant secretion of IL-2 in absence or in presence of pGM-CSF, ($p<0.05$ versus PBS) and the level of IL-2 in supernatants was increased in mice immunized with adjuvant after restimulation ($p<0.0001$, DNA vaccines versus DNA vaccines + pGM-CSF). Remarkably, the IL-2 secretion was even higher in mice immunized with pscDEC-eGn than pscCtrl-eGn without pGM-CSF (Fig. 3), indicating that eGn-targeted to DEC205 did not seem to induced T cell anergy. Finally, no significant IL-5 secretion was measured in the supernatant of restimulated splenocytes from control and in all immunized group (Fig. 3).

Altogether, our results indicate that peGn is immunogenic and is efficient to induce T cell responses, especially when combined with pGM-CSF which enhanced the responses. In contrast, while pscDEC-eGn was efficient at inducing IL-2 responses, it failed to promote the IFNγ T cell responses.

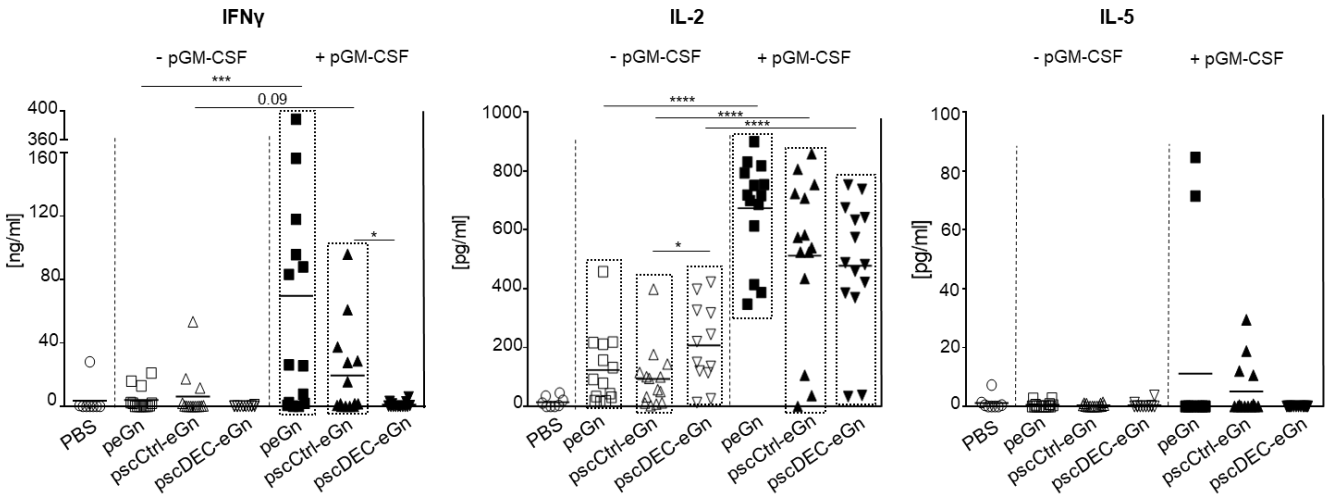



**Figure 3: Effect of pGM-CSF on IFNγ T cell response induced by peGn, pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn.**

Six to eight week-old female Balb/c were immunized three times at day 0, 21 and 42 with 100 µg of peGn, pscCtrl-eGn, pscDEC-eGn with or without 20 µg of pGM-CSF or saline buffer only (PBS) as described in Fig. 2. The T cell responses were evaluated by indirect ELISA 3 weeks after the last immunization (day 60). A. Splenocytes (2 x 106 cells per well) were re-stimulated in vitro with overlapping eGn peptides covering the N-terminal and C-terminal parts (5 µg/ml) or with an irrelevant peptide (5 µg/ml). IFNγ, IL-2 and IL-5 concentration were measured from cell culture supernatants at 72 h after the stimulation. Specific cytokine secretion was obtained from irrelevant peptides wells subtracted from condition with specific eGn peptides covering the N-terminal or C-terminal parts. The T cell responses towards the two pool eGn peptides are shown for each group. Each symbol represents an individual animal and the mean is indicated (n = 5-7 per group). P values were determined according to the Mann-Whitney test (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$). The significance difference of the cytokine level between PBS and immunized group is indicates by a box for clarity ($p<0.05$).

**Targeting eGn to DEC205 decreases the anti-eGn IgG responses in DNA vaccination.**

Sera from control and immunized mice were regularly collected to analyze the eGn-specific Ab responses. After two immunizations (D42), significant level of anti-eGn IgG in serum was measured in peGn-immunized mice alone or with pGM-CSF ($p<0.05$ versus PBS), and pGM-CSF did not improved the Ab response (Fig. 4). Significant Ab response were detected in mice immunized with pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn only with plasmid adjuvant ($p<0.05$ versus PBS) and the level of anti-eGn IgG Abs were lower in the pscDEC-eGn that pscCtrl-eGn immunized group. After three immunization (D60), lower Ab response was observed in the serum of mice immunized with pscDEC-eGn than in mice immunized with pscCtrl-eGn in combination with or without pGM-CSF ($p<0.01$ and $p<0.05$ respectively). At both time points, the levels of anti-eGn IgG appear to be higher in the peGn vaccinated group than in the pscCtrl-eGn vaccinated group, although not statistically significant. The ELISA-positive sera were tested for their capacity to neutralize RVFV in a reduction plaque assay. None of the sera were neutralizing at the difference with positive control sera from infected mice (data not shown). Altogether, our results indicate that pscDEC-eGn was less efficient than pscCtrl-eGn and peGn for inducing anti-eGn IgG responses, independently of the co-administration of pGM-CSF, and the anti-eGn IgG induced by our DNA vaccines were not able to neutralize RVFV *in vitro.*

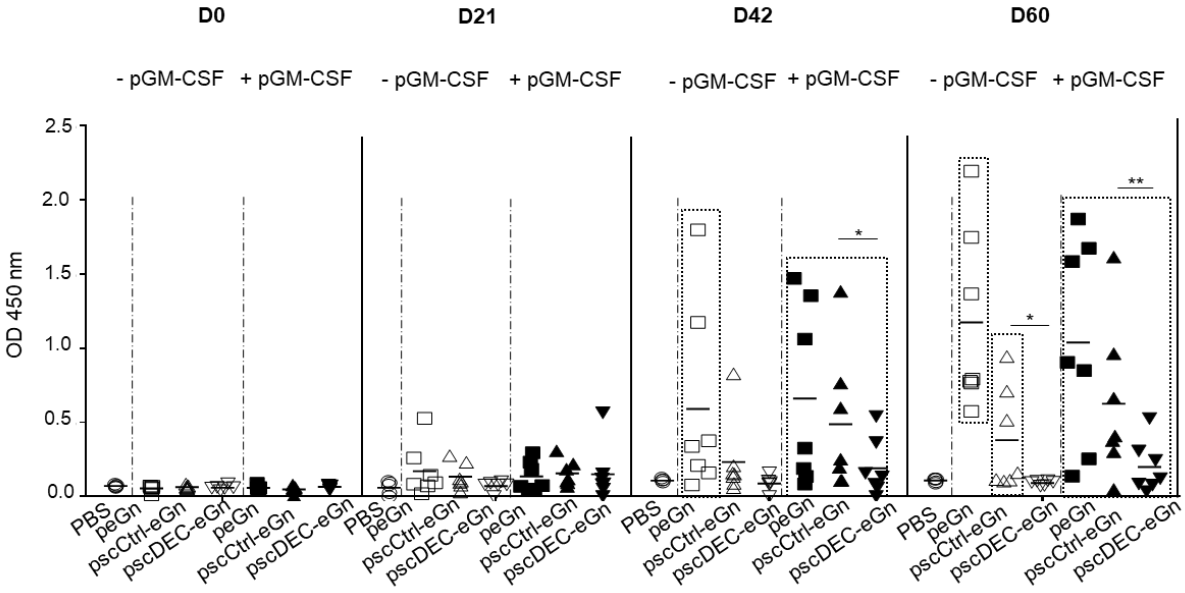



**Figure 4: Effect of pGM-CSF on Ab responses induced by peGn, pscCtrl-eGn and pscDEC-eGn.**

The serum from the immunized Balb/c as described in Fig. 3 were collected at day 0, 21, 42, 60 and were assayed for the detection of eGn-specific IgG using lysate from HEK293 cells transfected with peGn as coating. The OD signals at 450nm from the individual sera collected at each time point and tested at a 1:100 dilution are shown. Each animal is represented with a distinct symbol and the mean OD value is indicated. P values were determined using to the Mann-Whitney test (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$). The significance differences of the OD values measured at each time point in comparison with PBS group is indicate by a box for clarity ($p<0.05$).

**Passive transfer of serum from peGn-vaccinated mice protects against RVFV infection.**

So far our results show that both IFNγ and TNF-α T cell and IgG responses are reduced when eGn is targeted to DEC205. However, these immune parameters do not inform us on the protective immune response effectors induced by the DNA vaccines. Therefore, we performed transfer experiment. Donors Balb/c mice were immunized 3 times with peGn or PBS and combined with pGM-CSF along with SEP (Fig. 5A). Three weeks after the last recall (day 60), serum and spleen were collected, and T cells were isolated via cell sorting. Naïve recipient mice received 300 µl of eGn-specific or control serum and 1 x $10^7$ of purified eGn-specific T cells or control T cells. One day after serum and T cell transfer, mice were subsequently challenged with a lethal dose of RVFV ZH501 strain. The survival and clinical signs were daily monitored for 21 days. As previously shown, immunized mice with peGn + pGM-CSF were totally protected compared to control group PBS + pGM-CSF (Fig. 5B). No

significant weight loss was measured and no apparent clinical signs were observed in the protected peGn-vaccinated mice (data not shown). Conversely, 3 out of 5 mice of the control group became moribund, exhibited significant weight loss and died after infection compared to peGn-vaccinated mice (data not shown). Moreover, viral RNA (ranging from 2.05 x $10^9$ to 2.28 x $10^9$ viral RNA copies/g) and infectious viral particles (ranging from 3.67 x $10^6$ to 2.60 x $10^7$ pfu/g) were found in the brain of 2 mice in this group (Table 1). Recipient mice that received control T cell or eGn-specific T cell were not protected and most of them succumbed upon the infection (3/5 and 4/5 death respectively). Mice in these two groups displayed clinical signs (hypothermia, weight loss compared to peGn-vaccinated mice, neurological manifestations and ruffled fur) and became moribund and died upon the infection (data not shown). Furthermore, viral RNA were found in the liver (ranging from 2.98 x $10^6$ to 1.36 x $10^7$ viral RNA copies/g), both viral RNA (ranging from 2.13 x $10^8$ to 2.75 x $10^{13}$ viral RNA copies/g), and viral particles (ranging from 5.65 x $10^7$ to 3.84 x $10^9$ pfu/g) were detected in brain of several mice in these groups (Table. 1). Interestingly, all mice that received the control serum died (7/7 death) and exhibited severe manifestations (hypothermia, significant weight loss, neurological manifestations and ruffled fur). Viral RNA (ranging from 1.18 x $10^7$ to 6.5 x $10^{10}$ viral RNA copies/g) and viral particles (ranging from 1.11 x $10^4$ to 1.33 x $10^6$ pfu/g) were found in liver, as well as in the brain in this group (ranging from 1.98 x $10^{10}$ to 5.57 x $10^{12}$ viral RNA copies/g and from 3.27 x $10^8$ to 1.25 x $10^9$ pfu/g) (Table. 1). This high level of sensitivity in the mice receiving control serum as compared to PBS + pGM-CSF mice might be explained by the well described immunosuppressive effect of IgG systemic injection (22). Conversely, the majority of the mice that received the anti-eGn immune serum were protected (5/7 survival) (Fig. 5.B). Most of mice in this group did not displayed apparent clinical signs and, consistent with these results, no viral particles were found in the liver and in the brain. Viral RNA was found in this organ but at much lower levels than in the mice injected with the control serum. Altogether, this experiment shows that the transfer of humoral immune effectors from peGn-vaccinated mice protected mice against RVFV challenge contrary to the adoptively transferred T cell. This finding support the role of anti-eGn immunoglobulins in the protection against RVFV.

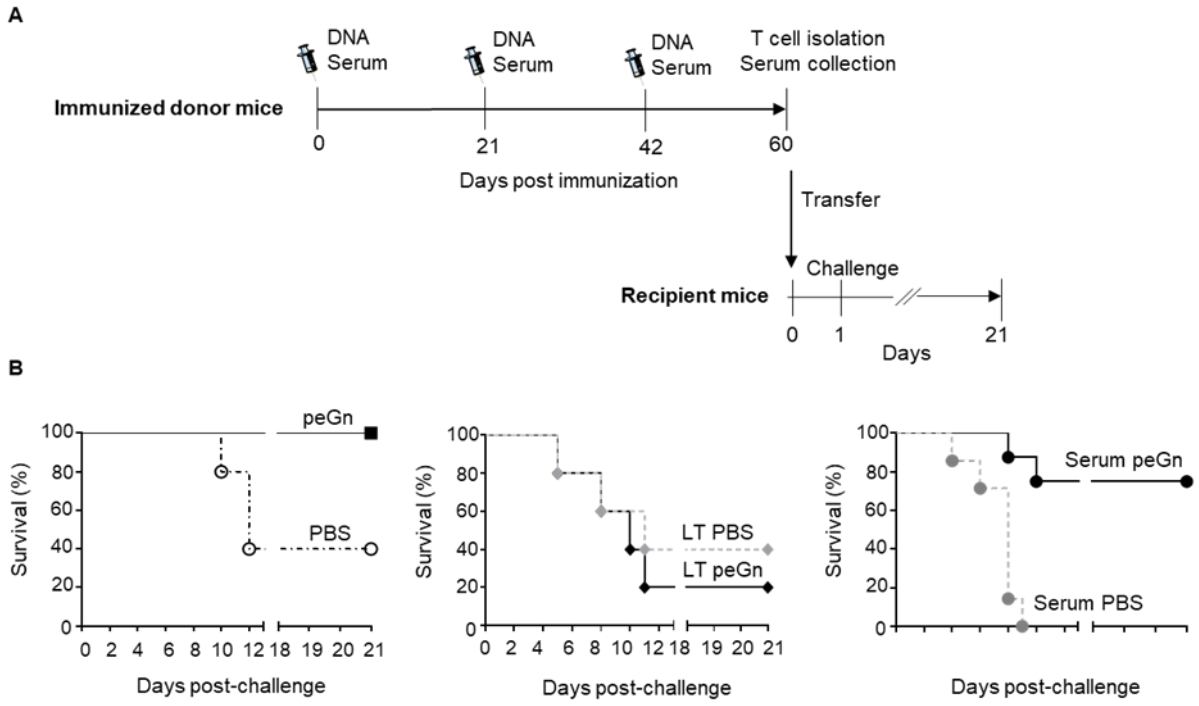



**Figure 5: Protection mediated by eGn-specific Ab by passive transfer against RVFV**

A. Six to eight week-old female Balb/c were immunized three times at day 0, 21 and 42 with 100 µg of peGn or PBS with 20 µg of pGM-CSF by intradermal injection in the flank and immediately followed by surface electroporation (1730 V/cm). Three weeks after the last immunization (day 60), serum and splenocytes were collected and pooled. Naïve recipient mice received 1 x 107 T cell isolated from donor immunized mice (see material and method section) and 300 µl of pooled serum. Immunized mice with peGn or PBS with 20 µg of pGM-CSF were use as positive and negative control respectively (n = 5 per group). Twenty-four hours after the passive and adoptive transfer, mice were challenged with 1 x 104 pfu of RVFV ZH501 strain. B. The survival was daily monitored for 21 days and percentage of survival is shown on the table. (n = 5 for adoptive transfer; n = 7 for passive transfer).

**DEC205 targeting of mCherry also decreases the IFNγ but promotes the IL-5 and antibody responses in DNA vaccination.**

The reduction of the humoral IgG and cellular IFNγ responses induced by DEC205 targeting of eGn is conflicting with several reports demonstrating an enhancement of antibody and $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell responses with DEC205 targeting in DNA vaccination. In order to assess whether the effect of DEC205 targeting on the immune response could be antigen-dependent, Balb/c mice were immunized with pscCtrl-mCherry or pscDEC-mCherry combined or not with pGM-CSF along with SEP using the same delivery method as described above (Fig. 3). Three weeks after the last immunization, spleen were extracted to analyze the T cell responses and total splenocytes were restimulated *in vitro* with a pool of overlapping peptides covering mCherry sequence or with an irrelevant peptide as control. The secretion of IFNγ, IL-2 and IL-5 cytokines were analyzed by ELISA. The IFNγ T cell response was lower in splenocytes from mice immunized with pscDEC-mCherry compared to pscCtrl-mCherry especially when pGM-CSF was induced, and the IL-2 response was similar in both groups (Fig. 6A). However, the IL-5 secretion was higher in the pscDEC-mCherry immunized group compared to the pscCtrl-mCherry immunized group, especially when pGM-CSF was administrated ($p<0.05$ versus pscCtrl-mCherry).

Sera from immunized mice were collected at the indicated time point and mCherry-specific Abs were detected by ELISA. Significant mCherry-specific Abs were detected in immunized mice at all time point ($p<0.05$ day 0 versus day 21, 42, 60) (Fig. 6B). In absence of pGM-CSF pscDEC-mCherry promotes a higher Ab response than pscCtrl-mCherry ($p<0.05$) after one immunization and the response tended to be higher in the pscDEC-mCherry immunized group at later times. Plasmid adjuvant pGM-CSF promoted the IgG response induced by pscCtrl-mCherry which was not further enhanced by DEC205 targeting. Thus targeting eGn and mCherry to DEC205 have opposite outcome in the IgG response with an inhibition in the case of eGn and an enhancement in the case of mCherry, in association with stimulation of Il-5 response. However, on both case, DEC205 targeting decreases the IFNγ T cell response.

Altogether, our results indicate that the outcome of DEC205 targeting in DNA vaccination appears to depend on the fused antigen. This strategy was particularly inefficient in the case of eGn where protective immunity is likely mediated by the humoral IgG response.

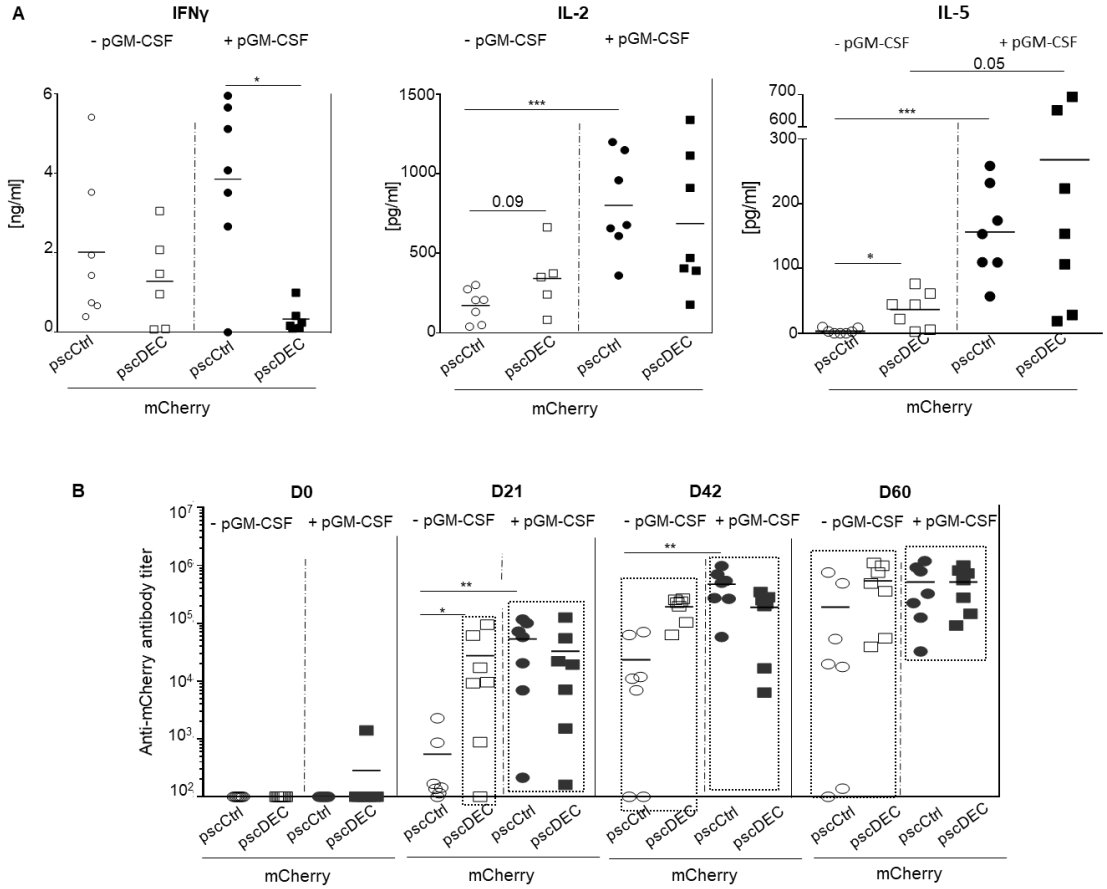



**Figure 6: Immunogenicity induced by pscCtrl-mCherry and pscDEC-mCherry.**

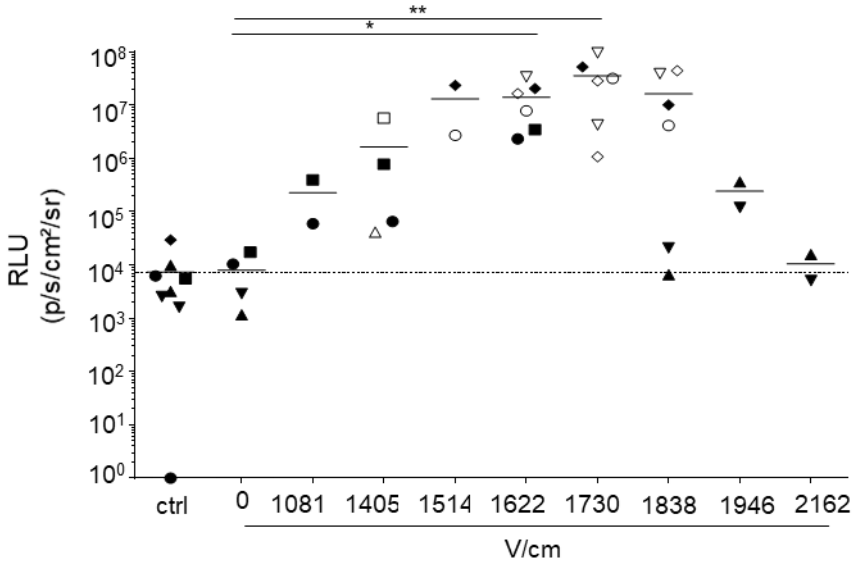
Six to eight week-old female Balb/c were immunized three times at day 0, 21 and 42 with 50 µg of pscCtrl-mCherry, pscDEC-mCherry with or without 20 µg of pGM-CSF. The T cell responses were evaluated by indirect ELISA 3 weeks after the last immunization and Ab response at the indicated times point. A. Splenocytes (2 x $10^6$ cells per well) were re-stimulated in vitro with overlapping mCherry peptides (5 µg/ml) or with an irrelevant peptide (5 µg/ml). IFNγ, IL-2 and IL-5 concentration were measured from cell culture supernatants at 72 h after the stimulation. Specific cytokine secretion was obtained from irrelevant peptides wells subtracted from condition with specific mCherry peptides. Each symbol represents an individual animal and the mean is indicated (n = 7 per group). P values were determined according to the Mann-Whitney test (*, $p<0.05$; ***, $p<0.001$). B. The mCherry-specific IgG titers were evaluated from serum of immunized mice collected at day 0, 21, 42, 60 using indirect using recombinant mCherry as coating. Each animal is represented with a distinct symbol and the mean is indicated (n = 6-7 per group). P values were determined using to the Mann-Whitney test (*, $p<0.05$). The significance differences of IgG titers measured at day 0 in comparison to days 21, 42 and 60 are indicate by a box for clarity using a paired non parametric Wilcoxon test ($p<0.01$).

