

e Efficacités sur dilutions de plasmides

Mesure des efficacités sur dilutions de plasmides. Dans le cadre de l'optimisation de la qPCR, différentes concentrations d'amorces et de sondes sont testées sur des dilutions en cascade des différents plasmides (section 3.4.7 page 63). On en mesure systématiquement les efficacités (section 3.4.8 page 67). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 – Variation des concentrations en amorces et sonde. Conséquence sur l'efficacité de la qPCR.

Concentrations (μM)		Efficacités (%)		
Sonde	Amorce	IL-4	IFN γ	GAPDH
0.1	0.1	84.7	105.1	Infini
0.2	0.1	106.3	108.4	Infini
0.1	0.2	83.9	117.5	109
0.2	0.2	94	124.3	99.2

En ce qui concerne IFN γ , une concentration de 0.1 μM pour les amorces comme pour la sonde, donne une efficacité plus proche de 100 % (105,1 %) que les trois autres combinaisons (108.4 %, 117.5 %, 124.3 %). Dans le cas d'IL-4 comme GAPDH, 0.2 μM de concentration finale pour les amorces et les sondes contribue à une efficacité de PCR plus proche de 100 % (94 % pour IL-4 et 99.2 % pour GAPDH) que les trois autres combinaisons (84.7 %, 106.3 % et 83.9 % pour IL-4, et 109 % pour GAPDH, une concentration d'amorces de 0.1 μM ne donne aucun résultat).

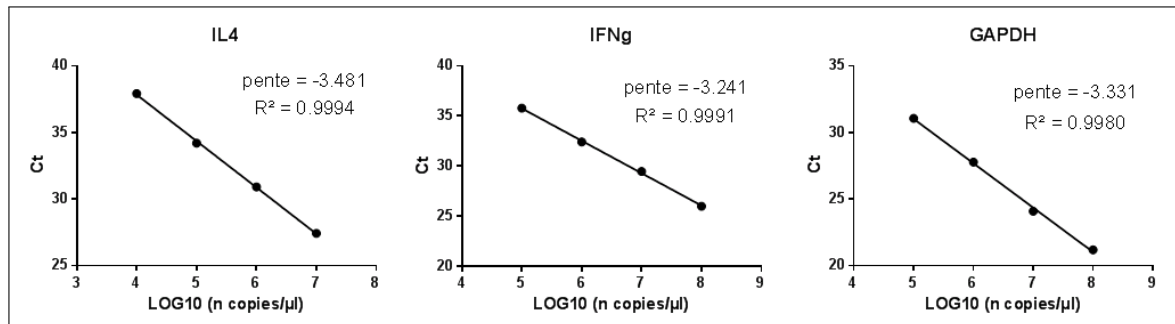


FIGURE 4.1 – **Efficacité des PCR sur plasmides.** Ct obtenus après amplification des cibles IFN γ (concentrations finales en amorces et sonde de 0.1 μM), IL-4 et GAPDH (avec concentrations finales en amorces et sonde de 0.2 μM), en fonction du nombre de copies des plasmides dilués en cascade au dixième.

La représentation des Ct, en fonction de la concentration en plasmides (logarithme en base 10 du nombre de copies/ μL) amplifiés par des qPCR optimisées nous permet

d'observer figure 4.1, une corrélation importante (R^2 proche de 1 pour les 3 cibles)¹ avec des concentrations en amorces et en sonde de 0.1 μM pour IFN γ , et de 0.2 μM pour IL-4 et GAPDH.

En ce qui concerne IFN γ , entre 10^5 et 10^8 copies/ μL , la pente de la droite est de -3,241 ce qui correspond à une efficacité de 2,05 soit 105 % (selon les formules 3.2 et 3.3 page 67).

Pour IL-4, entre 10^4 et 10^7 copies/ μL , on observe une pente de -3,481 ce qui fait une efficacité de 1,94 soit 94 %.

Pour GAPDH, entre 10^5 et 10^8 copies/ μL , la pente est de -3,331, ce qui correspond à une efficacité de 2,00 soit 100 %.

Mesure des efficacités sur dilutions de cDNA. Des dilutions de cDNA sont ensuite réalisées (voir section 3.4.4 page 58) à partir d'ARN extrait (voir section 3.4.3 page 57) de PBMC de chiens (protocole 2b, prélèvement sanguin de J13, section 3.1.4 page 32), et les qPCR réalisées selon la méthode optimisée.

Aucun des ARN rétrotranscrits sans la présence de rétrotranscriptase (NoRT), n'a présenté d'amplification (absence de Ct) et ce, quelle que soit la cible. Le traitement à la DNase lors de la rétrotranscription, est suffisant pour éliminer toute amplification génomique.

Les Ct ont été représentés figure 4.2, en fonction du logarithme en base 10 de la concentration en nanogrammes par microlitre d'ARN total (de l'échantillon initial et de ses concentrations théoriques après dilutions en cascade).

Les résultats figure 4.2 représentant les Ct en fonction du logarithme en base 10 de la concentration en nanogrammes par microlitre d'ARN total (de l'échantillon initial et de ses concentrations théoriques après dilutions en cascade), permettent d'observer des corrélations importantes (R^2 proche de 1) pour les 3 cibles.

Une pente de -3,608 pour IFN γ entre 0.01116 ng/ μL et 27,9 ng/ μL (Ct allant de 25.5 à 37.9) permet de calculer une efficacité de 1,89 soit 89 %.

En ce qui concerne IL-4, une pente de -3,2777 correspond à une efficacité de 2,02 soit 102 % constatée entre 0.01116 ng/ μL et 27,9 ng/ μL (Ct allant de 25.7 à 33.3).

Pour GAPDH, une pente de -3,3567 correspond à une efficacité de 1,99 soit 99 % est observée entre 0.00112 ng/ μL et 27,9 ng/ μL (Ct allant de 21.9 à 36.9).

Ces efficacités, proches de 100 % (ou 2), sont utilisées dans les calculs d'expression des gènes cibles décrits section 3.4.9 page 67) dans la formule 3.4.9 : en résumé pour IFN γ : 1.89, pour IL-4 : 2.02 et pour GAPDH : 1.99.

1. Plus le coefficient de corrélation R^2 est proche de 1 plus les points sont alignés sur une droite

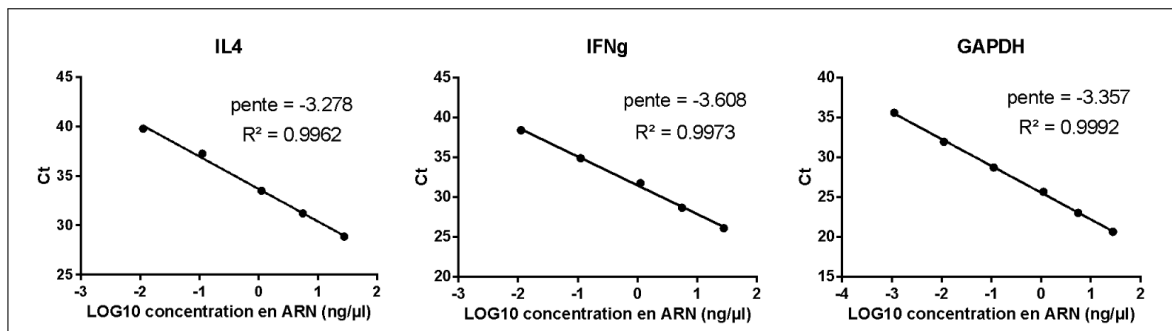


FIGURE 4.2 – **Efficacité des PCR sur cDNA.** Ct obtenus après amplification des cibles IFN γ (concentrations finales en amorces et sonde de 0.1 μ M), IL-4 et GAPDH (avec concentrations finales en amorces et sonde de 0.2 μ M), en fonction de la concentration en ARN théorique correspondant aux cDNA pur, dilués en cascade au dixième.

Ces efficacités correspondent à des gammes de Ct allant de 26.4 à 38.4 pour IFNg, de 28.9 à 39.8 pour IL-4 et de 20.6 à 31.9 pour GAPDH représentant les limites de l'utilisation de cette méthode.

4.2 Profil d'expression des cytokines après stimulation polyclonale

Une étude dose réponse est réalisée, en stimulant *in vitro* 2.10^6 PBMC des chiens du protocole clinique 2b prélèvement sanguin J3 (section 3.1.4 page 32), avec des concentrations croissantes en ConA, durant 6 h.

