



HAL
open science

Persistence du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche “ interféreactomique ” chez quatre espèces cibles (Bos taurus, Ovis aries, Capra hircus et Sus scrofa)

Morgan Sarry

► **To cite this version:**

Morgan Sarry. Persistence du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche “ interféreactomique ” chez quatre espèces cibles (Bos taurus, Ovis aries, Capra hircus et Sus scrofa). Biochimie, Biologie Moléculaire. AgroParisTech, 2023. Français. NNT : 2023AGPT0008 . tel-04370247

HAL Id: tel-04370247

<https://pastel.hal.science/tel-04370247>

Submitted on 3 Jan 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

Docteur d'AgroParisTech

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Morgan SARRY

Persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche « interféromique » chez quatre espèces cibles (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus* et *Sus scrofa*)

Directeur de thèse : Labib BAKKALI KASSIMI

Encadrante de thèse : Sandra BLAISE-BOISSEAU

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort le 18 septembre 2023

Membres du jury avec voix délibérative :

Isabelle SCHWARTZ, Directrice de Recherche, INRAE (Université Paris-Saclay)

Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur, Université Paris-Cité

Pierre-Olivier VIDALAIN, Directeur de Recherche, CNRS (Université de Lyon 1)

Jean-François VALARCHER, Professeur, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU)

Présidente

Rapporteur & Examineur

Rapporteur & Examineur

Examineur

En attendant de marcher dans ses pas...

« La tradition n'est pas l'ennemi mais le support de l'audace. Je rêvais de vacciner tous les enfants du monde et je commençais ma carrière en saignant les vaches dans le Jura pour la production du sérum anti aphteux »

Dr. Charles Mérieux (1907-2001)



Dr. Charles Mérieux, 1937 (Ressources web Institut Mérieux)



Remerciements

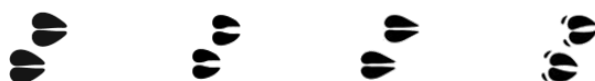
Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi et le Dr. Pierre-Olivier Vidalain d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le Dr. Isabelle Schwartz, le Dr. Karelle De Luca et le Pr. Jean-François Valarcher d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse, le Dr. Labib Bakkali Kassimi et le Dr. Sandra Blaise-Boisseau, d'avoir monté ce projet de thèse, de m'avoir permis de travailler à leurs côtés et de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse, depuis la préparation du concours de l'école doctorale jusqu'à celle de ma soutenance.

Labib, merci pour ta disponibilité, ton soutien, et tes précieux conseils durant ces trois belles années. Merci de m'avoir offert l'opportunité de rejoindre les rangs de l'équipe BioPic et de m'avoir fait profiter de ton expertise scientifique. J'attends encore ton invitation pour le Maroc ☺

Sandra, je sais que tu as longuement hésité avant de répondre à ma candidature tardive lors du processus de recrutement, tu as fini par passer outre et je t'en suis infiniment reconnaissant. Durant ces trois années tu auras été à la fois mon encadrante, mon mentor, mon binôme de manips, parfois même ma confidente. J'aurais difficilement pu rêver d'un meilleur accompagnement professionnel et personnel dans cette étape importante de ma vie. Merci pour ton soutien indéfectible, ta présence de jour comme de nuit, ta bienveillance et tes conseils avisés. Merci de m'avoir mis le pied à l'étrier lors de mon arrivée au laboratoire, puis de m'avoir accordé ta confiance pour me permettre de m'épanouir. Merci pour tout.



J'adresse également mes remerciements au Pr. Pascal Boireau qui m'a permis de réaliser ma thèse au sein du Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maisons-Alfort. De même, je remercie le Dr. Stephan Zientara pour m'avoir ouvert les portes de l'UMR Virologie. Merci Stephan pour ta bonne humeur, ton humour - quoique parfois douteux ☺ - et pour les dizaines et les dizaines de personnes que tu as pu me présenter lors de nos déplacements en congrès.

Je tiens à remercier le Dr. Béatrice Grasland, le Dr. Ronan Le Goffic en qualité de membres extérieurs de mon comité de thèse, le Dr. Eve Laloy, le Pr. Grégory Jouvion et le Dr. Damien Vitour en tant que scientifiques participant au projet, ainsi que le Dr. Nicolas Meunier en tant que référent ABIES, pour leurs conseils avisés et leur implication.

Mes remerciements sont également dirigés vers l'école doctorale ABIES ainsi que les financeurs de cette thèse, à savoir l'ANSES et AgroParisTech.

Merci infiniment aux membres actuels et passés de l'équipe BioPic, Anne-Laure, Anthony, Aurore, Caroline, Cindy, Guillaume, Mathilde, Philippine et Souheyla, pour leur soutien au quotidien, leur bienveillance, leur bonne humeur, leurs conseils et leur aide précieuse au laboratoire.

Je remercie l'ensemble des membres de l'UMR Virologie qui ont tous, à leur échelle, œuvré au bon déroulement de ces trois années. Je remercie tout particulièrement la direction de l'unité, l'équipe I5 qui a été grandement impliquée dans mes travaux de thèse, ainsi qu'Aurélia, Lauren et Dominique qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions possibles dans les labos de Bressou et d'Icube. Un immense merci à Bahia, qui a toujours été là pour trouver des solutions à tous mes soucis administratifs et organisationnels.



J'ai une pensée particulière pour tous les docs et post-docs que j'ai eu la chance de croiser au cours de ma thèse. Merci pour les discussions qu'on a pu avoir, les conseils échangés et les moments les moins productifs partagés. Tous mes vœux de réussite, notamment pour les prochains qui soutiendront leur thèse !

Je remercie également les stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer, Maxence, Enzo, Estelle, Clara. Merci pour l'intérêt que vous avez montré, votre implication et votre curiosité. J'espère vous avoir transmis ma passion pour la science et que vous vous épanouirez dans votre vie professionnelle future.

Je remercie tous mes coéquipiers de l'ANSES et de l'EnvA, les parties de foot du mercredi midi et du jeudi soir m'ont permis de relâcher la pression, de m'entretenir physiquement et de leur prouver que les meilleurs joueurs sont rhodaniens !

Enfin, je tiens à remercier mes amis ainsi que ma famille. Merci d'avoir été là, depuis toujours, et notamment ces derniers mois. J'ai le cœur gros de devoir peut-être vous quitter pour aller explorer un autre continent, à l'autre bout du monde, mais je pars avec un peu de chacun d'entre vous. Vous me connaissez suffisamment pour savoir que je ne m'épancherai pas davantage dans ce manuscrit mais vous savez à quel point je vous aime.

Je tiens également à dédier ce travail à mes animaux adorés, eux qui me motivent à faire avancer la recherche en santé animale.



Sommaire

Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Liste des annexes	11
Liste des abréviations	12
Liste des productions issues de la thèse	15
I. Articles sur travaux	15
II. Revues	16
III. Communications orales	17
IV. Posters	19
Introduction générale	20
I. Généralités sur la fièvre aphteuse	20
1) Historique de la fièvre aphteuse	20
2) La fièvre aphteuse en France	21
3) Répartition géographique de la fièvre aphteuse	22
4) Enjeux économiques et sociaux associés à la fièvre aphteuse	25
II. Généralités sur le virus de la fièvre aphteuse	30
1) Taxonomie du FMDV	30
2) Structure du FMDV	31
a) Organisation de la capsid	31
b) Organisation du génome	32
3) Variabilité génétique du FMDV	43
a) Variation génétique	43
b) Variation antigénique	45
III. Infection par le virus de la fièvre aphteuse	47
1) Espèces sensibles	47
2) Cycle viral	48
a) Attachement	49
b) Internalisation	50
c) Décapsidation	50
d) Traduction	51
e) Clivage	51
f) Réplication	52
g) Encapsidation	53
h) Morphogénèse	53
i) Libération	54
3) Modes de transmission	54
4) Signes cliniques et progression de l'infection	56
a) Pathogénèse chez les différentes espèces d'intérêt	56
b) Persistance virale & problématiques associées	63



c) Réponse de l'hôte & interactions FMDV _____	74
IV. Méthodes de lutte contre la fièvre aphteuse _____	123
1) Prophylaxie sanitaire _____	123
a) Coordination internationale _____	123
b) Epidémiosurveillance et contrôle des importations _____	125
2) Gestion des cas de suspicion _____	126
a) Protocole d'alerte en cas de suspicion _____	126
b) Méthodes de diagnostic _____	128
c) Dispositif de lutte en cas d'épizootie _____	131
3) Vaccination _____	132
4) Modèles d'étude _____	137
a) Modèles d'étude <i>in vivo</i> _____	138
b) Modèles d'étude <i>in vitro</i> _____	140
Objectifs des travaux de thèse _____	146
Résultats _____	149
I. Mise en évidence d'interactions protéine-protéine entre le virus de la fièvre aphteuse et la voie interféron de type I _____	149
Introduction de la partie I _____	149
1) Construction des banques de vecteurs _____	151
2) Mise en évidence d'interactions protéine-protéine entre le virus de la fièvre aphteuse et la voie interféron de type I et détermination de leur spécificité d'hôte _____	156
3) Détermination des domaines minimums d'interaction de la 3D ^{pol} par approche « fragmentome » _____	197
Discussion et perspectives de la partie I _____	205
II. Développement de modèles cellulaires d'intérêt pour l'étude de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse _____	209
Introduction de la partie II _____	209
1) Développement d'un modèle de cellules primaires porcines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse _____	211
2) Développement d'un modèle de cellules primaires ovines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse _____	247
Discussion et perspectives de la partie II _____	272
III. Validation fonctionnelle des interactions protéine-protéine en contexte infectieux dans des cellules d'intérêt _____	278
Introduction de la partie III _____	278
Matériels et Méthodes _____	279
Résultats _____	288
1) Evaluation d'anticorps commerciaux _____	288
2) Production d'un anticorps dirigé contre la protéine MAVS _____	294



3) Mise au point d'une méthode d'immunoprécipitation visant à valider les interactions protéiques en contexte infectieux	301
Discussion et perspectives de la partie III	316
<i>Discussion générale & perspectives</i>	324
<i>Bibliographie</i>	335
<i>Annexes</i>	370



Liste des figures

<i>Figure 1 : Répartition mondiale de la fièvre aphteuse.</i>	23
<i>Figure 2 : Répartition mondiale des pools de virus de la fièvre aphteuse.</i>	25
<i>Figure 3 : Répartition mondiale des foyers de fièvre aphteuse déclarés entre 2021 et juin 2023.</i>	26
<i>Figure 4 : Capside du virus de la fièvre aphteuse.</i>	32
<i>Figure 5 : Structure du génome du virus de la fièvre aphteuse et expression des protéines virales.</i>	32
<i>Figure 6 : Espèces sensibles à l'infection par le virus de la fièvre aphteuse.</i>	48
<i>Figure 7 : Cycle de réplication du virus de la fièvre aphteuse.</i>	49
<i>Figure 8 : Voies de transmission du virus de la fièvre aphteuse.</i>	55
<i>Figure 9 : Signes cliniques et lésions associés à la fièvre aphteuse.</i>	62
<i>Figure 10 : Sites de réplication et sites de persistance du virus de la fièvre aphteuse chez le bovin, l'ovin, le caprin et le porc.</i>	70
<i>Figure 11 : Principe de fonctionnement de la macro-autophagie.</i>	116
<i>Figure 12 : Prophylaxie de la fièvre aphteuse.</i>	123
<i>Figure 13 : Dispositif d'alerte français en cas de suspicion de fièvre aphteuse.</i>	128
<i>Figure 14 : Jonctions caractéristiques des cellules épithéliales et protéines du cytosquelette associées.</i>	145
<i>Figure 15 : Processus de construction par clonage Gateway® des banques de vecteurs d'expression correspondant aux séquences virales et cellulaires d'intérêt.</i>	151
<i>Figure 16 : Principe du clonage Gateway®.</i>	152
<i>Figure 17 : Vecteurs entrée et vecteurs d'expression correspondant aux protéines du virus de la fièvre aphteuse, construits par clonage Gateway® au cours de la thèse PersIFA.</i>	154
<i>Figure 18 : Vecteurs entrée et vecteurs d'expression correspondant aux seize protéines de la voie IFN de type I impliquées dans plus de soixante-quinze pour cent des interactions virus-hôte, construits par clonage Gateway® au cours de la thèse PersIFA.</i>	155
<i>Figure 19 : Prédiction de la structure tridimensionnelle de la 3D^{pol} du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2.</i>	198
<i>Figure 20 : Stratégie de découpe de la 3D^{pol} pour l'étude des domaines minimums d'interactions par approche « fragmentome ».</i>	200
<i>Figure 21 : Principe de détection d'interactions protéiques par approche double-hybride en levures.</i>	202
<i>Figure 22 : Principe de la méthode de gap repair en levures.</i>	204
<i>Figure 23 : Evaluation des anticorps sélectionnés par analyse Western-Blot après surexpression des protéines d'intérêt.</i>	293
<i>Figure 24 : Obtention de virus recombinant MVA-T7green-MAVS.</i>	296
<i>Figure 25 : Sélection des virus recombinant MVA-T7green-MAVS.</i>	297
<i>Figure 26 : Détection de la protéine MAVS par analyse Western-Blot.</i>	298



Figure 27 : Evaluation de l'efficacité de production et de purification de la protéine MAVS.	300
Figure 28 : Evolution de l'ECP au cours de l'infection de cellules ZZ-R127 par le FMDV.	303
Figure 29 : Activation de la voie IFN de type I après infection de cellules ZZ-R127 par le FMDV.	305
Figure 30 : Cinétique de détection des protéines d'intérêt lors de l'infection de cellules ZZ-R127.	307
Figure 31 : Evolution de l'ECP au cours de l'infection de cellules DSP bovines par le FMDV.	308
Figure 32 : Activation de la voie IFN de type I après infection de cellules DSP bovines par le FMDV.	310
Figure 33 : Cinétique de détection des protéines d'intérêt lors de l'infection de cellules DSP bovines.	312
Figure 34 : Optimisation des conditions de couplage Dynabeads™ Protein G-anticorps 3F12.	314
Figure 35 : Recherche d'interactions protéine-protéine en contexte infectieux en cellules ZZ-R127.	316



Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Éléments de comparaison de la pathogenèse du virus de la fièvre aphteuse chez le bovin domestique, le buffle africain, l'ovin, le caprin et le porcin.</i>	63
<i>Tableau 2 : Caractéristiques des principaux types d'infections considérées comme persistantes.</i>	68
<i>Tableau 3 : Prédiction des domaines désorganisés de la 3D^{pol} du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2.</i>	198
<i>Tableau 4 : Couples d'amorces utilisés pour l'obtention des formes tronquées de 3D^{pol} dans le cadre de l'étude des domaines minimums d'interactions par approche « fragmentome ».</i>	201
<i>Tableau 5 : Réactivité prédite des anticorps sélectionnés contre les quatre espèces d'étude.</i>	289



Liste des annexes

- Annexe 1 : Revue Sarry et al. 2022 : Le virus de la fièvre aphteuse : transmission, pathogénèse, diagnostic et surveillance.* _____ 370
- Annexe 2 : Poster Journées Francophones de Virologie (JFV) 2022 : « Interaction de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I : un lien avec la persistance virale ? » Strasbourg, France, 11-12 avril 2022.* _____ 390
- Annexe 3 : Poster European Society for Veterinary Virology (ESVV) 2022 : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Gand, Belgique, 20-23 septembre 2022.* _____ 391
- Annexe 4 : Poster Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES (JSDA) 2022 : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Maisons-Alfort, France, 18-19 octobre 2022.* _____ 392
- Annexe 5 : Poster Journées Francophones de Virologie (JFV) 2023 : « Développement d'un modèle de cellules primaires porcines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse. » Paris, France, 17-18 avril 2023* _____ 393
- Annexe 6 : Poster EPIZONE 2023 : « Development of a porcine primary cell model for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis. » Novi Sad, Serbie, 26-28 avril 2023_* 394
- Annexe 7 : Oral Master 1 – Estelle Koulmann : « Détermination des domaines d'interaction minimums de la 3Dpol du FMDV O Mayenne Clone 2.2 par approche « fragmentome ». » Paris, France, 02 juin 2023* _____ 395



Liste des abréviations

3D^{pol} : 3D polymerase

Aa : Acides aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATF4 : *Activating transcription factor 4*

ATG5 : *Autophagy related 5*

BEI : *Binary Ethylenimine*

BFK : *Bovine Fetal Kidney*

BGK : *Black Goat Kidney*

BHK21 : *Baby Hamster Kidney*

BLMNMEC : *Bovine mesenteric lymph node microvascular endothelial cells*

BLUMEC : *Bovine lung microvascular endothelial cells*

BRV : *Bovine rhinitis virus*

BTE : *Bovine fetal Tongue Epithelium*

BTY : *Bovine Thyroid*

BUcEC : *Bovine umbilical cord endothelial cells*

BVDV : *Bovine Viral Diarrhea virus*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Cre : *Cis acting replicating element*