**Table 1. Protection mediated by the T cell or eGn-specific Ab upon RVFV challenge in mice[a]**

| Groupe | Nb de survie/nb totale | J.P.I. | Foie | | Cerveau | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ARN viral (copie ARN/g) | Particules virales infectieuses (pfu/g) | ARN viral (copie ARN/g) | Particules virales infectieuses (pfu/g) |
| Non vacciné | 2/5 | 9 [I] | ND | ND | ND | ND |
| | | 12 [I] | 1,13E+06 | - | 2,28E+09 | 3,67E+06 |
| | | 12 [I] | 1,37E+06 | - | 2,05E+09 | 2,60E+07 |
| | | 22 | - | - | - | - |
| | | 22 | - | - | - | - |
| peGn | 5/5 | 22 | - | - | - | - |
| | | 22 | - | - | - | - |
| | | 22 | - | - | - | - |
| | | 22 | - | - | - | - |
| | | 22 | - | - | - | - |
| Transfère LT PBS | 2/5 | 5 [I] | ND | ND | ND | ND |
| | | 8 [I] | 6,21E+06 | 4,40E+02 | 7,72E+10 | 5,65E+07 |
| | | 11 [I] | 2,98E+06 | - | 3,03E+10 | 1,94E+08 |
| | | 22 | - | - | 2,13E+08 | - |
| | | 22 | - | - | 4,71E+09 | - |
| Transfère LT peGn | 1/5 | 5 [I] | ND | ND | ND | ND |
| | | 8 [I] | 1,36E+07 | - | 2,75E+13 | 3,84E+09 |
| | | 8 [I] | 8,70E+06 | - | 9,58E+09 | 5,78E+07 |
| | | 9 [I] | - | - | 8,31E+11 | 7,16E+08 |
| | | 22 | - | - | 1,32E+09 | - |
| Transfère serum PBS | 0/7 | 4 [I] | 6,50E+10 | 1,33E+06 | 1,98E+10 | - |
| | | 6 [I] | ND | ND | ND | ND |
| | | 8 [I] | ND | ND | ND | ND |
| | | 8 [I] | ND | ND | ND | ND |
| | | 8 [I] | 1,20E+07 | 1,11E+04 | 5,57E+12 | 1,25E+09 |
| | | 8 [I] | 1,18E+07 | - | 4,86E+12 | 8,24E+08 |
| | | 9 [I] | 1,45E+07 | - | 4,94E+10 | 3,27E+08 |
| Transfère serum eGn | 5/7 | 8 [I] | ND | ND | ND | ND |
| | | 10 [I] | 1,70E+06 | - | 9,02E+09 | 4,87E+07 |
| | | 22 | - | - | - | - |
| | | 22 | - | - | 2,39E+09 | - |
| | | 22 | - | - | - | - |
| | | 22 | - | - | 1,26E+09 | - |
| | | 22 | - | - | 1,50E+09 | - |

Days post challenge ; [I] Dead or euthanized during the challenge protocol; - Not detected ; ND : Not done

**Supplementary material 1**




**Optimization of the SEP V/cm parameter for pLuc expression in mouse skin *in vivo.***

pLuc (50 µg) was injected intradermally in mouse skin followed by SEP (6 pulses, 10 ms per pulse with 90 ms intervals). Different voltages per cm pulses were applied. After 48 h, the site of SEP was harvested and processed to measure the luciferase activity (p/s/cm²/sr). The background signal is given by the non-treated skin (ctrl).The luciferase activity of the skin biopsies injected with pLuc and subjected to different V/cm from a given mice is represented by the same symbol. The luciferase activity mean obtained at a given V/cm from different mice is shown as a horizontal bar. P values were determined according to the Kruskal Wallis test with Dunn's correction (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$).

## DISCUSSION

In the present study, we showed that a DNA vaccine encoding native eGn conferred a full protection against a RVFV challenge in mice. To our knowledge, this is the first study reporting full clinical protection induced in mice with a DNA vaccine encoding eGn and administered with pGM-CSF by surface electroporation; only partial protection had been previously achieved with a eGn encoding plasmid and delivered by gene gun (6). Our results indicate that anti-eGn Abs are likely to be instrumental in protection while we could not show the implication of effector T cells by adoptive transfer. Interestingly, targeting eGn to DEC205 drastically reduced the capacity of eGn to induce IFNγ T cell and anti-eGn IgG responses in our mouse model.

Neutralizing Abs are believed to be critical for the protection against RVFV (2). We showed by transfer experiments that humoral immune effectors, probably anti-eGn Abs, protected mice and favored viral clearance in the liver and the brain which are the main target organs of RVFV (23). The administration of purified immunoglobulins would be needed to fully demonstrate their role. However it is unlikely that any other component of the transferred serum from peGn in combination with pGM-CSF-vaccinated mice would be implicated, also considering that the control serum which rather promoted to sensitivity to RVFV, was obtained from mice injected with pGM-CSF plasmid alone. Surprisingly the serum from peGn-vaccinated mice did not display any RVFV-neutralizing properties *in vitro*. The ability of Ab to exert viral neutralization is often related to the natural conformation of the vaccine antigen. In our case, expression of eGn by the plasmid vaccine *in vivo* may display differential post-translational modifications or folding than the subunit eGn protein vaccines that were able to induce neutralizing Ab in mice and sheep (5,24). The eGn Abs induced by our DNA vaccine may also contribute to the viral clearance by other mechanism such as complement-dependent inhibition or Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or phagocytosis which remains to be investigated. In addition, it is possible that the classical *in vitro* neutralization assay does not faithfully recapitulate the *in vivo* neutralization and that the mouse sera were neutralizing *in vivo*. Finally we have also shown that anti-eGn IgG levels correlated with protection in peGn-vaccinated lambs, and that these sheep IgG were also not neutralizing *in vitro* (Chrun et al. 2018, in press npj Vaccines).

The targeting of vaccine antigen to DEC205 has been reported to be particularly efficient at promoting Th1 $CD4^+$ T and $CD8^+$ T cell responses, both in the case of protein vaccines (8,25) and DNA vaccines (11,12,14). However one study reports that a DNA vector encoding influenza haemagglutinin targeted to DEC205 and delivered by electroporation in mice led to a strong reduction of the IFNγ T cell response (26), as we also found here, both in the case of DNA encoding for DEC205-targeted eGn and mCherry antigens. The reasons for these discrepancies between all these studies are unclear and might reside in the ambivalent effect of DEC205 targeting which promotes effector T cell responses when the targeted DC are activated by adjuvants whereas it promotes regulatory T cell responses when the targeted DC at steady state (25,27). Electroporation induces an inflammatory response which is known to have adjuvant properties (28). However, in the case where plasmid expression is prolonged beyond the inflammatory response, regulatory T cell responses (Treg) may be dominating. Indeed influenza haemagglutinin targeted to DEC205 induced a potent Treg response in the mouse local lymph nodes (26). However in our work, the Foxp3 T cell numbers in spleen and the secretion of IL-10 in eGn-restimulated splenocytes were not enhanced by DEC205 targeting of eGn (data not shown), but we may have missed the Treg response if mainly located in the local lymph node. In any event, we also found that the reduction of the IFNγ responses induced by DEC205-targeted eGn and mCherry was particularly clear when pGM-CSF was co-injected. Whereas pGM-CSF potently activated the T cell response induced by the plasmids encoding the non-targeted antigens, it may have induced the recruitment of immature dendritic cells (29), whose targeting via DEC205 would have promoted a regulatory response.

DEC205 targeting of antigens has also been found efficient at promoting Ab responses, depending on the presence of adjuvant in the case of protein vaccines (30). Interestingly however, we show here that this promotion can depend on the antigen fused to the scFv anti-DEC moiety, as an enhancement was found in the case of mCherry but a reduction in the case of eGn. We can speculate that these opposite outcomes may depend on the altered or maintained antigen conformation induced by the fusion with scFv, on the interactions of the antigens with other immune receptors together with the targeted receptor, on the kinetics of internalization of the fusion protein affecting the duration of the interaction with the B cell receptor, or on the presence of T cell epitopes favorable to the induction of T follicular helper response (31). In favor of this later hypothesis, we found that pscDEC-mCherry and not

pscDEC-eGn induced higher IL-5 responses than the plasmid encoding for the non-targeted antigens.

In a previous study performed in sheep, we found that a DNA vaccine encoding eGn targeted to the ruminant DEC205 molecule was more potent than non-targeted eGn to induce the IFNγ T cell response, and less to induce the antibody response, using DNA delivered by SEP together with a plasmid encoding GM-CSF (Chrun et al. 2018, in press npj Vaccines). The difference of outcome between these 2 different species regarding the T cell response is puzzling. It is possible that the duration of plasmid expression was different between the two species, leading to target steady state DC in the case of mice and not in sheep. In addition the routing of DEC205 may follow different maturation and compartment pathways and the effect of the combination with GM-CSF may induce different signaling.

Altogether we showed that a DNA vaccine encoding eGn is efficient at fully protecting mice from RVFV pathogenesis and we bring evidences that the Ab response is instrumental in this protection. Therefore the improvement of DNA vaccine for application in target species should aim at inducing high anti-eGn Ab levels. We found that targeting eGn to DEC205 was not suitable for that purpose, both in mice and in sheep. Other DC receptors known to promote Ab response should be evaluated such as CLEC9A (32,33). Our work also illustrates that the outcome of antigen-DC targeting remain unpredictable and at least depends on the antigen and the species. Knowledge in the mechanistic clues governing DC targeting efficacy is urgently needed to improve the success of this strategy.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Jérôme Pottier, Marlène Héry and Charline Pontlevoy from the Fish and Rodent Experimental Infectiology unit (IERP, INRA, Jouy-en-Josas, France) for their participation in the experiments conducted at the IERP. We thank Michèle Bouloy (Paris Pasteur Institute, France) for the MP-12 strain, Stéphane Biacchesi (VIM-INRA-Université Paris-Saclay, France) for the pLuc plasmid, and Philippe Desprès (Paris Pasteur Institute, France) for the purified N protein. We thank the Synogene team for their excellent technical support and follow up with the scFv constructs.

## COMPETING INTEREST

The authors declare no competing interest.

## FUNDING

The work was supported by the grant ANR ASTRID RIFTVAC ANR-12-ASTR-0006-01, financed by the Direction Générale de l'Armement (France). TC was supported by a joint INRA-ANSES fellowship.

## REFERENCE


1. Mansfield KL, Banyard AC, McElhinney L, Johnson N, Horton DL, Hernández-Triana LM, Fooks AR. Rift Valley fever virus: A review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe. Vaccine (2015) 33:5520–5531. doi:10.1016/j.vaccine.2015.08.020

2. Faburay B, LaBeaud A, McVey D, Wilson W, Richt J. Current Status of Rift Valley Fever Vaccine Development. Vaccines (2017) 5:29. doi:10.3390/vaccines5030029

3. Faburay B, Wilson WC, Gaudreault NN, Davis AS, Shivanna V, Bawa B, Sunwoo SY, Ma W, Drolet BS, Morozov I, et al. A Recombinant Rift Valley Fever Virus Glycoprotein Subunit Vaccine Confers Full Protection against Rift Valley Fever Challenge in Sheep. Sci Rep (2016) 6:1–12. doi:10.1038/srep27719

4. Besselaar TG, Blackburn NK. The synergistic neutralization of Rift Valley fever virus by monoclonal antibodies to the envelope glycoproteins. Arch Virol (1992) 125:239–250. doi:10.1007/BF01309641

5. Kortekaas J, Antonis AFG, Kant J, Vloet RPM, Vogel A, Oreshkova N, De Boer SM, Bosch BJ, Moormann RJM. Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep. Vaccine (2012) 30:3423–3429. doi:10.1016/j.vaccine.2012.03.027

6. Bhardwaj N, Heise MT, Ross TM. Vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or alphavirus replicons expressing Gn protects mice against rift valley fever virus. PLoS Negl Trop Dis (2010) 4:e725. doi:10.1371/journal.pntd.0000725

7. Jorritsma SHT, Gowans EJ, Grubor-Bauk B, Wijesundara DK. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. Vaccine (2016) 34:5488–5494. doi:10.1016/j.vaccine.2016.09.062

8. Lehmann C, Heger L, Heidkamp G, Baranska A, Lühr J, Hoffmann A, Dudziak D. Direct Delivery of Antigens to Dendritic Cells via Antibodies Specific for Endocytic Receptors as a Promising Strategy for Future Therapies. Vaccines (2016) 4:8. doi:10.3390/vaccines4020008

9. Dutertre C-A, Wang L-F, Ginhoux F. Aligning bona fide dendritic cell populations across species. Cell Immunol (2014) 291:3–10. doi:10.1016/j.cellimm.2014.08.006

10. Contreras V, Urien C, Guiton R, Alexandre Y, Vu Manh T-P, Andrieu T, Crozat K, Jouneau L, Bertho N, Epardaud M, et al. Existence of CD8α-like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. J Immunol (2010) 185:3313–3325. doi:10.4049/jimmunol.1000824

11. Nchinda G, Kuroiwa J, Oks M, Trumpfheller C, Park CG, Huang Y, Hannaman D, Schlesinger SJ, Mizenina O, Nussenzweig MC, et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. Conflict (2008) 118: doi:10.1172/JCI34224DS1

12. Cao J, Jin Y, Li W, Zhang B, He Y, Liu H, Xia N, Wei H, Yan J. DNA vaccines targeting the encoded antigens to dendritic cells induce potent antitumor immunity in mice. BMC Immunol (2013) 14:39. doi:10.1186/1471-2172-14-39

13. Hua Y, Jiao Y-Y, Ma Y, Peng X-L, Fu Y-H, Zhang X-J, Zheng Y-B, Zheng Y-P, Hong T, He J-S. Enhanced humoral and CD8 + T cell immunity in mice vaccinated by DNA vaccine against human respiratory syncytial virus through targeting the encoded F protein to dendritic cells. Int Immunopharmacol (2017) 46:62–69. doi:https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.023

14. Njongmeta LM, Bray J, Davies CJ, Davis WC, Howard CJ, Hope JC, Palmer GH, Brown WC, Mwangi W. CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4 + T cell responses following DNA vaccination of outbred animals. Vaccine (2012) 30:1624–1635. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.110

15. Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. Expert Rev Vaccines (2012) 11:189–209. doi:10.1586/erv.11.188

16. Gothelf A, Gehl J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. (2012) 8:1694–1702.

17. Bird BH, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. J Virol (2007) 81:2805–2816. doi:10.1128/JVI.02095-06

18. Meegan JM. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-1978 1. Description of the epizootic and virological studies. Trans R Soc Trop Med Hyg (1979) 73:618–623. doi:10.1016/0035-9203(79)90004-X

19. Caplen H, Peters CJ, Bishop DHL. Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development. J Gen Virol (1985) 66:2271–2277. doi:10.1099/0022-1317-66-10-2271

20. Coconi-Linares N, Ortega-Dávila E, López-González M, García-Machorro J, García-Cordero J, Steinman RM, Cedillo-Barrón L, Gómez-Lim MA. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. Vaccine (2013) 31:2366–2371. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.009

21. Drosten C, Göttig S, Schilling S, Panning M, Schmitz H, Asper M, Günther S. Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses , Lassa Virus , Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus , Rift Valley Fever Virus , Dengue Virus , and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Rapid Detection and Quantification of RNA o. J Clin Microbiol (2002) 40:2323–2330. doi:10.1128/JCM.40.7.2323

22. Prabagar MG, Choi H jwa, Park JY, Loh S, Kang YS. Intravenous immunoglobulin-mediated immunosuppression and the development of an IVIG substitute. Clin Exp Med (2014) 14:361–373. doi:10.1007/s10238-013-0255-4

23. Gommet C, Billecocq A, Jouvion G, Hasan M, do Valle TZ, Guillemot L, Blanchet C, van Rooijen N, Montagutelli X, Bouloy M, et al. Tissue tropism and target cells of NSs-deleted rift valley fever virus in live immunodeficient mice. PLoS Negl Trop Dis (2011) 5: doi:10.1371/journal.pntd.0001421

24. de Boer SM, Kortekaas J, Antonis AF, Kant J, van Oploo JL, Rottier PJM, Moormann RJM, Bosch BJ. Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge. Vaccine (2010) 28:2330–2339. doi:10.1016/j.vaccine.2009.12.062

25. Macri C, Dumont C, Johnston AP, Mintern JD. Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness. Clin Transl Immunol (2016) 5:e66. doi:10.1038/cti.2016.6

26. Niezold T, Storcksdieck genannt Bonsmann M, Maaske A, Temchura V, Heinecke V, Hannaman D, Buer J, Ehrhardt C, Hansen W, Überla K, et al. DNA vaccines encoding

DEC205-targeted antigens: Immunity or Tolerance? Immunology (2015)n/a-n/a. doi:10.1111/imm.12467

27. Mahnke K, Ring S, Enk AH. Antibody targeting of “steady-state” dendritic cells induces tolerance mediated by regulatory T cells. Front Immunol (2016) 7: doi:10.3389/fimmu.2016.00063

28. Todorova B, Adam L, Culina S, Boisgard R, Martinon F, Cosma A, Ustav M, Kortulewski T, Grand RL, Chapon C. Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. Sci Rep (2017) 7:1–11. doi:10.1038/s41598-017-04547-2

29. Matthews K, Rhind SM, Gossner AG, Dalziel RG, Hopkins J. The effect of gene gun-delivered pGM-CSF on the immunopathology of the vaccinated skin. Scand J Immunol (2007) 65:298–307. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01902.x

30. Cheong C, Choi J, Vitale L, He L-Z, Trumpfheller C, Bozzacco L, Do Y, Nchinda G, Park SH, Dandamudi DB, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti – human DEC205 monoclonal antibody. Blood (2010) 116:3828–3838. doi:10.1182/blood-2010-06-288068.

31. Amorim KNS, Rampazo E V., Antonialli R, Yamamoto MM, Rodrigues MM, Soares IS, Boscardin SB. The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205+ dendritic cells. Sci Rep (2016) 6:1–15. doi:10.1038/srep39250

32. Park H-Y, Tan PS, Kavishna R, Ker A, Lu J, Chan CEZ, Hanson BJ, MacAry PA, Caminschi I, Shortman K, et al. Enhancing vaccine antibody responses by targeting Clec9A on dendritic cells. npj Vaccines (2017) 2:31. doi:10.1038/s41541-017-0033-5

33. Lahoud MH, Ahmet F, Kitsoulis S, Wan SS, Vremec D, Lee C-NC-N, Phipson B, Shi W, Smyth GK, Lew AM, et al. Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype. J Immunol (2011) 187:842–850. doi:10.4049/jimmunol.1101176

## 1. Résultats principaux

Dans cette étude, nous avons montré que le plasmide codant l'eGn en présence du plasmide adjuvant pGM-CSF était immunogène et a conféré une protection complète chez la souris. De façon similaire aux résultats précédemment obtenus chez le mouton avec ce vecteur, les anticorps anti-eGn générés ne neutralisaient pas le virus *in vitro*. Les expériences de transfert ont montré le rôle majeur des réponses humorales anti-eGn dans la protection par rapport aux réponses cellulaires contre une infection par le vFVR.

En revanche, le ciblage des DCs via DEC205 a conféré une protection partielle et a induit des réponses cellulaires IFNγ, TNF-α et humorales plus faibles que l'eGn non ciblé, que ce soit en présence ou en l'absence du pGM-CSF. Ces réponses n'étaient pas liées à une anergie des lymphocytes T puisqu'une forte sécrétion d'IL-2 a été mesurée après une stimulation spécifique des splénocytes chez les souris immunisées par pscDEC-eGn en présence ou en l'absence du plasmide pGM-CSF. De plus, cette diminution n'était pas liée à une augmentation de lymphocytes T régulateurs totaux dans les rates de souris immunisées par les vecteurs pscCtrl-eGn et pscDEC-eGn en présence ou en l'absence d'adjuvant (résultats non montrés). Ces résultats sont différents de ceux rapportés dans la littérature qui indiquent que la fusion d'antigènes à un scFv anti DEC205 améliore en général les réponses humorale et cellulaire induite par des vaccins ADN (Cao et al., 2013; Nchinda et al., 2008), bien que ce ne soit pas toujours le cas (Niezold et al., 2015). Ceci nous a conduit à étudier l'influence de l'antigène fusionné sur les réponses immunes induites par le ciblage des DCs via DEC205. L'adressage d'un autre antigène vers DEC205 (mcherry) en présence ou en l'absence du plasmide pGM-CSF a également induit une réduction des réponses IFNγ mais pas l'IL-2, comme dans le cas du plasmide scFvDEC-eGn. En revanche, pscDEC-mCherry a induit une meilleure réponse humorale anti-mCherry par rapport au vecteur pscCtrl-mCherry avec une meilleuref sécrétion d'IL-5, à la différence de ce qui a été obtenu avec le vecteur pscDEC-eGn. Ainsi ces résultats indiquent que les réponses immunes induites par le ciblage des DCs via DEC205 sont antigène-dépendants. En tous cas, l'association de l'antigène eGn avec la stratégie de ciblage des DCs via DEC205 n'est pas favorable à l'induction d'une réponse immunitaire protectrice contre le vFVR.

# VII. Discussion et perspectives

La vaccination à ADN est une stratégie adaptée contre les maladies infectieuses. Les plasmides sont rapides à produire à grande échelle, stables et sûrs, critères qui sont avantageux en cas d'apparition d'épidémies. Cette stratégie vaccinale a d'ailleurs été employée contre la fièvre de la vallée du Rift (FVR) chez le mouton par l'immunisation d'un plasmide codant les protéines NSm-Gn-Gc. Cependant, les animaux immunisés n'ont développé aucune réponse cellulaire et humorale détectable (Lorenzo et al., 2008).

Dans notre projet, nous avons cherché à améliorer l'immunogénicité de cette stratégie dans l'hôte naturel et à mieux comprendre les mécanismes de protection chez la souris. Le choix de l'antigène s'est porté sur l'ectodomaine de la glycoprotéine Gn (eGn) du vFVR. En effet, des travaux antérieurs ont montré son potentiel vaccinal dans différentes espèces. Chez le mouton, l'immunisation par un vaccin sous-unitaire protéique eGn en présence d'adjuvant a induit une immunité stérilisante (Kortekaas et al., 2012). Chez la souris, l'immunisation par un plasmide codant pour l'eGn délivré par « gene gun » a conféré une protection partielle (Bhardwaj, Heise, and Ross 2010).

Nous avons ensuite fait l'hypothèse que l'adjonction d'un adjuvant génique couplé au plasmide codant l'antigène vaccinal suivie d'une méthode de délivrance de l'ADN *in vivo* augmenterait l'immunogénicité. Enfin, nous avons souhaité voir si l'adressage de l'antigène vers des récepteurs exprimés à la surface des DCs, impliqués dans l'apprêtement et dans la présentation antigénique renforcerait l'immunogénicité et la protection.

Nous avons ainsi développé une stratégie vaccinale qui consiste à 1) utiliser un adjuvant génique codant le GM-CSF, 2) employer l'électroporation de surface (SEP) et 3) adresser l'antigène eGn vers les récepteurs DEC205 ou CD11c via un plasmide qui code des fragments d'anticorps scFvs spécifiques contre ces récepteurs.

## 1. La vaccination à ADN, une stratégie prometteuse contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez le mouton

### a) Induction d'une réponse immunitaire protectrice par un plasmide codant l'eGn du vFVR chez le mouton

Un point fort de notre étude est l'utilisation du modèle ovin. Nous avons pu tester nos candidats vaccins dans des cohortes de moutons de races européennes différentes (Lacaune et Préalpes) et d'âges différents (2 et 12 mois). Ceci nous a permis d'évaluer de façon pertinente leur efficacité chez l'hôte naturel du virus qui peut également être considéré comme un modèle d'intérêt préclinique pour l'Homme. Toutefois, ce modèle présente également des limites, notamment le manque d'outils disponibles pour investiguer des réponses immunitaires, la complexité du modèle pour l'étude des mécanismes impliqués dans la protection qui sera discutée ultérieurement et le coût financier qui conditionne la planification de l'étude (le choix du nombre de groupes, les conditions à tester, les prélèvements à collecter).

Nous avons montré que le plasmide codant l'eGn (peGn) a induit une réponse humorale et a conféré une protection chez les agneaux vaccinés par rapport aux non vaccinés. La fièvre et la virémie étaient significativement diminuées par rapport aux groupes non vaccinés (article 1, Figure 4). Nous avons ainsi validé le potentiel vaccinal de l'eGn en vaccination à ADN chez le mouton et à notre connaissance, notre étude montre pour la première fois la protection médiée par un vaccin à ADN dans l'hôte naturel contre le vFVR (Faburay et al., 2017). Ce vaccin présente l'avantage de pouvoir induire une réponse immunitaire permettant de distinguer des animaux vaccinés des infectés (DIVA) et il est sûr (innocuité, pas de virus réassortant possible).

Etant donné que peGn a conféré la meilleure protection et la plus forte réponse humorale par rapport au plasmide codant l'eGn soit fusionné à un scFv dirigé contre DEC205 (pscDEC-eGn), soit fusionné à un scFv dirigé contre CD11c (pscCD11c-eGn), nous avons fait l'hypothèse que la protection était majoritairement médiée par les anticorps anti-eGn. Pour essayer de répondre à cette hypothèse, nous avons réalisé des analyses de corrélations à partir des données immunologiques et virologiques chez les animaux vaccinés, avant et après infection. Les analyses ont montré une bonne corrélation entre les anticorps anti-eGn avec la réduction de la virémie et les signes cliniques, mais pas avec la réponse cellulaire IFNγ. Toutefois, dans la limite des outils disponibles, nous n'avons pas pu analyser la sécrétion

d'autres cytokines ainsi que l'activité cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$ qui pourraient avoir un rôle dans cette protection.