Les résultats de qPCR figure 4.3, permettent d'observer une augmentation de l'expression de IFN γ et IL-4, avec l'augmentation de la concentration en concanavaleine A. Un maximum d'expression est observable à une concentration de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ratio de 1250 pour IL-4 et 950 pour IFN γ). Un ratio de 400 pour IL-4 et 250 pour IFN γ est également significatif avec une concentration de 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

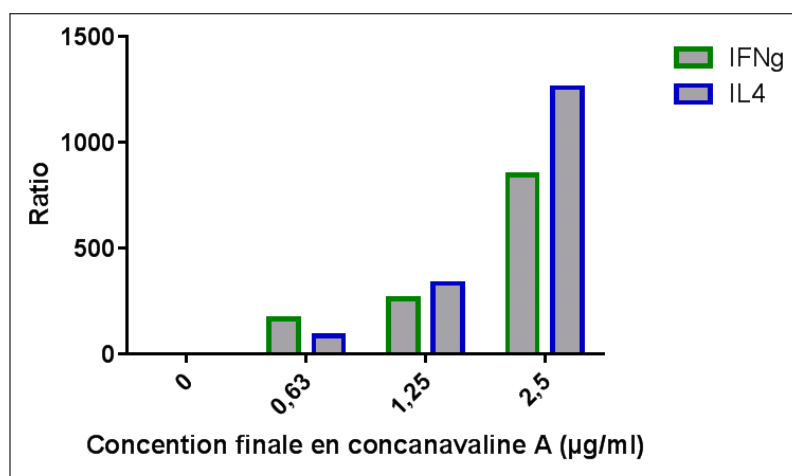


FIGURE 4.3 – Variation de l'expression des gènes de IFN γ et IL-4 lors d'une étude réponse à la concanavaleine A après 6h d'incubation Graphique représentant les ratios en fonction de la concentration en ConA. Les barres représentent les médianes et les traits horizontaux représentent les écarts interquartiles. Les écarts sont significatifs à une erreur de 5 %. Une ligne discontinue représente un ratio de 2. Certains scientifiques admettent comme significatif un ratio supérieur à 2.

Une cinétique a été réalisée sur les mêmes cellules que précédemment à une concentration finale en ConA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durant, 6 h, 24 h et 48 h.

Une très forte surexpression de IFN γ et IL-4, est observée figure 4.4 avec une concentration de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConA à 6 h (ratio supérieur à 900), 24 h et 48 h (significatives supérieures à un facteur 30).

la qPCR dans les conditions décrites plus haut, nous permet de mesurer une surexpression des transcrits de IFN γ et IL-4 après stimulation des PBMC avec un antigène polyclonal.

Des études dose réponse à la ConA et une cinétique, ont permis de déterminer que

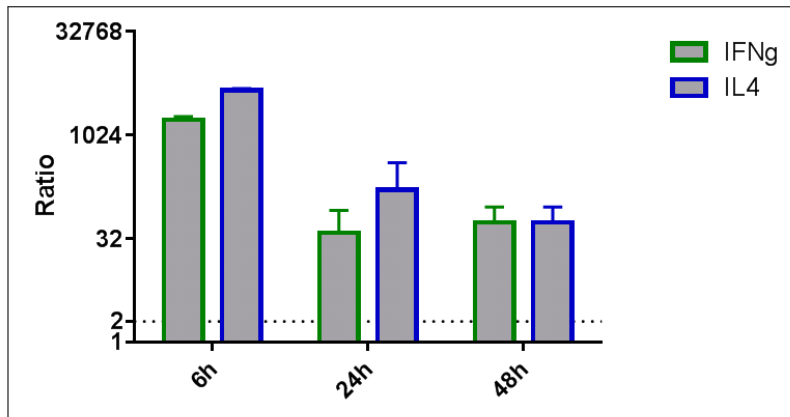


FIGURE 4.4 – Cinétique d'expression de IFN γ et IL-4 en fonction du temps après stimulation avec une concentration finale en ConA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Graphique représentant les ratios en fonction du temps. Les barres représentent les médianes et les barres horizontales, les écarts interquartiles. Les écarts sont significatifs à une erreur de 5 %. Une ligne discontinue représente un ratio de 2. Certains scientifiques admettent comme significatif un ratio supérieur à 2.

l'utilisation de la ConA comme contrôle positif de la qualité des cellules et de la stimulation semble possible avec une concentration finale en ConA de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 6 h d'incubation, 24 h ou 48 h, voir 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 6 h.

Ces résultats sont en adéquation totale avec une étude équivalente réalisée par RT-qPCR sur des cellules de chiens, avec un autre gène de référence (β -Actine) (Saldarriaga et al., 2006).

Les méthodes de prélèvement sanguin, isolement de PBMC, congélation et décongélation mises en place sur les cellules du protocole 2b, semblent adaptées car elles ont été capables de préserver les capacités des PBMC à recruter leur fonction sécrétrices de cytokines et ce, après quatre années de stockage en azote liquide.

4.3 Profil d'expression des cytokines après stimulation spécifique

Validation des cellules et de l'antigène de référence Un ELISPOT IFN γ (protocole décrit section 3.3.5 page 52) est réalisé sur les PBMC des animaux du protocole clinique 1 (section 3.1.3 page 31) dans les conditions de stimulations décrites section 3.2.4 page 46.

Préalablement, les PBMC sont analysées après isolement (protocole technique section 3.2.1 page 38), avec la technique du marquage au VIVID pour cytomètre en flux (voir section 3.2.1 page 42).

Les résultats du test VIVID (figure 4.5 nous permet de voir sur la figure de gauche, la présence de nombreux lymphocytes (SSC entre 0K et 50K, FSC entre 50K et 100K) et de monocytes (SSC entre 100K et 250K, FSC entre 80K et 150K). Ces deux populations représentent environ 67 % des cellules. On constate quelques débris cellulaires (SSC entre 0K et 50K, FSC entre 0K et 50K).

Ces proportions sont comparables à celles des PBMC Humaines selon [Silva et al. \(2013\)](#).

Lorsque l'on focalise l'analyse du marquage au VIVID sur les lymphocytes et monocytes (figure 4.5 droite), on constate une très faible mortalité (environ 0,237 %).

Ces résultats sont comparables pour tous les animaux de ce protocole)

En ce qui concerne les résultats bruts de l'ELISPOT (tableau 4.2 et photos figure 8 en annexe) les puits des cellules non stimulées présentent entre 0 et 4 spots pour les chiens vaccinés (2 ou 3 spots en moyenne) et 0 spot pour les 2 puits concernant les chiens naïfs. Le PA FCV fait apparaître 2 spots dans un puits seulement (animal 1), pour ce qui est des chiens vaccinés et aucun pour les chiens non vaccinés.

Tableau 4.2 – **Nombre de spots obtenus lors de l'essai avec les cellules de référence.** Données brutes après passage au lecteur automatique et réinterprétation d'un technicien expérimenté.

Traitement \ Animaux	Vaccinés				Naïfs	
	1	2	3	4	1	2
NA	4	1	0	4	0	0
FCV	2	0	0	0	0	0
PA rage	28	11	19	18	0	1
PMA/iono	79	52	33	64	31	72

Les puits ayant contenu les PBMC des chiens vaccinés et non vaccinés, stimulés avec PMA/iono semblent montrer un nombre important de spots : entre 33 et 79 (moyenne de

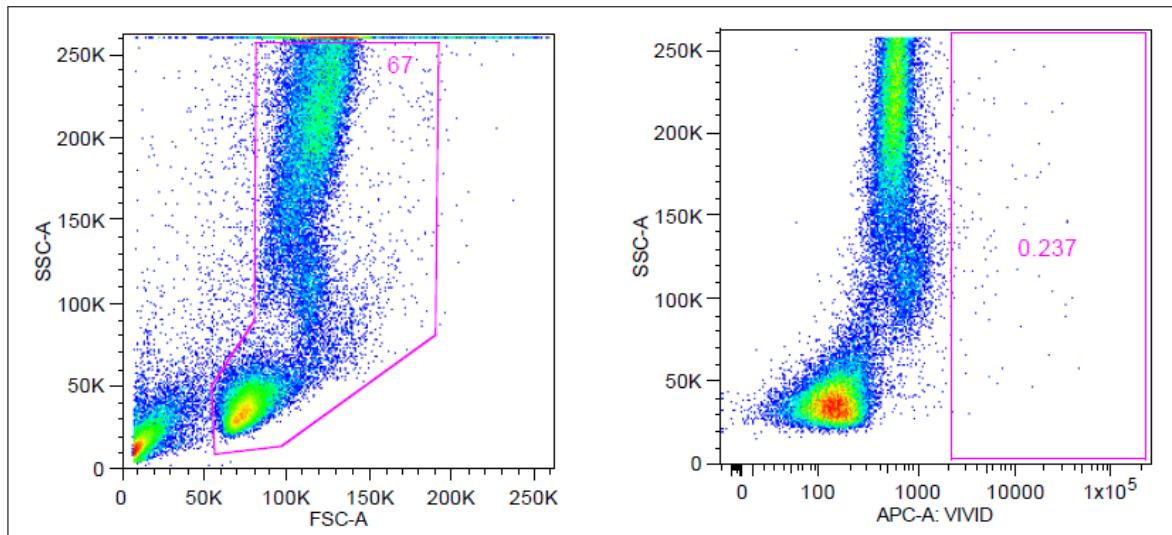


FIGURE 4.5 – **Caractérisation des cellules de référence.** Coloration spécifique au marqueur VIVID et mesure par cytométrie en flux. Chaque point représente une cellule. Dans le cadre de gauche : Les cellules sont placées selon leur complexité des cellules ou granulométrie (FSC-A en abscisse) et leur taille (SSC-A en ordonnée). Dans le cadre de droite : Les cellules sont placées selon leur rayonnement (APC-A VIVID en abscisse) et leur taille (SSC-A en ordonnée).