CV : *Coxsackievirus*

DDX21 : *Nucleolar RNA helicase 2*

DIVA : *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*

DNAJA3 : *DnaJ homolog subfamily A member 3*

DSP : *Dorsal Soft Palate*

DTT : *Dithiothréitol*

EBV : *Epstein-Barr virus*

ECP : *Effet cytopathique*

eIF4G : *eukaryotic translation Initiation Factors 4 Gamma*

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMCV : *Encephalomyocarditis virus*

ERAV : *Equine rhinitis virus A*

EuFMD : *European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*

FA : *Fièvre aphteuse*

FAO : *Food and Agriculture Organisation*

FMDV : *Foot-and-mouth-disease virus*

FRET : *Fluorescence Resonance Energy Eransfert*

GFRA : *Global Foot-and-Mouth Research Alliance*

GST : *Glutathion S-transférase*

HAV : *Hepatitis A virus*

HBV : *Hepatitis B virus*

HCV : *Hepatitis C virus*

HEK293T : *Human Embryonic Kidney*

HIV : *Human Immunodeficiency virus*

HmLu : *Hamster Lung*

HPV : *Human Papilloma virus*



HRP : *Horseradish Peroxidase*

HRV : *Human rhinovirus*

HS : Héparanes-sulfate

HSV : *Herpès simplex virus*

IBRS-2 : *Instituto Biologico-Rim Suino-2*

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobulines

IL-10 : Interleukines-10

IPTG : *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

IRES : *Internal ribosome entry site*

ISG : *Interferon Stimulated Genes*

ITAF : *IRES Transacting Factors*

Kb : Kilobases

LC3 : *Microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LNR : Laboratoire National de Référence

L_{pro} : *Leader protein*

LRRC25 : *Leucine-rich repeat-containing protein 25*

MALT : *Mucosa-associated lymphoid tissue*

MAVS : *Mitochondrial Antiviral Signalling protein*

MDBK : *Madin-Darby Bovine Kidney*

MDOK : *Madin-Darby Ovine Kidney*

MOI : *Multiplicity Of Infection*

MV : *Measles virus*

MVA : *Modified vaccinia virus Ankara*

MVPK-1 : *Mengeling-Vaughn Porcine Kidney-1*

NALT : *Nasopharyng-associated lymphoid tissue*

NiV : *Nipah virus*

NK : *Natural Killer*

NLS : *Nuclear Localisation Signal*

NME1 : *Nucleoside diphosphate kinase A*

Nmi : *N-myc and STAT interacting*

NRLP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

Nt : Nucleotides

OIE : Office International des Epizooties

OMSA : Organisation Mondiale de la Santé Animale

ORF : *Open Reading Frame*

OVK : *Ovine Kidney*

PCBP : *Poly r(C)-Binding Protein 1*

PCBP2 : *Poly(rC)-binding Protein 2*

PK15 : *Porcine Kidney-15*

PLA : *Proximity Ligation Assay*

Poly-C : Polyribocytidylate

Poly-IC : Acide polyinosinique-polycitydylique

PTB : *Polypyrimidine Tract-Binding protein)*

RE : Réticulum Endoplasmique

RLR : *RIG-I-Like Receptors*

rtRT-PCR : *real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SAT : *Southern African Territories*

SDRP : *Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc*



SIV : *Simian Immunodeficiency virus*

SK6 : *Swine Kidney-6*

SLU : *Université Suédoise des sciences agricoles*

SVDV : *Swine vesicular disease virus*

SVV : *Seneca Valley virus*

TBK1 : *TANK-binding kinase 1*

TCID₅₀ : *50% tissue culture infective dose*

TEM : *Transition épithélio-mésenchymateuse*

TLR : *Toll-Like Receptors*

TMB : *TétraMéthylBenzidine*

TMEV : *Theiler's Murine Encephalomyelitis virus*

UMP : *Uridine Monophosphate*

UTR : *Untranslated Region*

VLP : *Virus-Like Particle*

VP : *Viral protein*

VPg : *Viral Genome Linked Protein*

VSV : *Vesicular stomatitis virus*

VZV : *Varicella-Zoster virus*



Liste des productions issues de la thèse

I. Articles sur travaux

- Sarry M, Caignard G, Dupré J, Zientara S, Vitour D, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway.** Viruses. 2023 Mar 1;15(3):666. doi: 10.3390/v15030666. PMID: 36992375; PMCID: PMC10054395.
- Sarry M, Bernelin-Cottet C, Michaud C, Relmy A, Romey A, Salomez A L, Renson P, Contrant M, Berthaud M, Huet H, Jouvion G, Hägglund S, Valarcher J F, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis.** Soumis à Frontier in Microbiology le 01/05/2023
- Sarry M, Laloy E, Relmy A, Romey A, Bernelin-Cottet C, Salomez A L, Huet H, Hägglund S, Valarcher J F, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Development of a primary cell model derived from ovine dorsal soft palate and palatine tonsils for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis.** En cours de relecture avant soumission.



II. Revues

- Sarry M, Vitour D, Zientara S, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model.** Viruses. 2022 Sep 27;14(10):2129. doi: 10.3390/v14102129. PMID: 36298684.
- Sarry M, Romey A, Lefebvre D, Benfrid S, Dufour B, Durand B, Zanella G, De Regge N, Zientara S, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Le virus de la fièvre aphteuse : transmission, pathogenèse, diagnostic et surveillance.** [Foot and mouth disease virus: transmission, pathogenesis, diagnosis and surveillance]. Virologie (Montrouge). 2022 Sep 1;26(5):355-373. French. doi: 10.1684/vir.2022.0972. PMID: 36413121.



III. Communications orales

- Colloque International Francophone en Maladies Infectieuses Animales (CIFMIA) (2nd Prix de la meilleure conférence) : « Interaction de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I (IFN I) : un lien avec la persistance virale? » Montréal, Canada (on line), 6 mai 2022.
- Les Lundi du SAPS (Santé Animale Paris Saclay) : « Thèse PersIFA : Persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche “interféromique” chez 4 espèces cibles. » Paris, France, online, 9 mai 2022.
- 12^{ème} congrès de l’European Society of Veterinary Virology (ESVV) : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Gand, Belgique, 20 septembre 2022
- European Union Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease (EURL FMD) Workshop : « FMDV 3D interference with innate immunity. » Paris, France 27 septembre 2022.
- European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease Open Session (OS EuFMD) : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Marseille, France, 26 octobre 2022.
- Journées Francophones de Virologie (JFV) 2023 : « Interaction hôte spécifique de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I » Paris, France, 17-18 avril 2023

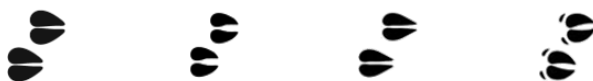


- EPIZONE 2023: « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Novi Sad, Serbie, 26-28 avril 2023
- International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (ISWAVLD) 2023: « Development of a porcine primary cell model for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis. » Lyon, France, 29 juin-01 juillet 2023



IV. Posters

- Journées Francophones de Virologie (JFV) 2022 : « Interaction de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I : un lien avec la persistance virale ? » Strasbourg, France, 11-12 avril 2022.
- European Society for Veterinary Virology (ESVV) 2022 : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Gand, Belgique, 20-23 septembre 2022.
- Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES (JSDA) 2022 : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Maisons-Alfort, France, 18-19 octobre 2022.
- Journées Francophones de Virologie (JFV) 2023 : « Développement d'un modèle de cellules primaires porcines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse. » Paris, France, 17-18 avril 2023
- EPIZONE 2023 : « Development of a porcine primary cell model for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis. » Novi Sad, Serbie, 26-28 avril 2023
- Oral Master 1 – Estelle Koulmann : « Détermination des domaines d'interaction minimums de la 3D^{pol} du FMDV O Mayenne Clone 2.2 par approche « fragmentome ». » Paris, France, 02 juin 2023



Introduction générale

I. Généralités sur la fièvre aphteuse

1) Historique de la fièvre aphteuse

La fièvre aphteuse (FA) est une maladie hautement contagieuse du bétail, connue depuis l'Antiquité et longtemps confondue avec d'autres affections telles que la peste bovine (1). Cependant, les premiers écrits décrivant un tableau clinique pouvant correspondre à la fièvre aphteuse ne datent que de 1514. Cette description est l'œuvre de Girolamo Fracastoro, aussi connu sous son nom latin Hieronymus Fracastorius, un moine vénitien qui a rapporté que les bovins malades présentaient des rougeurs et des aphtes dans la cavité buccale et au niveau des pattes (2). La maladie doit plus tard son nom à Francisco Toggia et à ses observations dans le Piémont en 1799. Des cas de fièvre aphteuse ont fréquemment été rapportés en France, en Allemagne et en Italie au cours des XVII^e et XVIII^e siècles. La maladie a été décrite pour la première fois en Asie en 1842, en Amérique du Sud en 1871 puis en Afrique en 1892 (3).

L'agent étiologique responsable de la fièvre aphteuse, connu aujourd'hui sous le nom de FMDV (*Foot-and-Mouth Disease Virus*) a été mis en évidence en 1897 par Loeffler et Frosch (4). Il s'agissait là d'une découverte historique puisqu'il s'agit de la première démonstration d'une maladie animale causée par un agent filtrable, et donc le premier virus animal mis au jour.

La découverte de la sensibilité du cobaye au virus de la fièvre aphteuse par Waldmann et Pape en 1920 a permis de définir un premier modèle expérimental permettant l'étude de cette maladie (5). En 1922, Vallée et Carré ont démontré la pluralité séro-immunologique du virus de la fièvre aphteuse en caractérisant deux sérotypes qu'ils ont nommés Vallée O et Vallée A d'après leur région de provenance respective (le département de l'Oise en France et l'Allemagne) (6). L'existence d'un troisième



sérotype, nommé Waldmann C a été démontrée quatre ans plus tard, en 1926, par Waldmann et Trautwein (7). Les noms de Vallée O, Vallée A et Waldmann C ont par la suite été raccourcis en O, A et C.

Trois sérotypes ont ensuite été découverts en 1948 à partir d'échantillons provenant du Botswana, de Zambie et du Zimbabwe, d'où leurs noms de SAT 1 (*Southern African Territories 1*), SAT 2 et SAT 3 (8).

Le septième et dernier sérotype décrit à ce jour, nommé Asia 1, a été identifié dans les années 1950 à partir d'échantillons provenant d'Inde et du Pakistan (9).

Le sérotype C du FMDV n'ayant pas été détecté depuis 2004 (au Kenya et au Brésil), il pourrait être considéré comme le premier sérotype connu à ne plus circuler et à s'éteindre (10).

2) La fièvre aphteuse en France

Jusqu'au début du XX^e siècle, la fièvre aphteuse revêtait un caractère enzootique en France et était considérée comme l'une des maladies les plus difficiles à combattre. Nocard et Leclainche, entre autres, décrivirent ainsi pas moins de huit épizooties au cours du XIX^e siècle, dont certaines longues de plusieurs années (11).

Entre la Première Guerre mondiale et 1950, la maladie s'est faite plus rare en France et est devenue épizootique, l'origine des foyers détectés provenant alors essentiellement du Moyen-Orient, d'Afrique du Nord ou d'Allemagne (12).

Les années 1950 marquent le début de la vaccination des bovins sur le territoire français. Cette mesure sera rendue obligatoire en 1962, dans le cadre d'une politique nationale de lutte médico-sanitaire, impliquant également l'élimination systématique de tous les animaux des espèces sensibles à proximité d'un foyer. L'efficacité de ces mesures fut rapidement prouvée puisque dès le début des années 1960, le nombre de



foyers atteints par le virus lors des épizooties se comptait en centaines, puis en dizaines, contre plusieurs centaines de milliers durant la première moitié du siècle.

Après deux brefs épisodes dans les années 1970, la fièvre aphteuse a touché 18 foyers en 1981, avant de disparaître du pays pendant 20 ans. En 1991, considérant que la fièvre aphteuse était éradiquée, la communauté européenne a décidé d'interdire la vaccination du cheptel (13).

Le 20 février 2001, la mise en évidence d'un foyer de fièvre aphteuse sur des porcs dans un abattoir du Sud de l'Angleterre marqua le retour de la fièvre aphteuse en Europe occidentale. Le virus ayant été détecté avec quelques semaines de retard, le risque de dissémination du virus était important. Après s'être répandu dans tout le Royaume-Uni, le virus fut détecté pour la première fois en France le 13 mars, puis une seconde fois le 23 mars 2001. Les mesures sanitaires ayant été appliquées rapidement et de manière drastique en France, la crise sanitaire a été contenue et aucun autre foyer n'a été détecté. Il s'agit là des derniers foyers détectés sur le sol français, et le pays a depuis recouvré son statut indemne vis-à-vis de la fièvre aphteuse (14).

3) Répartition géographique de la fièvre aphteuse

Si, par le passé, la quasi-totalité des régions d'élevage de la planète a déjà été touchée par des épizooties de fièvre aphteuse, de nombreuses zones telles que l'Europe occidentale, l'Amérique du Nord et centrale et l'Océanie en sont actuellement indemnes sans vaccination comme l'indique la [Figure 1](#). La majeure partie de l'Amérique du Sud est quant à elle indemne avec ou sans vaccination, selon les zones géographiques. A l'inverse, la fièvre aphteuse reste présente sous forme sporadique ou enzootique dans de nombreuses régions d'Asie, d'Afrique et du Moyen-Orient ainsi qu'au Venezuela (15).



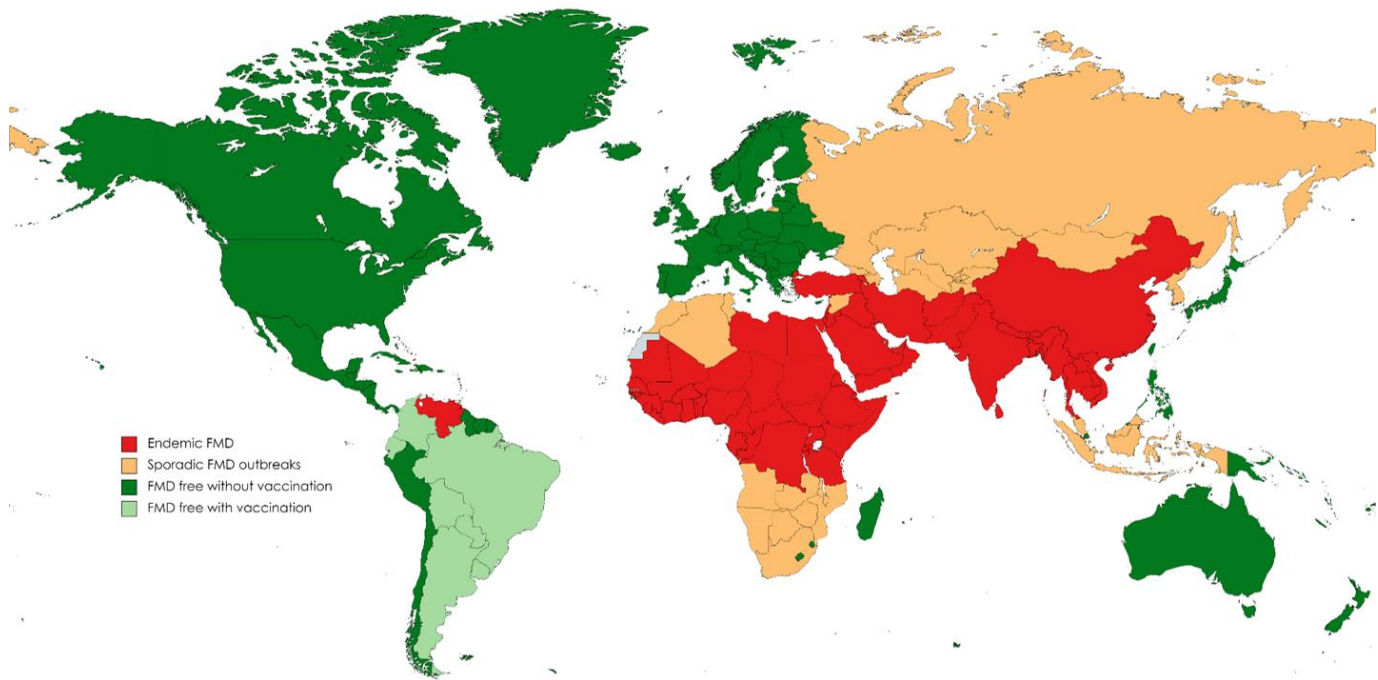


Figure 1 : Répartition mondiale de la fièvre aphteuse.

Répartition au 27 mars 2023 selon le Laboratoire Mondial de Référence pour la fièvre aphteuse. En rouge sont représentés les pays considérés comme endémiques pour la fièvre aphteuse. En orange, les pays présentant des cas sporadiques. En vert foncé, les pays possédant un statut indemne sans vaccination. En vert clair les pays possédant un statut indemne avec vaccination. Créé avec Mapchart.net, selon les données du World Reference Laboratory for foot-and-mouth disease.

Il convient toutefois de noter que seul un nombre restreint de pays et/ou régions, indemnes de fièvre aphteuse depuis plusieurs années pour l'extrême majorité, possèdent un statut officiel vis-à-vis de cette maladie, délivré par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA, fondée en tant qu'Office International des Epizooties (OIE)) (*cf.* Coordination internationale). Ainsi, la quasi-totalité des territoires où circule la fièvre aphteuse n'est pas officiellement recensée. Les épizooties sont déclarées de manière très hétérogène et il n'existe pas de distinction officielle entre les territoires où la maladie est enzootique et ceux affectés de manière sporadique.