Les anticorps anti-eGn induits par nos vaccins à ADN ne neutralisent pas le virus *in vitro*, propriété qui sera discutée ultérieurement. De plus, ils pourraient protéger contre l'infection par le vFVR par la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante (ADCC), par phagocytose ou par la lyse complément-dépendante.

### b) Perspectives

Nos vaccins à ADN ont été administrés par voie intradermique à l'aide d'une seringue à insuline suivie d'une électroporation de surface, à raison de 3 injections à 3 ou 4 semaines d'intervalle sur des animaux anesthésiés. Les injections intradermiques sont plus délicates à réaliser par rapport aux injections intramusculaires et nous avons montré que l'injection intradermique pouvait introduire une variabilité au niveau de l'expression des vecteurs *in vivo* (article 1, Figure 2.E). D'autres systèmes de délivrance portatifs qui sont plus adaptés pour des vaccinations de masse, et qui idéalement permettent d'injecter des plasmides de manière standardisée, pourraient être testés. Une étude récente a montré que l'administration chez des porcs d'un plasmide codant l'hémagglutinine du virus de la grippe délivré d'une part par pression (needle-free jet injector) et d'autre part par injection intradermique suivie d'une électroporation a induit des réponses similaires (Grodeland et al., 2016). La technologie d'injection par pression est actuellement testée en combinaison à une vaccination à ADN contre le PRRSV (syndrome dysgénésique respiratoire porcin) chez le porc dans un projet coordonné par notre équipe de l'INRA.

L'injection d'une dose plus élevée de plasmide pourrait permettre de diminuer le nombre de rappels. En effet, chez l'Homme, des doses de plasmide pouvant aller jusqu'à 5mg/injection ont été utilisées en étude clinique (Beckett et al., 2011). Or, dans notre étude, nous avons utilisé 400µg de plasmide vaccinal/injection.

Nous avons montré que peGn a induit une réponse humorale 3 semaines après la dernière immunisation. Il serait intéressant d'évaluer la durée du maintien de cette réponse et la protection à long terme médiée par ce vaccin à ADN.

Le plasmide peGn a conféré une immunité non stérilisante chez les agneaux puisqu'il n'a pas empêché pas la virémie, bien qu'elle était significativement diminuée (~3 $log_{10}$) par rapport

aux agneaux non vaccinés (article 1, Figure 4). La combinaison de plusieurs antigènes pourrait être une alternative pour renforcer la protection. En effet, une étude a montré une protection totale chez des moutons suite à l'injection de protéines eGnGc (Faburay et al., 2016). La co-injection de plasmides codant eGn et Gc pourrait être testée chez les moutons, et plus particulièrement chez des femelles gestantes qui font parties des cibles prioritaires à protéger.

A l'heure actuelle, aucun vaccin commercialisé n'a montré une innocuité et une protection chez les femelles gravides contre les avortements (cf. introduction partie IV.B.1). Par ailleurs, il serait également intéressant d'évaluer le rôle des anticorps maternels anti-Gn et anti-Gc générés lors de l'immunisation dans la protection du nouveau-né, qui, jusqu'à présent, n'a pas été exploré.

### 2. L'efficacité du ciblage des DCs en vaccination à ADN contre le vFVR

L'efficacité du ciblage des DCs via DEC205 et CD11c pour améliorer les réponses immunitaires a été largement documentée chez la souris, que ce soit en vaccins protéiques ou géniques (cf. introduction partie IV.C.3). Malgré ces résultats prometteurs, peu d'études ont transposé cette approche dans des modèles grands mammifères. En l'occurrence, chez les ruminants, une seule étude a montré l'amélioration des réponses cellulaires IFNγ chez le veau via DEC205 (Njongmeta et al., 2012). L'efficacité de la stratégie du ciblage des DCs dans un modèle ovin nous est donc parue pertinente à tester contre le vFVR et il serait intéressant d'approfondir les mécanismes de protection dans le modèle murin.

#### a) Dans le modèle ovin

Nous avons montré pour la première fois l'amélioration de la réponse cellulaire IFNγ par le ciblage des DCs via DEC205 dans un modèle ovin (article 1, Figure 3.B) et cette augmentation n'était pas liée à une surexpression du vecteur pscDEC-eGn par rapport peGn seul *in vivo* (article 1, Figure 2.E). Bien que la réponse humorale et la protection n'étaient pas améliorées par rapport à celles observées avec peGn contre le vFVR, ce type de stratégie pourrait être utilisé contre des pathogènes pour lequel la réponse cellulaire a un rôle important dans la clairance virale, notamment contre le virus de la grippe (Baranowska et al., 2015). En

revanche, l'adressage d'eGn vers le récepteur CD11c a montré des résultats contradictoires par rapport aux résultats obtenus dans un modèle murin contre un antigène tumoral (Wang et al., 2015). En effet, nous avons obtenu de manière globale une faible immunogénicité suite à la vaccination avec pscCD11c-eGn. A noter aussi que des différences d'immunogénicité ont été observées pour un même vecteur chez des moutons adultes et des agneaux (article 1, Figure 3 et Figure 14). L'âge et la race pourraient avoir influencé la réponse immunitaire.

De manière générale, les vecteurs pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn ont conféré une immunité différente ainsi qu'une protection plus faible par rapport à peGn et ces résultats peuvent être liés à plusieurs facteurs.

Premièrement, la vitesse d'internalisation de l'antigène adressé à la DC influence les réponses immunitaires induites. En effet, des études ont proposé qu'une présentation antigénique prolongée favoriserait la formation de lymphocytes Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires, le développement de centres germinatifs et l'induction d'une réponse humorale robuste (Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011). Par ailleurs, la persistance plus longue de la protéine eGn non ciblée par rapport à l'eGn ciblée favoriserait l'interaction avec les LBs (Gudjonsson, 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'adressage d'eGn vers le récepteur DEC205 entrainerait une internalisation plus rapide par rapport à la protéine eGn seule et favoriserait la réponse cellulaire plutôt qu'humorale.

Deuxièmement, la différente distribution des récepteurs ciblés DEC205 et CD11c sur les leucocytes au sein d'une même espèce pourrait influencer la réponse immunitaire induite. (Geherin et al., 2012). Nous avons montré que les récepteurs DEC205 et CD11c étaient exprimés de façon indifférencié sur les cDC1 et les cDC2 issues de la lymphe ovine (article 1, Fig.1). D'autres études ont montré que DEC205 était également exprimé sur les lymphocytes du mouton, mais à un niveau plus faible par rapport aux DCs (Gliddon et al., 2004) et que le récepteur CD11c était exprimé sur les monocytes/macrophages (Bonneau et al., 2006) et les lymphocytes B (Geherin et al., 2012).

Troisièmement, les différents niveaux d'anticorps anti-eGn, les épitopes reconnus par ces anticorps et la nature des isotypes d'anticorps induits par nos vaccins pourraient expliquer les différences d'efficacité de protection observées. Nous avons constaté des signes cliniques plus graves et une virémie élevée chez les moutons immunisés par pscCD11c-eGn, groupe dans lequel une faible réponse humorale a été mesurée. A l'inverse, la meilleure protection a été observée dans le groupe immunisé par peGn qui présente la réponse humorale la plus forte.

La conformation de l'antigène eGn pourrait varier entre la forme libre et la forme fusionnée à un scFv. Ainsi, certains épitopes clés pour induire une cytotoxicité pourraient être masqués (He et al., 2016). Les anticorps anti-eGn générés par les vecteurs pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn seraient moins efficaces pour exercer l'ADCC par rapport à ceux induits par peGn.

D'autre part, la nature des anticorps anti-eGn induits par nos vecteurs pourraient être différente et auraient ainsi une efficacité différente à induire la cytotoxicité. Le mécanisme d'action des anticorps dépend de l'affinité du domaine Fc des IgG avec les récepteurs FcγR sur des cellules effectrices. Chez la souris, les isotypes IgG2a et IgG2b sont plus efficaces pour médier la cytotoxicité (Nimmerjahn and Ravetch, 2005), tandis que chez l'Homme, ce sont plutôt les IgG1 et les IgG3 (Irani et al., 2015). Dans la limite des outils disponibles, nous n'avons pas pu répondre à ces questions qui restent à être éclaircir.

Enfin, les niveaux et la durée d'expression des plasmides peuvent varier *in vivo* et peuvent impacter l'immunogénicité.

### b) Dans le modèle murin

La stratégie de ciblage des DCs via DEC205 a induit des réponses immunes différentes chez le mouton et la souris. Chez le mouton, la réponse IFNγ était améliorée. Au contraire, chez la souris, les réponses IFNγ et humorales étaient réduites (article 2, Figure 4). Ces résultats montrent les limites du modèle murin qui n'est pas forcément prédictif sur les réponses immunes chez le mouton.

Parmi les nombreuses études ayant montré l'efficacité du ciblage des DCs chez la souris, une seule étude a rapporté une réduction de la réponse IFNγ chez des souris immunisées par un plasmide codant l'hémagglutinine et délivré par électroporation. Cette faible immunogénicité était associée à l'induction de lymphocytes T régulateurs (Tregs) dans les ganglions lymphatiques (Niezold et al., 2015). Bien que les raisons ne soient pas très claires, il semblerait que certaines conditions favoriseraient la mise en place d'une réponse tolérogène plutôt qu'effectrice.

De nombreux travaux ont montré l'effet adjuvant d'un plasmide codant le GM-CSF (Saade and Petrovsky, 2012). Pourtant, une étude a montré que la délivrance d'un plasmide codant le GM-CSF dans la peau a induit le recrutement de DCs semi-matures (Matthews et al., 2007)

favorables à l'induction de Tregs (Gaudreau et al., 2007). De plus, la dose de GM-CSF semble déterminer son effet sur la réduction de la réponse immune. L'injection d'une haute dose de GM-CSF chez le singe par un vecteur virus de la vaccine exprimant le GM-CSF (MVA-GM-CSF) a fortement réduit la réponse humorale (Kannanganat et al., 2016).

Dans notre étude, nous avons émis l'hypothèse que l'expression d'une forte dose de GM-CSF chez la souris dans nos conditions d'immunisation aurait favorisé l'induction de Tregs. Cependant, la présence ou l'absence de l'adjuvant GM-CSF n'a pas amélioré l'immunogénicité médiée par pscDEC-eGn (article 2, Fig. 3). Au contraire, en ce qui concerne les plasmides codant l'eGn non ciblé (peGn et pscCtrl-eGn), le plasmide codant le GM-CSF a eu un effet adjuvant sur la réponse cellulaire. Il est possible que l'expression prolongée de pscDEC-eGn, au-delà de l'inflammation locale induite par l'électroporation, permette la fixation du scDEC-eGn sur les DCs semi-matures et favorise l'induction de Tregs. Nous n'avons mesuré ni d'augmentation de lymphocytes Tregs totaux dans la rate, ni celle de lymphocytes T sécréteurs d'IL-10 induite par le GM-CSF et/ou le ciblage des DCs via DEC205. Toutefois, nous n'avons pas évalué ce paramètre dans les ganglions et cette augmentation possible des Tregs dans ce compartiment pourrait expliquer la réduction des réponses IFNγ et humorales observées. Aussi, nous n'avons pas mesuré les Tregs spécifiques de l'antigène vaccinal. Nous pourrions spéculer que chez le mouton l'expression du pscDEC-eGn serait moins longue que chez la souris, scDEC-eGn aurait alors ciblé des DCs activées par la vaccination et non pas des DCs semi-matures et elle aurait ainsi favorisé l'induction d'une réponse effectrice. Chez la souris, l'expression plus longue du plasmide aurait conduit au ciblage de DCs semi-matures, favorisant l'apparition des Tregs.

L'adressage de mCherry vers DEC205 en présence ou en l'absence d'adjuvant génique pGM-CSF a induit une forte réponse humorale, d'ailleurs améliorée en l'absence d'adjuvant. Ces résultats diffèrent de ceux qui ont été obtenus avec le ciblage eGn (article 2, Figure 5.B). L'efficacité du ciblage des DCs en vaccination à ADN semble dépendre également de l'antigène fusionné au scFv qui pourrait affecter l'endocytose du complexe et impacter la réponse humorale ou cellulaire.

### c) Perspectives

Nous avons montré que les résultats de la stratégie de ciblage DCs chez la souris en vaccination à ADN n'étaient pas prédictifs de ceux obtenus dans un modèle grand mammifère et dépendaient de l'antigène ainsi que de l'espèce testés. Bien qu'une étude ait essayé d'investiguer les paramètres clés associés à une présentation antigénique efficace suite au ciblage des DCs *in vitro*, ils restent encore inconnus à ce jour (Reuter et al., 2015). Les paramètres capables d'influencer la présentation antigénique dans le cadre de la stratégie de ciblage des DCs, tels que le récepteur ciblé, l'adjuvant utilisé, le routage intracellulaire de l'antigène d'intérêt, la persistance de la présentation antigénique dans les organes lymphoïdes secondaires *in vivo*, doivent être d'avantage investigués pour améliorer l'efficacité de la stratégie de ciblage des DCs.

Nous avons montré que peGn induisait une protection incomplète et que la réponse humorale était importante dans la protection contre le vFVR chez le mouton. Le ciblage des DCs via les récepteurs CLEC9A (Lahoud et al., 2011; Park et al., 2017) et XCR1 (Fossum et al., 2015), connus pour améliorer la réponse humorale chez la souris, pourrait être évalué chez le mouton pour renforcer la protection. Par ailleurs, un projet coordonné par notre équipe de l'INRA et dans lequel j'ai participé (pour l'analyse des réponses cellulaires), a montré que le ciblage des DCs via XCR1 contre le virus de la grippe par l'utilisation d'un vaccibody, formé de l'XCL1 porcin et de l'ectodomaine de la protéine de la matrice M2 du virus, en l'absence d'adjuvant améliore la réponse humorale chez le porc (Annexe 2). Le ciblage des DCs via le récepteur XCR1 pourrait être un candidat pertinent dans le cadre de la vaccination contre le vFVR.

Le ciblage des DCs via DEC205 en vaccination protéique sans adjuvant induit une réponse tolérogène et semble être une approche intéressante contre des maladies inflammatoires (Ring et al., 2017; Spiering et al., 2017). En vaccination à ADN, il serait également possible d'induire des réponses tolérogènes. Cette stratégie peut être envisagée contre ce type de pathologie, bien que les paramètres gouvernant l'induction d'une réponse tolérogène ne soient pas maitrisés en vaccination ADN et restent à être déterminés.

### 3. L'étude des réponses immunes impliquées dans la protection médiée par peGn chez la souris

#### a) La contribution des réponses humorales et cellulaires

Parmi nos candidats vaccinaux, la meilleure protection a été obtenue avec peGn chez le mouton et les analyses de corrélations ont mis en évidence une forte relation entre le niveau d'anticorps anti-eGn dans les sérums et la réduction de la virémie et celle des signes cliniques. Pour valider cette hypothèse, nous avons évalué le rôle de la réponse humorale et des lymphocytes T dans la protection médiée par peGn dans le modèle murin. Le choix s'est porté sur ce modèle car les souris sont sensibles à l'infection par le vFVR, elles développent des symptômes similaires à ceux observés chez l'Homme infecté (Smith et al., 2010) et enfin pour des raisons pratiques (nombre d'animaux, taille, lignée consanguine).

Nous avons tout d'abord confirmé l'immunogénicité de peGn chez la souris. En présence d'adjuvant pGM-CSF, le vecteur peGn a induit une réponse humorale et également une réponse IFNγ (article 2, Figure 2.A). De façon similaire aux résultats obtenus chez le mouton, ce plasmide induit des anticorps anti-eGn non neutralisants *in vitro*.

Nous avons réalisé un transfert passif et adoptif de sérum et de lymphocytes T purifiés sur colonne, issus de souris non immunisées (PBS + pGM-CSF) et immunisées (peGn + pGM-CSF) dans des souris naïves. Après une infection expérimentale, nous avons confirmé le rôle majeur du sérum contenant les anticorps anti-eGn par rapport aux lymphocytes T. Les souris ayant reçu du sérum de souris vaccinées étaient mieux protégées (75% de survie) par rapport aux souris qui ont reçu du sérum de souris non vaccinées (0% de survie). Les souris ayant reçu des lymphocytes T de souris vaccinées ou contrôles n'étaient pas protégées (20% et 40% de survie respectivement). Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-eGn, bien qu'ils soient non neutralisants *in vitro*, seraient importants pour la protection. Nos résultats confirment le rôle de la réponse humorale dans la protection médiée par un plasmide codant l'eGn qui a été mis en évidence dans une étude antérieure chez la souris (Bhardwaj et al., 2010). En revanche, nous avons apporté une information supplémentaire quant à l'absence probable du rôle des lymphocytes T induit par peGn contre le vFVR et qui n'avait pas été évalué jusqu'à présent. Toutefois, nous n'avons peut-être pas transféré suffisamment de lymphocytes T cytotoxiques pour obtenir une protection. De plus, bien que nous ayons trié négativement les lymphocytes T pour éviter leur activation, il n'est pas exclu que le stress cellulaire induit par l'extraction, l'isolement et le transfert aient affecté leur fonction.

### b) La caractérisation des anticorps anti-eGn : la séro-neutralisation

Classiquement, le test de séroneutralisation est réalisé sur des cellules Vero. Dans nos deux modèles d'études, les vaccins à ADN ont induit la production d'anticorps anti-eGn non neutralisants *in vitro*. Cependant, cette propriété, mise en évidence *in vitro*, ne reflète peut-être pas leur capacité à neutraliser les particules virales *in vivo* étant donné que certains récepteurs cellulaires identifiés dans l'attachement viral ne sont pas exprimés sur les cellules Vero (DC-SIGN, L-SIGN). En effet, une étude a mis en évidence une différence de titres d'anticorps neutralisants médiés par des anticorps polyclonaux issus de sérums prélevés chez des patients vaccinés contre le virus du West Nile selon le type de cellules employées, en particulier entre des cellules Vero et des Raji exprimant le récepteur DC-SIGN impliqué dans l'attachement viral des flavivirus (Mukherjee et al., 2014).

### c) Perspectives

Bien que nous ayons confirmé le rôle de la réponse humorale médiée par peGn chez la souris, le mécanisme d'action reste à être étudié. Nous avons émis l'hypothèse que les anticorps anti-eGn non neutralisants protègent contre l'infection par le vFVR, entre autre par ADCC. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait d'abord valider leur rôle grâce à un transfert d'anticorps anti-eGn purifiés dans des souris naïves et tester leur protection. Dans un second temps, un transfert d'anticorps anti-eGn purifiés dans des souris naïves déficientes pour le récepteur FcRγ nous permettrait de mieux comprendre le mécanisme d'action médiée par ces anticorps contre le vFVR. La validation du rôle protecteur des anticorps anti-eGn est primordiale pour consolider le corrélat de protection et ainsi permettre le développement de futurs vaccins efficaces contre le vFVR. Il serait également intéressant d'évaluer la neutralisation des anticorps anti-eGn sur d'autres types cellulaires, en particulier les cellules neuronales, hépatiques et dendritiques/macrophages qui sont les cellules cibles du virus *in vivo*, pour CLEC9A CLEC9A déterminer au mieux leurs propriétés.

# VIII. Conclusion

La vaccination à ADN a montré des résultats prometteurs chez la souris contre divers pathogènes mais s'est révélée peu immunogène dans les modèles grands mammifères. Lors de mon travail de thèse nous avons établi une vaccination optimisée en co-injectant le plasmide codant l'antigène d'intérêt avec un adjuvant génique, délivré par une électroporation de surface, et nous avons adressé l'antigène vers des récepteurs exprimés à la surface des DCs connus pour être impliqués dans une présentation antigénique efficace.

Nous avons montré qu'un vaccin à ADN codant l'eGn en présence d'adjuvant génique délivré par électroporation induisait une forte production d'anticorps non neutralisants et pouvait conférer une protection contre le vFVR chez le mouton. Les analyses de corrélation ont indiqué que les réponses humorales anti-eGn étaient associées à la protection chez le mouton et nous avons confirmé leur rôle protecteur par un transfert passif chez la souris. Les mécanismes d'actions de ces anticorps non neutralisants *in vitro* restent à être déterminés.

En revanche, nous avons montré que la stratégie de ciblage des DCs n'améliorait pas l'efficacité d'un vaccin à ADN contre le vFVR et que l'effet de cette stratégie sur la réponse immune était difficilement transposable entre espèces. Chez le mouton, bien que l'adressage de l'antigène eGn vers DEC205 ait amélioré la réponse cellulaire IFNγ, la protection était réduite par rapport à celle induite par l'eGn non ciblée. Au contraire chez la souris, les réponses IFNγ et humorales induites par l'eGn ciblée vers DEC205 étaient inhibées. De plus l'effet du ciblage deDEC205 sur la réponse immune s'est révélé dépendre de l'antigène fusionné. Les mécanismes impliqués dansl'efficacité du ciblage des DCs doivent être davantage explorés pour améliorer cette stratégie vaccinale.

# IX. Bibiographie


Agarwal, A., 2017. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses 1–12. https://doi.org/10.1002/rmv.1941

Ahmed Kamal, S., Kamal, S.A., 2011. Observations on rift valley fever virus and vaccines in Egypt. Virol. J. 8, 532. https://doi.org/10.1186/1743-422x-8-532

Åkesson, C.P., McL Press, C., Espenes, A., Aleksandersen, M., 2008. Phenotypic characterisation of intestinal dendritic cells in sheep. Dev. Comp. Immunol. 32, 837–849. https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.12.004

Alvarez, B., Poderoso, T., Alonso, F., Ezquerra, A., Domínguez, J., Revilla, C., 2013. Antigen targeting to APC: From mice to veterinary species. Dev. Comp. Immunol. 41, 153–163. https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.021

Antonis, a. F.G., Kortekaas, J., Kant, J., Vloet, R.P.M., Vogel-Brink, a., Stockhofe, N., Moormann, R.J.M., 2013. Vertical Transmission of Rift Valley Fever Virus Without Detectable Maternal Viremia. Vector Borne Zoonotic Dis. 13, 1–6. https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1160

Ardouin, L., Luche, H., Chelbi, R., Carpentier, S., Shawket, A., Montanana Sanchis, F., Santa Maria, C., Grenot, P., Alexandre, Y., Grégoire, C., Fries, A., Vu Manh, T.P., Tamoutounour, S., Crozat, K., Tomasello, E., Jorquera, A., Fossum, E., Bogen, B., Azukizawa, H., Bajenoff, M., Henri, S., Dalod, M., Malissen, B., 2016. Broad and Largely Concordant Molecular Changes Characterize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery. Immunity 45, 305–318. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.019

Ayari-Fakhfakh, E., Ghram, A., Bouattour, A., Larbi, I., Gribâa-Dridi, L., Kwiatek, O., Bouloy, M., Libeau, G., Albina, E., Cêtre-Sossah, C., 2011. First serological investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia. Vet. J. 187, 402–404. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.007

Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.-M., Gurka, S., Kroczek, R.A., 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c $^{+}$ CD141 $^{+}$ cells as homologues of mouse CD8 $^{+}$ dendritic cells. J. Exp. Med. 207,

1273–1281. https://doi.org/10.1084/jem.20100348

Baranowska, M., Hauge, A.G., Hoornaert, C., Bogen, B., Gr??deland, G., 2015. Targeting of nucleoprotein to chemokine receptors by DNA vaccination results in increased CD8+-mediated cross protection against influenza. Vaccine 33, 6988–6996. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.08.094

Barnard, B.J., Botha, M.J., 1977. An inactivated rift valley fever vaccine. J. S. Afr. Vet. Assoc. 48, 45–48.