57) pour les chiens vaccinés et 31 et 72 pour les chiens naïfs (moyenne de 51).

Les cellules de chiens vaccinés semblent avoir fortement répondu avec le PA rage avec un minimum de 11 spots et un maximum de 28. Quant aux PBMC des chiens non vaccinés, un seul puits ne présente qu'un seul spot (voir résultats bruts tableau 4.2).

En ce qui concerne les cellules non stimulées et ce, quel que soit le statut vaccinal des chiens, avec un nombre de spots compris entre 0 et 4 spots, on considère ces résultats comme le bruit de fond dû à la manipulation en elle-même ainsi qu'aux interprétations de lecture de l'opérateur.

La variation du nombre de spots pour FCV se trouve dans le bruit de fond et l'on considère donc une réponse non représentative. Ce point est confirmé pour les chiens vaccinés, par l'analyse statistique qui ne montre pas de différence significative avec le groupe de cellules non stimulées. En ce qui concerne les chiens non vaccinés, on peut réaliser un test de Mann-Whitney entre la réponse FCV des chiens vaccinés et celle des chiens non vaccinés. Ce traitement ne montre pas de différence significative cependant, ce test n'est pas très robuste (test au risque $\alpha = 20\%$). Le traitement PMA/iono sur les cellules de tous les chiens, induit une réponse très forte chez les animaux vaccinés et naïfs.

Sur la figure 4.6 sont représentées les réponses T, au traitement (nombre de spot du traitement – nombre de spot des non stimulées) en nombre de spots.

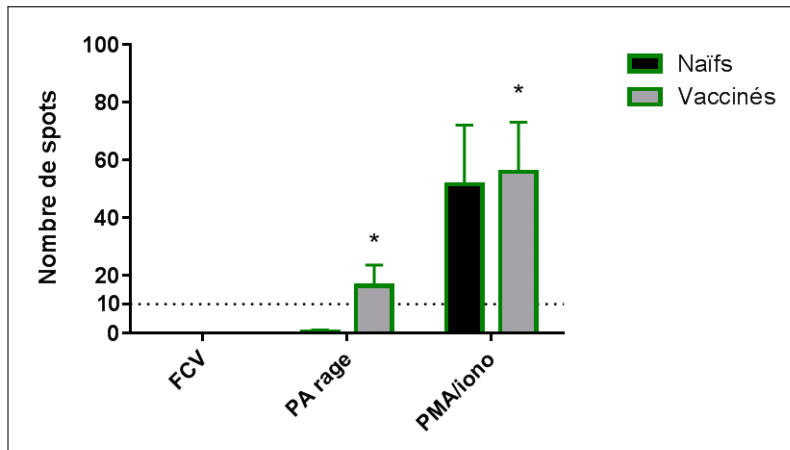


FIGURE 4.6 – Réponse cellulaire Th1, de PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé) en ELISPOT $IFN\gamma$ après stimulation spécifique. Représentation graphique des différences, pour chaque traitement avec la moyenne du nombre de spots sans traitement. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : P -value <0.05, (**) : P -value <0.01. Les barres représentent les medienes et les tirets, les troisièmes quartiles.

Après un test de Mann-Whitney entre chiens vaccinés et naïfs, pour le traitement FCV aucune différence n'a été montrée. De même, il n'y a pas de différence entre PBMC de chiens naïfs et vaccinés pour ce qui est du nombre de spots avec une stimulation avec PMA/iono. Par contre une différence significative a été calculée pour ce qui est du traitement avec le PA rage.

L'antigène stimule bien de façon spécifique les cellules des chiens vaccinés contrairement aux chiens naïfs. On peut considérer l'ELISPOT comme méthode de référence. Les cellules donnent de bons résultats à l'état frais. On ne sait pas si après congélation et décongélation elles montreraient les mêmes résultats.

L'antigène de référence peut être utilisé pour stimuler *in vitro* de façon spécifique, les PBMC de chiens vaccinés avec un vaccin inactivé, par voie parentérale. On ne sait pas s'il en est de même pour des PBMC de chiens vaccinés avec un vaccin vivant atténué par la voie parentérale.

Sur ces mêmes cellules fraîches de ce protocole expérimental animal (protocole 1), on réalise en parallèle une stimulation en plaque de culture selon le protocole de stimulation section 3.2.4 page 47.

La réponse en $IFN\gamma$ (figure 4.7), représentée par une soustraction des concentrations en protéines sécrétées dans le surnageant des cellules non stimulées, et celles dont les cellules ont été stimulées, est très différente de la réponse en ELISPOT. En effet, il semble y avoir une augmentation de la sécrétion par les cellules de chiens vaccinés et naïfs avec le

PA rage. Cependant, le contrôle PMA/iono ne montre pas de réponse sur les chiens naïfs, contrairement aux cellules de chiens vaccinés.

Aucune autre cible ne semble montrer un profil « intéressant », excepté IL8 dont la stimulation avec PMA/iono montre une réponse satisfaisante pour les cellules de chiens vaccinés et naïfs. Comme pour $IFN\gamma$ en revanche, même si elle semble faible, une augmentation de la sécrétion semble être montrée avec le PA rage. IL8 est surexprimée avec le PA rage, chez les cellules de chiens vaccinés contre la rage.