En ce qui concerne la distribution des sept sérotypes du virus de la fièvre aphteuse dans le monde, leur répartition n'est pas uniforme. En effet, les sérotypes ubiquitaires, A et O, circulent dans l'ensemble des régions touchées à l'exception de l'Afrique australe,



alors que les sérotypes SAT 1-2-3 sont présents en Afrique subsaharienne, et que le sérotype Asia 1 est cantonné à l'Asie et au Moyen-Orient. Il existe toutefois quelques exceptions à cette distribution à l'image de la présence du sérotype Asia 1 en Grèce en 1984 et en 2000 et sa dissémination vers le Nord de l'Asie (Kirghizistan, le Tadjikistan, l'Ouzbékistan, Chine) durant les années 2000 (16,17). De même, le sérotype SAT 2, normalement limité à l'Afrique subsaharienne, a été détecté au Moyen-Orient, en Egypte et en Libye, et plus récemment en Irak, Jordanie puis en Turquie (18–21).

En se basant sur la répartition des différentes souches de fièvre aphteuse, les agences de santé animale que sont l'OMSA et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO, pour *Food and Agriculture Organisation*) ont pu définir sept pools de sérotypes co-circulants dans les régions enzootiques (Figure 2). Les pools 1, 2 et 3 correspondent respectivement à l'Asie du Sud-Est, au sous-continent indien et au Moyen-Orient, zones où co-circulent les sérotypes O, A et Asia 1. Le pool 4, couvrant l'Afrique de l'Est et une partie de l'Afrique centrale, regroupe les sérotypes O, A et SAT 1-2-3. Le pool 5 s'étend de la côte Ouest de l'Afrique jusqu'au Nord du Maghreb et à l'Afrique centrale, où il chevauche le pool 4. Le pool 5 contient les sérotypes O, A et SAT 1-2. Le pool 6 correspond à l'Afrique australe et abrite uniquement les sérotypes SAT 1-2-3. Enfin, le pool 7, recouvrant une grande partie de l'Amérique du Sud, renferme les sérotypes O et A.



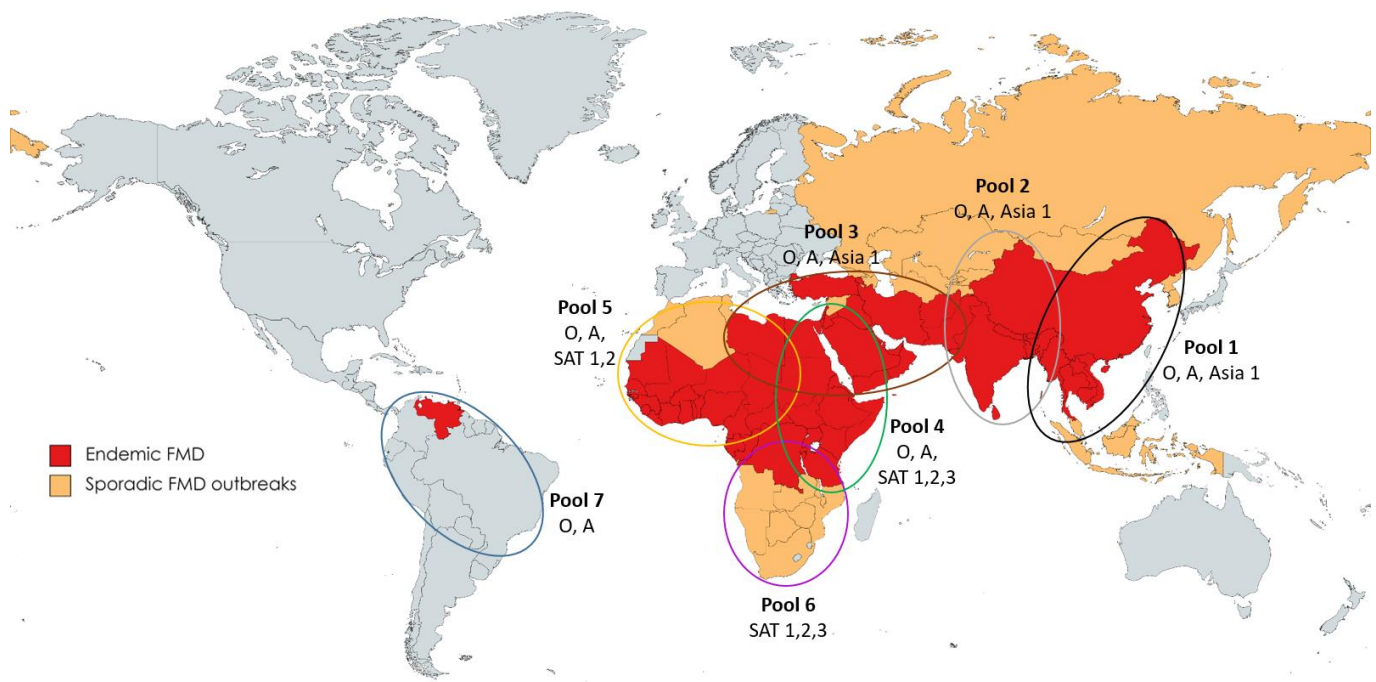


Figure 2: **Répartition mondiale des pools de virus de la fièvre aphteuse.**

Les sept cercles représentent les zones de circulation des sept pools de virus de la fièvre aphteuse ainsi que leur composition au 27 mars 2023. En rouge sont représentés les pays considérés comme endémiques pour la fièvre aphteuse. En orange, les pays présentant des cas sporadiques. Créé avec Mapchart.net, selon les données du World Reference Laboratory for foot-and-mouth disease.

4) Enjeux économiques et sociaux associés à la fièvre aphteuse

La fièvre aphteuse, listée parmi les quarante-neuf maladies réglementées par la nouvelle Loi de Santé Animale 2021 et parmi les cinq maladies majeures citées dans l'article 5 de cette loi, représente un véritable fléau pour l'élevage, non pas pour sa létalité, qui demeure relativement limitée, mais pour les conséquences socio-économiques qui en découlent. En effet, cette maladie engendre des retards de croissance, des avortements ainsi que des baisses de production laitière chez les animaux de rente, induisant une perte considérable de leur valeur économique. La détection d'un foyer de fièvre aphteuse a également pour conséquence l'instauration de restrictions commerciales à long terme dans la zone touchée dont les conséquences peuvent être désastreuses, ainsi que l'abattage des animaux sensibles à la maladie dans



les pays précédemment indemnes et qui pratiquent cette politique d'éradication (22,23). Ces dernières décennies, les épizooties de fièvre aphteuse ont principalement touché des pays en développement (Figure 3).

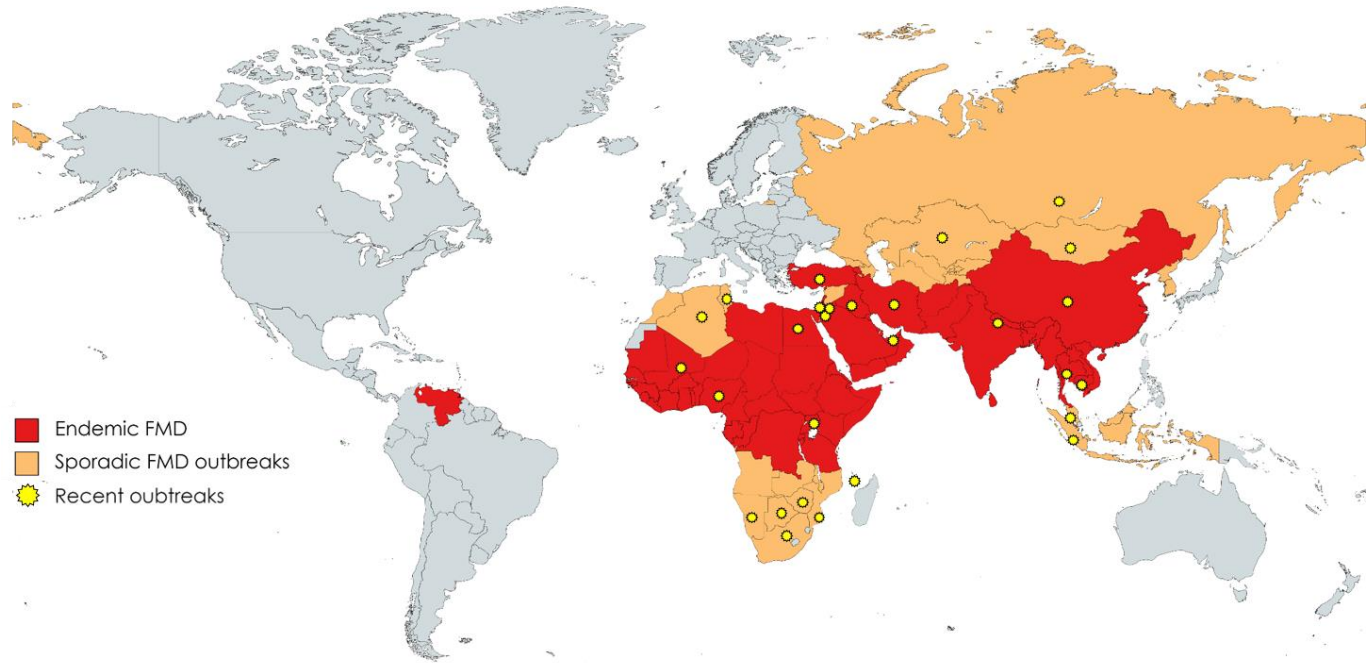
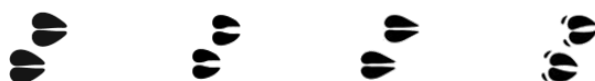


Figure 3 : Répartition mondiale des foyers de fièvre aphteuse déclarés entre 2021 et juin 2023. En rouge sont représentés les pays considérés comme endémiques pour la fièvre aphteuse. En orange, les pays présentant des cas sporadiques. Les foyers sont marqués par une étoile à douze branches. Créé avec Mapchart.net, selon les données du World Reference Laboratory for foot-and-mouth disease.

Ces pays, principalement africains, moyen-orientaux et asiatiques, ont pour la plupart un niveau de richesse considéré comme faible et sont fortement tributaires de l'élevage. En effet, la FAO considère cette activité comme essentielle à la sécurité alimentaire humaine des pays en développement puisqu'elle permet de transformer les résidus de récolte en denrées à forte teneur nutritive et à haute qualité nutritionnelle, et de garantir l'approvisionnement alimentaire même en cas de mauvaises récoltes (24). De plus, l'élevage constitue souvent un des principaux produits d'échange intra- et interrégionaux (25). Ces échanges très fréquents d'animaux, souvent élevés par de petits exploitants en semi-liberté - au contact d'animaux sauvages potentiellement porteurs de la maladie, comme le buffle, - participent ainsi grandement à la diffusion



de la fièvre aphteuse et sont à l'origine de nombreux foyers dans ces territoires. A titre d'exemple, le Népal a recensé près de 45 foyers (types A et O) au cours du premier semestre 2017, mettant en péril la fragile situation économique et par conséquent la survie d'une partie de la population (26). D'après l'OMSA, 75 % des dépenses liées à la prévention et à la lutte contre la fièvre aphteuse concernent les pays à faible revenu et à revenu intermédiaire inférieur, preuve de l'importance prépondérante de cette maladie dans les régions très dépendantes de l'élevage (15). Le coût annuel associé à la fièvre aphteuse dans les régions enzootiques a été estimé entre 6,5 et 21 milliards de dollars US par Knight-Jones *et al.* (23). Cette estimation prend en compte l'impact économique direct de la maladie, à savoir les pertes de production liées à la diminution de la quantité et de la qualité du lait, la limitation du gain de poids du bétail, la baisse de la fertilité et la perte d'animaux. Elle tient également compte de son impact économique indirect associé à la surveillance des troupeaux, au diagnostic, à la vaccination, aux potentielles restrictions commerciales et touristiques ainsi qu'aux coûts importants relatifs à l'abattage. Outre les fonds alloués à la prévention et à la lutte, il s'avère que la circulation du FMDV dans les zones enzootiques a un impact économique mondial. En effet, le marché économique international peut être sujet à des perturbations lors de certaines épizooties. Il a notamment été montré que le prix de la viande de bœuf dépendait grandement du statut sanitaire du pays exportateur (27). Alors que les échanges internationaux participent à la propagation de nombreux pathogènes dont le FMDV, l'application de politiques sanitaires rend en effet impossible l'exportation de bétail ou de produits qui en sont issus depuis les régions enzootiques vers les zones indemnes (*cf.* Epidémiologie et contrôle des importations) (28). Or, il est estimé que les régions enzootiques hébergent près de trois-quarts du bétail mondial sensible au FMDV, limitant l'accès d'un grand nombre d'animaux au marché international (29). Ceci a abouti à la création de deux marchés



parallèles, à savoir le marché ouvert aux régions enzootiques et le marché principalement réservé aux régions indemnes. L'exemple du commerce international de viande de bœuf est particulièrement frappant avec des écarts de prix entre les deux marchés dépassant les 50% durant la seconde partie du XX^e siècle (27). Ces différences de prix et la possibilité d'accéder au marché réservé aux zones indemnes peuvent constituer une motivation importante pour certains pays. Certains pays enzootiques par le passé tels que l'Argentine et l'Uruguay, ont ainsi bénéficié d'une augmentation de la richesse générée par leurs exportations agricoles lors de leur accès au marché américain à la fin des années 1990 (27).

L'impact de la fièvre aphteuse sur l'économie mondiale est d'autant plus important lorsque des épizooties surviennent dans des pays qui en étaient exempts jusqu'alors. L'introduction du FMDV dans les pays indemnes peut provenir de l'importation de marchandises contaminées issue de pays touchés, d'une dissémination accidentelle du virus, ou encore faire suite à des échanges illégaux d'animaux. L'intensification de la circulation des moutons dans les semaines précédant la fête de l'Aïd-el-Kébir constitue notamment un facteur de risque important. Les pays exempts de fièvre aphteuse étant pour la plupart des pays à revenu supérieur, les conséquences de la maladie sont surtout économiques (30). L'exemple le plus frappant est l'épizootie survenue au Royaume-Uni en 2001, probablement suite à l'alimentation de porcs avec des eaux grasses non traitées issues d'une importation de viande asiatique contaminée. Cet événement a illustré la menace que constitue la fièvre aphteuse pour un pays indemne ne vaccinant pas contre la maladie, avec plus de 2000 élevages infectés (31). En considérant à la fois les pertes dues à l'abattage de plus de 6 millions d'animaux sensibles autour des foyers, l'embargo commercial de plusieurs mois, et la limitation du tourisme, cette épizootie a coûté près de 8 milliards de livres sterling au pays (32). Lors de la survenue d'une épizootie dans une région indemne, l'embargo commercial



constitue un frein extrêmement important à l'économie agricole des pays touchés. En effet, cette limitation des exportations, causant de lourdes pertes économiques, reste appliquée durant plusieurs mois après l'abattage du dernier animal et se traduit par la suite par une baisse de confiance des consommateurs (*cf. Dispositif de lutte en cas d'épizootie*) (33). De nombreux travaux de simulation portant sur les conséquences possibles d'une introduction du FMDV dans des régions indemnes ont été menés afin d'en estimer l'impact financier. Il a notamment été suggéré qu'en cas d'épizootie en Australie, sixième plus grand producteur de viande de bœuf et deuxième exportateur mondial, l'impact économique sur la seule filière bovine pourrait atteindre les 1,7 milliard de dollars (34).



II. Généralités sur le virus de la fièvre aphteuse

1) Taxonomie du FMDV

L'agent étiologique de la fièvre aphteuse est un virus appartenant au genre *Aphthovirus* dans la famille *Picornaviridae*. Cette famille compte à ce jour, 158 espèces classées en 68 genres au sein de 5 sous-familles. Les picornavirus sont de petits virus non enveloppés, à ARN monocaténaire de polarité positive, dont les génomes mesurent entre 6,7 et 10,1kb, et possédant une capsidie de symétrie icosaédrique (35).

La plupart des picornavirus connus sont spécifiques à un faible nombre d'espèces hôtes, le FMDV et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV, pour *Encephalomyocarditis virus*), virus au large spectre d'hôtes, faisant figure d'exception. Les virus de cette famille infectent principalement les mammifères et les oiseaux, mais certains ont également été détectés chez des reptiles, des amphibiens ou encore des poissons. Ces virus se transmettent de manière horizontale, principalement par voie oro-fécale, aérienne ou par contact. Parmi les picornavirus se trouvent plusieurs agents pathogènes d'intérêt en médecine humaine et vétérinaire, tels que les poliovirus, l'EMCV, le virus de l'hépatite A (HAV, pour *Hepatitis A virus*), ou encore le virus de la fièvre aphteuse.