Baskerville, A., Hubbard, K.A., Stephenson, J.R., 1992. Comparison of the pathogenicity for pregnant sheep of Rift Valley fever virus and a live attenuated vaccine. Res Vet Sci 52, 307–311. https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90029-2

Baudin, M., Jumaa, A.M., Jomma, H.J.E., Karsany, M.S., Bucht, G., Näslund, J., Ahlm, C., Evander, M., Mohamed, N., 2016. Association of Rift Valley fever virus infection with miscarriage in Sudanese women: a cross-sectional study. Lancet Glob. Heal. 4, e864–e871. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30176-0

Beckett, C.G., Tjaden, J., Burgess, T., Danko, J.R., Tamminga, C., Simmons, M., Wu, S.J., Sun, P., Kochel, T., Raviprakash, K., Hayes, C.G., Porter, K.R., 2011. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. Vaccine 29, 960–968. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.050

Bernelin-Cottet, C., , Charlotte Deloizy, O.S., Barc3, C., , Edwige Bouguyon1, Céline Urien1 , Olivier Boulesteix3, J.P., Charles-Adrien Richard1, M.M., Costa1, B. Da, Jouneau1, L., Christophe Chevalier1, Claude Leclerc4, 5, Peter Sebo2, N.B., And, 2016. A Universal Influenza Vaccine Can Lead to Disease Exacerbation or Viral Control Depending on Delivery Strategies 7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00641

Besselaar, T.G., Blackburn, N.K., 1992. The synergistic neutralization of Rift Valley fever virus by monoclonal antibodies to the envelope glycoproteins. Arch. Virol. 125, 239–250. https://doi.org/10.1007/BF01309641

Besselaar, T.G., Blackburn, N.K., 1991. Topological mapping of antigenic sites on the Rift Valley fever virus envelope glycoprotein using monoclonal antibodies. Arch Virol 121, 111–124.

Besselaar, T.G., Blackburn, N.K., Meenehan, G.M., 1991. Antigenic analysis of Pdft Valley

fever virus isolates : monoclona | antibodies distinguish between wild-type and neurotropic virus strains 2131, 469–474.

Bhardwaj, N., Heise, M.T., Ross, T.M., 2010. Vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or alphavirus replicons expressing Gn protects mice against rift valley fever virus. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e725. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000725

Bird, B.H., Khristova, M.L., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Nichol, S.T., 2007. Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. J. Virol. 81, 2805–2816. https://doi.org/10.1128/JVI.02095-06

Bird, B.H., Ksiazek, T.G., 2009. Zoonosis Update Rift Valley fever virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 234, 883–893. https://doi.org/10.2460/javma.234.7.883

Bird, B.H., Maartens, L.H., Campbell, S., Erasmus, B.J., Erickson, B.R., Dodd, K. a, Spiropoulou, C.F., Cannon, D., Drew, C.P., Knust, B., Mcelroy, A.K., Khristova, M.L., Albariño, C.G., Nichol, S.T., Al, B.E.T., Irol, J. V, 2011. Rift Valley fever virus vaccine lacking the NSs and NSm genes is safe, nonteratogenic, and confers protection from viremia, pyrexia, and abortion following challenge in adult and pregnant sheep. J. Virol. 85, 12901–9. https://doi.org/10.1128/JVI.06046-11

Boer, S.M. De, Kortekaas, J., Haan, C.A.M. De, Rottier, P.J.M., Moormann, R.J.M., Bosch, B.J., 2012. Heparan Sulfate Facilitates Rift Valley Fever Virus Entry into the Cell 86, 13767–13771. https://doi.org/10.1128/JVI.01364-12

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., 2002. Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8 $^{+}$ T Cell Tolerance. J. Exp. Med. 196, 1627–1638. https://doi.org/10.1084/jem.20021598

Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M.K., Moltedo, B., Moran, T.M., Steinman, R.M., 2004. In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination 199. https://doi.org/10.1084/jem.20032220

Bonneau, M., Epardaud, M., Payot, F., Niborski, V., Thoulouze, M.-I., Bernex, F., Charley, B., Riffault, S., Guilloteau, L. a, Schwartz-Cornil, I., 2006. Migratory monocytes and

granulocytes are major lymphatic carriers of Salmonella from tissue to draining lymph node. J. Leukoc. Biol. 79, 268–76. https://doi.org/10.1189/jlb.0605288

Botros, B., Omar, A., Elian, K., Mohamed, G., Soliman, A., Salib, A., Salman, D., Saad, M., Earhart, K., 2006. Adverse Response of Non-Indigenous Cattle of European Breeds to Live Attenuated Smithburn Rift Valley Fever Vaccine. J. Med. Virol. J. Med. Virol 78. https://doi.org/10.1002/jmv.20624

Bouloy, L.E., Janzen, C., Vialat, P., Khun, H., Pavlovic, J., Huerre, M., Haller, O., 2001. Genetic Evidence for an Interferon-Antagonistic Function of Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs. J. Virol. 75, 1371–1377. https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1371

Breton, G., Lee, J., Zhou, Y.J., Schreiber, J.J., Keler, T., Puhr, S., Anandasabapathy, N., Schlesinger, S., Caskey, M., Liu, K., Nussenzweig, M.C., 2015. Circulating precursors of human CD1c $^{+}$ and CD141 $^{+}$ dendritic cells. J. Exp. Med. 212, 401–413. https://doi.org/10.1084/jem.20141441

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C., 2015. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective, Annual Review of Immunology. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240

Bujdoso, R., Hopkins, J., Dutia, B., Young, P., I, M., 1989. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. J. Exp. Med. 170, 1285–301. https://doi.org/10.1084/jem.170.4.1285

Busquets, N., Lorenzo, G., López-Gil, E., Rivas, R., Solanes, D., Galindo-Cardiel, I., Abad, F.X., Rodríguez, F., Bensaid, A., Warimwe, G., Gilbert, S.C., Domingo, M., Brun, A., 2014. Efficacy assessment of an MVA vectored Rift Valley Fever vaccine in lambs. Antiviral Res. 108, 165–172. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.020

Busquets, N., Xavier, F., Lorenzo, G., Rivas, R., Iglesias, J., Rodrı, F., Solanes, D., Domingo, M., Brun, A., 2010. Experimental Infection of Young Adult European 10.

Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Teh, J.S., Lo, J.C.Y., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., Dommelen, S.L.H. Van, Campbell, I.K., Maraskovsky, E., Braley, H., Davey, G.M., Mottram, P., Velde, N. Van De, Jensen, K., Lew, A.M., Wright, M.D., Heath, W.R., Shortman, K., Lahoud, M.H., 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement 112, 3264–3274.

https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-155176.

Cao, J., Jin, Y., Li, W., Zhang, B., He, Y., Liu, H., Xia, N., Wei, H., Yan, J., 2013. DNA vaccines targeting the encoded antigens to dendritic cells induce potent antitumor immunity in mice. BMC Immunol. 14, 39. https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-39

Caridade, M., Graca, L., Ribeiro, R.M., 2013. Mechanisms underlying CD4+ Treg immune regulation in the adult: From experiments to models. Front. Immunol. 4, 1–9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00378

Castro, F.V. V, Tutt, A.L., White, A.L., Teeling, J.L., James, S., French, R.R., Glennie, M.J., 2008. CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. Eur. J. Immunol. 38, 2263–2273. https://doi.org/10.1002/eji.200838302

Chevalier, V., Pépin, M., Plée, L., Lancelot, R., 2010. Rift Valley fever--a threat for Europe? Euro Surveill. 15, 19506.

Chu, C.-C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Grys, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., Peakman, M., Lombardi, G., Nestle, F.O., 2012. Resident CD141 (BDCA3) $^{+}$ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. J. Exp. Med. 209, 935–945. https://doi.org/10.1084/jem.20112583

Coconi-Linares, N., Ortega-Dávila, E., López-González, M., García-Machorro, J., García-Cordero, J., Steinman, R.M., Cedillo-Barrón, L., Gómez-Lim, M.A., 2013. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. Vaccine 31, 2366–2371. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.009

Coetzer, J.A.W., 1982. THE PATHOLOGY OF RIFT VALLEY FEVER . II . LESIONS OCCURRING IN FIELD CASES IN ADULT CATTLE , CALVES AND ABORTED FOETUSES 17, 11–17.

Cohn, L., Chatterjee, B., Esselborn, F., Smed-Sörensen, A., Nakamura, N., Chalouni, C., Lee, B.-C., Vandlen, R., Keler, T., Lauer, P., Brockstedt, D., Mellman, I., Delamarre, L., 2013. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. J. Exp. Med. 210, 1049–63. https://doi.org/10.1084/jem.20121251

Collin, M., Milne, P., 2016. Europe PMC Funders Group Langerhans cell origin and regulation 23, 28–35. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000202.Langerhans

Contreras, V., Urien, C., Guiton, R., Alexandre, Y., Vu Manh, T.-P., Andrieu, T., Crozat, K., Jouneau, L., Bertho, N., Epardaud, M., Hope, J., Savina, A., Amigorena, S., Bonneau, M., Dalod, M., Schwartz-Cornil, I., 2010. Existence of CD8α-like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. J. Immunol. 185, 3313–3325. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000824

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Vu Manh, T.-P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., 2010a. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. J. Exp. Med. 207, 1283–92. https://doi.org/10.1084/jem.20100223

Crozat, K., Guiton, R., Guilliams, M., Henri, S., Baranek, T., Schwartz-Cornil, I., Malissen, B., Dalod, M., 2010b. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. Immunol. Rev. 234, 177–198. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00868.x

Cruz, L.J., Rosalia, R.A., Willem, J., Rueda, F., Löwik, C.W.G.M., Ossendorp, F., 2014. Targeting nanoparticles to CD40 , DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for ef fi cient CD8 + T cell response : A comparative study. J. Control. Release 192, 209–218. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.040

Cruz, L.J., Tacken, P.J., Pots, J.M., Torensma, R., Buschow, S.I., Figdor, C.G., 2012. Comparison of antibodies and carbohydrates to target vaccines to human dendritic cells via DC-SIGN. Biomaterials 33, 4229–4239. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.036

Daouam, S., Ghzal, F., Naouli, Y., Tadlaoui, K.O., Ennaji, M.M., Oura, C., Harrak, M.E.L., 2016. Safety and immunogenecity of a live attenuated Rift Valley fever vaccine ( CL13T ) in camels. BMC Vet. Res. 8–12. https://doi.org/10.1186/s12917-016-0775-8

De-chu Tang, Michael DeVit, S.A. johnston, 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response 359, 150–152.

de Boer, S.M., Kortekaas, J., Antonis, A.F., Kant, J., van Oploo, J.L., Rottier, P.J.M.,

Moormann, R.J.M., Bosch, B.J., 2010. Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge. Vaccine 28, 2330–2339. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.062

de Boer, S.M., Kortekaas, J., Spel, L., Rottier, P.J.M., Moormann, R.J.M., Bosch, B.J., 2012. Acid-activated structural reorganization of the Rift Valley fever virus Gc fusion protein. J. Virol. 86, 13642–52. https://doi.org/10.1128/JVI.01973-12

De Silva, N.S., Klein, U., 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. Nat. Rev. Immunol. 15, 137–148. https://doi.org/10.1038/nri3804

Delamarre, L., Holcombe, H., Mellman, I., 2003. Presentation of Exogenous Antigens on Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Molecules Is Differentially Regulated during Dendritic Cell Maturation. J. Exp. Med. 198, 111–122. https://doi.org/10.1084/jem.20021542

Demangel, C., Zhou, J., Choo, A.B.H., Shoebridge, G., Halliday, G.M., Britton, W.J., 2005. Single chain antibody fragments for the selective targeting of antigens to dendritic cells. Mol. Immunol. 42, 979–985. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.09.034

den Haan, J.M., Lehar, S.M., Bevan, M.J., 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. J. Exp. Med. 192, 1685–96. https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1685

Dhodapkar, M. V, Sznol, M., Zhao, B., Wang, D., Carvajal, R.D., Keohan, M.L., Chuang, E., Sanborn, R.E., Lutzky, J., Powderly, J., Kluger, H., Tejwani, S., Green, J., Ramakrishna, V., Crocker, A., Vitale, L., Yellin, M., Davis, T., Keler, T., 2014. Induction of Antigen-Specific Immunity with a Vaccine Targeting NY-ESO-1 to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 6, 1–10.

Dickinson, R.E., Milne, P., Jardine, L., Zandi, S., Swierczek, S.I., Mcgovern, N., Cookson, S., Ferozepurwalla, Z., Langridge, A., Pagan, S., Gennery, A., Helbert, M., Tholouli, E., Gambineri, E., Hirschfield, G., Richter, A.G., Jolles, S., Bacon, C.M., Hambleton, S., Haniffa, M., Bryceson, Y., Allen, C., Prchal, J.T., Dick, J.E., Bigley, V., Collin, M., 2014. The evolution of cellular de fi ciency in GATA2 mutation 123, 863–874. https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-517151.P.M.

Dimier, J., Ferrier-Rembert, A., Pradeau-Aubreton, K., Hebben, M., Spehner, D., Favier, A.-L., Gratier, D., Garin, D., Crance, J.-M., Drillien, R., 2011. Deletion of major

nonessential genomic regions in the vaccinia virus Lister strain enhances attenuation without altering vaccine efficacy in mice. J. Virol. 85, 5016–5026. https://doi.org/10.1128/JVI.02359-10

do Valle, T.Z., Billecocq, A., Guillemot, L., Alberts, R., Gommet, C., Geffers, R., Calabrese, K., Schughart, K., Bouloy, M., Montagutelli, X., Panthier, J.-J., 2010. A New Mouse Model Reveals a Critical Role for Host Innate Immunity in Resistance to Rift Valley Fever. J. Immunol. 185, 6146–6156. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000949

Dodd, K.A., Bird, B.H., Metcalfe, M.G., Nichol, S.T., Albariño, C.G., 2012. Single-Dose Immunization with Virus Replicon Particles Confers Rapid Robust Protection against Rift Valley Fever Virus Challenge 4204–4212. https://doi.org/10.1128/JVI.07104-11

Dodd, K.A., McElroy, A.K., Jones, M.E.B., Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., 2013. Rift Valley fever virus clearance and protection from neurologic disease are dependent on CD4+ T cell and virus-specific antibody responses. J. Virol. 87, 6161–71. https://doi.org/10.1128/JVI.00337-13

Dodd, K.A., Mcelroy, A.K., Jones, T.L., Zaki, S.R., Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., 2014. Rift Valley Fever Virus Encephalitis Is Associated with an Ineffective Systemic Immune Response and Activated T Cell Infiltration into the CNS in an Immunocompetent Mouse Model 8. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002874

Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R.S., Henn, V., Kroczek, R.A., 2009. Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. Immunity 31, 823–833. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.027

Dubensky, T.W., Campbell, B.A., Villarreal, L.P., 1984. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 7529–7533. https://doi.org/10.1073/pnas.81.23.7529

Dudziak, D., Kampfhorst, A., Heidkamp, G., Buhcholz, V., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H., 2007. Dendritic Cell Subsets in Vivo. Science (80-. ). 315, 107–112. https://doi.org/10.1126/science.1136080

Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.-W., Park, C.G., Steinman, R.M.,

Nussenzweig, M.C., 2007. Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo. Science (80-. ). 315, 107–111. https://doi.org/10.1126/science.1136080

Dungu, B., Louw, I., Lubisi, A., Hunter, P., Teichman, B.F. Von, Bouloy, M., 2010. Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep. Vaccine 28, 4581–4587. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.085

DuPage, M., Bluestone, J.A., 2016. Harnessing the plasticity of CD4+ T cells to treat immune-mediated disease. Nat. Rev. Immunol. 16, 149–163. https://doi.org/10.1038/nri.2015.18

Durand, M., Segura, E., 2015. The known unknowns of the human dendritic cell network. Front. Immunol. 6, 2–8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00129

Dutertre, C.-A., Wang, L.-F., Ginhoux, F., 2014. Aligning bona fide dendritic cell populations across species. Cell. Immunol. 291, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.08.006

Edelson, B.T., KC, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., Bhattacharya, D., Stappenbeck, T.S., Holtzman, M.J., Sung, S.-S.J., Murphy, T.L., Hildner, K., Murphy, K.M., 2010. Peripheral CD103 $^{+}$ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8α $^{+}$ conventional dendritic cells. J. Exp. Med. 207, 823–836. https://doi.org/10.1084/jem.20091627

Elodie Segura, 2010. Dendritic Cell Protocols. Elodie Segura 595. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-421-0

Epardaud, M., Bonneau, M., Payot, F., Cordier, C., Howard, C., Schwartz-cornil, I., 2004. Enrichment for a CD26 hi SIRP – subset in lymph dendritic cells from the upper aero-digestive tract 76. https://doi.org/10.1189/jlb.0404223.1

Faburay, B., LaBeaud, A., McVey, D., Wilson, W., Richt, J., 2017. Current Status of Rift Valley Fever Vaccine Development. Vaccines 5, 29. https://doi.org/10.3390/vaccines5030029

Faburay, B., Wilson, W.C., Gaudreault, N.N., Davis, A.S., Shivanna, V., Bawa, B., Sunwoo, S.Y., Ma, W., Drolet, B.S., Morozov, I., Mcvey, D.S., Richt, J.A., 2016. A Recombinant Rift Valley Fever Virus Glycoprotein Subunit Vaccine Confers Full Protection against Rift Valley Fever Challenge in Sheep. Sci. Rep. 6, 1–12. https://doi.org/10.1038/srep27719

Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., Mason, D.Y., Pulford, K., van den Oord, J.J., Desmet, V.J., 1988. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. Am. J. Pathol. 133, 15–21.

Fach, S.J., Brockmeier, S.L., Hobbs, L.A., Lehmkuhl, H.D., Sacco, R.E., 2006. Pulmonary dendritic cells isolated from neonatal and adult ovine lung tissue. Vet. Immunol. Immunopathol. 112, 171–182. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.02.012

Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J., 2002. Lectin receptors on DC cells and related sugars_Useful. Nat. Rev. Immunol. 2, 77–84. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.09.013

Filone, C.M., Heise, M., Doms, R.W., Bertolotti-Ciarlet, A., 2006. Development and characterization of a Rift Valley fever virus cell-cell fusion assay using alphavirus replicon vectors. Virology 356, 155–164. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.035

Fossum, E., Grødeland, G., Terhorst, D., Tveita, A.A., Vikse, E., Mjaaland, S., Henri, S., Malissen, B., Bogen, B., 2015. Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8+ T-cell responses against influenza virus. Eur. J. Immunol. 45, 624–635. https://doi.org/10.1002/eji.201445080

Fredriksen, A.B., Sandlie, I., Bogen, B., 2006. DNA Vaccines Increase Immunogenicity of Idiotypic Tumor Antigen by Targeting Novel Fusion Proteins to 13, 776–785. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.019

Freiberg, A.N., Sherman, M.B., Morais, M.C., Holbrook, M.R., Watowich, S.J., 2008. Three-dimensional organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography. J. Virol. 82, 10341–10348. https://doi.org/10.1128/JVI.01191-08

Fujita, H., Nograles, K.E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J.A., Krueger, J.G., 2009. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4 ⁄ T cells lacking IL-17 production 106, 21795–21800.

Fuller, D.H., Loudon, P., Schmaljohn, C., 2006. Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. Methods 40, 86–97. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.022

Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.C., Robinson, H.L., 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun

inoculations. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 11478–11482. https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11478

Gaudreau, S., Guindi, C., Ménard, M., Besin, G., Dupuis, G., Amrani, A., 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells. J. Immunol. 179, 3638–3647. https://doi.org/179/6/3638 [pii]

Geherin, S.A., Fintushel, S.R., Lee, M.H., Wilson, R.P., Patel, R.T., Alt, C., Young, A.J., Hay, J.B., Debes, G.F., 2012. The Skin, a Novel Niche for Recirculating B Cells. J. Immunol. 188, 6027–6035. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102639

Gerrard, S.R., Nichol, S.T., 2007. Synthesis, proteolytic processing and complex formation of N-terminally nested precursor proteins of the Rift Valley fever virus glycoproteins. Virology 357, 124–133. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.002

Gerrard, S.R., Nichol, S.T., 2002. Characterization of the Golgi Retention Motif of Rift Valley Fever Virus G N Glycoprotein. J. Virol. 76, 12200–12210. https://doi.org/10.1128/JVI.76.23.12200

Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., Stanley, E.R., Nussenzweig, M., Merad, M., 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103 + DCs 206, 3115–3130. https://doi.org/10.1084/jem.20091756

Gliddon, D.R., Hope, J.C., Brooke, G.P., Howard, C.J., 2004. DEC-205 expression on migrating dendritic cells in afferent lymph. Immunology 111, 262–272. https://doi.org/10.1111/j.0019-2805.2004.01820.x

Gommet, C., Billecocq, A., Jouvion, G., Hasan, M., do Valle, T.Z., Guillemot, L., Blanchet, C., van Rooijen, N., Montagutelli, X., Bouloy, M., Panthier, J.J., 2011. Tissue tropism and target cells of NSs-deleted rift valley fever virus in live immunodeficient mice. PLoS Negl. Trop. Dis. 5. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001421

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Asselin-paturel, C., Trinchieri, G., Kaiserlian, D., Garnier, A.T., F-, L., 2013. NIH Public Access 29, 464–475. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.017.Plasmacytoid

Grobbelaar, A.A., Weyer, J., Leman, P.A., Kemp, A., Paweska, J.T., Swanepoel, R., 2011.

Molecular Epidemiology of Rift Valley Fever Virus. Emerg. Infect. Dis. J. 17, 2270–2276. https://doi.org/10.3201/eid1712.111035

Grodeland, G., Fredriksen, A.B., Løset, G.Å., Vikse, E., Fugger, L., Bogen, B., 2016. Antigen Targeting to Human HLA Class II Molecules Increases Efficacy of DNA Vaccination. J. Immunol. 197, 3575–3585. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600893

Grotzke, J.E., Kozik, P., Morel, J.-D., Impens, F., Pietrosemoli, N., Cresswell, P., Amigorena, S., Demangel, C., 2017. Sec61 blockade by mycolactone inhibits antigen cross-presentation independently of endosome-to-cytosol export. Proc. Natl. Acad. Sci. 114, E5910–E5919. https://doi.org/10.1073/pnas.1705242114

Grunwald, T., Tenbusch, M., Schulte, R., Raue, K., Wolf, H., Hannaman, D., de Swart, R.L., Uberla, K., Stahl-Hennig, C., 2014. Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. J. Virol. 88, 3997–4007. https://doi.org/10.1128/JVI.02736-13

Gudjonsson, A., Lysén, A., Balan, S., Sundvold-Gjerstad, V., Arnold-Schrauf, C., Richter, L., Bækkevold, E.S., Dalod, M., Bogen, B., Fossum, E., 2017. Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1+ Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses. J. Immunol. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601881

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., Yona, S., 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nat. Rev. Immunol. 14, 571–578. https://doi.org/10.1038/nri3712

Gutiérrez-Martínez, E., Planès, R., Anselmi, G., Reynolds, M., Menezes, S., Adiko, A.C., Saveanu, L., Guermonprez, P., 2015. Cross-presentation of cell-associated antigens by MHC class I in dendritic cell subsets. Front. Immunol. 6. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00363

Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., Renia, L., Tam, J., Song, C., Connolly, J., Chan, J.K.Y., Gehring, A., Bertoletti, A., Collin, M., Ginhoux, F., 2012. Human Tissues Contain CD141 hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional

Homology to Mouse CD103 + Nonlymphoid Dendritic Cells. Immunity 37, 60–73. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.012

Hans Will, Roberto Cattaneo, Hans-Georg Koch, Gholamreza Darai, H.S., 1982. Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V, Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C., 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. J. Exp. Med. 194, 769–779. https://doi.org/10.1084/jem.194.6.769

He, W., Tan, G.S., Mullarkey, C.E., Lee, A.J., Lam, M.M.W., Krammer, F., Henry, C., Wilson, P.C., Ashkar, A.A., Palese, P., Miller, M.S., 2016. Epitope specificity plays a critical role in regulating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza A virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113, 11931–11936. https://doi.org/10.1073/pnas.1609316113

Heesters, B.A., van der Poel, C.E., Das, A., Carroll, M.C., 2016. Antigen Presentation to B Cells. Trends Immunol. 37, 844–854. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.003

Hesse, C., Ginter, W., Förg, T., Mayer, C.T., Baru, A.M., Arnold-Schrauf, C., Unger, W.W.J., Kalay, H., van Kooyk, Y., Berod, L., Sparwasser, T., 2013. In vivo targeting of human DC-SIGN drastically enhances CD8+ T-cell-mediated protective immunity. Eur. J. Immunol. 43, 2543–2553. https://doi.org/10.1002/eji.201343429

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., Schreiber, R.D., Murphy, T.L., Murphy, K.M., 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. Science 322, 1097–100. https://doi.org/10.1126/science.1164206

Hua, Y., Jiao, Y.-Y., Ma, Y., Peng, X.-L., Fu, Y.-H., Zhang, X.-J., Zheng, Y.-B., Zheng, Y.-P., Hong, T., He, J.-S., 2017. Enhanced humoral and CD8 + T cell immunity in mice vaccinated by DNA vaccine against human respiratory syncytial virus through targeting the encoded F protein to dendritic cells. Int. Immunopharmacol. 46, 62–69. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.023

Hunter, P., Erasmus, B.J., Vorster, J.H., 2002. Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep. Onderstepoort J. Vet. Res. 69, 95–8.