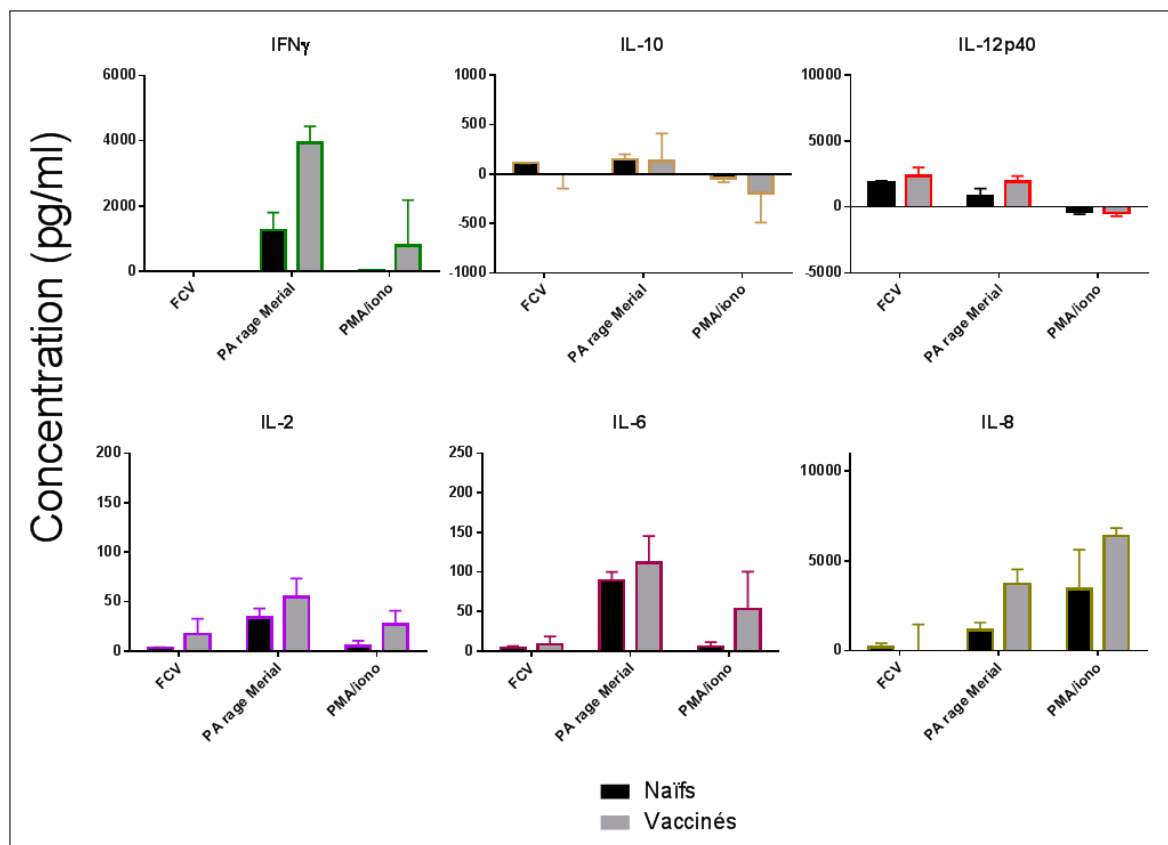


FIGURE 4.7 – Expressions en protéines $IFN\gamma$ et autres cibles, avec la technique Luminex après stimulation spécifique des PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé). Représentation graphique des différences pour chaque traitement avec les concentrations sans traitement. Les barres représentent les medianes et les tirets, les troisièmes quartiles.

IL-8 est une chimiokine sécrétée par les macrophages et autres cellules endothéliales. Je pense qu'il s'agit d'un signal bruit de fond. Il n'y a pas eu de réplicat technique ce qui rend l'interprétation difficile. Cela présage tout de même une grande variabilité de réponse à ce niveau d'expression.

Les résultats obtenus par qPCR (figure 4.8, les expressions des gènes de $IFN\gamma$ et IL-4), nous montrent qu'à 72 h, les PBMC de chiens vaccinés et naïfs, semblent exprimer $IFN\gamma$

après stimulation au PA rage, plus que les cellules non stimulées (différence significative par rapport à un ratio de 1, pour les chiens vaccinés). En revanche PMA/iono semble ne pas surexprimer les gènes de IFN γ dans ces conditions. Pour IL-4 aucun traitement ne montre de surexpression.

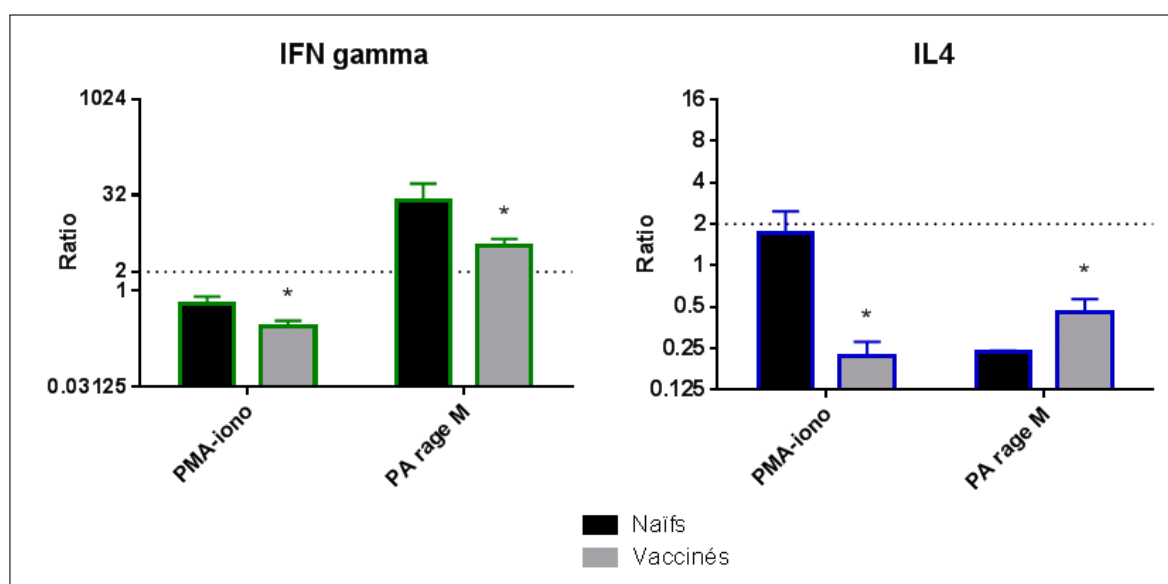


FIGURE 4.8 – Expressions des transcrits de IFN γ et IL-4 en qPCR, après stimulation spécifique des PBMC du protocole 1 (vaccin inactivé). Représentation graphique des expressions en ratio, pour chaque traitement par rapport aux cellules non traitées. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : *P-value* < 0.05, (**) : *P-value* < 0.01. Les barres représentent les medianes et les tirets, les troisième quartiles en ordonnée est représenté l'expression en ratio.

Il est possible que 72 h ne soit pas un temps d'incubation adéquat, pour observer une réponse spécifique à la rage dans ces conditions.

Expression des ARNm après activation avec l'antigène spécifique En effet, l'expression des transcrits et la sécrétion des cytokines n'étant pas homogène dans le temps [Listvanova et al. \(2003\)](#). Une cinétique d'expression des cytokines, est réalisée pour déterminer le temps idéal et optimiser la méthode (voir section 3.2.4 page 47).

Un titrage de RVNA selon la méthode de titrage FAVN test (section 3.3.1 page 48) a donné des valeurs de 6,01 ; 7,91 et 10,5 UI/mL respectivement pour A, B et C. Ces animaux sont considérés comme vaccinés avec des virus vivants. à J35 A : 281, B : 830 et C : 31.6 UI/mL.

Les titres intermédiaires sont considérés comme très forts : entre 6,01 et 281 UI/mL pour A, 7,91 et 830 UI/mL pour B et entre 10,5 et 31.6 UI/mL pour C.

Après un diagnostic post-mortem, les animaux n'ont pas montré de particule virale, qu'elle soit infectieuse ou pas.

On étudie alors le profil d'expression de $\text{IFN}\gamma$ et IL-4 pour PA rage sur 3 réplicats techniques de 1.10^6 cellules d'un lot provenant de chiens hyperimmunisés avec un vaccin vivant (protocole 2) en réalisant une cinétique à 3 h, 6 h et 48 h. En parallèle on stimule un puits avec des cellules et de la ConA ($2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 6 h et 48 h.

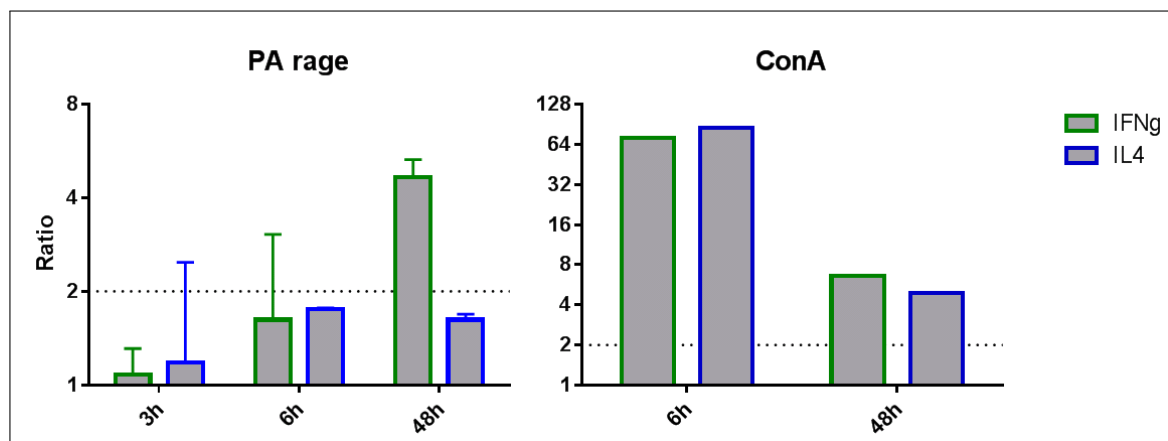


FIGURE 4.9 – Profil d'expression de $\text{IFN}\gamma$ et IL-4 après stimulation avec le PA rage et ConA. Les barres représentent les médianes et les tirets, les troisième quartiles.

Les résultats de la cinétique par qPCR (figure 4.9) montrent qu'il semblerait que 48 h soit un temps d'incubation permettant d'obtenir une expression significative pour $\text{IFN}\gamma$.

En ce qui concerne IL-4 dans ces conditions, une surexpression n'est pas observée.