Le genre *Aphthovirus* – du grec *aphtha* (aphte, ulcère superficiel douloureux de la muqueuse) – se compose de quatre espèces virales, pathogènes pour les animaux uniquement, à savoir le virus de la fièvre aphteuse, les virus de la rhinite bovine A (BRAV, pour *Bovine rhinitis virus A*) et B (BRBV) et le virus de la rhinite équine A (ERAV, pour *Equine rhinitis A Virus*) (36). Ces quatre espèces virales ont également pour point commun leur importante sensibilité aux pH extrêmes et notamment aux pH acides (37).



2) Structure du FMDV

Le FMDV est un virus de petite taille (entre 25 et 30nm de diamètre), à ARN simple brin de polarité positive, doté d'une capsidie de symétrie icosaédrique et d'un génome d'environ 8,5kb (16).

a) Organisation de la capsidie

La capsidie du FMDV, dont la structure tridimensionnelle a été déterminée par cristallographie aux rayons X, suit une symétrie icosaédrique, caractérisée par la présence d'axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2 (Figure 4) (38). Chez les picornavirus, la capsidie est divisée en 60 unités ou protomères, elles-mêmes organisées en 12 pentamères, constitués de quatre protéines structurales, à savoir : VP1 (pour *Viral Protein 1*), VP2, VP3 et VP4. Chacune de ces protéines est ainsi présente à raison de 60 copies par capsidie (39).

Les protéines VP1, VP2 et VP3, aux structures assez similaires, sont situées sur la face externe de la capsidie. Les protéines VP1 étant localisées autour de l'axe de symétrie d'ordre 5, tandis que les protéines VP2 et VP3 sont réparties de manière alternée autour de l'axe de symétrie d'ordre 3. A l'inverse, les protéines VP4 sont localisées sur la face interne de la capsidie, à proximité de l'ARN viral (38). Cet assemblage de multiples sous-unités identiques permet aux virus à symétrie icosaédrique d'assurer les fonctions essentielles de protection du génome viral et d'attachement aux récepteurs de surface de la cellule hôte. Cette structure, plus économique pour le virus que l'association de structures plus larges selon une symétrie hélicoïdale, ne permet toutefois que l'encapsidation d'un génome de taille limitée (40).



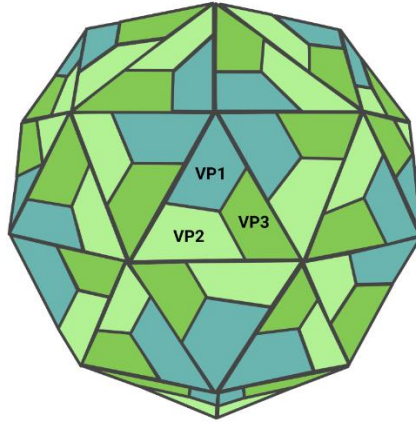


Figure 4 : **Capside du virus de la fièvre aphteuse.**

Chacune des faces de la capside est divisée en 60 unités, elles-mêmes organisées en 12 pentamères, constitués de quatre protéines structurales, VP4, VP2, VP3 et VP1. Chacune de ces protéines est ainsi présente à raison de 60 copies par capside. Les protéines VP1, VP2 et VP3, aux structures assez similaires, sont situées sur la face externe de la capside, tandis que VP4 est située sur la face interne. Créé avec Biorender.com.

b) Organisation du génome

Le génome du FMDV est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive mesurant environ 8,5 kb (Figure 5). Il est subdivisé en trois régions principales, à savoir la région non codante 5'UTR (*Untranslated Region*), la région codant la polyprotéine précurseur et la région non codante 3'UTR (41).

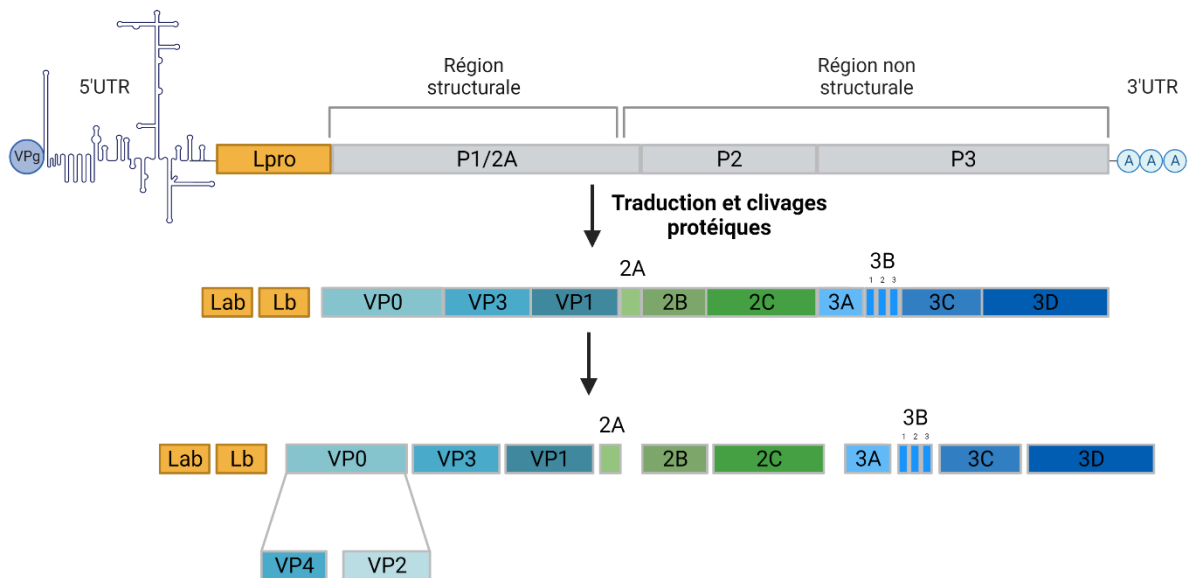


Figure 5 : **Structure du génome du virus de la fièvre aphteuse et expression des protéines virales.**

Le virus de la FA possède un génome de petite taille (environ 8,5 kb) codant 4 protéines structurales, VP4, VP2, VP3 et VP1, formant la capside, et 11 protéines non structurales, Lab pro, Lb pro, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C et 3D, responsables du cycle infectieux. De Sarry et al. 2022 (42). Créé avec BioRender.com.



i. Région non codante

5'UTR

La région 5'UTR du FMDV, mesurant environ 1,3kb, est particulièrement longue par rapport à celle des autres picornavirus (43). Cette région a la structure secondaire complexe, composée de doubles hélices et de boucles, comprend cinq éléments ARN hautement structurés impliqués dans la traduction et la réplication virale, à savoir le segment S, le fragment polyribocytidylate (poly-C), deux à quatre structures de pseudo-noeuds, l'élément répliatif en cis (*cre*, pour *cis acting replicating element*) et le site d'entrée interne du ribosome (IRES, pour *Internal ribosome entry site*).

Le fragment S est une structure de tige-boucle de 360 nucléotides (nt) décrite comme jouant un rôle dans le maintien de la stabilité du génome, la réplication du génome viral, et la pathogénèse du FMDV (44-47).

Le fragment poly-C est un élément de taille variable (100 à 250 nt) composé de résidus cytidines (48). Cet élément variable n'a été retrouvé que chez quelques espèces de picornavirus dont le FMDV. Alors que des études ont avancé un potentiel impact du fragment poly-C sur la réplication virale, la pathogénicité et la virulence du FMDV, son rôle biologique reste encore mystérieux à ce jour (49,50).

En aval du fragment poly-C, se trouve un nombre variable de pseudo-noeuds, ou pseudoknots, dont les fonctions sont largement méconnues. Il a toutefois été démontré assez récemment que ces structures sont associées au spectre d'hôte du virus, à la réplication virale, à l'assemblage du virion ainsi qu'à la pathogénèse du FMDV (51,52).

L'élément *cre* est une courte structure tige-boucle d'environ 55 nt comprenant un motif conservé (AAACA) au niveau de la boucle (53). Ce motif, essentiel à l'initiation de la réplication du génome viral, est impliqué dans l'uridylylation de la VPg (pour Viral Genome Linked Protein) par l'ARN polymérase (47,54) (*cf.* Réplication).



L'IRES, dernière structure rencontrée dans la région 5'UTR, est une structure d'environ 450 nt servant à la fixation du ribosome et à l'initiation de la traduction de l'ARN viral de manière coiffe-indépendante (55,56). Cette séquence hautement conservée se subdivise en cinq domaines structuraux nommés de H à L, et contient une région riche en pyrimidines précédant immédiatement les codons d'initiation de la traduction AUG du génome (57).

3'UTR

La région 3'UTR, située en aval du codon stop du cadre ouvert de lecture (ORF, pour *Open Reading Frame*), est composée d'environ 90 nt formant deux structures tiges-boucles suivies d'une queue poly-A de longueur variable (54,58). Cette région a été décrite comme pouvant moduler l'efficacité de répllication et la virulence du FMDV par le biais d'interactions avec le fragment S et/ou l'IRES (59–61).

ii. Région codante

Le génome du FMDV, comme tous les picornavirus, comprend un ORF codant une seule grande polyprotéine précurseur formée de plus de 2300 acides aminés (aa). Cette polyprotéine n'est quasiment jamais observée sous sa forme intacte puisqu'elle subit un traitement co- et post-traductionnel consistant en une succession de clivages essentiellement opérés par les protéases virales L_{pro} et 3C. Ces clivages successifs aboutissent à la production de divers précurseurs, et *in fine* à quinze protéines matures. Parmi ces protéines matures figurent les quatre protéines structurales impliquées dans l'architecture de la capsidie et onze protéines non structurales impliquées à la fois dans l'accomplissement du cycle viral ainsi que dans l'échappement du virus à la réponse de l'hôte (42,62–65).

Les quatre protéines structurales VP4, VP2, VP3 et VP1 proviennent du précurseur P1/2A (66). Ce précurseur subit une myristoylation de son extrémité N-terminale, puis



un clivage médié par la protéase 3C, aboutissant à la production de VP0, VP3 et VP1, ainsi que le peptide 2A (67). A la fin de l'étape d'assemblage de la particule virale, VP0 subit un nouveau clivage, dont le mécanisme n'est pas décrit, pour donner VP4 et VP2 (65).

VP4

La protéine VP4 est la plus petite des protéines structurales du FMDV, composée de 85 aa, et située sur la face interne de la capsid. Cette région du génome est hautement variable parmi les picornavirus. Cette protéine, pour laquelle assez peu de données sont disponibles dans la littérature, contribue à l'assemblage de la capsid *via* le groupement myristate ajouté à son extrémité N-terminale par myristoylation (38). Un rôle secondaire de la VP4 a également été mis en évidence dans la facilitation de la réplication virale par inhibition de la réponse immunitaire innée (*cf. Immunité innée*).

VP2

La protéine structurale VP2, est formée de 218 aa dont une région riche en acides glutamiques servant probablement de site de liaison du calcium et pouvant jouer un rôle important dans la stabilité de la capsid (38). VP2 participe également à la stabilité de la capsid en formant des liaisons disulfures avec la protéine VP1. En outre, il a été montré que VP2 pouvait favoriser la réplication du FMDV en stimulant certaines voies de l'autophagie (68) (*cf. Immunité innée*).

VP3

La protéine VP3, constituée de 220 aa, est la protéine structurale la plus conservée parmi les picornavirus. Bien que figurant sur la face externe de la capsid, la protéine VP3 possède une extrémité N-terminale plus ou moins hydrophobe, dirigée vers l'intérieur de la capsid, qui favorise l'association des protomères de protéines



structurales en pentamères (38). Des dimères de VP3 peuvent également se former, par des ponts disulfures, participant de fait, au maintien de la capsid virale. La protéine VP3 est également impliquée dans la pathogénicité du FMDV. En effet, il a été montré qu'une mutation unique pouvait favoriser la fixation du virus aux héparanes sulfate (HS), un corécepteur utilisé par certaines souches, en augmentant la charge positive de la surface virale (69). De plus, VP3 a été montré comme participant à la modulation de la réponse immunitaire innée médiée par le FMDV, en ciblant notamment la réponse interféron (IFN) de type I (*cf. Immunité innée*).

VP1

La protéine structurale VP1 se compose de 213 aa formant de multiples boucles extrêmement exposées, ce qui en fait la protéine la plus antigénique du FMDV (65). Son caractère antigénique dépend notamment de deux régions très variables (70). L'une de ces régions est la boucle G-H qui présente un motif conservé Arg-Gly-Asp (RGD) (71). Ce dernier joue un rôle central dans le cycle de vie du FMDV puisqu'il constitue un site de liaison aux récepteurs principaux du virus, à savoir les intégrines (72). Tout comme la protéine VP3, VP1 possède une extrémité N-terminale, dirigée vers l'intérieur de la capsid, qui participe à l'association et au maintien des différents éléments de cette dernière (38). La protéine VP1 est la protéine structurale du FMDV pour laquelle le rôle dans la subversion de la réponse immunitaire est le plus documenté (42). En effet, cette protéine, figurant parmi les premières protéines virales détectées par la cellule hôte, a été montrée comme capable d'interagir avec de nombreux acteurs de la réponse interféron de type I (*cf. Immunité innée*).



Lab_{pro}/ Lb_{pro}

La protéine *leader*, L_{pro}, première protéine du FMDV à être traduite, est une protéase à cystéine de type papaïne, qui se libère de la polyprotéine par clivage entre son domaine C-terminal et le domaine N-terminal de VP4 au cours de la maturation virale (73,74). Il existe deux codons AUG d'initiation de la traduction de L_{pro} distants de 84 nt (75). Selon le codon AUG à partir duquel débute la traduction, deux formes alternatives de la protéine peuvent être produites, à savoir la forme longue de 200 aa Lab_{pro}, et la forme courte de 170 aa Lb_{pro}, qui est la forme prédominante *in vivo* (76). Bien que cela ne soit pas certain, il semblerait que la séquence séparant les deux AUG soit impliquée dans le choix du codon d'initiation de la traduction par le biais d'interactions avec un facteur de régulation (77). Qu'elle soit sous sa forme courte ou sa forme longue, la protéase L_{pro} est un déterminant majeur de la virulence du FMDV. Il a ainsi été montré qu'une délétion de la région Lab_{pro} complète était létale pour le virus, tandis qu'un virus dépourvu de Lb_{pro} présente un taux de réplication plus faible, et une propension largement inférieure à induire des signes cliniques par rapport à un virus sauvage (78–81). L_{pro} est également impliquée dans la facilitation de la synthèse des protéines virales au détriment des protéines cellulaires. En effet, cette protéine est responsable du clivage des facteurs d'initiation de la traduction eIF4G-I (*eukaryotic translation Initiation Factors 4 Gamma I*) et eIF4G-II, résultant en l'interruption de la traduction de l'ARN messager (ARNm) de l'hôte (82–84). La traduction de l'ARN du FMDV, médiée par l'IRES, étant indépendante des facteurs eIF4G, le virus peut de ce fait détourner entièrement la machinerie cellulaire de son hôte (85). Cette inhibition de la traduction des ARN cellulaires constitue un moyen efficace de lutte contre la réponse immunitaire de l'hôte. Ce n'est toutefois pas le seul mécanisme de lutte impliquant L_{pro}, bien au contraire. Plus de vingt interactions protéiques faisant



intervenir L_{pro} ont notamment été décrites comme participant à la subversion de la réponse interféron de type I (42,62,86). L_{pro} figure ainsi parmi les protéines du FMDV les plus importantes dans la lutte contre la réponse cellulaire antivirale (*cf. Immunité innée*).

2A

Alors que la protéine 2A du FMDV a longtemps été considérée comme codée par la région P2 du génome, il se trouve qu'elle provient en réalité du précurseur P1/2A. En effet, cette protéine de 18 aa, bien plus petite que celle des autres picornavirus et dépourvue d'activité protéase, se dissocie de la protéine 2B en induisant un « *ribosomal skipping* » ou saut ribosomal (87). Ainsi, une séquence NPG(P) située en C-terminal de la 2A favorise l'hydrolyse de la liaison entre P1/2A et 2B, séparant simultanément P1/2A du reste de la polyprotéine et permettant au ribosome de continuer à synthétiser les protéines situées en aval (88). Très peu de données concernant la 2A sont actuellement disponibles et le rôle biologique de ce petit peptide reste pour l'heure méconnu.

2B

La protéine 2B, codée par l'une des régions les plus conservées du génome du FMDV, est une protéine transmembranaire hydrophobe de 154 aa appartenant à la classe des viroporines (89). Elle possède deux domaines transmembranaires impliqués dans le réarrangement des membranes cellulaires. Après homodimérisation, les domaines hydrophobes s'associent pour endommager la bicouche lipidique induisant ainsi une augmentation de la perméabilité membranaire et favorisant de fait la libération des particules virales (90,91). Les dommages causés à l'intégrité des membranes provoquent aussi des anomalies au niveau de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique



activant certaines voies de l'autophagie (*cf.* [Immunité innée](#)). Les réarrangements membranaires aboutissent également à la formation de niches intracellulaires qui permettent au FMDV de ne pas être détecté par les senseurs de l'immunité cellulaire. La viroporine 2B est principalement localisée au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (RE), où elle interagit avec la protéine 2C afin de bloquer la sécrétion de protéines, affectant ainsi le transport des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et donc les voies de signalisation impliquées dans la réponse cellulaire (92,93).