Idoyaga, J., Fiorese, C., Zbytnuik, L., Lubkin, A., Miller, J., Malissen, B., Mucida, D., Merad, M., Steinman, R.M., 2014. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. J. Clin. Invest. 4, 1–11. https://doi.org/10.1172/JCI65260.conditions

Idoyaga, J., Lubkin, A., Fiorese, C., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Huang, Y., 2010. Comparable T helper 1 ( Th1 ) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within 1, 1–6. https://doi.org/10.1073/pnas.1019547108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1019547108

Igyártá, B.Z., Haley, K., Ortner, D., Bobr, A., Gerami-nejad, M., 2012. NIH Public Access 35, 260–272. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.06.005.Skin-Resident

Ikegami, T., 2017. Rift Valley Fever vaccines: An overview of the safety and efficacy of the live-attenuated MP-12 vaccine candidate 16, 601–611. https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1321482.Rift

Ikegami, T., 2012. Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. Antiviral Res. 95, 293–310. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.06.001

Ikegami, T., Hill, T.E., Smith, J.K., Zhang, L., Juelich, T.L., Gong, B., Slack, O.A.L., Ly, H.J., Lokugamage, N., Freiberg, A.N., 2015. Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine Is Fully Attenuated by a Combination of Partial Attenuations in the S, M, and L Segments. J. Virol. 89, 7262–7276. https://doi.org/10.1128/JVI.00135-15

Ikegami, T., Makino, S., 2011. The pathogenesis of rift valley fever. Viruses 3, 493–519. https://doi.org/10.3390/v3050493

Ikegami, T., Makino, S., 2010. Rift Valley Fever Vaccines. Vaccine 27, 69–72. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.046.Rift

Inaba, K., Swiggard, W.J., Inaba, M., Meltzer, J., Miryza, A., Sasagawa, T., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.U., 1995. Tissue Distribution of the DEC-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal Antibody NLDC-145: I. Expression on Dendritic Cells and Other Subsets of Mouse Leukocytes. Cell. Immunol. 163, 148–156. https://doi.org/10.1006/CIMM.1995.1109

Irani, V., Guy, A.J., Andrew, D., Beeson, J.G., Ramsland, P.A., Richards, J.S., 2015. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. Mol. Immunol. 67, 171–

182. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.255

Ishii, K.J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., Akira, S., 2008. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. Nature 451, 725–729. https://doi.org/10.1038/nature06537

Ishikawa, H.M.G.N.B., 2015. HHS Public Access 347, 882–886. https://doi.org/10.1126/science.aaa1823.Using

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., Inaba, K., 2002. The CD8 $^{+}$ Dendritic Cell Subset Selectively Endocytoses Dying Cells in Culture and In Vivo. J. Exp. Med. 195, 1289–1302. https://doi.org/10.1084/jem.20020161

Jáuregui-zúñiga, D., Pedraza-escalona, M., Espino-solís, G.P., Quintero-hernández, V., Olvera-rodríguez, A., Díaz-salinas, M.A., López, S., Domingos, L., 2017. Research in Veterinary Science Targeting antigens to Dec-205 on dendritic cells induces a higher immune response in chickens : Hemagglutinin of avian in fl uenza virus example. YRVSC 111, 55–62. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.12.002

Joachim, A., Munseri, P.J., Nilsson, C., Bakari, M., Aboud, S., Lyamuya, E.F., Tecleab, T., Liakina, V., Scarlatti, G., Robb, M.L., Earl, P.L., Moss, B., Wahren, B., Mhalu, F., Ferrari, G., Sandstrom, E., Biberfeld, G., 2017. Three-Year Durability of Immune Responses Induced by HIV-DNA and HIV-Modified Vaccinia Virus Ankara and Effect of a Late HIV-Modified Vaccinia Virus Ankara Boost in Tanzanian Volunteers. AIDS Res. Hum. Retroviruses 33, 1–9. https://doi.org/10.1089/aid.2016.0251

Joffre, O.P., Sancho, D., Zelenay, S., Keller, A.M., Reis E Sousa, C., 2010. Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4+ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. Eur. J. Immunol. 40, 1255–1265. https://doi.org/10.1002/eji.201040419

Johnson, T.S., Mahnke, K., Storn, V., Schönfeld, K., Ring, S., Nettelbeck, D.M., Haisma, H.J., Le Gall, F., Kontermann, R.E., Enk, A.H., 2008. Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule. Clin. Cancer Res. 14, 8169–8177. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1474

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J.E., Hart, D.N.J., Radford, K.J., 2010. Human CD141 $^{+}$ (BDCA-3) $^{+}$ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. J. Exp. Med. 207, 1247–1260. https://doi.org/10.1084/jem.20092140

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.I., De Los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E.G., Littman, D.R., Lang, R.A., 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. Immunity 17, 211–220. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00365-5

Kannanganat, S., Wyatt, L.S., Gangadhara, S., Chamcha, V., Chea, L.S., Kozlowski, P.A., LaBranche, C.C., Chennareddi, L., Lawson, B., Reddy, P.B.J., Styles, T.M., Vanderford, T.H., Montefiori, D.C., Moss, B., Robinson, H.L., Amara, R.R., 2016. High Doses of GM-CSF Inhibit Antibody Responses in Rectal Secretions and Diminish Modified Vaccinia Ankara/Simian Immunodeficiency Virus Vaccine Protection in TRIM5α-Restrictive Macaques. J. Immunol. 197, 3586–3596. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600629

Kastenmüller, W., Kastenmüller, K., Kurts, C., Seder, R.A., 2014. Dendritic cell-targeted vaccines — hope or hype? Nat. Rev. Immunol. 14, 705–711. https://doi.org/10.1038/nri3727

Kato, M., McDonald, K.J., Khan, S., Ross, I.L., Vuckovic, S., Chen, K., Munster, D., MacDonald, K.P.A., Hart, D.N.J., 2006. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. Int. Immunol. 18, 857–869. https://doi.org/10.1093/intimm/dxl022

Kato, Y., Zaid, A., Davey, G.M., Mueller, S.N., Nutt, S.L., Zotos, D., Tarlinton, D.M., Lahoud, M.H., Heath, W.R., Zotos, D., Tarlinton, D.M., Shortman, K., Lahoud, M.H., 2015. Memory Responses Capable of Robust Recall. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500767

Kaufman, H.L., Ruby, C.E., Hughes, T., Jr, C.L.S., 2014. Current status of granulocyte – macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma.

Kautz-neu, K., Noordegraaf, M., Dinges, S., Bennett, C.L., John, D., Clausen, B.E., Stebut, E.

Von, 2011. Langerhans cells are negative regulators of the anti- Leishmania response 208. https://doi.org/10.1084/jem.20102318

Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Thompson-snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Palucka, A.K., Reiter, Y., Banchereau, J., Ueno, H., 2008. NIH Public Access 29, 497–510. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.013.Functional

Koretzky, G.A., 2010. Multiple Roles of CD4 and CD8 in T Cell Activation. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1090076

Kortekaas, J., Antonis, A.F.G., Kant, J., Vloet, R.P.M., Vogel, A., Oreshkova, N., De Boer, S.M., Bosch, B.J., Moormann, R.J.M., 2012. Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep. Vaccine 30, 3423–3429. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.027

Kortekaas, J., Oreshkova, N., van Keulen, L., Kant, J., Bosch, B.J., Bouloy, M., Moulin, V., Goovaerts, D., Moormann, R.J.M., 2014. Comparative efficacy of two next-generation Rift Valley fever vaccines. Vaccine 32, 4901–4908. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.037

Kreher Felix, Guillemot, L., Ermonval, M., Tamietti, C., Flamand, M., Failloux, A., Panthier, J., 2014. The Rift Valley fever accessory proteins NSm and P78 / NSm-G N are distinct determinants of virus propagation in vertebrate and invertebrate hosts. https://doi.org/10.1038/emi.2014.71

Kurts, C., 2008. CD11c: Not merely a murine DC marker, but also a useful vaccination target. Eur. J. Immunol. 38, 2072–2075. https://doi.org/10.1002/eji.200838645

Lagerqvist, N., Moiane, B., Bucht, G., Fafetine, J., Paweska, J.T., Lundkvist, å, Falk, K.I., 2012. Stability of a formalin-inactivated Rift Valley fever vaccine: Evaluation of a vaccination campaign for cattle in Mozambique. Vaccine 30, 6534–6540. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.052

Lagerqvist, N., Näslund, J., Lundkvist, A.A., Bouloy, M., Ahlm, C., Bucht, G., 2009. Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley Fever virus cDNA constructs. Virol. J. 6, 1–10. https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-6

Lahoud, M.H., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Wan, S.S., Vremec, D., Lee, C.-N.C.-N., Phipson, B.,

Shi, W., Smyth, G.K., Lew, A.M., Kato, Y.Y., Mueller, S.N., Davey, G.M., Heath, W.R., Shortman, K., Caminschi, I., 2011. Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype. J. Immunol. 187, 842–850. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101176

Lahoud, M.H., Ahmet, F., Zhang, J.-G., Meuter, S., Policheni, A.N., Kitsoulis, S., Lee, C.-N., O'Keeffe, M., Sullivan, L.C., Brooks, A.G., Berry, R., Rossjohn, J., Mintern, J.D., Vega-Ramos, J., Villadangos, J.A., Nicola, N.A., Nussenzweig, M.C., Stacey, K.J., Shortman, K., Heath, W.R., Caminschi, I., 2012. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 16270–16275. https://doi.org/10.1073/pnas.1208796109

Laidlaw, B.J., Craft, J.E., Kaech, S.M., 2016. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. Nat. Publ. Gr. https://doi.org/10.1038/nri.2015.10

Lathan, R., Simon-chazottes, D., Jouvion, G., Godon, O., 2017. Innate Immune Basis for Rift Valley Fever Susceptibility in Mouse Models 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07543-8

Lauterbach, H., Bathke, B., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Luber, C.A., Fejer, G., Freudenberg, M.A., Davey, G.M., Vremec, D., Kallies, A., Wu, L., Shortman, K., Chaplin, P., Suter, M., O'Keeffe, M., Hochrein, H., 2010. Mouse CD8α $^{+}$ DCs and human BDCA3 $^{+}$ DCs are major producers of IFN-λ in response to poly IC. J. Exp. Med. 207, 2703–2717. https://doi.org/10.1084/jem.20092720

Léger, P., Tetard, M., Youness, B., Cordes, N., Rouxel, R.N., Flamand, M., Lozach, P.Y., 2016. Differential Use of the C-Type Lectins L-SIGN and DC-SIGN for Phlebovirus Endocytosis. Traffic 17, 639–656. https://doi.org/10.1111/tra.12393

Lehmann, C., Heger, L., Heidkamp, G., Baranska, A., Lühr, J., Hoffmann, A., Dudziak, D., 2016. Direct Delivery of Antigens to Dendritic Cells via Antibodies Specific for Endocytic Receptors as a Promising Strategy for Future Therapies. Vaccines 4, 8. https://doi.org/10.3390/vaccines4020008

León, B., López-Bravo, M., Ardavín, C., 2007. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. Immunity 26, 519–531. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.017

Li, J., Ahmet, F., Sullivan, L.C., Brooks, A.G., Kent, S.J., Rose, R. De, Salazar, A.M., Reis,

C., 2015. Antibodies targeting Clec9A promote strong humoral immunity without adjuvant in mice and non-human primates 854–864. https://doi.org/10.1002/eji.201445127

Liu, L., Celma, C.C.P., Roy, P., 2008. Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins. Virol. J. 5, 82. https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-82

Liu, M.A., 2011. DNA vaccines: An historical perspective and view to the future. Immunol. Rev. 239, 62–84. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x

López-Gil, E., Lorenzo, G., Hevia, E., Borrego, B., Eiden, M., Groschup, M., Gilbert, S.C., Brun, A., 2013. A Single Immunization with MVA Expressing GnGc Glycoproteins Promotes Epitope-specific CD8+-T Cell Activation and Protects Immune-competent Mice against a Lethal RVFV Infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002309

Lorenzo, G., Martín-Folgar, R., Rodríguez, F., Brun, A., 2008. Priming with DNA plasmids encoding the nucleocapsid protein and glycoprotein precursors from Rift Valley fever virus accelerates the immune responses induced by an attenuated vaccine in sheep. Vaccine 26, 5255–5262. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.042

Lozach, P.Y., Kühbacher, A., Meier, R., Mancini, R., Bitto, D., Bouloy, M., Helenius, A., 2011. DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. Cell Host Microbe 10, 75–88. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.007

Lumley, S., Horton, D.L., Hernandez-triana, L.L.M., Johnson, N., Fooks, A.R., 2017. Rift Valley fever virus : strategies for maintenance , survival and vertical transmission in mosquitoes 875–887. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000765

Ly, H.J., Ikegami, T., 2016. Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins. Virol. J. 13, 118. https://doi.org/10.1186/s12985-016-0573-8

Mahnke, K., Qian, Yingjie, J., Jurgen Knop, A.H.E., 2003. Induction of CD4 ƨ / CD25 ƨ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells 101, 4862–4869. https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3229.Supported

Mahnke, K., Ring, S., Enk, A.H., 2016. Antibody targeting of “steady-state” dendritic cells

induces tolerance mediated by regulatory T cells. Front. Immunol. 7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00063

Makoschey, B., van Kilsdonk, E., Hubers, W.R., Vrijenhoek, M.P., Smit, M., Wichgers Schreur, P.J., Kortekaas, J., Moulin, V., 2016. Rift Valley Fever Vaccine Virus Clone 13 Is Able to Cross the Ovine Placental Barrier Associated with Foetal Infections, Malformations, and Stillbirths. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004550

Malissen, B., Tamoutounour, S., Henri, S., 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. Nat. Rev. Immunol. 14, 417–28. https://doi.org/10.1038/nri3683

Mandell, R.B., Koukuntla, R., Mogler, L.J.K., Carzoli, A.K., Freiberg, A.N., Holbrook, M.R., Martin, B.K., Staplin, W.R., Vahanian, N.N., Link, C.J., Flick, R., 2010. A replication-incompetent Rift Valley fever vaccine: Chimeric virus-like particles protect mice and rats against lethal challenge. Virology 397, 187–198. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.001

Manh, T.P.V., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Ruscanu, S., Jouneau, L., Bourge, M., Moroldo, M., Foucras, G., Salmon, H., Marty, H., Quéré, P., Bertho, N., Boudinot, P., Dalod, M., Schwartz-Cornil, I., 2015. Defining mononuclear phagocyte subset homology across several distant warm-blooded vertebrates through comparative transcriptomics. Front. Immunol. 6, 1–26. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00299

Mann, J.F.S., McKay, P.F., Fiserova, A., Klein, K., Cope, A., Rogers, P., Swales, J., Seaman, M.S., Combadiere, B., Shattock, R.J., 2014. Enhanced Immunogenicity of an HIV-1 DNA Vaccine Delivered with Electroporation via Combined Intramuscular and Intradermal Routes. J. Virol. 88, 6959–69. https://doi.org/10.1128/JVI.00183-14

Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R., Sancho, D., 2015. Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against Leishmania major infection in mice. Eur. J. Immunol. 45, 119–129. https://doi.org/10.1002/eji.201444651

Martinon, F., Kaldma, K., Sikut, R., Čulina, S., Romain, G., Tuomela, M., Adojaan, M., Männik, A., Toots, U., Kivisild, T., Morin, J., Brochard, P., Delache, B., Tripiciano, A., Ensoli, F., Stanescu, I., Le Grand, R., Ustav, M., 2009. Persistent Immune Responses

Induced by a Human Immunodeficiency Virus DNA Vaccine Delivered in Association with Electroporation in the Skin of Nonhuman Primates. Hum. Gene Ther. 20, 1291–1307. https://doi.org/10.1089/hum.2009.044

Mashayekhi, M., Sandau, M., Dunay, I., Frickel, E., Khan, A., Goldszmid, R., Sher, A., Ploegh, H., Murphy, T., Sibley, L., Murphy, K., 2011. CD8α+ Dendritic Cells Are the Critical Source of Interleukin-12 that Controls Acute Infection by Toxoplasma gondii Tachyzoites. Immunity 35, 249–259. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.008

Matthews, K., Rhind, S.M., Gossner, A.G., Dalziel, R.G., Hopkins, J., 2007. The effect of gene gun-delivered pGM-CSF on the immunopathology of the vaccinated skin. Scand. J. Immunol. 65, 298–307. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01902.x

McAllister, L., Anderson, J., Werth, K., Cho, I., Copeland, K., Le Cam Bouveret, N., Plant, D., Mendelman, P.M., Cobb, D.K., 2014. Needle-free jet injection for administration of influenza vaccine: A randomised non-inferiority trial. Lancet 384, 674–681. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60524-9

Mildner, A., Jung, S., 2014. Development and function of dendritic cell subsets. Immunity 40, 642–656. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016

Miller, J., Brown, B., Shay, T., Gautier, E., Jojic, V., 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. Nature 13, 888–899. https://doi.org/10.1038/ni.2370.Deciphering

Mir, M. a, Panganiban,  a T., 2005. The Hantavirus Nucleocapsid Protein Recognizes Specific Features of the Viral RNA Panhandle and Is Altered in Conformation upon RNA Binding The Hantavirus Nucleocapsid Protein Recognizes Specific Features of the Viral RNA Panhandle and Is Altered in Confo 79, 1824–1835. https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1824

Morrill, J.C., Carpenter, L., Taylor, D., Ramsburg, H.H., Quance, J., Peters, C.J., 1991. Further evaluation of a mutagen-attenuated Rift Valley fever vaccine in sheep. Vaccine 9, 35–41.

Morrill, J.C., Laughlin, R.C., Lokugamage, N., Pugh, R., Sbrana, E., Weise, W.J., Adams, L.G., Makino, S., Peters, C.J., 2013. Safety and immunogenicity of recombinant Rift Valley fever MP-12 vaccine candidates in sheep. Vaccine 31, 559–565. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.118

Morrill, J.C., Mebus, C.A., Peters, C.J., 1997. Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in cattle. Am. J. Vet. Res. 58, 1104–9.

Morrill, J.C., Peters, C.J., 2011a. Mucosal Immunization of Rhesus Macaques With Rift Valley Fever MP-12 Vaccine. J. Infect. Dis. 204, 617–625. https://doi.org/10.1093/infdis/jir354

Morrill, J.C., Peters, C.J., 2011b. Protection of MP-12-vaccinated rhesus macaques against parenteral and aerosol challenge with virulent Rift Valley fever virus. J. Infect. Dis. 204, 229–236. https://doi.org/10.1093/infdis/jir249

Moutailler, S., Krida, G., Schaffner, F., Vazeille, M., Failloux, A.-B., 2008. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 749–753. https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0009

Moutailler, S., Roche, B., Thiberge, J.M., Caro, V., Rougeon, F., Failloux, A.B., 2011. Host alternation is necessary to maintain the genome stability of Rift Valley fever virus. PLoS Negl. Trop. Dis. 5. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001156

Mukherjee, S., Dowd, K.A., Manhart, C.J., Ledgerwood, J.E., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Pierson, T.C., 2014. Mechanism and Significance of Cell Type-Dependent Neutralization of Flaviviruses. J. Virol. 88, 7210–7220. https://doi.org/10.1128/JVI.03690-13

Muller, R., Saluzzo, J.F., Lopez, N., Dreier, T., Turell, M., Smith, J., Bouloy, M., 1995. Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53, 405–411.

Murithi, R.M., Munyua, P., Ithondeka, P.M., Macharia, J.M., Hightower, a, Luman, E.T., Breiman, R.F., Njenga, M.K., 2011. Rift Valley fever in Kenya: history of epizootics and identification of vulnerable districts. Epidemiol. Infect. 139, 372–80. https://doi.org/10.1017/S0950268810001020

Murphy, T.L., Grajales-Reyes, G.E., Wu, X., Tussiwand, R., Briseño, C.G., Iwata, A., Kretzer, N.M., Durai, V., Murphy, K.M., 2016. Transcriptional Control of Dendritic Cell Development. Annu. Rev. Immunol. 34, 93–119. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120204

Nakano, H., Yanagita, M., Gunn, M.D., 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse

lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. J. Exp. Med. 194, 1171–1178. https://doi.org/10.1084/jem.194.8.1171

Nanyingi, M.O., Munyua, P., Kiama, S.G., Muchemi, G.M., Thumbi, S.M., Bitek, A.O., Bett, B., Muriithi, R.M., Njenga, M.K., 2015. A systematic review of Rift Valley Fever epidemiology 1931 2014 1, 1–12.

Nchinda, G., Kuroiwa, J., Oks, M., Trumpfheller, C., Park, C.G., Huang, Y., Hannaman, D., Schlesinger, S.J., Mizenina, O., Nussenzweig, M.C., Überla, K., Steinman, R.M., 2008. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. Conflict 118. https://doi.org/10.1172/JCI34224DS1

Nfon, C.K., Marszal, P., Zhang, S., Weingartl, H.M., 2012. Innate immune response to rift valley fever virus in goats. PLoS Negl. Trop. Dis. 6. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001623

Ngu, L.N., Nji, N.N., Ambada, G.E., Sagnia, B., Sake, C.N., Tchadji, J.C., Donald, G., Priso, N., Lissom, A., Tchouangueu, T.F., Tebit, D.M., Waffo, A.B., Park, C.G., Steinman, R.M., Nchinda, G.W., Uberla, K., 2017. In vivo targeting of protein antigens to dendritic cells using anti-DEC-205 single chain antibody improves HIV Gag specific CD4 þ T cell responses protecting from airway challenge with recombinant vaccinia-gag virus 1–13. https://doi.org/10.1002/iid3.151

Nguku, P.M., Sharif, S.K., Mutonga, D., Amwayi, S., Omolo, J., Mohammed, O., Farnon, E.C., Gould, L.H., Lederman, E., Rao, C., Sang, R., Schnabel, D., Feikin, D.R., Hightower, A., Njenga, M.K., Breiman, R.F., 2010. An investigation of a major outbreak of rift valley fever in Kenya: 2006-2007. Am. J. Trop. Med. Hyg. 83, 5–13. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0288

Niborski, V., Li, Y., Brennan, F., Lane, M., Torché, a. M., Remond, M., Bonneau, M., Riffault, S., Stirling, C., Hutchings, G., Takamatsu, H., Barnett, P., Charley, B., Schwartz-Cornil, I., Torch, A.M., Barnett, P., Charley, B., Schwartz-Cornil, I., 2006. Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. Vaccine 24, 7204–7213. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.048

Niezold, T., Storcksdieck genannt Bonsmann, M., Maaske, A., Temchura, V., Heinecke, V., Hannaman, D., Buer, J., Ehrhardt, C., Hansen, W., Überla, K., Tenbusch, M., 2015. DNA vaccines encoding DEC205-targeted antigens: Immunity or Tolerance?

Immunology n/a-n/a. https://doi.org/10.1111/imm.12467

Niklasson, B., 1982. Rift Valley Fever Virus Vaccine Trial: Study of Side-Effects in Humans. Scand. J. Infect. Dis. 14, 105–109. https://doi.org/10.3109/inf.1982.14.issue-2.06

Niklasson, B., Peters, C.J., Bengtsson, E., Norrby, E., 1985. Rift Valley fever virus vaccine trial: study of neutralizing antibody response in humans. Vaccine 3, 123–127. https://doi.org/10.1016/0264-410X(85)90061-1

Nimmerjahn, F., Ravetch, J. V, 2005. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding 1663.

Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfelder, S., Facciotti, F., Gruarin, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., Romagnani, C., Stölzel, K., Torretta, S., Pignataro, L., Scheibenbogen, C., Neddermann, P., De Francesco, R., Abrignani, S., Geginat, J., 2013. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. Blood 122, 932–942. https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495424

Njenga, M.K., Njagi, L., Thumbi, S.M., Kahariri, S., 2015. Randomized Controlled Field Trial to Assess the Immunogenicity and Safety of Rift Valley Fever Clone 13 Vaccine in Livestock 6, 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003550

Njongmeta, L.M., Bray, J., Davies, C.J., Davis, W.C., Howard, C.J., Hope, J.C., Palmer, G.H., Brown, W.C., Mwangi, W., 2012. CD205 antigen targeting combined with dendritic cell recruitment factors and antigen-linked CD40L activation primes and expands significant antigen-specific antibody and CD4 + T cell responses following DNA vaccination of outbred animals. Vaccine 30, 1624–1635. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.110

Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., Gutchinov, B., Cohn, Z.A., 1980. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. 152, 1070–84.