Il s'agit d'un essai sur une faible quantité de cellules (en effet, les pertes de cellules à la décongélation, selon les lots de cellules sont parfois importantes). Il eut fallu plus de réplicats biologiques et technique pour conclure avec plus d'assurance. On retient tout de même le temps de 48 h pour privilégier le signal $\text{IFN}\gamma$.

Par contre on ne peut pas conclure sur la spécificité du signal pour cause d'absence de témoins animaux naïfs.

Le temps choisi pour les stimulations sera de 48h, en effet même si le test n'est pas significatif, il semble se profiler qu'il en soit ainsi. De plus, sur le modèle vulpin de [Lambot et al. \(2001\)](#), les stimulations *in vitro* des PBMCs de renards vaccinés ayant permis de montrer sur certains animaux une surexpression de $\text{IFN}\gamma$ et IL-4, ont été réalisées avec une incubation de 48h.

Dans le cadre de l'utilisation de la qPCR pour mesurer des expressions de gènes, il est important de valider l'utilisation du gène de référence pour l'utiliser dans les calculs.

Il faut dans un premier temps, que les efficacités des qPCR des cibles, soient proches de celle du gène de référence. Une façon de le montrer est de réaliser un ΔCt (cible-gène de référence), sur des dilutions d'un même échantillon en fonction de la concentration en ARN. On valide la condition quand la pente de la régression linéaire est inférieure en valeur absolue à 0.1 (ref: https://www.institutcochin.fr/core_facilities/genome-sequencing-studies/pcr-quantitative/la-theorie-de-la-pcr-quantitative)

Sur la figure 4.10, on voit que les delta ΔCt (IFNg-GAPDH) et (IL4-GAPDH) en fonction de la concentration en ARN montrent des régressions linéaires dont les pentes sont inférieures en valeur absolue, à 0.1.

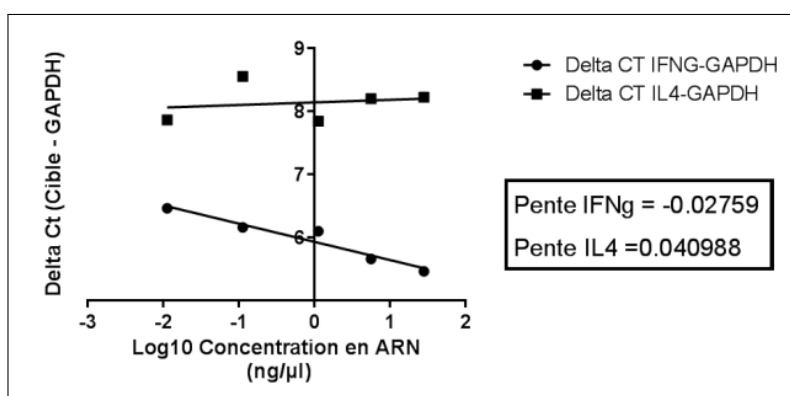


FIGURE 4.10 – Critère de validation de l'utilisation de GAPDH comme gène de référence : efficacité proche, avec les cibles. Représentation graphique des ΔCt (Cible - GAPDH), sur des dilutions croissantes d'un même échantillon, en fonction du \log_{10} de la concentration en ARN. Une pente résultante de la régression linéaire inférieure à 0.1, est un critère de l'utilisation de GAPDH en tant que gène de référence.

Validation du gène de référence De même, il faut que le gène de référence ne soit pas impacté par le traitement (Johnson et al., 2014).

Sur la figure 4.11 sont représentés graphiquement les ΔCt (traitement-NA), en fonction du traitement d'une série de stimulations à 48h, de cellules de chiens vaccinés (protocole 2). On montre que, pour PMA/iono, le traitement impacte l'expression du gène de référence. Ceci peut s'expliquer par une mise en mitose rapide des cellules d'où une diminution des Ct pour les cellules traitées.

Pour FCV, aucune variation n'est montrée. Pour PA rage, une hausse significative est à constater. Par contre celle-ci est très faible (inférieure à 0.5 Ct en moyenne).

Il peut-être remarqué que le choix de transférer un volume fixe d'ARN pour la rétrotranscription (voir section 3.4.4 page 58) et non pas une quantité d'ARN n'a pas été inapproprié. En effet, figure 4.11 on peut observer globalement une dispersion assez faible des valeurs moyennes des Ct de GAPDH de 13 animaux différents.

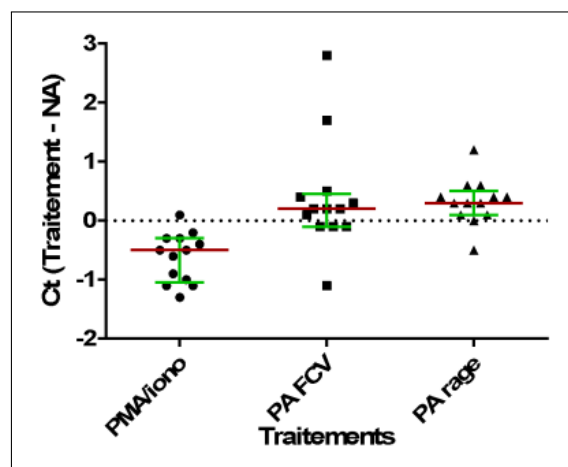


FIGURE 4.11 – Critère de validation de l'utilisation de GAPDH comme gène de référence : Absence de variation des Ct de GAPDH en fonction du traitement.

4.4 Détection de l'immunogenicit  cellulaire antira- bique par qPCR

A la lumière des résultats obtenus jusque là, il semble possible de mesurer l'expres-
sion des cytokines IFN γ après stimulation spécifique de 1.10^6 cellules de chiens vaccinés
pendant 48 h, avec la méthode de qPCR optimisée au préalable.

L'application de cette méthode dans le cadre du protocole 1 de vaccination avec un
vaccin inactivé (les cellules ayant été congelées), ainsi que les protocoles 2a et 2b permet
de connaitre la spécificité de la réponse.

Méthode de référence. A l'aide d'un antigène antirabique validé sur cellules de r f -
rence avec la méthode de référence ELISPOT IFN γ , on a pu montrer la possible utilisation
de la qPCR pour mesurer une expression en IFN γ après stimulation spécifique de 1.10^6
cellules de chien vacciné, après 48 h d'incubation. L'IL-4 ne semble pas montrer une r -
ponse significative dans ces conditions, le nombre faible de réplicats pouvant l'expliquer
 ventuellement.

Tableau 4.3 – **Résultats bruts d'ELISPOT IFN γ** après stimulation des cellules d'animaux
vaccinés ou naïfs, des protocoles de vaccination avec un vaccin inactivé (protocole 1) ou avec un
vaccin vivant (protocole 2)

	NA				PA FCV				PA rage			PMA/iono					
	1/V*	2/V	1/N	2/N	1/V	2/V	1/N	2/N	1/V	2/V	1/N	2/N	1/V	2/V	1/N	2/N	
Nombre de spots	16	10	7	2	3	26	10	2	37	24	4	1	194	173	60	72	
	6	3	7	0	9	14	9	9	35	30	4	6	195	290	49	34	
	7	9	10	7	15	14	4	15	53	33	7	12	182	244	21	134	
	11	11	15	2	12	28	3	4	40	33	3	1	160	204	30	44	
	12	1	0	2	8	3	10	5	23	21	1	2	155	126	98	165	
	13	7	2	4	3	4	4	2	42	22	6	3	121	116	61	212	
	5	10	13	8	32	8	4	1	83	34	3	3	115	132	88	136	
	11	9	0	5	33	9	5	1	56	51	12	2	156	68	90	84	
	20	23		30	13	19		2	27	84		1	147	136		127	
	10	21		1	8	22		2	19	78		0	86	186		124	
	13	16		3	7	24		3	29	100		8	142	208		135	
	44	21		18	14	19		0	22	82		3	116	199		78	
	Méd.	12	10	7	4	11	17	5	2	36	34	4	3	151	180	61	126
	Var.	39	22	15	30	30	25	7	15	64	79	11	12	109	222	77	178

(*) a/b : a=protocole a, b=animaux vaccinés (V) ou naïfs (N). (Med.) Médiane. (Var.) Variation, c'est à dire
la différence entre le plus grand et le plus petit.

Le tableau 4.3 nous montre que malgré des variations assez importantes, surtout pour
les stimulations avec PA rage et PMA/iono avec des variations entre réponse pouvant

aller jusque 222 spots entre le plus faible et le plus fort (protocole 2, chiens vaccinés).