2C

La protéine 2C, composée de 318 aa, est l'une des molécules les plus conservées parmi les protéines virales codées par le FMDV. Cette protéine possède notamment, à son extrémité N-terminale, une hélice amphipathique hautement conservée au sein des picornavirus (94). Cette structure permet à la protéine 2C de se lier aux membranes cellulaires du RE et du Golgi, contribuant ainsi à la formation des complexes de réplication du FMDV (95) (*cf.* [Réplication](#)). Le rôle de cette protéine dans la réplication virale est d'autant plus important qu'elle possède un domaine hélicase permettant la liaison à la région 3'UTR de l'ARN viral, potentiellement impliqué dans la transcription du brin positif (96,97). Au sein des complexes de réplication, une fois l'ARN viral néo-synthétisé, 2C peut interagir avec la protéine VP3, permettant l'assemblage de la capsid et l'empaquetage de l'ARN. La localisation subcellulaire de la protéine 2C, à proximité des membranes, détermine également les voies de signalisation bloquées par 2BC, et permet, de fait, l'inhibition de la réponse immunitaire (92,93). De manière plus générale, la protéine 2C fait partie des régulateurs importants de la réponse antivirale de l'hôte, modulant diverses voies de signalisations liées à l'apoptose, l'autophagie et



la réponse interféron de type I, afin de favoriser la prolifération du FMDV (*cf. Immunité innée*).

3A

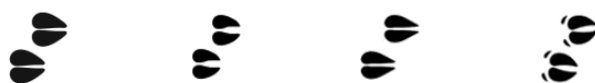
Le précurseur 3AB possède un domaine transmembranaire hydrophobe permettant son insertion dans la membrane du complexe de réplication virale, où il est clivé par l'intermédiaire de la protéase 3C. Ce clivage aboutit à la libération de la protéine 3A d'une part, et de la 3B d'autre part. La protéine 3A se compose de 153 aa, ce qui en fait la plus longue protéine 3A parmi les picornavirus, du fait d'une extension de son domaine C-terminal. Alors que cette protéine fait partie des protéines les plus variables du FMDV avec seulement 37% d'acides aminés invariants, son domaine N-terminal contenant un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe, est hautement conservé d'un sérotype à l'autre (60,98). Contrairement à la protéine 3A de la plupart des autres picornavirus, celle-ci, bien qu'étant localisée au niveau des membranes du RE et du Golgi, n'est pas directement impliquée dans le réarrangement des membranes intracellulaires. Cependant, la protéine 3A du FMDV joue un rôle clé dans la réplication du virus, puisqu'elle est impliquée dans la formation du complexe de réplication virale, ainsi que dans la virulence, le tropisme et le spectre d'hôte du virus. En effet, la région C-terminale de cette protéine est particulièrement sujette à des mutations ponctuelles pouvant affecter la pathogénicité du virus. Il a ainsi été démontré qu'une mutation unique pouvait aboutir à l'infection d'un hôte non naturel comme le cobaye (99). D'autres études ont identifié des isolats de virus présentant des délétions de 10 à 20 aa, associées à une virulence accrue chez le porc et à une virulence extrêmement réduite chez les bovins (99,100). En outre, la protéine 3A du FMDV fait partie des moyens utilisés par le virus pour faciliter sa réplication et éviter sa détection par le système immunitaire. Cette protéine est ainsi impliquée dans de nombreuses interactions avec



des protéines des voies de signalisation cellulaires responsables de la réponse antivirale de l'hôte (*cf. Immunité innée*).

3B

L'ARN génomique du FMDV présente la particularité d'être lié de façon covalente à une petite protéine virale de 23 ou 24 aa nommée 3B ou VPg. Cette protéine essentielle à la réplication du FMDV se lie à chaque molécule d'ARN viral *via* une liaison phosphodiester entre une tyrosine et l'acide uridylique terminal (101,102). Au cours du cycle viral, la protéine VPg, sous forme uridylée VPg(pU), sert d'amorce pour la synthèse des brins d'ARN négatifs ainsi que celle des brins positifs (103) (*cf. Réplication*). Contrairement à la plupart des autres virus de sa famille, le FMDV ne possède pas une mais trois copies similaires mais non identiques de 3B, à savoir 3B1, 3B2 et 3B3 (104). Si chacune des trois versions de la protéine 3B peut servir d'amorce à la polymérase virale, 3B3 s'avère être le substrat le plus efficace. Ainsi, il a été démontré qu'un virus délété de 3B3 aboutissait à la production d'un ARN non infectieux, tandis que les virus délétés de 3B1 ou 3B2 ne présentent qu'une réduction de l'efficacité de réplication (105,106). Alors que tous les isolats de FMDV recensés à travers le monde possédaient jusqu'alors les trois copies de la protéine 3B, la souche O/SKR/01/2014, identifiée en Corée du Sud présente une mutation délétère de 3B1. Cette découverte est d'autant plus intéressante que cette souche a été associée à une très faible virulence chez le porc, soulignant un potentiel rôle de 3B dans la pathogénicité du FMDV (107). Les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider, tout comme le rôle occupé par la protéine 3B dans la lutte contre la réponse immunitaire, qui est pour l'heure peu documenté.



3C

La protéine 3C du FMDV est une protéase à cystéine de type chymotrypsine, responsable de la plupart des clivages nécessaires à la maturation de la polyprotéine virale (108) (*cf.* Clivage). Tout comme la protéine L_{pro}, 3C est associée à l'inhibition de la traduction des ARNm de l'hôte, puisqu'elle est aussi responsable du clivage d'eIF4G, mais de manière plus tardive et au niveau d'un site de clivage différent (109). Cette protéase est également à l'origine du clivage protéolytique d'eIF4A, une autre sous-unité du complexe eIF4, dont l'activité hélicase est nécessaire au déroulement des structures secondaires de l'ARNm. Comme pour les autres picornavirus, la protéine 3C du FMDV a la capacité d'entrer dans le noyau de la cellule hôte, grâce à une séquence d'adressage (NLS, pour *Nuclear Localisation Signal*) située à l'extrémité N-terminale du précurseur 3CD (110). Une fois dans le noyau, cette protéine peut cliver de nombreux facteurs de transcription cellulaire (111,112). De plus, la protéase 3C a été montrée comme participant au remodelage des membranes intracellulaires médié par 2B et 2C, responsable du blocage de la sécrétion des molécules du CMH-I (93). Par ailleurs, 3C est considérée comme la seconde protéine la plus importante en ce qui concerne la subversion de la réponse antivirale de l'hôte (42) (*cf.* [Immunité innée](#)).

3D^{pol}

La protéine 3D^{pol}, dernière protéine codée par le génome du FMDV et constituée de 470 aa hautement conservés, est une ARN polymérase ARN-dépendante (113). Alors que la protéase 3C contenue dans le précurseur 3CD est active, la polymérase 3D^{pol} ne devient active qu'après le clivage du précurseur (114). Une fois active, la 3D^{pol}, associée à d'autres protéines non structurales, catalyse la réplication de l'ARN viral au sein des complexes de réplication (*cf.* [Réplication](#)). Comme la plupart des ARN polymérases ARN-dépendantes, la 3D^{pol} du FMDV possède une structure en forme de main,



composée de sous domaines appelés « paume », « doigts » et « pouce » permettant la reconnaissance du substrat au niveau du site catalytique (115,116). Le site catalytique de 3D^{pol} est localisé au niveau de la « paume », sous domaine le plus conservé et composé de motifs spécifiques, à savoir un feuillet- β flanqué de deux hélices- α . Ces motifs sont nécessaires au maintien de l'intégrité du site catalytique, ainsi qu'à la reconnaissance et à la liaison des nucléotides (117). A l'image de la protéine 3B, le rôle de 3D^{pol} dans la réplication de l'ARN viral est bien caractérisé, cependant son implication dans la lutte contre la réponse antivirale n'est que très peu documentée pour le FMDV (*cf. Immunité innée*).

3) Variabilité génétique du FMDV

a) Variation génétique

La grande diversité du FMDV, illustrée par l'existence de sept sérotypes, de plus de soixante sous-types et d'une infinité de quasi-espèces, *i.e.* populations composées de virus génétiquement apparentés mais non identiques, s'explique principalement par la faible fidélité de la polymérase virale et son absence d'activité correctrice (6,118,119). Les caractéristiques de son ARN polymérase, associées à un cycle répliatif extrêmement court, induisent en effet une évolution génomique très rapide du FMDV. Bien que le taux d'erreur de la polymérase virale soit constant, la forte dérive génétique observée au sein des populations de FMDV n'est pas homogène d'une région génomique à l'autre.

Ainsi, la diversité génétique du virus ne dépend pas que de la polymérase mais d'autres facteurs tels que la pression de sélection, la fixation des mutations et les événements de recombinaison (120–122). En effet, la dérive génétique est d'autant plus importante pour les régions codant les protéines de capsid, soumises à une plus forte pression de sélection par le système immunitaire. Le taux de substitution nucléotidique de ces



régions est de l'ordre de 10^{-3} nt par site et par an (31,123,124). Alors que le pourcentage d'identité moyen en prenant en compte tous les sérotypes est de 73%, il ne dépasse que légèrement les 50% d'identité dans le cas de la région codant la protéine VP1 (125). La pression de sélection peut être due à une grande diversité de paramètres liés à l'hôte tels que les récepteurs spécifiques dont il est pourvu, son statut immunitaire, ou à l'environnement extérieur. La fixation des mutations joue également un rôle majeur dans l'évolution des populations virales. Alors que certaines mutations ponctuelles n'ont pas d'impact sur la vitalité du virus, d'autres peuvent par exemple induire des avantages vis-à-vis de la pression de sélection ou des désavantages réplcatifs. Certaines régions extrêmement importantes dans le cycle de vie du FMDV, pour lesquelles une mutation est délétère, sont ainsi très hautement conservées entre les sérotypes, notamment au niveau des régions codant 3B et 3D^{pol} (126). Il est considéré que plus de 64 % du génome du FMDV est susceptible d'être affecté par une mutation sans que cela n'affecte la vitalité du virus (127).

Alors que l'impact des recombinaisons entre deux souches virales dans la diversité génétique du FMDV a longtemps été considéré comme mineur, les données récoltées ces dernières années tendent à montrer que ces évènements constituent un facteur important de la variabilité génétique du FMDV (128,129). En effet, il a été montré que dans le cas de co-infections expérimentales de buffles par deux sous-populations différant par leur séquence de capsid, le taux de recombinaison de la protéine VP1 est semblable au taux de substitution nucléotidique (130). Des phénomènes de trans-encapsidation, *i.e.* d'emballage de l'ARN génomique d'une souche dans la capsid d'une souche hétérologue ont également été mis en évidence dans le cas de co-infections (131,132). Ces phénomènes sont accentués par la présence d'animaux infectés de manière persistante, plus susceptibles aux co-infections (*cf.* Persistance du FMDV). Ainsi, il a été montré que des buffles africains, naturellement co-infectés par



les sérotypes SAT1 et SAT2, peuvent contribuer à l'émergence de nouveaux virus suite à des événements de recombinaisons intersérotypiques (133). De même, il a été montré que des co-infections et des surinfections expérimentales de bovins préalablement infectés de manière persistante peuvent aboutir à l'émergence des recombinants échappant à la réponse immunitaire de l'hôte (134,135). Les événements de recombinaison et de trans-encapsidation sont d'autant plus susceptibles de se produire dans les régions enzootiques pour le FMDV, où co-circulent plusieurs sérotypes et sous-types, et où les infections persistantes et les co-infections sont fréquentes. De nouvelles souches virales voient ainsi le jour régulièrement, facilitant l'infection des populations sensibles, en échappant aux anticorps circulants, et rendant toujours plus difficile le contrôle de la maladie (*cf.* [Persistance du FMDV & Méthodes de lutte contre la fièvre aphteuse](#)).

b) Variation antigénique

La variation antigénique découle de l'importante variabilité génétique du FMDV. En effet, les divergences intersérotypiques, voire au sein même des sérotypes, sont responsables de l'échappement du virus à la neutralisation médiée par des anticorps dirigés contre une autre souche. Ce concept a été mis en lumière il y a 100 ans, lorsque Vallée et Carré ont découvert qu'un animal ayant guéri d'une infection par le FMDV peut être réinfecté et peut à nouveau présenter des signes cliniques. Le FMDV possède ainsi la particularité de ne pas conférer de protection immunitaire croisée efficace entre les différentes souches existantes. Cette immunité croisée lacunaire est notamment due à une grande variabilité des sites antigéniques du FMDV, localisés sur les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3, qui ne sont pas forcément conservés d'une souche à une autre (136,137). Il existe toutefois quelques sites antigéniques majeurs, conservés parmi plusieurs sérotypes, à savoir un épitope situé sur la boucle G-H de VP1, un



épitope localisé à l'extrémité N-terminale de VP2 ou encore un épitope identifié dans la région N-terminale de VP3 (138–142). Les nombreuses boucles de VP1, particulièrement exposées, en font la protéine la plus antigénique pour l'ensemble des sérotypes. Ce n'est ainsi pas un hasard évolutif, mais bien une conséquence de la pression de sélection immunitaire s'il s'agit de la protéine dont la séquence codante est la moins conservée. La faible conservation des épitopes conférant une immunité au sein des différentes souches circulantes constitue ainsi un obstacle majeur à une vaccination efficace et donc au contrôle de la maladie (143) (*cf.* Vaccination).



III. Infection par le virus de la fièvre aphteuse

1) Espèces sensibles

Alors que la plupart des picornavirus sont connus pour affecter un nombre d'hôtes très restreint, ce n'est absolument pas le cas du FMDV. En effet, ce virus se caractérise par un très large spectre d'hôtes comprenant plus de soixante-dix espèces sensibles, essentiellement des artiodactyles, *i.e.* des mammifères bi-ongulés, aussi bien domestiques que sauvages (Figure 6). Ce virus constitue une menace socio-économique majeure puisqu'il peut infecter la plupart des espèces de production, à savoir les bovins, les ovins, les caprins et les porcins. Parmi les espèces sauvages susceptibles d'être infectées se trouvent des animaux potentiellement en contact avec les espèces domestiques tels que les sangliers et les cerfs dans les pays de l'hémisphère nord, ainsi que les antilopes, les gnous, les phacochères, les chameaux, et les buffles d'Asie et d'Afrique dans l'hémisphère sud (144,145). Les buffles, parfois assimilés à des animaux domestiques, utilisés pour le transport et le travail agricole, sont considérés comme des réservoirs de virus et jouent un rôle extrêmement important dans la propagation du FMDV (146). Quelques cas, considérés comme anecdotiques, ont été recensés chez des hôtes non naturels du virus comme l'éléphant d'Asie et d'Afrique, le hérisson, le kangourou, l'ours noir du Tibet, le chien domestique et l'Homme (144,147–150). Seuls de très rares cas sans gravité ont été rapportés chez ce dernier (151).





Figure 6 : **Espèces sensibles à l'infection par le virus de la fièvre aphteuse.** Représentation non exhaustive. Ce virus se caractérise par un très large spectre d'hôtes comprenant plus de soixante-dix espèces sensibles, essentiellement des artiodactyles, i.e. des mammifères bi-ongulés, aussi bien domestiques que sauvages. Créé avec BioRender.com.

2) Cycle viral

Même si certains mécanismes détaillés restent encore méconnus à ce jour, le cycle de réplication du FMDV a fait l'objet de nombreuses études et est bien décrit. Le FMDV possède un cycle viral extrêmement court, accompli en quatre à six heures seulement (152). Il peut être décomposé en neuf phases distinctes, à savoir l'attachement, l'internalisation, la décapsidation, la traduction, le clivage, la réplication, l'encapsidation, la morphogenèse et la libération des particules virales matures (Figure 7). En réalité, certaines de ces phases ne se succèdent pas mais se déroulent concomitamment.