Olive, M.-M.M., Goodman, S.M., Reynes, J.-M.M., 2012. The role of wild mammals in the maintenance of Rift Valley fever virus. J. Wildl. Dis. 48, 241–266. https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.2.241

Osborne, J.C., Elliott, R.M., 2000. RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5’ terminus of the

negative-sense S segment. J. Virol. 74, 9946–52. https://doi.org/10.1128/JVI.74.21.9946-9952.2000

Ouchi, T., Kubo, A., Yokouchi, M., Adachi, T., Kobayashi, T., Kitashima, D.Y., Fujii, H., Clausen, B.E., Koyasu, S., Amagai, M., 2011. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome 208, 2607–2613. https://doi.org/10.1084/jem.20111718

Ould El Mamy, A.B., Baba, M.O., Barry, Y., Isselmou, K., Dia, M.L., Hampate, B., Diallo, M.Y., El Kory, M.O.B., Diop, M., Lo, M.M., Thiongane, Y., Bengoumi, M., Puech, L., Plee, L., Claes, F., de la Rocque, S., Doumbia, B., 2011. Unexpected rift valley fever outbreak, Northern Mauritania. Emerg. Infect. Dis. 17, 1894–1896. https://doi.org/10.3201/eid1710.110397

Park, H.-Y., Tan, P.S., Kavishna, R., Ker, A., Lu, J., Chan, C.E.Z., Hanson, B.J., MacAry, P.A., Caminschi, I., Shortman, K., Alonso, S., Lahoud, M.H., 2017. Enhancing vaccine antibody responses by targeting Clec9A on dendritic cells. npj Vaccines 2, 31. https://doi.org/10.1038/s41541-017-0033-5

Park, H., Light, A., Lahoud, M.H., Tarlinton, D.M., Shortman, K., 2013. Evolution of B Cell Responses to Clec9A-Targeted Antigen. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301947

Pepin, M., Bouloy, M., Bird, B.H., Kemp, A., Paweska, J., 2010. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): An update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. Vet. Res. 41. https://doi.org/10.1051/vetres/2010033

Perales, M., Yuan, J., Powel, S., Gallardo, H.F., Teresa, S., Gonzalez, C., Manukian, G., Wang, J., Zhang, Y., Chapman, P.B., Krown, S.E., Livingston, P.O., Ejadi, S., Panageas, K.S., Manuel, E., Terzulli, S.L., Houghton, A.N., Wolchok, J.D., 2014. melanoma 16, 2022–2029. https://doi.org/10.1038/mt.2008.196.Phase

Pernthaner, A., Cole, S.A., Gatehouse, T., Hein, W.R., 2002. Phenotypic diversity of antigen-presenting cells in ovine-afferent intestinal lymph. Arch. Med. Res. 33, 405–412. https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00375-2

Persson, E., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hägerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Håkansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., Agace, W.W., 2013. IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103+CD11b+ Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation. Immunity 38, 958–969.

https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.009

Phoenix, I., Lokugamage, N., Nishiyama, S., Ikegami, T., 2016a. Mutational analysis of the rift valley fever virus glycoprotein precursor proteins for Gn protein expression. Viruses 8, 1–14. https://doi.org/10.3390/v8060151

Phoenix, I., Nishiyama, S., Lokugamage, N., Hill, T.E., Huante, M.B., Slack, O.A.L., Carpio, V.H., Freiberg, A.N., Ikegami, T., 2016b. N-glycans on the rift valley fever virus envelope glycoproteins Gn and Gc redundantly support viral infection via DC-SIGN. Viruses 8. https://doi.org/10.3390/v8050149

Pittman, P.R., Norris, S.L., Brown, E.S., Ranadive, M. V, Schibly, B.A., Bettinger, G.E., Lokugamage, N., Korman, L., Morrill, J.C., Peters, C.J., 2016. Rift Valley fever MP-12 vaccine Phase 2 clinical trial : Safety , immunogenicity , and genetic characterization of virus isolates. Vaccine 34, 523–530. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.078

Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswynghels, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2013. Conventional and Monocyte-Derived CD11b+ Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen. Immunity 38, 322–335. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.016

Pokorna, D., Rubio, I., Müller, M., 2008. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. Genet. Vaccines Ther. 6, 4. https://doi.org/10.1186/1479-0556-6-4

Pooley, J.L., Heath, W.R., Shortman, K., 2001. Cutting Edge: Intravenous Soluble Antigen Is Presented to CD4 T Cells by CD8- Dendritic Cells, but Cross-Presented to CD8 T Cells by CD8+ Dendritic Cells. J. Immunol. 166, 5327–5330. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5327

R. Daubney and J.R. Hudson, 1930. Enzootic Hepatitis of Rift valley fever.

Ramamoorth, M., Narvekar, A., 2015. Non viral vectors in gene therapy - An overview. J. Clin. Diagnostic Res. 9, GE01-GE06. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394

Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., Sisirak, V., 2011. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. Ann. Rev. Immunol. 29, 163–183. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101345.Plasmacytoid

Reuter, a., Panozza, S.E., Macri, C., Dumont, C., Li, J., Liu, H., Segura, E., Vega-Ramos, J., Gupta, N., Caminschi, I., Villadangos, J. a., Johnston, a. P.R., Mintern, J.D., 2015. Criteria for Dendritic Cell Receptor Selection for Efficient Antibody-Targeted Vaccination. J. Immunol. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402535

Ring, S., Maas, M., Nettelbeck, D.M., Enk, H., Mahnke, K., 2017. Targeting of Autoantigens to DEC205 + Dendritic Cells In Vivo Suppresses Experimental Allergic Encephalomyelitis in Mice. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202592

Roche, P.A., Furuta, K., 2015. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Nat. Rev. Immunol. 15, 203–216. https://doi.org/10.1038/nri3818

Rols, M., Golzio, M., Teissie, J., 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery 99.

Romani, N., Clausen, B.E., Stoitzner, P., 2010. UKPMC Funders Group subsets in the skin. Immunol. Rev. 234, 120–141. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x.Langerhans

Roos, A.K., Eriksson, F., Timmons, J. a., Gerhardt, J., Nyman, U., Gudmundsdotter, L., Bråve, A., Wahren, B., Pisa, P., 2009. Skin electroporation: Effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment. PLoS One 4. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007226

Rostal, M.K., Liang, J.E., Zimmermann, D., Bengis, R., Paweska, J., Karesh, W.B., 2017. Rift Valley Fever : Does Wildlife Play a Role ? 1–12. https://doi.org/10.1093/ilar/ilx023

Rusnak, J.M., Gibbs, P., Boudreau, E., Clizbe, D.P., Pittman, P., 2011. Immunogenicity and safety of an inactivated Rift Valley fever vaccine in a 19-year study. Vaccine 29, 3222–3229. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.037

Rusu, M., Bonneau, R., Holbrook, M.R., Watowich, S.J., Birmanns, S., Wriggers, W., Freiberg, A.N., 2012. An assembly model of Rift Valley fever virus. Front. Microbiol. 3, 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00254

Saade, F., Petrovsky, N., 2012. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. Expert Rev. Vaccines 11, 189–209. https://doi.org/10.1586/erv.11.188

Sadhu, C., Ting, H.J., Lipsky, B., Hensley, K., Garcia-martinez, L.F., Simon, S.I., Ium D.E.S., 2007. CD11c / CD18 : novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity

81, 1395–1403. https://doi.org/10.1189/jlb.1106680

Said, A., Elmanzalawy, M., Ma, G., Damiani, A.M., Osterrieder, N., 2017. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vector expressing Rift Valley fever virus (RVFV) Gn and Gc induces neutralizing antibodies in sheep. Virol. J. 14, 16–23. https://doi.org/10.1186/s12985-017-0811-8

Sall, A.A., Thiongane, Y., Bouloy, M., 1999. Genetic Reassortment of Rift Valley Fever Virus in Nature 73, 8196–8200.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., 2009. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity 458, 899–903. https://doi.org/10.1038/nature07750.Identification

Sanjua, R., 2016. Mechanisms of viral mutation ´ 4433–4448. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6

Satpathy, A.T., KC, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Murphy, K.M., 2012. *Zbtb46* expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. J. Exp. Med. 209, 1135–1152. https://doi.org/10.1084/jem.20120030

Savina, A., Amigorena, S., 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. Immunol. Rev. 219, 143–156. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x

Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H.A., Hilkens, C.M.U., Tam, J., Poidinger, M., Stanley, E.R., Krug, A.B., Renia, L., Sivasankar, B., Ng, L.G., Collin, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Honda, K., Haniffa, M., Ginhoux, F., 2013. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. Immunity 38, 970–983. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.011

Schlosser, E., Mueller, M., Fischer, S., Basta, S., Busch, D.H., Gander, B., Groettrup, M., 2008. TLR ligands and antigen need to be coencapsulated into the same biodegradable microsphere for the generation of potent cytotoxic T lymphocyte responses 1626–1637. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.030

Schreur, P.J.W., Keulen, L. Van, Kant, J., Kortekaas, J., 2017. Four-segmented Rift Valley

fever virus-based vaccines can be applied safely in ewes during pregnancy. Vaccine. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.024

Schwartz-Cornil, I., Epardaud, M., Bonneau, M., 2006. Cervical duct cannulation in sheep for collection of afferent lymph dendritic cells from head tissues. Nat. Protoc. 1, 874–879. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.147

Segura, E., Durand, M., Amigorena, S., 2013a. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ–resident dendritic cells. J. Exp. Med. 210, 1035–1047. https://doi.org/10.1084/jem.20121103

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., Amigorena, S., 2013b. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. Immunity 38, 336–348. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.018

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., Amigorena, S., 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. J. Exp. Med. 209, 653–660. https://doi.org/10.1084/jem.20111457

Seillet, C., Jackson, J.T., Markey, K.A., Brady, H.J.M., Hill, G.R., MacDonald, K.P.A., Nutt, S.L., Belz, G.T., 2013. CD8α+ DCs can be induced in the absence of transcription factors Id2, Nfil3, and Batf3. Blood 121, 1574–1583. https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445650

Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., Kupper, T.S., 2012. Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. Immunity 36, 873–884. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.018

Shari, M., Pasmans, F., Adriaensen, C., Devisscher, S., Adriaens, T., Louette, G., 2011. Rift Valley and West Nile Virus Antibodies in Camels , North Africa 17, 2372–2374. https://doi.org/10.3354/dao02032

Shrimpton, R.E., Butler, M., Morel, A., Eren, E., Hue, S.S., Ritter, M.A., 2009. CD205 ( DEC-205 ): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self 46, 1229–1239. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.11.016

Siegal, F.P., 1999. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells

in Human Blood. Science (80-. ). 284, 1835–1837. https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1835

Sissoko, D., Giry, C., Gabrie, P., Tarantola, A., Pettinelli, F., Collet, L., D'Ortenzio, E., Renault, P., Pierre, V., 2009. Rift valley fever, mayotte, 2007-2008. Emerg. Infect. Dis. 15, 568–570. https://doi.org/10.3201/eid1504.081045

Smith, D.R., Steele, K.E., Shamblin, J., Honko, A., Johnson, J., Reed, C., Kennedy, M., Chapman, J.L., Hensley, L.E., 2010. The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. Virology 407, 256–267. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.016

Smithburn, K.C., Haddow, A.J., Gillett, J.D., 1948. RIFT VALLEY FEVER . ISOLATION OF THE VIRUS FROM WILD MOSQUITOES .*.

Spiering, R., Margry, B., Keijzer, C., Hoek, A., Wagenaar-hilbers, J., Der, R. Van, Eden, W. Van, Kretschmer, K., 2017. DEC205 + Dendritic Cell − Targeted Tolerogenic Vaccination Promotes Immune Tolerance in Experimental Autoimmune Arthritis. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400986

Spik, K., Shurtleff, A., McElroy, A.K., Guttieri, M.C., Hooper, J.W., Schmaljohn, C., 2006. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. Vaccine 24, 4657–4666. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.034

Steinman, R.M., 1973. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. J Exp Med 1142–1162.

Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., Cohn, Z.A., 1979. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. J. Exp. Med. 149, 1–16. https://doi.org/10.1084/jem.149.1.1

Steinman, R.M., Witmer, M.D., 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice Immunology : October 75, 5132–5136. https://doi.org/10.1084/jem.157.2.613

Suschak, J.J., Wang, S., Fitzgerald, K.A., Lu, S., 2016. A cGAS-Independent STING/IRF7 Pathway Mediates the Immunogenicity of DNA Vaccines. J. Immunol. 196, 310–316. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501836

Suschak, J.J., Wang, S., Fitzgerald, K.A., Lu, S., 2015. Identification of Aim2 as a Sensor for DNA Vaccines. J. Immunol. 194, 630–636. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402530

Swiecki, M., Colonna, M., 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. Nat. Rev. Immunol. 15, 471–485. https://doi.org/10.1038/nri3865

Tel, J., Sittig, S.P., Blom, R.A.M., Cruz, L.J., Schreibelt, G., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., Luis, J., Schreibelt, G., Figdor, C.G., De, I.J.M., 2013. Targeting Uptake Receptors on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Antigen Cross-Presentation and Robust Type I IFN Secretion. J. Immunol. 191, 5005–5012. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300787

Tenbusch, M., Ignatius, R., Nchinda, G., Trumpfheller, C., Salazar, A.M., Töpfer, K., Sauermann, U., Wagner, R., Hannaman, D., Tenner-Racz, K., Racz, P., Stahl-Hennig, C., Überla, K., 2012. Immunogenicity of DNA vaccines encoding Simian immunodeficiency virus antigen targeted to dendritic cells in rhesus macaques. PLoS One 7, 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039038

Terhorst, D., Fossum, E., Baranska, A., Tamoutounour, S., Malosse, C., Garbani, M., Braun, R., Lechat, E., Crameri, R., Bogen, B., Henri, S., Malissen, B., 2015. Laser-Assisted Intradermal Delivery of Adjuvant-Free Vaccines Targeting XCR1+ Dendritic Cells Induces Potent Antitumoral Responses. J. Immunol. 194, 5895–5902. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500564

Thaiss, C.A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., Kurts, C., 2011. Chemokines: A new dendritic cell signal fort cell activation. Front. Immunol. 2, 1–9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00031

Todorova, B., Adam, L., Culina, S., Boisgard, R., Martinon, F., Cosma, A., Ustav, M., Kortulewski, T., Grand, R.L., Chapon, C., 2017. Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. Sci. Rep. 7, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04547-2

Tokuda, S., Valle, T.Z. Do, Batista, L., Guillemot, L., Flamand, M., Montagutelli, X., Panthier, J., 2016. The genetic basis for susceptibility to Rift Valley fever disease in MBT / Pas mice . To cite this version : HAL Id : pasteur-01325818.

Tomori, O.D.O., Schmitz, J.L.F.H., 1996. Experimental infection of three Nigerian breeds of sheep with the Zinga strain of the Rift Valley Fever virus.

Tregoning, J.S., Kinnear, E., 2014. Using Plasmids as DNA Vaccines for Infectious Diseases. Plasmids Biol. Impact Biotechnol. Discov. 2, 651–668. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0028-2014

Ulmer, J., Donnelly, J., Parker, S., Rhodes, G., Felgner, P., Dwarki, V., Gromkowski, S., Deck, R., DeWitt, C., Friedman, A., et, al., 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science (80-. ). 259, 1745–1749. https://doi.org/10.1126/science.8456302

Van Broekhoven, C.L., Parish, C.R., Demangel, C., Britton, W.J., Altin, J.G., 2004. Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: A highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. Cancer Res. 64, 4357–4365. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0138

van den Berg, J.H., Nuijen, B., Beijnen, J.H., Vincent, A., van Tinteren, H., Kluge, J., Woerdeman, L.A.E., Hennink, W.E., Storm, G., Schumacher, T.N., Haanen, J.B.A.G., 2009. Optimization of Intradermal Vaccination by DNA Tattooing in Human Skin. Hum. Gene Ther. 20, 181–189. https://doi.org/10.1089/hum.2008.073

Vasan, S., Hurley, A., Schlesinger, S.J., Hannaman, D., Gardiner, D.F., Dugin, D.P., Boente-Carrera, M., Vittorino, R., Caskey, M., Andersen, J., Huang, Y., Cox, J.H., Tarragona-Fiol, T., Gill, D.K., Cheeseman, H., Clark, L., Dally, L., Smith, C., Schmidt, C., Park, H.H., Kopycinski, J.T., Gilmour, J., Fast, P., Bernard, R., Ho, D.D., 2011. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. PLoS One 6, 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019252

Verstrepen, B.E., Bins, A.D., Rollier, C.S., Mooij, P., Koopman, G., Sheppard, N.C., Sattentau, Q., Wagner, R., Wolf, H., Schumacher, T.N.M., Heeney, J.L., Haanen, J.B.A.G., 2008. Improved HIV-1 specific T-cell responses by short-interval DNA tattooing as compared to intramuscular immunization in non-human primates. Vaccine 26, 3346–3351. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.091

Vicente, T., Roldão, A., Peixoto, C., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., 2011. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. J. Invertebr. Pathol. 107, S42–S48. https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.004

Von Teichman, B., Engelbrecht, A., Zulu, G., Dungu, B., Pardini, A., Bouloy, M., 2011. Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves.

Vaccine 29, 5771–5777. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.055

Vu Manh, T.P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., 2015. Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions. Front. Immunol. 6. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00260

Wallace, D.B., Ellis, C.E., Espach, a., Smith, S.J., Greyling, R.R., Viljoen, G.J., 2006. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. Vaccine 24, 7181–7189. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.041

Wang, Q., Cao, W., Yang, Z.G., Zhao, G.F., 2015. Dc targeting DNA vaccines induce protective and therapeutic antitumor immunity in mice. Int. J. Clin. Exp. Med. 8, 17565–17577.

Wang, Q., Jiang, W., Chen, Y., Liu, P., Sheng, C., Chen, S., Zhang, H., Pan, C., Gao, S., Huang, W., 2014. In Vivo Electroporation of Minicircle DNA as a Novel Method of Vaccine Delivery To Enhance HIV-1-Specific Immune Responses. J. Virol. 88, 1924–1934. https://doi.org/10.1128/JVI.02757-13

Warimwe, G.M., Gesharisha, J., Carr, B.V., Otieno, S., Otingah, K., Wright, D., Charleston, B., Okoth, E., Elena, L., Lorenzo, G., Ayman, E., Alharbi, N.K., Al-dubaib, M.A., Brun, A., Gilbert, S.C., Nene, V., Hill, A.V.S., 2016. Chimpanzee Adenovirus Vaccine Provides Multispecies Protection against Rift Valley Fever. Sci. Rep. 6, 1–7. https://doi.org/10.1038/srep20617

Wei, H., Wang, S., Zhang, D., Hou, S., Qian, W., Li, B., Guo, H., Kou, G., He, J., Wang, H., Guo, Y., 2009. Cancer Therapy : Preclinical argeted Delivery of T umor Antigens to Activated Dendritic Cells via CD11c Molecules Induces Potent Antitumor Immunity in Mice 15, 4612–4622. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3321

Weingartl, H.M., Nfon, C.K., Zhang, S., Marszal, P., Wilson, W.C., Morrill, J.C., Bettinger, G.E., Peters, C.J., 2014. Efficacy of a recombinant rift valley fever virus MP-12 with NSm deletion as a vaccine candidate in sheep. Vaccine 32, 2345–2349. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.064

White, A.L., Tutt, A.L., James, S., Wilkinson, K.A., Castro, F.V. V, Dixon, S. V., Hitchcock, J., Khan, M., Al-Shamkhani, A., Cunningham, A.F., Glennie, M.J., 2010. Ligation of CD11c during vaccination promotes germinal centre induction and robust humoral responses without adjuvant. Immunology 131, 141–151. https://doi.org/10.1111/j.1365-

2567.2010.03285.x

Wichgers Schreur, P.J., Kortekaas, J., 2016. Single-Molecule FISH Reveals Non-selective Packaging of Rift Valley Fever Virus Genome Segments. PLoS Pathog. 12, 1–21. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005800

Widera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S.W., Chen, M., Leung, L., Otten, G.R., Thudium, K., Selby, M.J., Ulmer, J.B., 2000. Increased DNA Vaccine Delivery and Immunogenicity by Electroporation In Vivo. J. Immunol. 164, 4635–4640. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4635

Witmer-Pack, M.D., Swiggard, W.J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., 1995. Tissue Distribution of the DEC-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal Antibody NLDC-145. Cell. Immunol. 163, 157–162. https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1110

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Wang, C., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science (80-. ). 247, 1465–1468. https://doi.org/10.1126/science.1690918

Won, S., Ikegami, T., Peters, C.J., Makino, S., 2007. NSm Protein of Rift Valley Fever Virus Suppresses Virus-Induced Apoptosis  81, 13335–13345. https://doi.org/10.1128/JVI.01238-07

Wu, Y., Zhu, Y., Gao, F., Jiao, Y., Oladejo, B.O., Chai, Y., Bi, Y., Lu, S., Dong, M., Zhang, C., Huang, G., Wong, G., Li, N., Zhang, Y., Li, Y., Feng, W., Shi, Y., Liang, M., Zhang, R., Qi, J., Gao, G.F., 2017. Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope. Proc. Natl. Acad. Sci. 114, E7564–E7573. https://doi.org/10.1073/pnas.1705176114

Xu, W., Watts, D.M., Costanzo, M.C., Tang, X., Venegas, L.A., Jiao, F., Sette, A., Sidney, J., Sewell, A.K., Wooldridge, L., Makino, S., Morrill, J.C., Peters, C.J., Kan-mitchell, J., 2013. The Nucleocapsid Protein of Rift Valley Fever Virus Is a Potent Human CD8 + T Cell Antigen and Elicits Memory Responses 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059210

Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., Yoshie, O., 1998. Identification of Single C Motif-1 / Lymphotactin Receptor XCR1 * 273, 16551–16554.

Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., ten Broeke, T., Matsuki, Y., Mount,

A.M., Belz, G.T., O'Keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M., Ishido, S., Stoorvogel, W., Heath, W.R., Shortman, K., Villadangos, J.A., 2008. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. Nat. Immunol. 9, 1244–1252. https://doi.org/10.1038/ni.1665

Yu, C.I., Becker, C., Wang, Y., Marches, F., Helft, J., Leboeuf, M., Anguiano, E., Pourpe, S., Goller, K., Pascual, V., Banchereau, J., Merad, M., Palucka, K., 2013. Human cd1c+ dendritic cells drive the differentiation of cd103+ cd8+ mucosal effector t cells via the cytokine tgf-β. Immunity 38, 818–830. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.004

Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., Reis, C., 2012. The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice 122, 1615–1627. https://doi.org/10.1172/JCI60644.viral

Zhang, H., Kong, H., Zeng, X., Guo, L., Sun, X., He, S., 2014. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. J. Transl. Med. 12, 1–11. https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-125

# X. Annexes

## A. Annexe 1 - Liste des congrès nationaux et internationaux

**Communications orales**

-20 au 21/03/17 : 10ème colloque du Club Vaccinologie Société Française d'Immunologie – Lyon, France

-25 au 26/10/17 : Journée scientifiques et des doctorants de l'Anses – Maisons-Alfort, France

**Communications affichées**

-12 au 15/09/17: 47th Annual Meeting of the German Society for Immunology – Erlangen, Allemagne

-23 au 25/11/15 : Congrès DC BIOL (2nd Workshop on dentritic celle Biology) Ciml (Centre d'immunologie de Marseille Luminy) – Marseille, France

## B. Annexe 2 - The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

# The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin

Received: 30 March 2017
Accepted: 7 July 2017
Published online: 09 August 2017

Charlotte Deloizy[1,7], Even Fossum[2], Christophe Barnier-Quer[4], Céline Urien[1], Tiphany Chrun[1], Audrey Duval[1,8], Maelle Codjovi[1,9], Edwige Bouguyon[1], Pauline Maisonnasse[1,10], Pierre-Louis Hervé[1,11], Céline Barc[5], Olivier Boulesteix[5], Jérémy Pezant[5], Christophe Chevalier[1], Nicolas Collin[4], Marc Dalod[6], Bjarne Bogen[2,3], Nicolas Bertho[1] & Isabelle Schwartz-Cornil[1]

**XCR1 is selectively expressed on a conventional dendritic cell subset, the cDC1 subset, through phylogenetically distant species. The outcome of antigen-targeting to XCR1 may therefore be similar across species, permitting the translation of results from experimental models to human and veterinary applications. Here we evaluated in pigs the immunogenicity of bivalent protein structures made of XCL1 fused to the external portion of the influenza virus M2 proton pump, which is conserved through strains and a candidate for universal influenza vaccines. Pigs represent a relevant target of such universal vaccines as pigs can be infected by swine, human and avian strains. We found that cDC1 were the only cell type labeled by XCR1-targeted mCherry upon intradermal injection in pig skin. XCR1-targeted M2e induced higher IgG responses in seronegative and seropositive pigs as compared to non-targeted M2e. The IgG response was less significantly enhanced by CpG than by XCR1 targeting, and CpG did not further increase the response elicited by XCR1 targeting. Monophosphoryl lipid A with neutral liposomes did not have significant effect. Thus altogether M2e-targeting to XCR1 shows promises for a trans-species universal influenza vaccine strategy, possibly avoiding the use of classical adjuvants.**

Targeting antigens to endocytic receptors expressed on dendritic cells is a potent way to enhance the efficiency of protein and DNA-based vaccines. To date, over a hundred preclinical studies have demonstrated that DC-targeting is efficient in many murine models to improve responses against model antigens such as ovalbumin, as well as against pathogen and tumor antigens, resulting in enhanced protection against infection and tumor challenges (for reviews see refs 1–4). However the translation of DC-targeting to other species such as livestock and primates has led to less spectacular outcomes[1,5]. For instance, whereas over 20 different mouse studies show that DEC205 targeting stimulates high antibody responses, Th1 orientation and strong $CD8^+$ T cell responses[4], DEC205 targeting only induced low level CTL responses in non-human primates and did not improve the Th1 nor the antibody responses[6]. Thus it remains to be established whether DC-targeting has any advantage above classical adjuvants to ameliorate vaccination in application species.