Les médianes des cellules non stimulées des deux protocoles ne dépassent pas les 12 spots avec tout de même des variabilités allant jusque 39 spots, ce qui montre l'importance de réaliser des répliquats techniques dans la recherche d'une conclusion de statut vaccinal sur un individu.

Des tests de Mann-Whitney ont été réalisés pour comparer les réponses des cellules stimulées et celles des cellules non stimulées.

Sur la figure 4.12, les médianes (barres) et 3^{èmes} quartiles (traits horizontaux) sont représentés pour chaque groupe. Les réponses significativement différentes de NA ont des barres surmontées d'au moins un astérisque ($p < 0,05$), voire 2 asterisques ($p < 0.01$).

Le même profil est observé pour les animaux des deux protocoles à savoir que, pour ce qui est des contrôles, la PMA/iono donne une réponse significative pour les chiens vaccinés comme les chiens naïfs. En ce qui concerne le FCV, aucune réponse n'est observée pour les deux statuts vaccinaux. Avec l'antigène spécifique PA rage, seules les cellules des animaux vaccinés réagissent significativement.

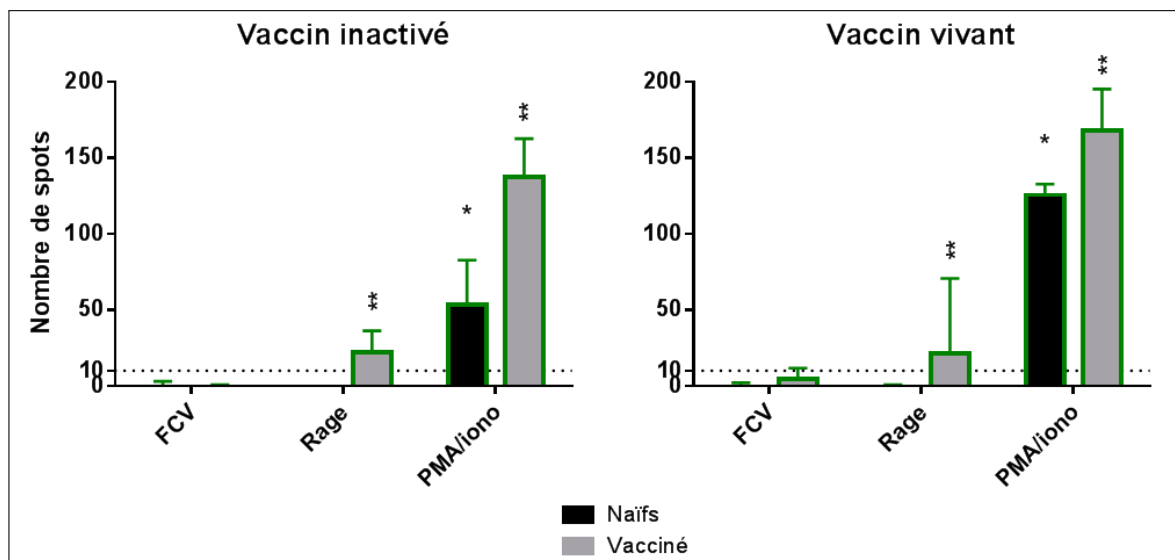


FIGURE 4.12 – Réponse cellulaire Th1, de PBMC des protocoles 1 (vaccin inactivé) et 2 (vaccin vivant) en ELISPOT $IFN\gamma$ après stimulation spécifique. Représentation graphique des différences, pour chaque traitement avec la moyenne du nombre de spots sans traitement. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : P -value < 0.05 , (**) : P -value < 0.01 . Les barres représentent les médianes et les tirets, les troisièmes quartiles.

On peut dire que les cellules des protocoles 2a sont capables dans les mêmes conditions, d'obtenir la même réponse T, spécifique à la vaccination antirabique. Un vaccin vivant est capable d'induire une mémoire T détectable avec l'ELISPOT $IFN\gamma$. Des protéines

IFN γ ont donc été secrétées spécifiquement et il est probable que cette sécrétion ait pu être précédée par une expression plus importante de transcrits de ces gènes.

Expression protéique par ELISA En parallèle de l'essai ELISPOT précédemment décrit, et le jour même, une stimulation a été réalisée à partir des mêmes suspensions cellulaires ainsi qu'avec les mêmes réactifs et principes actifs aux mêmes concentrations finales. 1.10^6 cellules sont stimulées pendant 48h.

Sur les surnageants, IFN γ les concentrations ont été dosées en ELISA.

On voit figure 4.13 une différence de profil entre les deux protocoles.

En ce qui concerne les contrôles FCV, aucun des 2 protocoles, et ce quel que soit le statut des animaux, ne présente une réponse.

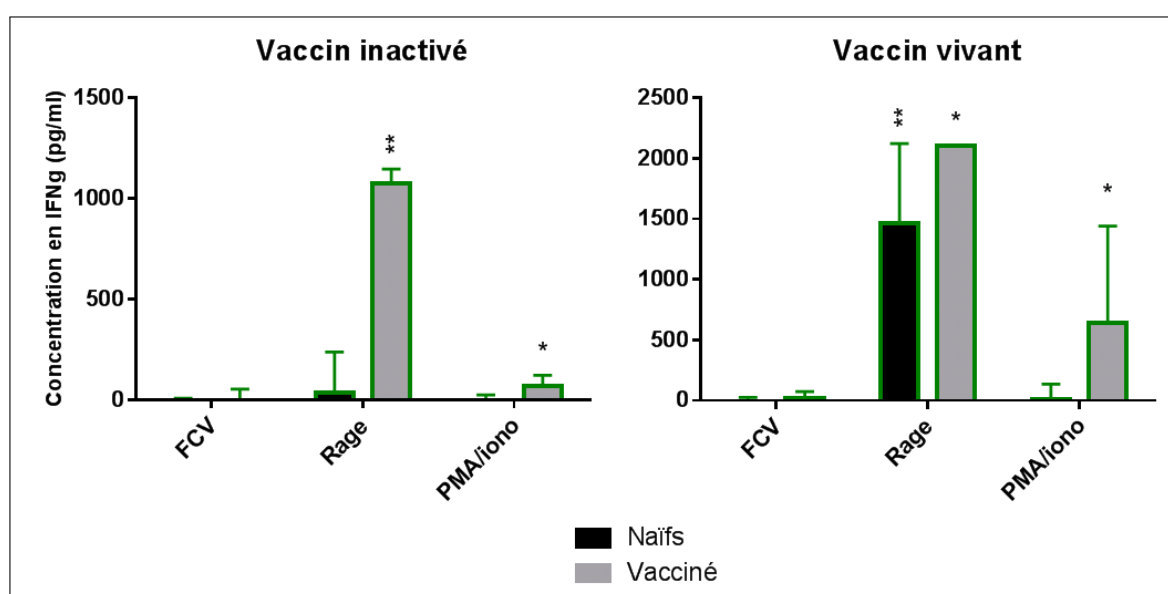


FIGURE 4.13 – **Expression en protéines IFN γ en ELISA après stimulation spécifique.** Représentation graphique des différences pour chaque traitement avec les concentrations sans traitement. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : P -value <0.05 ,(**) : P -value <0.01 . Les barres représentent les médianes et les tirets, les troisième quartiles.

Contrairement aux résultats de l'ELISPOT, PMA/iono ne provoque qu'une augmentation de la concentration en cytokines secrétées, pour les animaux vaccinés et ce, pour les deux protocoles.

Avec le vaccin inactivé, le PA rage montre une augmentation de la sécrétion de IFN γ significative chez les chiens vaccinés et pas sur les chiens naïfs. Avec les vaccins vivants du protocole 2, les PBMC de tous les animaux quel que soit le statut, montre une aug-

mentation de la sécrétion de $IFN\gamma$ dans le surnageant.

Expression des transcrits par qPCR Les culots de cellules sont eux extraits et rétrotranscrits. On réalise alors une qPCR $IFN\gamma$, IL-4 et GAPDH, en duplicat. Les expressions sont calculées et représentées graphiquement selon leur ratio par rapport aux cellules non stimulées (NA) (ratio de 1).

Un test de Mann-Whitney est effectué pour chaque condition pour tester si le ratio est significativement différent de 1 avec un risque alpha de 0.05 ou 0.01.

En ce qui concerne $IFN\gamma$, pour les deux protocoles (vaccin vivant et inactivé) on constate figure 4.14 le même profil. En ce qui concerne les contrôles dans un premier temps, PMA/iono surexprime très peu les gènes cibles, seule l'expression au niveau des animaux naïfs est significative. Une réponse significative pour le PA FCV (non spécifique) est observée pour les chiens naïfs. Dans un deuxième temps, au niveau de la stimulation spécifique, une surexpression significative avec PA rage pour les animaux naïfs et les animaux vaccinés est observée.