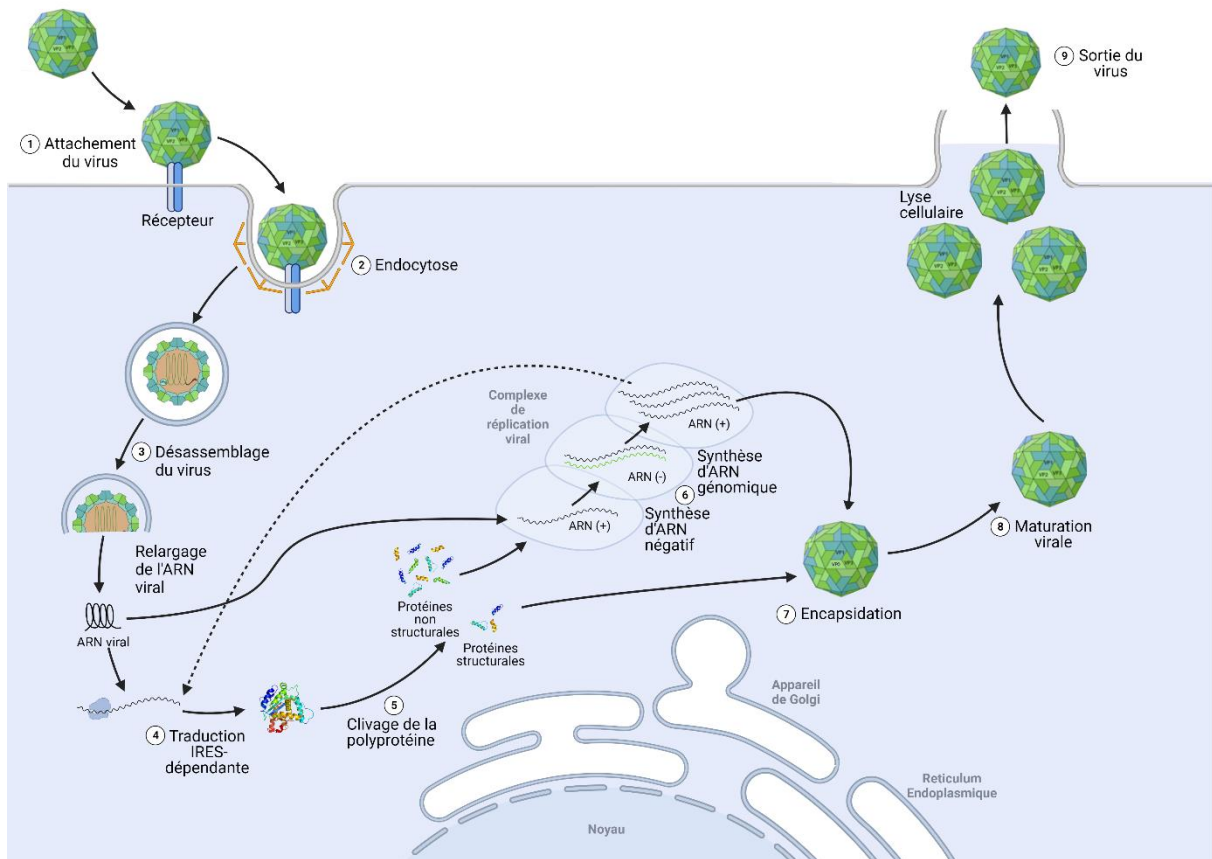


Figure 7 : **Cycle de réplication du virus de la fièvre aphteuse.**

Le cycle viral de ce virus peut être décomposé en neuf phases distinctes : la liaison, l'internalisation, la décapsidation, la traduction, le clivage, la réplication, l'encapsidation, la morphogénèse et la libération des particules virales matures. Adapté de Sarry et al. 2022 (42). Créé avec BioRender.com.

a) Attachement

L'infection d'une cellule hôte sensible par le FMDV débute par l'attachement de la capsid à un récepteur membranaire spécifique. Les récepteurs principaux du FMDV sont les protéines de la famille des intégrines. Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques impliquées dans divers processus biologiques comme la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose (153). Il existe vingt-quatre hétérodimères fonctionnels connus à ce jour, résultant de l'association entre dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β , et suivant une distribution tissulaire spécifique (154). Au sein de la famille des intégrines, certains récepteurs sont privilégiés par le FMDV (155). C'est notamment le cas de l'intégrine $\alpha\beta6$, fortement exprimée à la



surface des cellules épithéliales du tractus oropharyngé des ruminants (156,157). Ce récepteur est capable d'interagir avec le motif consensus RGD présent sur la boucle G-H de VP1, impliqué dans la liaison du virus (38,158). Le FMDV peut également se fixer sur une autre famille de récepteurs, les héparanes-sulfate (159). Il s'agit de glycosaminoglycanes chargés négativement, capables de se lier à la capsidite du FMDV (160). A l'inverse de celle des intégrines, la fixation des HS ne dépend pas d'un site spécifique mais repose sur une association d'interactions avec les trois protéines formant la capsidite externe, VP1, VP2 et VP3 (38).

b) Internalisation

Une fois adsorbé sur son récepteur spécifique le virus est internalisé. Cette entrée dans la cellule se fait généralement par endocytose clathrines-dépendante (161). Il a toutefois été démontré que le mécanisme d'endocytose était dépendant du récepteur membranaire impliqué dans la fixation du virus. Ainsi, dans le cas d'une liaison du FMDV à un récepteur HS, le virus pénètre plutôt dans la cellule par endocytose cavéolines-dépendante (162,163).

c) Décapsidation

Après avoir été internalisé, le virus est acheminé vers l'endosome précoce où a lieu la décapsidation. Bien que les mécanismes de décapsidation du FMDV soient encore partiellement incompris, il semblerait que l'acidification de l'endosome soit à l'origine de ce phénomène. Il a ainsi été démontré qu'à des valeurs de pH correspondant aux endosomes précoces, la capsidite des aphthovirus, sensible aux pH acides, se dissocie en sous-unités pentamériques (164). La dissociation de la capsidite virale conduit à la libération de l'ARN simple brin positif et de la protéine interne VP4 dans le cytoplasme de la cellule infectée (63,165). Le mécanisme impliqué dans le relargage de l'ARN viral n'est pas parfaitement décrit pour le FMDV. Toutefois, il se pourrait que, comme chez



le Rhinovirus Humain (HRV, pour *Human rhinovirus*), VP4 induit la formation de pores dans la membrane de l'endosome, participant ainsi à la libération de l'ARN viral (166,167).

d) Traduction

La traduction est initiée immédiatement après la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme selon un mécanisme indépendant de la coiffe (54). Tandis que la traduction des ARNm cellulaires est inhibée suite au clivage du facteur eIF4G par la protéase L_{pro}, le FMDV subvertit la machinerie cellulaire de l'hôte. Pour cela, le virus interagit notamment avec des facteurs de traduction, appelés facteurs trans-actifs spécifiques de l'IRES (ITAF, pour *IRES Transacting Factors*), possédant une activité modulatrice, tels que la protéine de liaison au motif polypyrimidine (PTB, pour *Polypyrimidine Tract-Binding protein*), ou la protéine de liaison poly-C (PCBP, pour *Poly r(C)-Binding Protein 1*) (168–171). Ces protéines, associées aux facteurs d'initiation eIF4G, eIF4A, eIF3a et eIF4B et à la sous-unité ribosomique 40s, sont impliquées dans la formation du complexe d'initiation de la traduction (172). Bien que eIF4G soit clivé par la protéase L_{pro}, sa région C-terminale suffit à l'assemblage du complexe (173). Une fois formé, ce complexe ribosomique se lie à l'élément IRES situé dans la région 5' UTR, déclenchant la synthèse de la polyprotéine précurseur, à l'origine des différentes protéines du FMDV (55).

e) Clivage

Afin d'aboutir à la formation de pré-protéines puis à celle des quinze protéines matures et fonctionnelles, la polyprotéine virale subit une succession de traitements protéolytiques co- et post-traductionnels. Comme décrit précédemment, la protéase L_{pro}, se libère de la polyprotéine par clivage entre son domaine C-terminal et le domaine N-terminal de la VP4 au cours de la maturation virale, tandis que la protéine



2A se dissocie de la 2B en induisant un décrochage du ribosome (73,74,87). Tous les autres clivages protéolytiques impliqués dans la production des protéines du FMDV sont médiés par la protéase 3C (108). Celle-ci possède un site actif bien décrit, impliquant trois acides aminés (His46, Asp84 et Cys163), capable de reconnaître différentes séquences peptidiques et d'induire des clivages au niveau de sites Gln-Gly, Glu-Gly, Leu-Gln, et Glu-Ser.

f) Réplication

Une fois les protéines virales synthétisées et rendues fonctionnelles, l'ARN viral peut être répliqué. Le mécanisme à l'origine de la transition entre la traduction et la réplication chez le FMDV est méconnu. Il est toutefois envisagé l'existence d'un évènement similaire à ce qu'il se passe chez le Poliovirus, à savoir le clivage par le précurseur 3CD, d'un ITAF essentiel, mettant un terme à la traduction (103). Comme un certain nombre de virus à ARN simple brin positif, la réplication du génome du FMDV a lieu au sein de compartiments intracellulaires dérivés du RE et du Golgi, appelés complexes de réplication (73). Ces compartiments intracellulaires, formés grâce aux réarrangements membranaires, médiés par les protéines 2B et 2C en association avec 3A et 3C, confèrent de nombreux avantages au virus. Au sein des complexes de réplication, le FMDV se trouve ainsi à l'abri des senseurs immunitaires de l'hôte et peut concentrer l'ensemble de ces composants dans une zone très réduite afin de se répliquer. Il semblerait que la réplication du génome du FMDV nécessite la circularisation de son ARN par l'intermédiaire d'interactions ARN-ARN et/ou ARN-protéines impliquant les régions 3'UTR et 5'UTR, les protéines virales 2B, 2C, 3A et 3D^{pol} ainsi que des facteurs cellulaires (58,174). Le cycle de réplication du FMDV débute par la synthèse d'un brin d'ARN négatif, complémentaire au génome viral. Pour ce faire, l'ARN polymérase ARN-dépendante, 3D^{pol}, induit l'uridylylation d'une des



versions de VPg au niveau du résidu tyrosine situé en troisième position (175). Cette liaison de deux molécules d'uridine monophosphate (UMP) à VPg, nécessitant également la présence de l'élément cre, permet la fixation de VPg(pU) à l'extrémité 3' de l'ARN (47,54,103). VPg(pU) sert alors d'amorce pour initier la réplication médiée par 3D^{pol} au niveau de la queue poly-A, permettant la synthèse du brin négatif (105,176). Ce brin complémentaire, néo-synthétisé, forme alors un intermédiaire de réplication double-brin qui est déroulé afin de servir de matrice pour la synthèse de plusieurs brins positifs (122). Ces ARN génomiques néoformés sont ensuite traduits afin de permettre l'amplification du cycle viral et la production de nouvelles protéines qui constitueront les futurs virions.

g) Encapsidation

Les protéines structurales VP0, VP3 et VP1 produites à partir des nouveaux brins d'ARN génomiques s'assemblent pour former des protomères qui constituent l'unité de base de la capsid (63). Ces protomères s'associent ensuite par groupes de cinq afin de former des pentamères, qui eux même se regroupent par douze pour former une capsid (35,177). Un brin d'ARN génomique se lie alors avec cette capsid immature, formant ainsi un provirion (178). Le mécanisme exact à l'origine de l'encapsidation de l'ARN du FMDV n'est pour l'heure pas entièrement compris. Parmi les pistes explorées, il est envisagé que le génome viral contienne des signaux spécifiques qui déclenchent l'encapsidation avant la maturation de la capsid (52,179).

h) Morphogénèse

Une fois l'ARN génomique empaqueté, la capsid immature subit une étape de maturation. Un clivage du précurseur VP0 en VP4 et VP2 donne ainsi lieu à une particule virale mature. Alors que ce clivage était considéré comme catalysé par l'ARN viral, à l'image du mécanisme observé pour le Poliovirus, il n'en est rien (180,181). En



effet, il a été démontré dans le cas du FMDV, que ce clivage avait lieu même en absence d'ARN viral (182,183). D'après les travaux de Newman *et al.*, il ne semblerait pas non plus que ce clivage soit dépendant de l'action de la protéase 3C et nécessite d'être étudié plus en détails (184).

i) Libération

Au fur et à mesure du cycle viral, de plus en plus de virions sont produits et s'accumulent dans le cytoplasme des cellules infectées. Cette accumulation de virions aboutit finalement à la lyse cellulaire, puis à la sortie des virus néoformés qui peuvent alors disséminer vers d'autres cellules de l'hôte ou être excrétés dans l'environnement (57,63).

3) Modes de transmission

La fièvre aphteuse est une maladie extrêmement contagieuse induisant près de 100% de morbidité chez les espèces les plus sensibles comme les bovins. Cette très forte contagiosité s'explique notamment par l'existence de multiples voies d'infection et d'excrétion du FMDV (Figure 8). Le principal mode de transmission de ce virus est un contact direct entre un animal infecté et un animal sensible (185). Dans ce cas, la contamination peut se faire par inhalation directe de virus excrétés dans l'air, par ingestion de matière contaminée par les sécrétions nasales, la salive, le sang, le lait, l'urine ou les fèces de l'animal infecté, ou encore par pénétration de virus au niveau d'un épithélium endommagé (47,186,187). La transmission du FMDV peut également être due à des contacts indirects *via* des vecteurs. Il peut s'agir soit de vecteurs vivants tels que les éleveurs ou des animaux non sensibles, soit de vecteurs inanimés, appelés fomites, comme des véhicules, de la litière, des outils ou encore des vêtements agricoles (188,189). La grande résistance du FMDV dans l'environnement est également impliquée dans d'autres voies de transmission. En effet, le virus peut survivre dans des



carcasses d'animaux pendant plusieurs semaines. Ce phénomène est bien évidemment amplifié lorsque les carcasses sont conservées en chambre froide. Il a ainsi été montré que des virus infectieux pouvaient être détectés dans des carcasses de porcs conservées à 4°C pendant de nombreux mois *post mortem* (190–192). De plus, il a également été montré que sous certaines conditions de température et d'humidité, le FMDV peut disséminer sur de très longues distances (193,194).

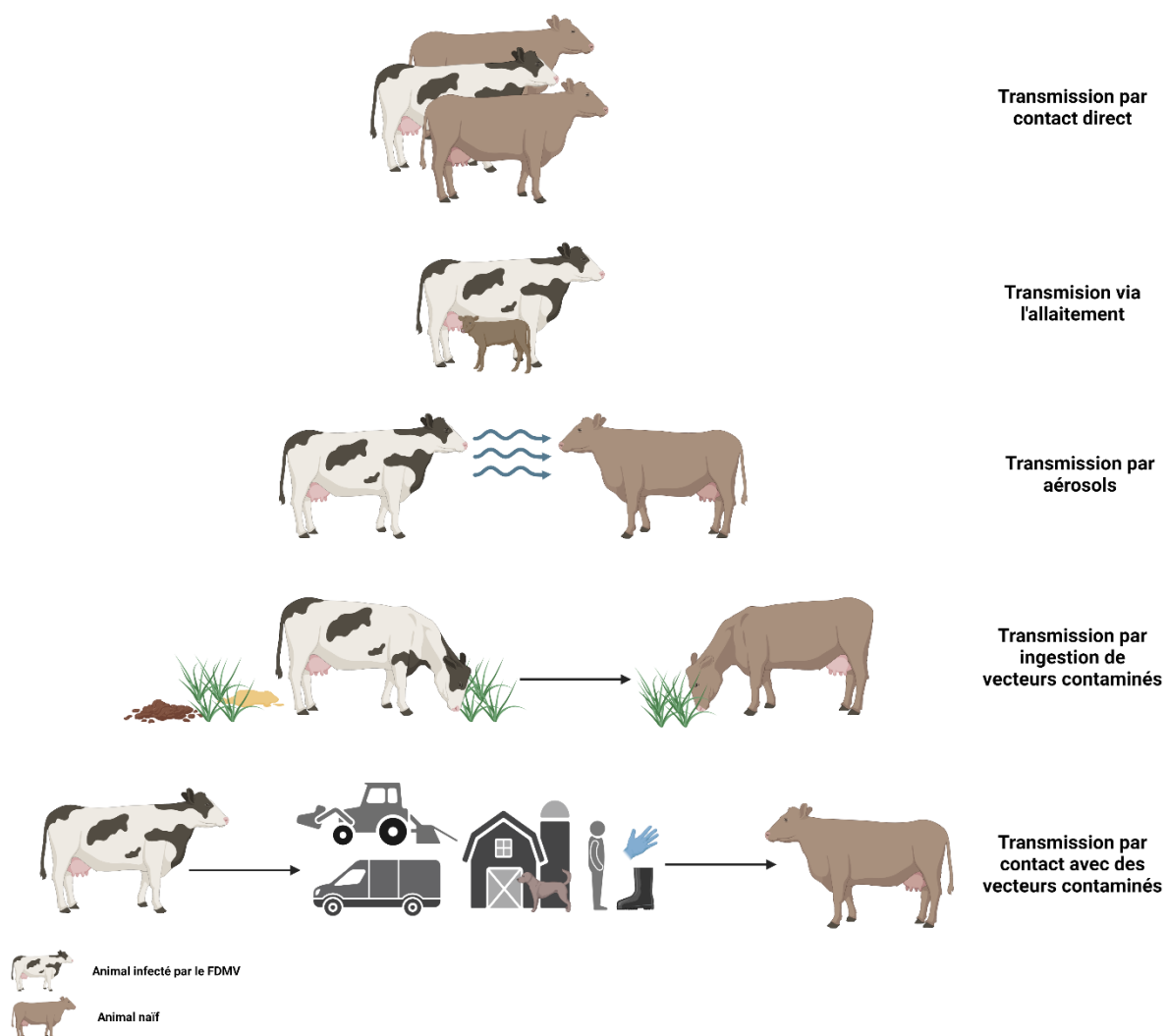


Figure 8 : Voies de transmission du virus de la fièvre aphteuse.

Ce virus extrêmement contagieux peut être transmis par contact direct entre animaux, par ingestion de produits contaminés tels que le lait, par aérosols, ou via des vecteurs animés ou inanimés ayant été en contact avec un animal infecté. Créé avec BioRender.com.