The limited benefit of the DC-targeting in non-murine species may be due to the targeted immune receptor which, depending on species, can be expressed on non-DC type cells and may trigger undesired or counteractive responses. Furthermore the targeted molecules are most often differentially expressed by different subtypes

[1]VIM-INRA-Université Paris-Saclay, Domaine de Vilvert, 78350, Jouy-en-Josas, France. [2]K.G. Jebsen Center for Influenza Vaccine Research, University of Oslo and Oslo University Hospital, 0027, Oslo, Norway. [3]Center for Immune Regulation, Institute of Immunology, University of Oslo and Oslo University Hospital Rikshospitalet, 0424, Oslo, Norway. [4]Vaccine Formulation Laboratory, University of Lausanne, Chemin des Boveresses 155, 1066, Epalinges, Switzerland. [5]UE1277-INRA, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale - PFIE, 37380, Nouzilly, France. [6]Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, 13288, Marseille, France. [7]Present address: GenoSafe, 1 bis rue de l'International, 91000, Evry, France. [8]Present address: Biostatistics, Biomathematics, Pharmacoepidemiology and Infectious Diseases (B2PHI), Inserm, UVSQ, Institut Pasteur, Université Paris-Saclay, 78180, Montigny-le-Bretonneux, France. [9]Present address: Genfit, 885 Avenue Eugène Avinée, 59120, Loos, France. [10]Present address: CEA - Université Paris Sud 11 - INSERM U1184, Immunology of Viral infections and Autoimmune Diseases (IMVA), IDMIT infrastructure, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. [11]Present address: DBV Technologies, 177-181 avenue Pierre Brossolette, 92120, Montrouge, France. Charlotte Deloizy and Even Fossum contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.S.-C. (email: isabelle.schwartz@inra.fr)

of mononuclear phagocytes, with different patterns across species. The subtypes of mononuclear phagocytes include monocytes and monocyte-derived cells, tissue macrophages, Langerhans cells and the bona fide DC which encompass plasmacytoid DC (pDC) and the conventional DC (cDC) types cDC1 and cDC2 (see recent review[7]). The subtypes of mononuclear phagocytes have distinct functional attributes, with cDC subsets being the most specialized subsets in antigen presentation. Thus cDC are the most attractive cell types for antigen-targeting. Furthermore, whereas the cDC1 type excels in cross-presentation of antigens for $CD8^+$ T cell priming, $CD8^+$ T resident memory generation[8] and recall responses[9], they also are effective in T helper follicular activation for high antibody production[10]. Indeed the targeting of CLEC9A, a cell surface molecule highly expressed on murine cDC1 over on other DC types, drove a highly efficient development of follicular helper T cells[11] and promoted affinity maturation of immunoglobulins in germinal centers in mice[10]. Furthermore, the targeting of influenza hemagglutinin to murine XCR1, the XCL1 receptor which is selectively expressed on cDC1[12,13], potently enhanced the $CD8^+$ T cell response[14–16] as well as the antibody response, especially of the IgG2a isotype[14]. Importantly we previously showed that XCR1 stands as a unique molecule selectively expressed by cDC1 across warm blooded species, i.e. mice, human, sheep and swine[17]. To the best of our knowledge, no other surface receptor selectively expressed on a DC subset is as widely conserved.

In this study, we assessed the efficiency of XCR1 targeting with a protein-based vaccine in pigs, which is an economically important livestock species and a biomedical model for the study of several human physiological and pathological conditions, including zoonotic infectious diseases, such as influenza infections. We selected the extracellular domain of the influenza A M2 proton pump (M2e), which is conserved across influenza strains and is a candidate B cell antigen for universal influenza vaccine development. M2e-specific Abs are responsible for the protective immunity induced by M2e vaccination: indeed the transfer of serum from M2e-immunized animals to naive recipients effectively protects against homologous and even heterologous challenges[18–20]. Anti-M2e IgG usually do not show viral neutralizing activity *in vitro* but Fc receptor-dependent mechanisms were shown to be critical in the protection, particularly through macrophages[19,21]. As M2 is expressed at low levels on the virus particles but is abundant on infected cells[22], anti-M2e IgG probably provide protection by interacting with virus-infected cells via antibody dependent cell-mediated cytotoxicity or phagocytosis. The role of complement appears negligible[19,23]. However as M2e is a very weak and poorly accessible antigen in influenza particles, it needs to be properly exposed to induce protective immunity. We expressed 3 tandem repeats of M2e in fusion with porcine XCL1 (poXCL1-M2e) in bivalent structures named vaccibodies (VB) and delivered them intradermally in pigs, alone or in combination with monophosphoryl lipid A (MPL), a non toxic derivative of *Salmonella minnesota* LPS and a Toll-like receptor (TLR) 4 ligand, or CpG, a TLR9 ligand. VB contain the hinge and CH3 domain of human IgG3 to mimic the bivalent receptor binding capacity of an antibody and they incorporate a targeting unit (here poXCL1) and an antigenic part (here M2e) and yet remain smaller than an Ig molecule. We found that when injected intradermally, poXCL1-M2e VB induced higher anti-M2e IgG responses than non-targeted VB, and revealed to be more potent than TLR ligand adjuvants such as CpG and MPL administered with neutral liposomes.

## Materials and Methods

**Adjuvants and formulations.** Squalene-in-water emulsion (SWE) was prepared as previously described[24]. Liposomes were manufactured by a lipid film-rehydration method followed by extrusion. The neutral liposomes (NL) are composed of 2.5 mg/mL cholesterol and 10 mg/mL of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine [DOPC] in PBS pH 7.2, while the cationic liposomes (CL) are composed of 2.5 mg/mL cholesterol and 10 mg/mL of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane [DOTAP] in 20 mM Hepes and Glucose 5%. Monophosphoryl Lipid A (MPL) from *Salmonella enterica* serotype *Minnesota* was suspended in water for injection at 1 mg/mL, and ultra-sonicated with a probe sonicator and filtered (0.20 μm). This solution was added to the liposome suspensions in a 1:1 v/v ratio. Lipids were acquired from Avanti lipids and MPL from Sigma. CpG oligo-dinucleotides 5′-ggTGCATCGATTTATCGATTATCGATGCAGggggg-3′ with lower case letters for phosphorothioate linkages and upper case letters for phosphodiester linkages previously shown to be efficient in pigs[25] were bought from Sigma.

**Vaccibody (VB) production.** The generation of poXCL1-mCherry and anti-4-hydroxy-3-iodo -5-nitrophenylacetic acid (NIP) -mCherry VB has been described previously[26]. For generation of poXCL1-M2e and NIP-M2e, three consecutive copies of the M2e (3M2e) antigen were cloned into the poXCL1 and NIP VB backbones. The aa sequence of M2e (SLLTEVETPTRSEWESRSSDSSDAAASLLTEVETPTRSEWESRSSDSSDAA ASLLTEVETPTRSEWESRSSDSSDAAA) was modified by replacing cysteines 17 and 19 of the original sequence with serine residues (underlined), to improve immunogenicity and avoid unwanted disulfide bounds in the chimera[27,28]. The M2e sequence was derived from the sequence of the human A/PARIS/2590/2009 (H1N1) pandemic virus. poXCL1-M2e and NIP-M2e were produced by transient transfection of HEK293E cells in 5 layer flasks (BD Multi-Flask) using Lipofectamine 2000 (Life technologies). VB were purified by harvesting supernatants and applying them onto a Sepharose 4 Fast flow column (GE Healthcare) conjugated with the antibody HP6017, that bind the human CH3 dimerization domain. Bound VB were washed with PBS before elution with 0.1 M Glycin-HCl pH 2.7. Eluted protein were dialyzed in PBS and concentrated to 1 mg/ml using a 10 kDa cutoff Vivaspin column (Sartorius Stedim Biotech). Purified VB were subsequently stored at −80 °C until use. The concentration of the purified poXCL1-M2e and NIP-M2e VB were initially determined by a BCA protein assay kit. Correct size of the purified VB were determined by SDS-PAGE on a 10% Bolt™ Bis-Tris Plus gel in MOPS Bolt™ SDS Running Buffer (Life Technologies). In addition, normalized poXCL1-M2e and NIP-M2e were evaluated for equal quantities by ELISA using Costar 96-well plates coated with anti-human $CH_3$ (MCA878, AbD Serotec). After blocking plates with 1% (w/v) BSA in PBS with 0.02% (w/v) Na Azide, normalized concentrations of VB were added and 3-fold serial diluted and incubated overnight at 4 °C. The plates were next washed and incubated

with HP-6017-biotin (Sigma) diluted 1:1000 in PBS with 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) Na Azide for 2 h at RT. After washing, streptavidin-ALP (Sigma) diluted 1:3000 in PBS with 0.1% (w/v) BSA and 0.02% (w/v) Na Azide was added and plates incubated 1 h at RT. The plates were subsequently washed and developed by adding 1 mg/ml phosphatase substrate (Sigma) dissolved in substrate buffer (9.7% w/v diethanol amine, 10.1% w/v MgClx6$H_2O$ and 0.02 (w/v) Na Azide in $H_2O$). $OD_{405}$ was measured using a TECAN microplate reader. Finally right before vaccination, the quality and quantity of the frozen stocks of the NIP and poXCL1-M2e were checked by the protein signals obtained in Coomassie blue staining of SDS-PAGE gel, under reducing conditions, relatively to a bovine serum albumin calibration, using the ChemiDc MP system (Bio-Rad).

**Animals.** The animal experiments were approved by the French ethical committee #19, i.e. the Comité d'Éthique en Expérimentation Animale Val de Loire, under the number 00783.02 and comply to the French law on animal experimentation 2013-118 and to the directive 2010/63/EU. The animal experiments were done at the Plateforme d'Infectiologie Expérimentale PFIE-INRA, Nouzilly, France, under the accreditation number for animal experimentation C37-175-3 under A-BSL1 containment. Large-white pigs were obtained from the INRA conventional breeding unit Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière PAO-INRA, Nouzilly, France.

**Immunization experiments.** In the case of experiment 1, 48 pigs (3–4 months of age) were randomly assigned into 8 groups of 6 pigs each (half males, half females in each group) originating from different mothers. The VB were delivered intradermally in a 450 µl volume in 4 spots (110 µl each) using hypodermic needle on day 0 (D0) and D28 under anesthesia (2 mg/kg xylazine and 10 mg/kg ketamine, intramuscular route), and the pigs were culled on D56. Four groups received 0.25 µg VB and 4 groups received 2.5 µg VB per pig either in plain PBS or formulated with 100 µg MPL+ neutral liposomes (NL). Serum was collected on D0, 28 and 56. Two pigs were prematurely culled due to lameness not resolved with anti-inflammatory drug treatment. In the case of experiment 2, 32 pigs (2 months of age), originating from 8 different mothers were serologically tested for anti-H1N1 and anti-NP IgG levels 2 weeks before the first vaccination. All mothers were seropositive for influenza and presented similar anti-H1N1 and anti-NP IgG levels. The piglets were assigned to 4 groups of 8 piglets, randomized based on anti-H1N1 and anti-NP IgG levels, mother of origin, and sex. The influenza seropositivity was due to previous exposure of the mothers or of the piglets to an influenza virus, not to vaccination.

The VB (8 µg) were delivered intradermally in a 450 µl volume using hypodermic syringe on D0, D28 and D55 under anesthesia, with or without 500 µg CpG, and the pigs were culled on D85. Serum was collected on D0, D55. D85. Five pigs were culled prematurely due to rectal prolapsus.

**Skin cell targeting by VB.** NIP-mCherry and poXCL1-mCherry VB (60 µg each) were mixed with different formulations in PBS except in the case of cationic liposomes (CL) where a 5% glucose +20 mM Hepes buffer was used, in a final 600 µl volume. The volume ratios were 50:50 for the VB:SWE adjuvant, 60:20:20 for the VB:NL:MPL (100 µg), and 60:20:20 for the VB:CL:MPL (100 µg). The formulated VB were injected intradermally in 8 spots (75 µl each) using an hypodermic needle under general anesthesia. One pig was used for each formulation for which the NIP-mCherry and the poXCL1-mCherry VB were injected in the left and in the right inguinal area respectively. After 24 hours, the pigs were culled and the injected skin spots were collected and placed on ice. After removal of fat, the injected skin spots were cut in 4, pooled and digested overnight in RPMI +10% FCS + collagenase D (1 mg/ml, Roche) + dispase (0.5 mg/ml, InVitrogen) + antimycotic antibiotic cocktail. The cells were then filtered through 100-µm pores-nylon mesh filters. For staining, $10^6$ cells per tube were incubated for 30 min on ice in blocking buffer (PBS + 5% horse serum + 5% pig serum) and stained with anti-MHC class II mAb (MSA3 clone, IgG2a, Washington State University Monoclonal Antibody Center, Pullman, Wa (WSU)) and anti-CD172 mAb (clone 74-22-15, WSU) at a 2 µg/ml concentration followed by Alexa 488 and Alexa 647 -conjugated goat IgG anti-mouse IgG2a and IgG1 respectively. Dead cells were excluded with DAPI. The isotype IgG2a and IgG1 control was done on a pool of skin cells injected with the different formulations. Flow cytometry acquisition was done with a Becton Dickinson Fortessa Flow cytometer and the acquired data were analyzed using FlowJo software (version X.0.6, Tree Star).

**Ab ELISA.** Individual pig sera were assayed for anti-M2e-specific IgG by ELISA at D0 and on the indicated days. Fifteen days before experiment 2, piglets and their mothers' sera were tested for anti-NP and H1N1-specific IgG. Half area flat bottom polystyrene high bind microplates (Corning) were coated overnight at 4 °C with 100 ng M2e peptide or 200 ng NP (described in ref. 29) or 200 ng inactivated A/PARIS/2590/2009 H1N1 in 50 µl of PBS. Plates were saturated with 5% FCS in PBS −0.05% Tween 20 for 1 h at 37 °C. Samples were 2-fold serially diluted starting at 1:30 and were incubated for 2 h at 37 °C. Antigen-bound IgG were detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-pig IgG Fc fragment (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) at 10 ng/ml. Antigen-bound pig IgG1 and IgG2 were detected with murine mAb anti-pig IgG1 (clone K139 3C8, IgG1 isotype, Bio-Rad) at 10 µg/ml and murine mAb anti-pig IgG2 (clone K68-Ig2, IgG1 isotype, Bio-Rad) at 1 µg/ml followed by HRP-conjugated rat anti-mouse IgG1 at 500 ng/ml (BD Biosciences). All detection antibodies were incubated for 1 h at 37 °C. The ULTRA-tetramethylbenzidine HRP substrate (TMB, Thermo-Scientific) was used and absorbance was measured at 405 nm and the results were expressed as endpoint antibody titers, calculated by regression analysis plotting dilution versus $A_{405}$. Endpoint titers were calculated as the highest dilution giving twice the absorbance of the negative control.

**Isolation of splenocytes and depletion of γ/δ and $CD8^+$ or $CD4^+$ T cells.** Spleen cells were isolated by mechanical dissociation followed by filtration on successive 500 µm and 100 µm mesh-sized nylon filters and centrifugation on Ficoll-Hypaque density gradient. Spleen cells were step frozen in FCS +10% dimethyl sulfoxide and stored in liquid nitrogen. Depletion of γ/δ and $CD8^+$ T or of γ/δ and $CD4^+$ T cells was performed

with indirect magnetic sorting according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). γ/δ T cells were removed as these cells have been shown to display regulatory properties in cattle, another artiodactyl species[30]. In brief, splenocytes were incubated with 0.5 μg/$10^7$ cells of anti-porcine γ/δ T cell receptor (mix of 86D and PGL22A clones (Washington State University (WSU), USA)) and together either with anti-porcine CD8β (PG164A, WSU) or with anti-porcine CD4 (74-12-4, WSU) and followed by incubation with 20 μl goat anti-mouse IgG microbeads and depletion using LD columns (Miltenyi Biotec). Depletion was checked by staining with anti-mouse IgG conjugated secondary antibody in flow cytometry and was found to be less than 1%.

**T-cell restimulation and ELISPOT.** The number of antigen-specific IFNγ-secreting splenocytes were determined using the porcine IFNγ ELISPOT assay, following the recommendations from MabTech AB (Nacka Strand, Sweden). MultiScreen HTS plates (Millipore) were pre-coated overnight with 15 μg/ml capture anti-pig IFNγ mAb in PBS. Spleen cells were thawed from frozen stocks and dead cells were removed with an optiprep gradient. Cells were resuspended in X-vivo medium (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) supplemented with 2% FCS and penicillin/streptomycin and $2.5 \times 10^5$ were plated in the pre-coated ELISPOT plate and stimulated with 5 μg/ml overlapping peptides covering the CH3 and hinge region of human IgG3 and M2e sequences of the vaccibodies (20 mers, offset 8, Mimotopes Pty Ltd, Victoria, Australia). Unstimulated wells included 5 μl of H20: acetonitril peptide diluent (vol:vol). A peptide derived from the HIV polymerase was used as negative control (5 μg/ml) and ConA (25 μg/ml) was used as positive control. After 18 h, the IFNγ-secreting cells were revealed by sequential incubations with 0.5 μg/ml biotinylated anti-IFNγ followed by 0.5 μg/ml alkaline phosphatase conjugated-streptavidin and BCIP/NBT reagent. The number of specific IFN-γ secreting cells was determined by the AID ELISPOT reader.

**Statistical analyses.** Data were analyzed with the GraphPad Prism 5.0 software. Unpaired t-tests were used for comparison of antibody responses between 2 vaccinated groups, bilateral in experiment 1, and monolateral in experiment 2.

**Data availability.** Materials, data and associated protocols are available to readers upon request to the corresponding author.

## Results

**poXCL1-mCherry selective interaction with skin cDC1 *in vivo* depends on the formulation used for adjuvant combination.** We recently published that vaccibodies (VB) made of pig XCL1 in fusion with mCherry (poXCL1-mCherry) selectively interacted with pig blood cDC1 as well as skin cDC1 from culture explants *in vitro*[26]. These observations suggest that poXCL1-fusion vaccines can be used to immunize pigs. However, to ensure efficient targeting of cDC1 *in vivo*, poXCL1-mCherry was delivered into the skin by intradermal injection and the injection site was excised and enzymatically digested after 24 h. As shows Fig. 1A (left panel), the $FSC^{hi}$ MHC class $II^{hi}$ cells, which correspond to pig skin DC[31], represent about 0.25% of the total skin cells. $CD172A^-$ $FSC^{hi}$ MHC class $II^{hi}$ cells correspond to cDC1 in pig skin[31]. In this experiment, poXCL1-mCherry selectively clearly labeled 35% of the $CD172A^-$ $FSC^{hi}$ MHC class $II^{hi}$ cells of enzymatically-extracted skin cells (2.82% of total DC), as compared to the NIP-mCherry negative control (VB containing a scFv specific for the hapten NIP, Fig. 1B). The labeling with poXCL1-mCherry may correspond to internalized, membrane-bound forms or both. Some $CD172A^+$ cells were very faintly labeled with poXCL1-mCherry, possibly related to the chemokine interaction with surface glycosaminoglycans[32]. There was no mCherry signal in DC from the NIP-mCherry VB injections when compared to PBS (Fig. 1A, right panel), indicating very limited non-specific binding of NIP-mCherry and/or rapid lysosomal degradation following non-specific receptor-mediated pinocytosis[33]. Finally the fraction of non-labeled cDC1 with poXCL1-mCherry might be explained either by lack of access of the inoculum to all the cDC1 present in the skin at the time of the digestion or possibly by the degradation/quenching of the poXCL1-mCherry which is likely to occur with time upon internalization. As addition of adjuvants has been shown to be beneficial and sometimes essential to the immunogenicity of DC-targeted antigens in the mouse model[34–36], we evaluated the interaction of poXCL1 and NIP-mCherry to cDC1 when mixed with squalene-in-water emulsion (SWE adjuvant), with MPL + cationic liposomes (CL) or with MPL + neutral liposomes (NL) injected intradermally. We selected these adjuvants because vaccines including squalene and MPL adjuvants have been licensed for human use. CL or NL were added to MPL with the goal to improve its bio-availability and to potentiate the immunostimulatory effect[37]. As shown Fig. 1C and D, SWE and CL formulations prevented the interaction of poXCL1-mCherry to pig skin cDC1, and in addition induced a strong local inflammation 24 h–96 h post injection at the difference with plain VB (Supplementary Fig. 1A,B,C). Interestingly, MPL + NL formulation maintained poXCL1-mCherry targeting to 30% of the cDC1 (Fig. 1E, 3.59% of the total DC) and was minimally inflammatory (Supplementary Fig. 1D). We thus selected MPL + NL for the experiment 1 of XCR1-targeting in pigs using the VB strategy.

**Production and purification of poXCL1-M2e and NIP-M2e VB.** Influenza M2e was selected as the antigen to be included in VB for targeting pig XCR1, as M2e represents an evolutionary conserved influenza antigen which is promising for generating universal influenza vaccines. Although M2e is poorly immunogenic in its natural context, it has been shown to induce protective immunity in mouse and ferret models when tandem repeats were expressed in fusion with different types of carriers[27,38]. Consequently, we fused three tandem repeats of M2e from pandemic H1N1 virus at the C terminal end of the CH3 domain of VB containing NIP or poXCL1 as targeting units at the N terminal end (Fig. 2A). The NIP portion corresponds to an irrelevant scFv for making VB with untargeted M2e. poXCL1-M2e and NIP-M2e were expressed and purified as previously published[14]. The purified VB proteins were evaluated for size and dimerization by SDS-PAGE (Fig. 2B). For NIP-M2e VB, we observed the presence of monomeric VB in the non-reduced samples, although the strongest band correlated

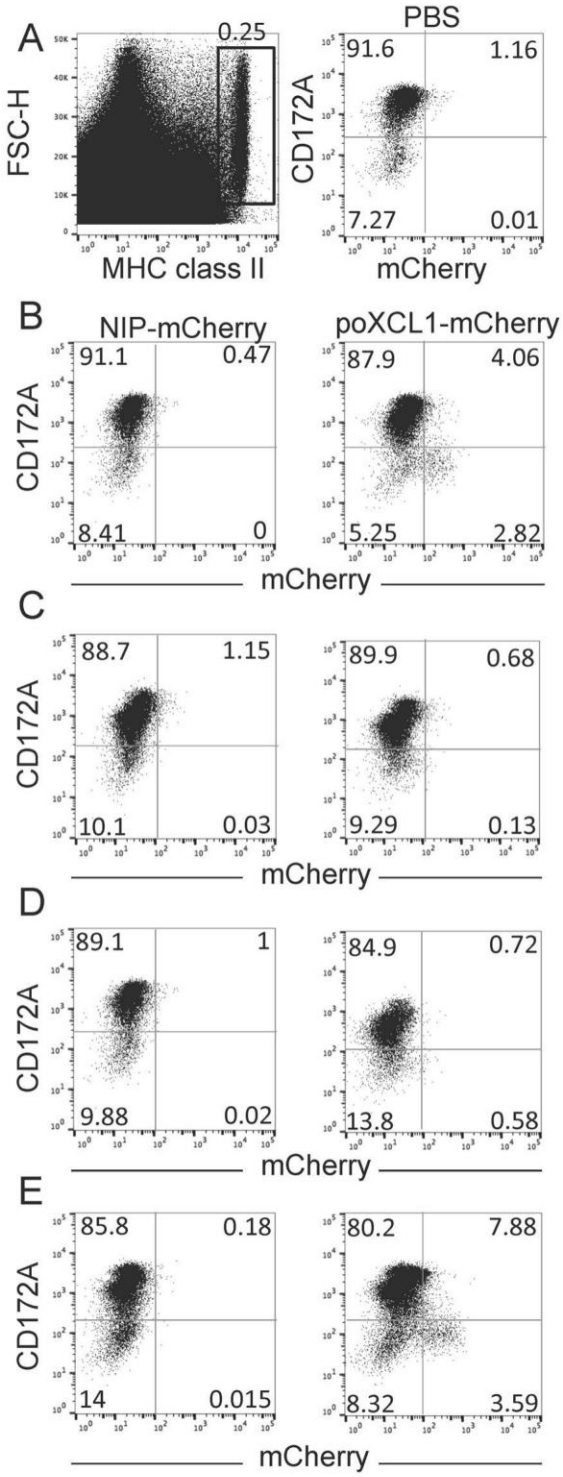



**Figure 1.** Selective targeting of pig skin cDC1 subset with poXCL1-mCherry upon intradermal injection with different adjuvant formulations. NIP-mCherry and poXCL1-mCherry (60 µg) were injected intradermally in different adjuvant formulations, skin cells were collected after 24 h by enzymatic dissociation and labeled for MHC class II and CD172A detection. $FSC^{high}$ and MHC class $II^{high}$ cells (cDC) were gated as shown in A (left panel) and their percentage among total extracted skin cells is indicated. The $FSC^{high}$ and MHC class $II^{high}$ gated cells were analyzed for CD172A and mCherry expression (in A (right panel) to E) and the percentage of each quadrant among gated cells is indicated. The injections are: in A (right panel), PBS; in B, plain VB; in C, VB formulated with SWE adjuvant; in D, VB formulated with CL + MPL; in E, VB formulated with NL + MPL.