La réponse $IFN\gamma$ par qPCR ne corrèle pas avec la réponse T en ELISPOT.

En ce qui concerne la réponse en IL-4, les profils observés sont différents selon le type de vaccin. En ce qui concerne le vaccin inactivé

En ce qui concerne les contrôles dans un premier temps, PMA/iono surexprime IL-4 chez les animaux vaccinés de manière significative. En ce qui concerne les animaux naïfs, une grande variabilité est observée, ce qui peut s'expliquer par la taille du groupe d'animaux constitué que de 2 individus.

Pour ce qui est de FCV, les ratios pour les animaux des deux statuts vaccinaux, ne sont pas significativement différents de 1.

Ensuite, toujours pour le protocole 1 concernant le vaccin inactivé, les ratios sont faibles (inférieurs à 2), pour les animaux vaccinés et naïfs pour la réponse IL-4 après stimulation spécifique avec le PA rage. Le schéma de réponse ne correspond pas non plus à la réponse attendue.

La réponse à IL-4 pour le protocole concernant les vaccins vivants, montre un profil intéressant. En effet en ce qui concerne les contrôles, PMA/iono surexprime IL-4 de façon importante et significative. PA FCV montre une surexpression qui semble significative même si elle très faible (médiane inférieure à 1). Le PA rage surexprimerait les cellules des animaux vaccinés assez fortement (médiane de ratio à 3.5) et de façon significative. Les cellules de chiens naïfs ne répondent pas en IL-4. Il semblerait qu'on ait là un profil se rapprochant de la réponse T en ELISPOT.

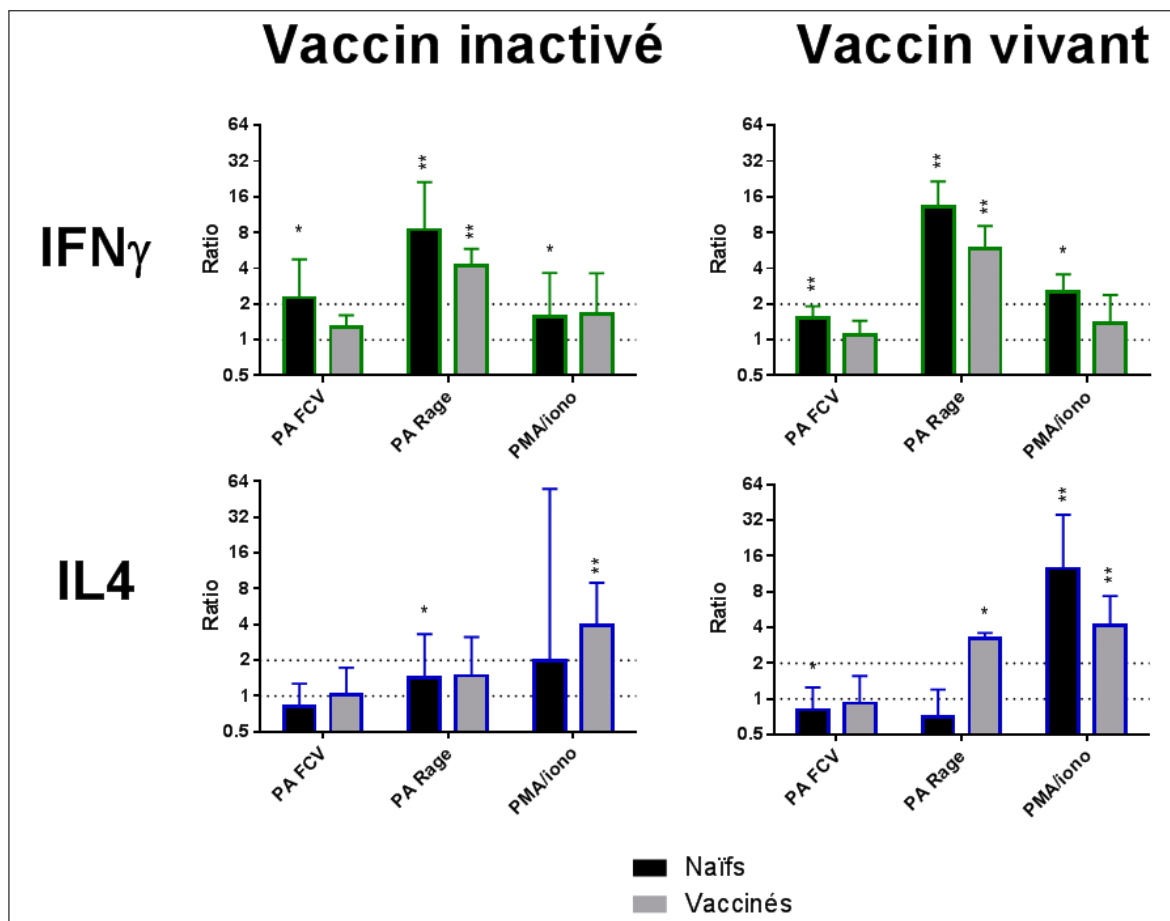


FIGURE 4.14 – Expression de IFN γ et IL-4 après stimulation de PBMC de chiens naïfs ou vaccinés contre la rage avec un vaccin inactivé ou vivant. Représentation graphique des expressions en ratio, pour chaque traitement par rapport aux cellules non traitées. Un test statistique de Mann-Whitney correspondant a été réalisé pour chaque condition. (*) : *P-value* < 0.05, (**) : *P-value* < 0.01. Les barres représentent les medians et les tirets, les troisièmes quartiles en ordonnée est représenté l'expression en ratio.

En résumé : On est capable de montrer une réponse T spécifique par ELISPOT, sur des PBMC d'animaux vaccinés avec un vaccin inactivé. On a montré que l'ELISPOT pouvait également montrer le statut vacciné avec un vaccin antirabique vivant. Il semblerait qu'une réponse spécifique avec IL-4 par qPCR montre des résultats s'y rapprochant.

A ma connaissance, dans l'équipe R&D immunologie de Boehringer Ingelheim (santé animale), ils n'ont jamais montré chez le chien, de réponse IL-4 (ou très peu) comme en général toutes les cytokines à Th2 (contrairement aux réponses équivalentes chez l'Homme et la souris). La qPCR serait peut-être capable de détecter ce faible signal par contre, pour un vaccin vivant.

En revanche, les animaux du protocole concernant les vaccins inactivés et vivants étaient peu nombreux. De plus, le statut de vaccination des animaux du protocole concer-

nant le vaccin vivant n'a aucune correspondance dans la réalité. Tous ces animaux ont été vaccinés par voie intramusculaire (parentéral).

La dernière partie de la méthodologie annoncée dans le but de répondre à la problématique annoncée, concerne le protocole expérimental 3, sur des chiens du terrain (Maroc), avec des animaux vaccinés par voie intramusculaire, et des animaux vaccinés par voie orale, avec le vaccin vivant SAG2 (voir section 3.1.5).

4.5 Protocole clinique de vaccination orale (application)

Avant vaccination des animaux du protocole 3 (section 3.5 page 37) un titrage par le FAVN test a montré des taux très inférieurs à 0.5 UI/mL.

En ce qui concerne le titrage sur souris de la souche ariana 2 utilisée pour l'euthanasie, le calcul automatique selon Spearman Kärber donne une dose inoculée de $10^{2,9}$ DL50ICS/mL soit 794 DL50ICS. Selon la méthode graphique, $10^{3,1}$ DL50ICS/mL soit 1259 DL50ICS auraient été inoculés.

Dans les 2 cas, il s'agit d'une dose supérieure à celle visée (500 DL50ICS), celle-ci d'autant plus au-delà de la dose habituelle inoculée aux chiens de 200 DL50ICS.

Deux chien naïfs sont morts 32 et 40 jours post-épreuve respectivement. Un diagnostic en FAT et RTCIT a été réalisé sur ces animaux confirmant la mort par la rage. Un séquençage a été réalisé sur les souches correspondantes confirmant la présence d'ariana 2.

Aucun des huit animaux vaccinés n'est mort. Leur euthanasie a été réalisée hors du temps de dernier délais observé. Un diagnostic a été réalisé en FAT confirmant l'absence de particule virale dans le SNC.

Les sérums de tous les animaux ont été titrés en RVNA par la méthode FAVN, sur toute la cinétique du protocole expérimental.

Tableau 4.4 – Résultats des titrages en RVNA par la méthode FAVN test exprimés en UI/mL.