Toutes les espèces sensibles au FMDV ne sont pas aussi susceptibles à toutes les voies de contamination. En effet, les bovins, espèce la plus sensible au virus, sont



particulièrement susceptibles d'être infectés par voie respiratoire. A l'inverse, les porcins, moins sensibles au virus, sont plus susceptibles d'être infectés par voie orale (195,196). Ces différences sont parfaitement corrélées avec les différences observées concernant les signes cliniques induits par le FMDV chez les espèces sensibles (Figure 9 & Tableau 1).

4) Signes cliniques et progression de l'infection

a) Pathogénèse chez les différentes espèces d'intérêt

i. Bovins domestiques

Comme indiqué précédemment, les bovins sont considérés comme les animaux les plus sensibles au FMDV. Même si elle est dépendante de la voie d'exposition, de la souche virale et de l'hôte (âge, race, sexe, statut immunitaire), une très faible dose de virus peut ainsi suffire à infecter un bovin. Le taux de transmission au sein d'un troupeau de bovins, modélisé par son R_0 , indique qu'un animal contagieux est responsable de l'infection de vingt-et-un à quatre-vingt-huit bovins (197,198). Après exposition d'un bovin au FMDV, l'infection se caractérise par une phase d'incubation, aussi nommée pré-virémie, d'une durée moyenne de deux à quatorze jours pour les animaux non immunisés (199). Des travaux plus récents avancent une durée d'incubation plus courte, à savoir un à sept jours post-exposition au FMDV (200). Chez les animaux vaccinés ou possédant des anticorps suite à une précédente infection, la phase d'incubation peut durer jusqu'à une vingtaine de jours. Cette phase de pré-virémie correspond au laps de temps s'écoulant entre l'exposition au virus et la détection de virus infectieux ou d'ARN viral dans le sang (195) (*cf.* Diagnostic en laboratoire). Cette période est également associée à la réplication du virus au sein des sites de réplication primaire (201). Chez les bovins, particulièrement susceptibles à une infection des voies respiratoires, les principaux sites de réplication primaire sont le palais mou dorsal et le nasopharynx dorsal. La phase préclinique est suivie de la dissémination du virus



dans l'organisme de l'hôte, marquant le début de la phase de virémie. Pour l'heure, aucun mécanisme cellulaire et/ou moléculaire à l'origine du déplacement du FMDV des tissus infectés vers le compartiment intravasculaire n'a été clairement mis en évidence. La transition entre les phases de pré-virémie et de virémie, élément important de la pathogenèse du FMDV, reste donc à élucider. La virémie correspond à la période durant laquelle du virus infectieux ou de l'ARN infectieux peut être détecté dans le sang, et coïncide, au moins partiellement, avec la phase clinique de la maladie (202). Une fois dans le compartiment intravasculaire, le virus se propage à travers le système lymphoïde, potentiellement par le biais de macrophages, afin d'atteindre les sites de réplication secondaires, à savoir des épithéliums pavimenteux stratifiés et cornés (203). Chez les bovins, considérés comme révélateurs de la présence du FMDV du fait de symptômes marqués, la phase clinique dure généralement entre un et treize jours (200,202). L'infection d'un bovin adulte par le FMDV se manifeste habituellement par quelques jours d'hyperthermie, suivis de la formation d'un nombre variable de vésicules à la surface de l'épithélium de la langue, du palais dur, du mufle, de la bande coronaire, des mamelles ou encore de l'espace interdigité. Ces lésions s'accompagnent d'un écoulement nasal et salivaire, de boiteries, d'un état d'abattement, de tremblements, d'avortements, ainsi que d'une réduction de l'alimentation à l'origine d'un amaigrissement et d'une chute de la production laitière (204,205). Dans l'immense majorité des cas, les vésicules se rompent après quelques jours puis l'épithélium cicatrise et les autres symptômes disparaissent sans intervention extérieure. L'infection par le FMDV est malgré tout létale dans près de 5 % des cas, du fait d'une dégradation trop importante de l'état général de certains animaux. Le taux de mortalité peut atteindre 100 % chez les jeunes. En effet, pour une raison non expliquée à ce jour, le virus possède un fort tropisme cardiaque chez les jeunes animaux, conduisant à une mort rapide des suites d'une myocardite (206).



A l'issue de la phase de virémie, l'animal entre dans une période de post-virémie qui peut prendre plusieurs formes (195). L'animal peut avoir complètement éliminé le virus et ne plus présenter aucun symptôme. Dans ce cas de figure, il a été montré que les bovins sont capables d'éliminer totalement le FMDV en vingt-et-un jours post-infection, voire dix jours dans le cas d'animaux vaccinés (207,208). Il est aussi possible que l'animal ait éliminé le virus mais qu'il souffre de séquelles chroniques telles qu'une intolérance à la chaleur ou un dysfonctionnement de la thyroïde. Il peut également présenter une persistance virale à court terme caractérisée par la détection de FMDV infectieux, d'antigènes ou d'ARN viraux résiduels, en cours d'élimination, dans certains tissus spécifiques. Enfin, près de 50% des ruminants deviennent infectés de manière persistante par le FMDV (209) (*cf.* Persistance du FMDV).

ii. Buffles d'Afrique et d'Asie

Bien qu'il s'agisse d'espèces apparentées aux bovins domestiques, les buffles d'Afrique et d'Asie, ne réagissent pas de la même manière en réponse à une infection par le FMDV. En effet, le buffle d'Afrique et d'Asie, tous deux considérés comme des réservoirs du virus, à la jonction entre la faune sauvage et le bétail, sont moins sensibles et excrètent une plus faible quantité de virus. Ils restent toutefois largement susceptibles d'assurer la transmission du FMDV, notamment par contact direct, puisque le R_0 associé à une population de buffles africains est estimé comme étant compris entre cinq et quinze (210,211). Une infection expérimentale de buffles africains, a permis de montrer que la durée de la phase de pré-virémie est sensiblement la même que chez les bovins domestiques et que les sites de réplication primaire sont conservés entre le bovin domestique et le buffle (196). En revanche, il semble que la phase de virémie durant moins de neuf jours est donc plus courte chez le buffle (212). De plus, les buffles présentent des signes cliniques bien moins marqués que les bovins. L'infection se manifeste généralement par une courte période d'hyperthermie ainsi que



de petites lésions buccales et podales chez le buffle asiatique, tandis qu'elle est fréquemment asymptomatique chez le buffle africain, pour lequel l'infection est dite subclinique (213,214). Ces observations peuvent notamment être expliquées par certaines distinctions morphologiques et par la circulation abondante du FMDV dans les régions où vivent les buffles, qui sont ainsi régulièrement infectés tout au long de leur vie (215,216). A l'image des bovins domestiques, les buffles ont une propension importante à présenter une infection persistante (145,210,211) (*cf.* Persistance du FMDV).

iii. Petits ruminants

La pathogénèse du FMDV chez les petits ruminants tels que les ovins et les caprins est relativement similaire à celle observée chez les bovins domestiques. L'infection par inhalation d'aérosols est ainsi considérée comme le principal mode de transmission chez les petits ruminants, même si les infections par voie orale semblent aussi être efficaces (217). Le R_0 au sein d'une population de petits ruminants est estimé entre un et quatorze (197,218). La phase d'incubation, correspondant à la réplication du FMDV au niveau des sites de réplication primaires que sont le palais mou dorsal et les amygdales palatines, dure en moyenne entre deux et huit jours (196,199). La phase virémique de l'infection dure de un à cinq jours chez les petits ruminants et se manifeste par des signes cliniques bénins à modérés rendant parfois le diagnostic compliqué (217,219). Le tableau clinique consiste ordinairement en une hyperthermie, une boiterie touchant une ou plusieurs pattes et un taux d'avortement encore plus important que chez les bovins. Des lésions podales sont fréquemment observées chez les ovins, tandis que les caprins présentent davantage de lésions buccales (220). A l'image de ce qui a été décrit chez les veaux, les agneaux et les chevreaux succombent fréquemment d'insuffisance cardiaque suite à une myocardite. Malgré un R_0 inférieur à celui des autres espèces sensibles, les petits ruminants sont considérés comme les



disséminateurs ou les introducteurs du FMDV. En effet, les nombreuses infections asymptomatiques ou non caractéristiques, difficilement détectables, associées à d'importants échanges de petits ruminants, moins contrôlés que les échanges de bovins, sont régulièrement à l'origine de l'introduction du FMDV dans des territoires indemnes (217).

iv. Porcins

De manière similaire à ce qui est observé chez les bovins, le taux de morbidité associé au FMDV chez les porcins peut atteindre les 100%. Le R_0 au sein d'une population de porcs est estimé entre trente et quarante (221). Les porcins sont particulièrement sensibles à l'infection par voie orale résultant de la consommation d'un produit contaminé. En revanche, ils sont assez peu sensibles à l'infection par voie aérienne (196,222). Il est ainsi estimé qu'il faut six-cent fois plus de particules virales pour infecter un porc par aérosol qu'un ruminant. Cette différence concernant les voies d'infection entre les porcins et les bovins est corrélée avec les différents sites de réplication. En effet, il a été montré chez le porc que le principal site de réplication n'est pas localisé dans le nasopharynx mais dans l'oropharynx. Il s'agit des amygdales oropharyngées, et plus particulièrement les cryptes épithéliales présentes sur ces amygdales (223). Le palais mou dorsal, structure anatomiquement continue avec les amygdales oropharyngées, constitue également un site de réplication important chez le porc. La période de pré-virémie, d'une durée moyenne de un à six jours chez le porc, est ordinairement plus courte que chez les ruminants (186). L'infection par le FMDV chez le porc se manifeste principalement par de petites lésions buccales et surtout de graves lésions podales, particulièrement au niveau du bourrelet coronaire, du talon et de l'espace interdigité. Ces vésicules douloureuses sont à l'origine de boiteries importantes, et peuvent même résulter en une impossibilité de déplacement de l'animal lorsque l'onglon se détache (224). Les porcs touchés peuvent également



présenter une perte d'appétit, un état léthargique, ainsi que des variations de température corporelle. A l'image des veaux, agneaux et chevreaux, les porcelets de quatorze semaines et moins sont sujets à des myocardites dues au tropisme épithélial du FMDV (225). Un porc atteint de fièvre aphteuse produit et excrète une quantité extrêmement importante de particules infectieuses. De ce fait, les porcs sont considérés comme des multiplicateurs du FMDV (223). En absence de complication, les porcs sont généralement capables d'éliminer le FMDV en moins de quinze jours. Contrairement aux ruminants, aucune étude n'a permis de démontrer la persistance de virus infectieux plus de dix-sept jours post-infection chez le porc (226,227) (*cf.* Persistance du FMDV). Alors que les travaux menés par Mezencio *et al.* ont mis à mal ce dogme en révélant des fluctuations de détection d'ARN viral pendant plus de deux-cent cinquante jours post-infection, de nombreuses études ont depuis confirmé l'absence d'indice corroborant une infection persistante chez le porc (226,228). Ainsi, seuls des ARN viraux peuvent être détectés après plus de dix-sept jours post-infection, sans aucune trace de virus infectieux (229–231). Stenfeldt *et al.* ont confirmé ces observations et mis en évidence le fait que ces ARN détectés tardivement sont des résidus d'une infection massive chez le porc, qui sont dégradés petit à petit par l'organisme (226).





Figure 9 : Signes cliniques et lésions associés à la fièvre aphteuse.

Chez les bovins : a) jetage nasal ; b) bouche, lésion fraîche ; c) lésion de la langue ; d) lésion interdigitée ; e) lésions des mamelles. Chez les porcins : f) groin, vésicules non rompues ; g) patte, lésion avec détachement de l'onglon ; h) groin, lésion fraîche ; i) lésion interdigitée ; j) porc présentant des lésions sur les pattes ; chez les petits ruminants : k) vésicule fraîchement rompue sur la langue d'une chèvre ; l) lésion sur la langue d'un mouton ; m) pied de mouton avec une lésion de la bande coronaire cicatrisée ; n) lésion interdigitée chez une chèvre ; o) la boiterie est généralement le premier signe de la fièvre aphteuse chez les moutons. Sources : Photo A : J.-F. Valarcher, avec permission. Photos B à I puis K et N : EuFMD, avec autorisation. Photo J : issue de la publication Pozzi et al, *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 2019, avec permission. Photos L et M : © Crown copyright [2022]. Licensed under the Open Government Licence v3.0., © UK DEFRA, avec permission. Photo o : Kitching et Hugues (2002), *Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats*, doi: 10.20506/rst.21.3.1342, reproduit avec permission. De Sarry et al. 2022 (232).



Tableau 1 : *Eléments de comparaison de la pathogenèse du virus de la fièvre aphteuse chez le bovin domestique, le buffle africain, l'ovin, le caprin et le porcin.*

N.A. : non applicable ; +/- : négligeable ; + : peu important ; ++ : important ; +++ : très important

Espèce	Voie d'infection majeure	Sévérité des signes cliniques	Signes cliniques caractéristiques	Sites de réplication primaire	Persistance virale	Sites de persistance	Niveau d'excrétion virale	R0	Rôle dans la dissémination du virus
Bovin domestique	Inhalation	+++	Ecoulement nasal et salivaire Vésicules buccales	Palais mou dorsal Nasopharynx dorsal	Oui	Palais mou dorsal Nasopharynx dorsal	++	[31;88]	Révéléateur
Buffle Africain	Inhalation	+/-	N.A.	Palais mou dorsal Nasopharynx dorsal	Oui	Palais mou dorsal Amygdales pharyngées Amygdales palatines	+	[5;15]	Réservoir sauvage
Ovin	Inhalation et Ingestion	+	Lésions podales	Palais mou dorsal Amygdales palatines	Oui	Amygdales palatines Amygdales pharyngées Palais mou dorsal	++	[1;14]	Disséminateur
Caprin	Inhalation et Ingestion	+	Lésions buccales	Palais mou dorsal Amygdales palatines	Oui	Amygdales palatines Amygdales pharyngées Palais mou dorsal	++	[1;14]	Disséminateur
Porcin	Ingestion	++	Boiteries et lésions podales	Amygdales oropharyngées Palais mou dorsal	Non	N.A.	+++	[30;40]	Amplificateur

b) **Persistance virale & problématiques associées**

i. **Qu'est-ce que la persistance virale ?**

La persistance virale est définie comme une infection au cours de laquelle le virus n'est pas éliminé de l'organisme de l'hôte après l'infection primaire et reste présent à long terme dans l'organisme de l'hôte (233). Si cette définition est globalement acceptée au sein de la communauté scientifique, les limites associées à cette notion sont difficiles à définir. En effet, cette définition soulève certaines questions :

- Quel est le point de transition entre l'infection primaire et l'infection à long terme ?
- A partir de quelle durée d'infection peut-on parler d'infection à long terme ?
- Comment caractériser la présence de virus après l'infection primaire ?
- Tous les cas d'infections à long terme sont-ils des infections persistantes ?

Cette partie n'a pas vocation à répondre à ces questions de manière tranchée, mais de remettre la notion de persistance virale dans son contexte et de discuter des différents



points évoqués. Premièrement, la caractérisation de la présence de virus après la phase d'infection primaire nécessite que l'infection primaire soit bien caractérisée. En effet, la distinction entre une longue infection primaire et une infection persistante est parfois peu évidente. Il est ainsi important de se questionner quant aux indicateurs permettant d'affirmer que la phase d'infection primaire est terminée. Il pourrait être tentant de penser que la phase d'infection primaire est toujours corrélée aux manifestations cliniques et/ou à la virémie. Bien que ce soit souvent le cas, il existe de nombreux contre-exemples. En effet, un certain nombre d'infections sont asymptomatiques et ne sont de fait pas liées à une manifestation clinique. C'est notamment le cas des infections causées par le virus de l'hépatite B (HBV, pour *Hepatitis B virus*), susceptibles d'occasionner des infections chroniques (234). Les infections primaires par les virus responsables de l'herpès, *herpès simplex virus* (HSV), bien que parfois asymptomatiques, peuvent conduire à des phénomènes de latence et de réactivation du virus à l'origine de manifestations cliniques (235,236). Comme précédemment indiqué, le FMDV peut également causer des infections asymptomatiques, chez le buffle africain notamment, rendant de fait impossible la distinction clinique entre la période d'infection primaire et l'infection persistante. En ce qui concerne la virémie, de nombreux virus persistants sont associés à des phénomènes de latence, à l'abri du système immunitaire, dans des tissus spécifiques, ne se traduisant pas par une virémie. Cependant, il existe des cas où la fin de la phase primaire d'infection n'est pas liée à la fin de la virémie. Il a par exemple été montré qu'une virémie durable pouvait être induite lors d'une infection persistante par le virus de l'immunodéficience simien (SIV, pour *Simian Immunodeficiency virus*) (237).