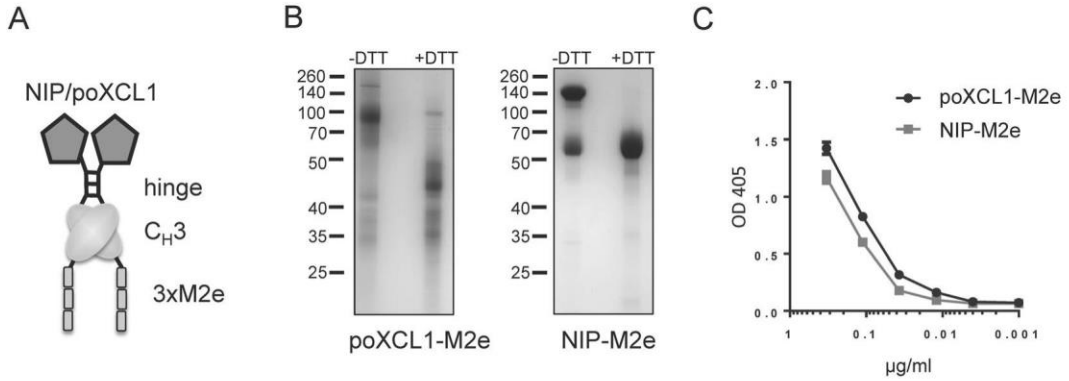



**Figure 2.** Characterization of poXCL1-M2e and NIP-M2e VB. In (**A**) the M2e VB consist of a targeting unit (poXCL1 or NIP), a dimerization domain with hinge and $CH_3$ from human IgG3 and an antigenic unit with three repeats of the M2e sequence. In (**B**) purified poXCL1-M2e (predicted size 33 kDa) and NIP-M2e (predicted size 48 kDa) were analyzed by SDS-PAGE under reducing (+DTT) and non-reducing (-DTT) conditions. In (**C**) normalized concentrations of purified poXCL1-M2e and NIP-M2e preparations were evaluated by ELISA, and detected using an antibody specific for the VB dimerization domain.

with the dimeric molecule. For poXCL1-M2e VB, the main band correlated to the dimeric molecule. We did however observe a more smeary background which is similar to previous observations with poXCL1-mCherry[26]. The concentration of the purified poXCL1-M2e and NIP-M2e VB were initially determined by BCA protein assay kit. In addition, to ensure equal amounts of VB in the two normalized protein preparations, an ELISA was performed where we detected the dimerization domain of the VB (Fig. 2C).

**XCR1 targeting with VB in skin enhances M2e immunogenicity in seronegative pigs.** poXCL1-M2e and NIP-M2e (0.25 or 2.5 µg, 6 pigs per groups, experiment 1) were inoculated intradermally into influenza seronegative piglets, in saline or in MPL + NL, twice at 28 days interval (D0 and D28). Serum samples were harvested at day 28 before the boost, and at day 56 and evaluated for the presence of M2e specific IgG. A tendency for higher IgG responses was obtained in the groups injected with poXCL1-M2e compared to NIP-M2e (Fig. 3A and B, $p < 0.05$ for the 2.5 µg condition without MPL + NL at D28, $p < 0.05$ for the 0.25 µg condition without MPL + NL at D56). No effect of MPL + NL addition nor of VB dose were found at both time points (Fig. 3A and B). In order to increase the statistical power, we compared the IgG titers in the sera of all the poXCL1-M2e versus the NIP-M2e inoculated pigs (Fig. 3C), as the doses and formulations were not confounding factors. After one injection, 6 sera out of 23 with titers above 1000 were found in the poXCL1-M2e and none in the NIP-M2e injected groups, only one pig out of 23 in the poXCL1-M2e and 5 pigs out of 23 in the NIP-M2e groups were not responding, and the IgG titers were superior in the poXCL1-M2e groups ($p < 0.05$). After 2 injections, 11 sera out of 23 with titers above 1000 were found in the poXCL1-M2e and 4 sera out of 23 in the NIP-M2e injected groups and the IgG titers were superior in the poXCL1-M2e groups ($p < 0.01$). Finally, commercial reagents exist to differentiate pig IgG1 and IgG2, which are distinct swine IgG isoforms separated by ion exchange chromatography[39]. Neither MPL + NL nor XCR1 targeting affected the IgG1 levels (Fig. 3D), however the IgG2 levels were enhanced by XCR1 targeting (Fig. 3E).

**XCR1 targeting with VB in skin enhances M2e immunogenicity in seropositive pigs.** As universal influenza vaccines are expected to be administered into individuals with pre-existing immunity against influenza, we immunized piglets presenting significant levels of anti-M2e IgG at D0, using 8 µg VB in 3 injections (at D0, 28 and 55, Experiment 2, Fig. 4A). In this case, since MPL + NL did not improve the vaccination efficacy, we used a pig CpG as an adjuvant. The pig CpG sequence used in this study contains the palindromic hexamer ATCGAT which was identified to be optimal for cytokine production by pig pDC[40,41] as well as for pig B cell activation[42] and it has been demonstrated to improve the immune responses in pigs *in vivo*[25]. The anti-M2e IgG titers were generally lower than in experiment 1. The group vaccinated with poXCL1-M2e with and without CpG showed higher anti-M2e IgG titers than the group vaccinated with NIP-M2e alone at D55 and D85, (Fig. 4A, $p < 0.05$). There was no clear differences between the titers measured at D85 versus D55, indicating that the third boost did not have much effect. CpG had a slight positive effect on the anti-M2e levels in the NIP-M2e vaccinated pigs, although the difference was not statistically significant, and CpG did not potentiate the anti-M2e titers seen with poXCL1-M2e. The level of pre-existing antibodies did not seem to compromise the anti-M2e responses induced by the poXCL1-M2e, as there was no negative correlation between pre-existing anti-M2e IgG and anti-M2e IgG at D85 (Fig. 4B). We further tested whether the VB structure (hinge, CH3 and M2e fusion) could have served as T cell antigens for eliciting $CD4^+$ or $CD8^+$ T responses. However, very scarce to no IFNγ-secreting cells were detected among total, $CD4^+$ or $CD8^+$ T cell-enriched splenic populations restimulated with overlapping peptides covering the VB structure (below 10 cells per 2.5 $10^5$ cells, Supplementary Fig. 2). While poXCL1-M2e preferentially induced IgG2 in seronegative pigs (Fig. 3), XCR1 targeting enhanced IgG1 titers, but not IgG2 titers, in the seropositive pigs, irrespective of the use of CpG (Fig. 4C and D). The anti-M2e IgG1 titers measured at D0 were slightly lower than the IgG2 titers (see Supplementary Fig. 3). Thus the anti-M2e IgG types of the pre-existing immunity, either resulting from infection or maternal antibodies, were slightly

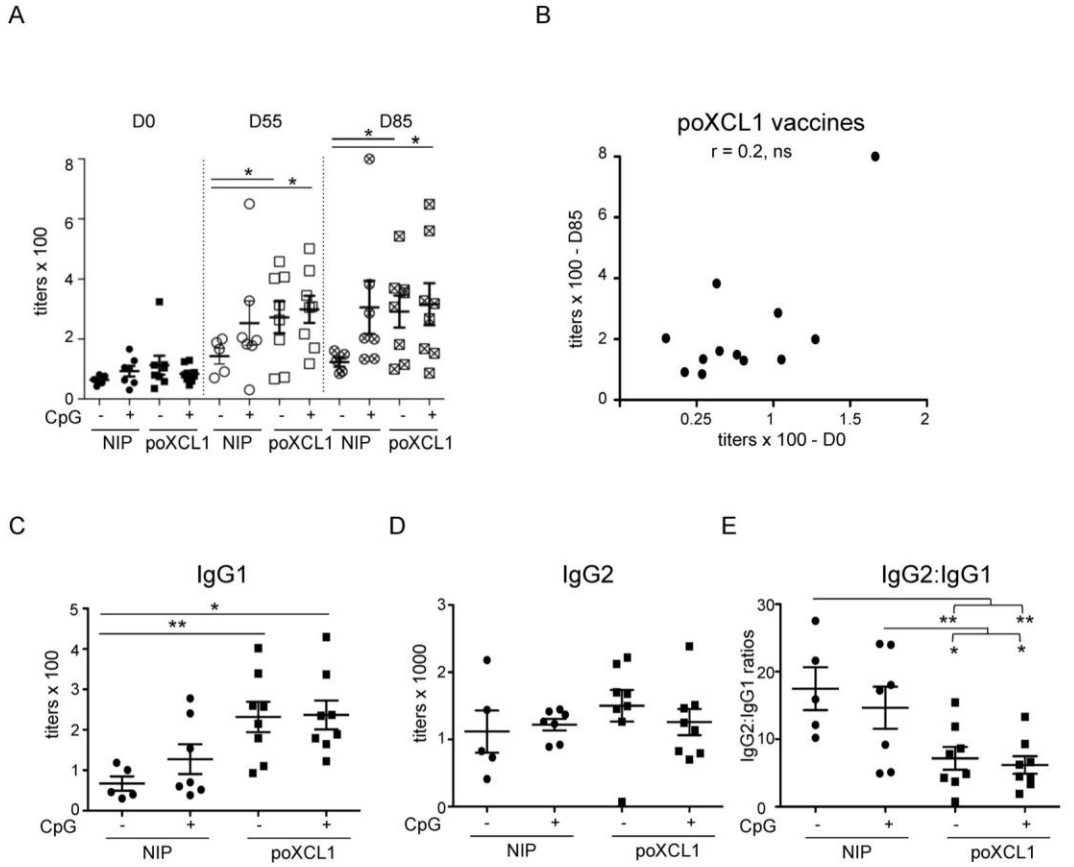



**Figure 4.** Effect of XCR1 targeting and CpG adjuvant on the anti-M2e IgG response in seropositive pigs. Pigs with pre-existing antibodies against M2e were inoculated 3 times intradermally (D0, 28, 55) with 8 µg poXCL1-M2e or NIP-M2e VB with or without CpG. In (**A**), the anti-M2e IgG titers obtained in the different groups at D0, D55 and D85 are shown. In (**B**), the D0 versus D85 anti-M2e IgG titers from poXCL1-M2e vaccinated pigs (with and without CpG) were plotted and correlation was estimated with a two-tailed Pearson test. In (**C** and **D**), the IgG1 and IgG2 anti-M2e titers at D85 are shown for the different groups. In (**E**) the IgG2 titer: IgG1 titer ratios are depicted. In all panels, each dot corresponds to individual pig values. Arithmetic means and standard errors of the mean are shown. Statistical significance between 2 groups was calculated with unpaired t-test (p values = * < 0.05; ** < 0.01).

IgG2 productions in pigs can be oriented by the immunological priming context, such as the combination of pre-existing immunity and XCR1 targeting. In mice, the presence of maternal Abs has an influence on the Th1–Th2 balance in the offspring[46] and XCR1 targeting preferentially orient Th1 responses[14]. The combination of the two factors has not been evaluated in this biologically relevant species.

The lack of detection of anti-M2e IgG in 5 pigs from the NIP-M2e vaccinated groups may be explained by their low capacity for VB antigen presentation in relation to their MHC haplotypes, a high activation threshold of their B cell receptors interacting with M2e epitopes and/or of their T cell receptors interacting with the VB peptides presented on their MHC molecules. The pigs used in this study, although not MHC typed, were likely to be heterogeneous at their MHC locus, given the breeding scheme used in the animal facility. XCL1-mCherry VB were shown in mice to remain at the cell membrane or be rapidly internalized upon interaction with XCR1, depending on the murine or human origin of XCL1[32]. Interestingly the persistence at the cell membrane was associated to higher capacity for antibody induction, possibly by increasing the duration of interaction with the BCR[32]. In addition, cDC1 excel in follicular T helper cell activation[11]. Whereas we do not know whether poXCL1-M2e is rapidly internalized or not, we can speculate that poXCL1-M2e interaction with pig cDC1 favors the crosstalk between cDC1, follicular T helper cells and B cells and thus bypass the threshold of BRC activation, even in the case of intrinsically poorly responding pigs to M2e antigen.

The enhancement of humoral responses with DC-targeted antigens in absence of additional adjuvants has been obtained in mice in several instances whereas the increase in T cell responses, and especially in $CD8^+$ T cell responses, required the combination with adjuvants[47]. The enhancement of the humoral responses without adjuvant depended on the targeted receptors and was observed for some antigen-targeted receptors, such as CIRE and FIRE[48] and CLEC9A[49], but not in the case of DEC205[49], DCIR2[50] or Dectin 1[51]. In addition, the lack of requirement for adjuvants appeared to depend on helper peptides available in the Ig backbone of the antibody used for targeting, such as motives in the IgG2a backbone in the case of C57BL6 mice[49]. Similarly in non-human primates, an increase of antibody response independently of adjuvant has been observed in the case of antigen

6. Flynn, B. J. *et al.* Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. doi:10.1073/pnas.1103869108 (2011).
7. Schlitzer, A., McGovern, N. & Ginhoux, F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol* **41**, 9–22, doi:10.1016/j.semcdb.2015.03.011 (2015).
8. Iborra, S. *et al.* Optimal Generation of Tissue-Resident but Not Circulating Memory T Cells during Viral Infection Requires Crosspriming by DNGR-1+ Dendritic Cells. *Immunity*. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.019 (2016).
9. Alexandre, Y. O. *et al.* XCR1+ dendritic cells promote memory CD8+ T cell recall upon secondary infections with Listeria monocytogenes or certain viruses. *J Exp Med* **213**, 75–92, doi:10.1084/jem.20142350 (2016).
10. Park, H. Y. *et al.* Evolution of B cell responses to Clec9A-targeted antigen. *Journal of immunology* **191**, 4919–4925, doi:10.4049/jimmunol.1301947 (2013).
11. Lahoud, M. H. *et al.* Targeting Antigen to Mouse Dendritic Cells via Clec9A Induces Potent CD4 T Cell Responses Biased toward a Follicular Helper Phenotype. *J Immunol* **187**, 842–850, doi:10.4049/jimmunol.1101176 (2011).
12. Bachem, A. *et al.* Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+ CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 1273–1281, doi:10.1084/jem.20100348 (2010).
13. Crozat, K. *et al.* The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 1283–1292, doi:10.1084/jem.20100223 (2010).
14. Fossum, E. *et al.* Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8(+) T-cell responses against influenza virus. *European journal of immunology* **45**, 624–635, doi:10.1002/eji.201445080 (2015).
15. Terhorst, D. *et al.* Laser-Assisted Intradermal Delivery of Adjuvant-Free Vaccines Targeting XCR1+ Dendritic Cells Induces Potent Antitumoral Responses. *Journal of immunology* **194**, 5895–5902, doi:10.4049/jimmunol.1500564 (2015).
16. Hartung, E. *et al.* Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells *in vivo* via murine or human XCR1. *J Immunol* **194**, 1069–1079, doi:10.4049/jimmunol.1401903 (2015).
17. Vu Manh, T. P. *et al.* Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics. *Front Immunol* **6**, 299, doi:10.3389/fimmu.2015.00299 (2015).
18. Neirynck, S. *et al.* A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* **5**, 1157–1163, doi:10.1038/13484 (1999).
19. El Bakkouri, K. *et al.* Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *Journal of immunology* **186**, 1022–1031, doi:10.4049/jimmunol.0902147 (2011).
20. Fan, J. *et al.* Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* **22**, 2993–3003, doi:10.1016/j.vaccine.2004.02.021.S0264410×04001835.
21. Van den Hoecke, S. *et al.* Hierarchical and Redundant Roles of Activating FcgammaRs in Protection against Influenza Disease by M2e-Specific IgG1 and IgG2a Antibodies. *J Virol* **91**, doi:10.1128/JVI.02500-16 (2017).
22. Harris, A. *et al.* Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 19123–19127, doi:10.1073/pnas.0607614103 (2006).
23. Jegerlehner, A., Schmitz, N., Storni, T. & Bachmann, M. F. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J Immunol* **172**, 5598–5605 (2004).
24. Westdijk, J. *et al.* Antigen sparing with adjuvanted inactivated polio vaccine based on Sabin strains. *Vaccine* **31**, 1298–1304, doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.076 (2013).
25. Linghua, Z., Xingshan, T. & Fengzhen, Z. *In vivo* effects of oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in the immune response to swine streptococcic septicemia vaccine in weaned piglets. *Mol Immunol* **44**, 1141–1149, doi:10.1016/j.molimm.2006.07.001 (2007).
26. Deloizy, C. *et al.* Expanding the tools for identifying mononuclear phagocyte subsets in swine: Reagents to porcine CD11c and XCR1. *Dev Comp Immunol* **65**, 31–40, doi:10.1016/j.dci.2016.06.015 (2016).
27. De Filette, M. *et al.* Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs. *Virology* **337**, 149–161 (2005).
28. Herve, P. L. *et al.* A novel subnucleocapsid nanoplatform for mucosal vaccination against influenza virus that targets the ectodomain of matrix protein 2. *J Virol* **88**, 325–338, doi:10.1128/JVI.01141-13 (2014).
29. Bernelin-Cottet, C. *et al.* A Universal Influenza Vaccine Can Lead to Disease Exacerbation or Viral Control Depending on Delivery Strategies. *Front Immunol* **7**, 641, doi:10.3389/fimmu.2016.00641 (2016).
30. Guzman, E. *et al.* Bovine gammadelta T Cells Are a Major Regulatory T Cell Subset. *Journal of immunology* **193**, 208–222, doi:10.4049/jimmunol.1303398 (2014).
31. Marquet, F. *et al.* Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. *J Immunol* **193**, 5883–5893, doi:10.4049/jimmunol.1303150 (2014).
32. Gudjonsson, A. *et al.* Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1+ Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses. *J Immunol*. doi:10.4049/jimmunol.1601881 (2017).
33. Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P. A. & Kurts, C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* **316**, 612–616, doi:10.1126/science.1137971 (2007).
34. Trumpfheller, C. *et al.* The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2574–2579 (2008).
35. Bonifaz, L. C. *et al.* *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* **199**, 815–824 (2004).
36. Joffre, O. P., Sancho, D., Zelenay, S. & Keller, A. M. & Reis e Sousa, C. Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4+ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A. *Eur J Immunol* **40**, 1255–1265, doi:10.1002/eji.201040419 (2010).
37. Alving, C. R., Peachman, K. K., Rao, M. & Reed, S. G. Adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol* **24**, 310–315, doi:10.1016/j.coi.2012.03.008 (2012).
38. Deng, L., Cho, K. J., Fiers, W. & Saelens, X. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines (Basel)* **3**, 105–136, doi:10.3390/vaccines3010105 (2015).
39. Butler, J. E., Wertz, N. & Sinkora, M. Antibody repertoire development in swine. *Annu. Rev. Anim. Biosci* **5**, 3.1–3.25, doi:10.1146/annurev-animal-022516-022818 (2017).
40. Hasslung, F. C. *et al.* Identification of a sequence from the genome of porcine circovirus type 2 with an inhibitory effect on IFN-alpha production by porcine PBMCs. *J Gen Virol* **84**, 2937–2945, doi:10.1099/vir.0.19362-0 (2003).
41. Guzylack-Piriou, L., Balmelli, C., McCullough, K. C. & Summerfield, A. Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. *Immunology* **112**, 28–37 (2004).
42. Van der Stede, Y., Verdonck, F., Verfaillie, T., Goddeeris, B. M. & Cox, E. Porcine-specific CpG-oligodeoxynucleotide activates B-cells and increases the expression of MHC-II molecules on lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* **105**, 115–124, doi:10.1016/j.vetimm.2004.12.020 (2005).
43. Andrews, S. F. *et al.* High preexisting serological antibody levels correlate with diversification of the influenza vaccine response. *J Virol* **89**, 3308–3317, doi:10.1128/JVI.02871-14 (2015).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license 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 license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

**Titre :** Développement d'un vaccin à ADN optimisé contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez le mouton

**Mots clés :** Fièvre de la vallée Rift, Vaccination à ADN, Cellules dendritiques, scFv, DEC205, CD11c

**Résumé :** Transmis par les moustiques, le virus de la fièvre de la vallée du Rift (vFVR) est un virus zoonotique qui affecte principalement les ruminants en Afrique et conduit à des pertes économiques importantes. Il n'existe actuellement pas de traitements et les seuls vaccins disponibles sont à usage vétérinaire. Le développement de nouveaux vaccins plus sûrs contre le vFVR est une priorité de l'OMS en raison du risque d'émergence de cet arbovirus dans d'autres continents. Dans cette étude, nous avons développé une vaccination à ADN optimisée contre le vFVR qui consiste à administrer par voie cutanée un plasmide codant pour l'ectodomaine de la glycoprotéine de surface Gn du vFVR (eGn) en présence d'un plasmide adjuvant codant le GM-CSF et combinée avec une électroporation. De plus, nous avons également optimisé la vaccination à ADN en l'associant à la stratégie de ciblage des cellules dendritiques (DCs) via un plasmide qui code des fragments d'anticorps scFv fusionnés avec l'eGn dirigés contre les récepteurs DEC205 et CD11c exprimés à la surface des DCs. Les vaccins ont été testés chez le mouton, hôte naturel du virus et dans le modèle murin pour étudier les mécanismes de protection. Dans nos deux modèles d'études, l'immunisation par le plasmide codant l'eGn confère une meilleure protection après une épreuve virale ainsi qu'une forte production d'anticorps non neutralisants par rapport au ciblage des DCs. En revanche, le ciblage d'eGn vers des récepteurs de DCs protège partiellement contre une épreuve virale et induit une immunogénicité différente dans les deux espèces. Nous avons confirmé le rôle protecteur de ces anticorps anti-eGn par un transfert passif dans le modèle murin et le mécanisme d'action de ces anticorps protecteurs reste encore à être déterminé. Notre étude montre pour la première fois la protection par un vaccin à ADN contre le vFVR chez le mouton.

**Title :** Development of an optimized DNA vaccination against the Rift valley fever virus in sheep

**Keywords :** Rift valley fever, DNA vaccination, Dendritic cell, scFv, DEC205, CD11c

**Abstract :** The Rift valley fever virus (RVFV) is a mosquito-borne virus that mainly affect ruminants in Africa, resulting in economic burden. There is currently no treatment and only vaccine for veterinary use against the RVFV are available. The development of new and safer vaccine is urgently needed due to the risk of introduction of this arbovirus to other continents. In the present work, we developed an optimized DNA vaccination against RVFV using a plasmid encoding the ectodomain of surface glycoprotein Gn (eGn) of RVFV into the skin with plasmid adjuvant encoding GM-CSF and electroporation in sheep. We further optimized the DNA vaccination using dendritic cell targeting strategy with a plasmid encoding a single chain fragment variable (scFv) fused with eGn directed to two DC receptors, DEC205 and CD11c. The efficacy of the vaccines were tested in the sheep, the natural host and in the mouse model to investigate the mechanism of protection. In both models non-targeted eGn vaccine confer a better clinical protection and higher non-neutralizing antibody production than DC-targeted vaccine. However, in both models eGn targeting to DEC205 differentially affected the immune response and induced a partial protection after a challenge. We further demonstrated that non-neutralizing antibodies induced by native eGn protect mice by passive transfer. The mechanism mediated by these antibodies remains to be investigated. Overall, this work indicates the proof of concept that DNA vaccine can confer protection against the RVFV in the sheep.