Post-V	VO				VIM				Non vaccinés			
J0	0,22	0,07	0,13	0,1	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
J7				0,38	0,04	0,04	4,56	4,56		0,06		
J14	6,01	0,04	0,66				7,92	31,55				
J21				6,01	0,66	1,15	10,45	77,27		0,13	0,04	0,22
J28		0,5	1,51	1,99			10,45	18,55	0,04		0,04	
J35				6,01	1,15	3,46	10,45	18,15		0,04		0,04
J42	1,15	1,87	2,62				13,77		0,04		0,04	
J49				10,45	0,66	0,66	18,15	29,93		0,24		0,24
J60	6,01	2,62	3,46	10,45	0,87	7,92	10,45	31,55	0,04	0,04	0,1	0,04
J90	3,46	1,51	2,62	4,56	0,5	4,56	7,92	31,55	0,04	0,04	0,04	0,04
J168	10,45	1,51	6,01	6,01	0,66	10,45	7,92	13,77	0,04	0,06	0,04	0,04

Les résultats de la figure 4.15 nous permettent d'observer une réponse humorale au vaccin inoculé intramusculairement, avec un pic à J21 et avec chute du taux d'anticorps jusqu'à un plateau très au-dessus (en moyenne 10 UI/mL) de la limite de 0,5 UI/mL.

En ce qui concerne les animaux dont le vaccin a été instillé oralement, un pic de RVNA est observé vers J60, une chute du taux d'anticorps jusqu'à un plateau (en moyenne 7 UI/mL) au dessus de la limite de 0,5 UI/mL. Seul un animal a un taux qui, bien que supérieur à la limite, reste plutôt faible.

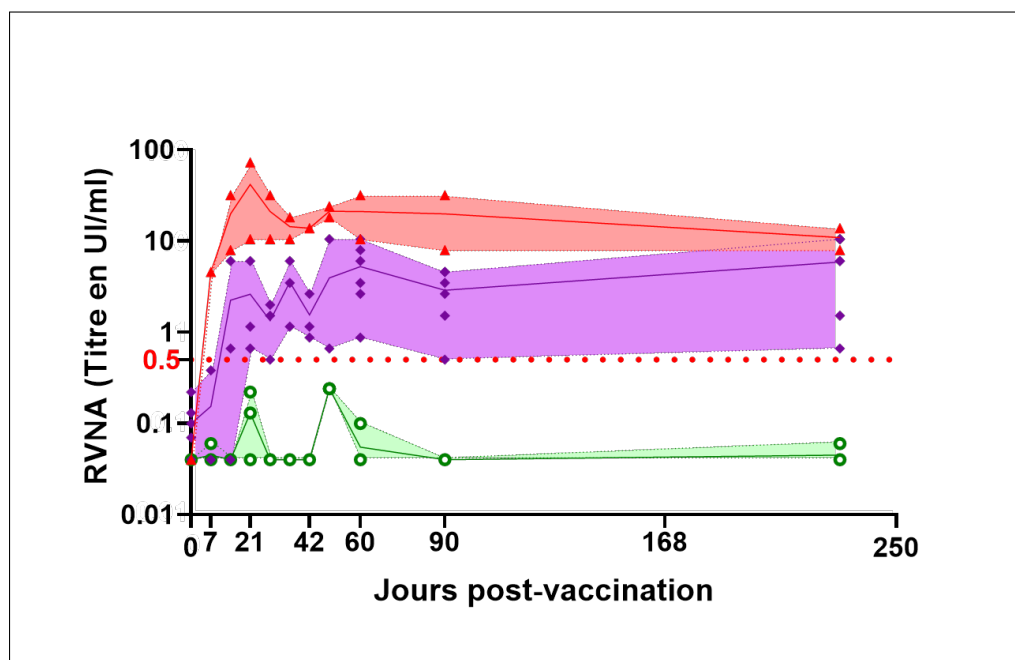


FIGURE 4.15 – **Cinétique du taux d'anticorps neutralisant du protocole clinique 3.** Les lignes représentent la médiane du log 10 du titre en UI/mL de chaque groupe et chaque repère, un animal. En abscisse est représenté le temps en nombre de jour après vaccination (J0). Les aires colorées représentent les étendues des réponses, pour chaque groupe. (—) : les animaux vaccinés intramusculairement, (—) : les animaux vaccinés oralement ; (—) : les animaux du groupe témoin non vaccinés contre la rage. La ligne en pointillé représente la limite de 0.5 UI/mL au dessus de laquelle on considère un individu séropositif.

En ce qui concerne les PBMC correspondantes, elles ont été décongelées et la viabilité mesurée, inférieure à 40 % pour les meilleures.

Une analyse par cytomètre en flux avec un marquage au VIVID a été réalisée sur les échantillons ayant une concentration cellulaire suffisante pour réaliser un test ELISPOT au moins.

Sur la figure 4.16 est représenté à gauche le profil SSC en fonction de FSC (voir section 3.2.1) des cellules, montrant une population de lymphocytes (FSC entre 50k et 100k, SSC entre 0 et 50k) très réduite ne correspondant qu'à moins de 5 % des cellules totales. En

dessous d'un FSC de 20K, s'amassent les débris cellulaires qui sont importants. Sur la partie droite de la figure, on a isolé l'information du marquage au VIVID concernant cette population de lymphocytes. On montre un pourcentage de plus de 12 % de mortalité.

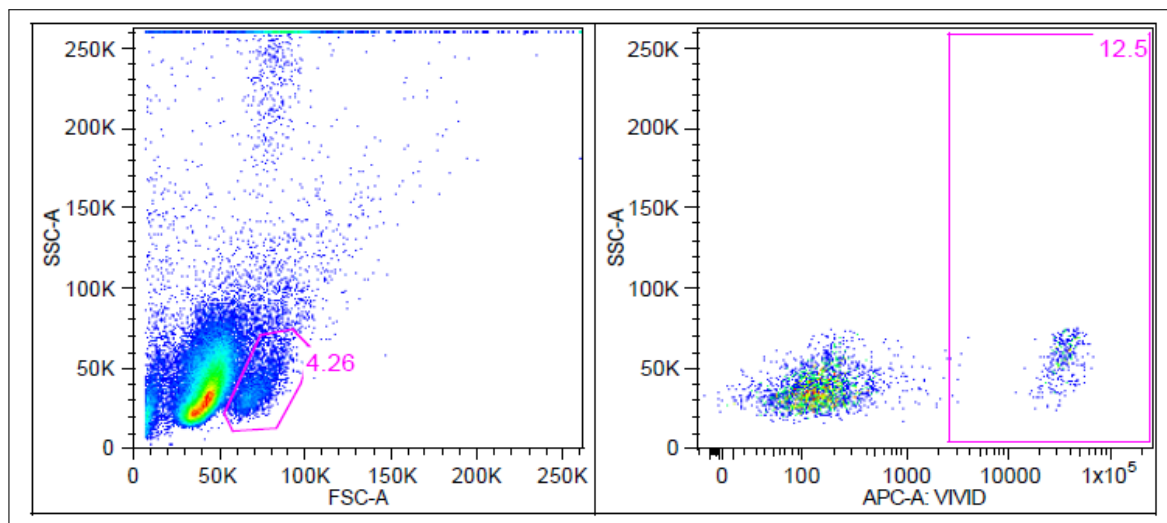


FIGURE 4.16 – Analyse des PBMC du protocole clinique d'efficacité vaccinale. Marquage au vivid et analyse par cytométrie en flux.

Un ELISPOT a été réalisé avec les cellules ayant une viabilité différente de zéro. Aucun spot n'a été révélé quel que soit le traitement (PA rage, PA FCV, PMA/iono).

Les méthodes de prélèvement sanguins, isolement, congélation et décongélation sont très importantes et délicates. De plus, ces cellules ont voyagé durant quelques jours, en carboglace (-78.5°C) alors qu'elles ont été stockées de façon optimales à -195.79°C . Elles ont été manipulées et transférées deux fois dans des containers à azote à leur arrivée au laboratoire. Il se peut qu'elles aient subi un choc de température qui leur ait été fatal.

Des sérums sont envoyés depuis des années au laboratoire pour titrage sans que le transport ne pose problème dans leur analyse. Cela montre la difficulté de travailler sur le pan immunité cellulaire dans le cadre d'études de vaccinations sur le terrain si les échantillons ne sont pas analysés sur place.

Une réflexion sur ce sujet devra être entreprise avant de refaire un essai des méthodes ELISPOT et qPCR IL-4 sur des animaux vaccinés avec un vaccin vivant atténué par voie orale dans des pays éloignés.