Deuxièmement, alors que la limite entre infection primaire et infection à long terme est difficile à définir à l'aide de paramètres cliniques, la durée d'infection pourrait être le facteur déterminant. Cela ne semble cependant pas être le cas puisque les durées



associées aux différentes infections à long terme sont extrêmement variables. Ainsi, alors que dans le cas d'une infection par le FMDV, l'infection persistante est définie à partir de vingt-huit jours post-infection, l'infection par le HBV est considérée comme chronique seulement après plus de six mois. Dans le cas d'une infection par le virus responsable du Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP), la forme aiguë de la maladie dure entre quatre et dix semaines avant de laisser place à une infection subclinique persistante (238,239). De même, la durée de l'infection à long terme est extrêmement variable, y compris au sein d'une espèce virale puisqu'elle dépend à la fois des caractéristiques de la souche virale, de l'hôte infecté et de l'environnement. Ainsi, certains virus tels que le virus varicelle-zona (VZV, pour *Varicella-Zoster virus*) peuvent persister tout au long de la vie de l'hôte sous la forme de génomes viraux non productifs capables de sortir ponctuellement de leur état de latence lorsqu'ils sont réactivés (240). D'autres virus persistent moins longtemps dans l'organisme de l'hôte. C'est notamment le cas du virus Nipah (NiV, pour *Nipah virus*). En effet, même si les mécanismes liés à l'infection à long terme par ce virus sont encore méconnus, des résurgences de la maladie ont été observées après des périodes de latence de plusieurs mois ou plusieurs années chez l'humain et la roussette (241). Il en est de même pour le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler (TMEV, pour *Theiler's Murine Encephalomyelitis virus*), un picornavirus pour lequel l'infection persistante dans la moelle épinière dure une centaine de jours (242). En ce qui concerne le Poliovirus, autre picornavirus connu pour persister, il a été montré que du virus infectieux pouvait être détecté dans le liquide cérébro-spinal des patients pendant plusieurs semaines post-infection (243). La durée de l'infection persistante est encore plus courte lors de l'infection de porcelets par l'EMCV. Il a ainsi été montré que cette infection persistante pouvait ne durer que quelques jours chez les animaux ayant survécu au virus (244).

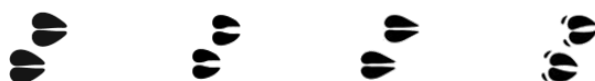


Troisièmement, la caractérisation de la présence virale pose également question. En effet, les méthodes diagnostiques varient selon les infections étudiées. En considérant que la persistance virale soit associée à la présence de virus infectieux, il semblerait pertinent de privilégier des tests permettant de détecter le virus vivant, comme c'est le cas pour le Senecavirus (SVV, pour *Seneca Valley virus*) et d'autres aphtovirus (245,246).

En revanche, dans le cas de certains virus se répliquant à bas bruit dans des cellules spécialisées, il est parfois impossible de détecter leur présence en dehors d'un événement de réactivation comme le HSV (236). Le diagnostic de certains virus comme les papillomavirus humains (HPV, pour *Human Papilloma virus*), difficilement cultivables *in vitro*, repose alors sur la détection d'ADN viral par des méthodes de biologie moléculaire (247). Il en est de même pour le virus Epstein-Barr (EBV, pour *Epstein-Barr virus*), qui persiste uniquement sous la forme d'ADN (248).

Enfin, alors qu'il est souvent accepté que les infections persistantes peuvent adopter deux formes majeures, à savoir une infection chronique ou une infection latente, la distinction des différents types d'infection à long terme est peu évidente (Tableau 2). En effet, la clarté de ce message est obscurcie par l'utilisation du terme persistance à la fois comme terme générique, comme synonyme d'une infection chronique, voire pour parler de la présence durable de virus dans l'environnement (249,250).

L'infection chronique est définie comme une infection à long terme au cours de laquelle la production de virus est ininterrompue. Il convient ici de distinguer les infections chroniques focales ciblant une petite fraction de la population cellulaire des infections chroniques diffuses moins spécialisées. Dans le premier cas, il s'agit majoritairement de virus lytiques qui se répliquent de manière raisonnée afin de permettre la mise en place d'un équilibre avec la réponse immunitaire de l'hôte. Cet équilibre permet ainsi au virus de survivre tout en conservant l'intégrité de son hôte et en évitant une réponse



immunitaire massive. Cette stratégie a par exemple été adoptée par le virus de la rougeole (MV, pour *Measles virus*) (251). Dans le second cas, il s'agit majoritairement de virus non lytiques qui sont produits de manière continue et assez importante par les cellules de l'hôte. Afin de se protéger face à la réponse immunitaire de l'hôte, les virus tels que les rubulavirus mettent généralement en place des mesures leur permettant de bloquer efficacement la réponse immunitaire de l'hôte, en ciblant fréquemment les molécules du CMH (252).

L'infection latente est définie comme une infection subclinique au cours de laquelle le génome viral persiste dans l'organisme de l'hôte, souvent dans des cellules spécialisées. Parmi les infections latentes, il est possible de distinguer les cas de latence stricte, où le virus n'a pas à dupliquer son génome durant les phases de persistance. C'est par exemple le cas du HSV qui s'abrite dans des cellules qui ne se divisent pas, à savoir les neurones (236). Aucune production de virus infectieux n'a lieu durant cette phase, seuls des ARN non traduits sont exprimés et servent à la réactivation ultérieure du virus. Les infections impliquant une intégration du virus dans le génome de la cellule hôte sont également fréquemment rattachées aux infections latentes. L'intégration rétrovirale est un processus clé du cycle de vie des rétrovirus, famille dont fait partie le virus de l'immunodéficience humaine (HIV, pour *Human Immunodeficiency virus*) (253). Il consiste en la rétro-transcription du génome viral en ADN double-brin qui, *via* son activité intégrase, s'intègre dans le génome de la cellule hôte, permettant, de fait, une transmission stable du génome et une expression durable du génome viral à chaque cycle cellulaire (254). Toutefois, l'infection par le HIV est également fréquemment considérée comme une infection chronique dans la littérature, signe d'une limite parfois fine entre les deux notions (255–259).



Tableau 2 : *Caractéristiques des principaux types d'infections considérées comme persistantes.*
 - : absence ; +/- : variable ; + : non négligeable ; ++ : important

		Infection de cellules spécialisées	Niveau de réplication virale	Lyse cellulaire	Réponse antivirale induite par le virus	Exemples de virus
Infection chronique	Focale	+	+	+	+	Virus de la Rougeole
	Diffuse	-	++	-	+	Rubulavirus
Infection latente	Phase latente	+	-	-	-	Virus de l'herpès
	Phase de réactivation	+/-	+	+	++	
Infection persistante par le FMDV		+	+	+	+	/

ii. Persistance du FMDV

A l'image de nombreux virus de la famille des *Picornaviridae* tels que le Poliovirus, l'EMCV, le SVV ou encore certains virus Coxsackie (CV, pour *Coxsackievirus*), le FMDV est décrit comme pouvant persister dans l'organisme de ses hôtes (260). La persistance du FMDV a été mise en évidence pour la première fois chez le bovin en 1959 lorsque Van Bekkum *et al.* ont identifié du virus infectieux dans le liquide pharyngo-œsophagien d'animaux convalescents (152). Il a depuis été démontré qu'à l'issue de la phase clinique, environ 50% des ruminants présentent une infection persistante, tandis que les porcins ne sont pas considérés comme pouvant être infectés de manière persistante (226). La persistance du FMDV est officiellement associée à la détection de virus infectieux dans un probang, *i.e.* prélèvement de liquide du pharynx et de l'œsophage, réalisé au moins vingt-huit jours post-infection (152,261). Le seuil de vingt-huit jours post-infection, fruit d'une convention désignée arbitrairement, est toutefois remis en question au regard de la pathogenèse du virus puisqu'il a notamment été démontré que les bovins sont capables d'éliminer totalement le FMDV en seulement vingt-et-un jours post-infection (207,208). La limite à partir de laquelle est définie la persistance du FMDV pourrait ainsi être reconsidérée afin de détecter



plus précocement les animaux infectés de manière persistante. A la lumière des définitions énoncées précédemment, la persistance du FMDV pourrait être assimilée à une infection chronique. En effet, même si les titres viraux issus de probang sont considérés comme faibles et inconstants, l'infection persistante se caractérise par une production continue de virus. Pour davantage de précision, cette infection pourrait même être considérée comme une infection chronique focale puisqu'elle a lieu uniquement à certains sites spécifiques et potentiellement dans des cellules spécifiques non identifiées pour l'heure (262). A l'image des sites de réplication primaire du virus, les sites de persistance diffèrent d'une espèce à l'autre (Figure 10). Des virus persistants ont ainsi été détectés dans les tissus nasopharyngés des bovins, en particulier au niveau du palais mou dorsal et dans le nasopharynx dorsal adjacent (263). Chez les buffles africains, les sites anatomiques de persistance du FMDV sont les amygdales palatines, les amygdales pharyngées et le palais mou dorsal (145). Chez les ovins, le FMDV persiste principalement dans les cryptes épithéliales des amygdales oropharyngées et laryngopharyngées, et dans une moindre mesure dans le palais mou dorsal (264). La durée de persistance de virus infectieux dans l'organisme de l'hôte dépend de nombreux facteurs dont l'espèce infectée. Elle peut atteindre neuf mois chez les petits ruminants, deux ans et demi chez les bovins domestiques, un an et demi chez le buffle asiatique et cinq ans chez le buffle africain (209,265–267). Les travaux de Maree *et al.* ont notamment mis en évidence une corrélation directe entre la durée de persistance du FMDV des sérotypes SAT et leur virulence chez le buffle africain. Il semblerait ainsi que les virus qui tuent rapidement les cellules persistent plus efficacement dans les cultures cellulaires (145).



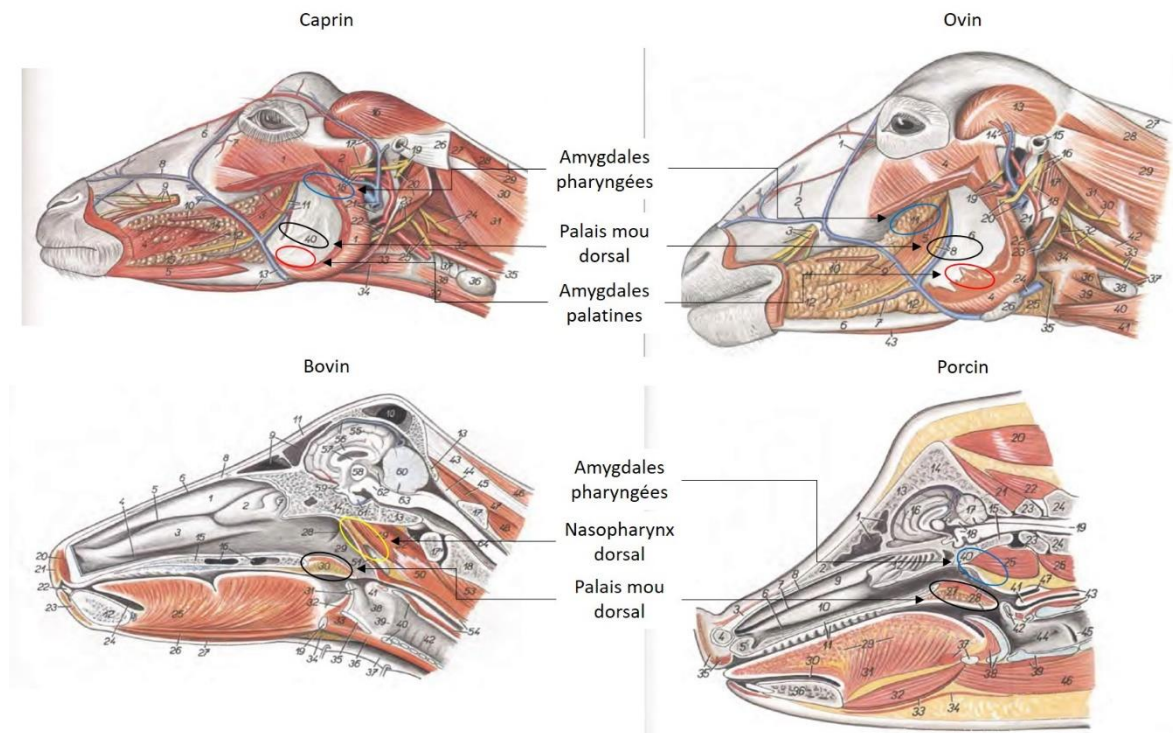


Figure 10 : Sites de réplication et sites de persistance du virus de la fièvre aphteuse chez le bovin, l'ovin, le caprin et le porcin.
 Planches d'anatomie adaptées de Atlas of Topographical Anatomy of the Domestic Animals Volume I, 1990 (268).

iii. Problématiques associées à la persistance du FMDV

Alors qu'un ruminant sur deux devient infecté de manière persistante après avoir été infecté par le FMDV, le nombre considérable d'animaux sensibles vivant dans les zones d'enzootie rend ce phénomène non négligeable. Bien que les animaux concernés soient considérés comme des porteurs sains, ou *carriers*, ils restent susceptibles d'excréter du virus infectieux (209). En effet, malgré une réplication virale considérée comme assez faible et une excrétion de virus non systématique, le grand nombre de porteurs, souvent en contact avec des animaux sensibles, associé à la longue durée de portage, constituent un risque de transmission qui n'est absolument pas négligeable (209). Ce risque de transmission à partir d'individus porteurs asymptomatiques représente un obstacle considérable au contrôle de la maladie, notamment dans les régions enzootiques (210,269). Cette assertion est confortée par la mise en évidence du rôle des animaux porteurs du FMDV dans la propagation de nouvelles souches virales. Ces

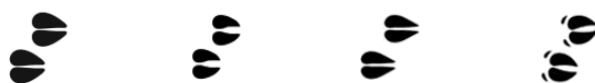


dernières années, il a ainsi été démontré que les porteurs sains représentent une source non négligeable d'émergence de nouveaux variants en abritant notamment des phénomènes de recombinaison et de trans-encapsidation du FMDV lorsqu'ils sont sujets à des co-infections ou des surinfections (131,132,134,270). Ce risque de contamination provenant d'animaux asymptomatiques constitue également un obstacle majeur au commerce du bétail. En effet, l'acquisition d'un animal porteur pourrait entraîner la contamination de tout un troupeau sain, causant ainsi des conséquences désastreuses (*cf.* Enjeux économiques et sociaux associés à la fièvre aphteuse).

La persistance du FMDV est d'autant plus problématique qu'il est extrêmement difficile de discriminer les animaux porteurs dans la population. En effet, alors que l'absence de manifestation visible de l'infection ne permet pas d'établir un diagnostic clinique, le diagnostic sérologique ne permet pas toujours la différenciation entre les animaux vaccinés et ceux présentant une infection persistante (*cf.* Diagnostic en laboratoire). De plus, il n'existe pour l'heure pas de moyen d'empêcher la mise en place de la persistance du FMDV. Bien que la vaccination soit fréquemment utilisée dans les zones où circule le virus, elle n'a pas d'impact sur les phénomènes de persistance. En effet, la persistance du FMDV n'est pas corrélée au statut vaccinal de l'hôte puisque la vaccination limite les manifestations cliniques mais n'empêche pas la surinfection et la multiplication du virus dans l'organisme de l'hôte (*cf.* Vaccination).

Plus de soixante ans après la mise en évidence de la persistance du FMDV, la lutte contre ce phénomène reste notamment compliquée par la mauvaise compréhension des mécanismes à l'origine de l'établissement et du maintien de la persistance (209).

Les nombreuses études menées à ce sujet durant les dernières décennies ont toutefois permis d'avancer des hypothèses mécanistiques. Il a ainsi été proposé que le FMDV



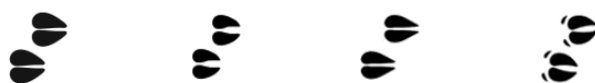
soit capable de muter au cours de l'infection persistante. En effet, deux études ont permis d'identifier systématiquement deux substitutions d'acides aminés, affectant la VP1 ou VP2 de virus issus de probang d'animaux infectés de manière persistante (271,272). Ces résultats n'ont toutefois pas pu être consolidés puisque la plupart des autres études réalisées tendent à indiquer une absence de mutation systématique associée aux infections persistantes (208,273). Cette absence de mutation spécifique coïncide avec la diminution observée de la variabilité des populations virales lors de la phase d'infection persistante par rapport à la phase aiguë (274). Cette tendance pourrait notamment être expliquée par la faible pression de sélection exercée par la réponse immunitaire sur les virus persistants qui se répliquent majoritairement dans des structures de réplication intra-épithéliales (208). Il a également été suggéré que l'établissement de l'infection persistante par le FMDV repose sur l'existence d'un cycle viral non-lytique. Une telle voie de sortie du virus a notamment été associée à la subversion d'autophagosomes par le virus, pouvant servir de cargos de transport permettant l'exocytose du virus (275,276). Cette alternative potentielle au cycle viral classique du FMDV a aussi été liée à la libération de complexes anticorps-virus. En effet, il a été montré qu'après traitement d'animaux porteurs à l'aide de composés fluorocarbonés, supposés induire la libération de tels complexes, l'infectivité des prélèvements de liquides oropharyngés augmente (277,278). Il n'existe toutefois aucune preuve tangible concernant la mise en place d'un cycle viral non lytique et de son implication dans l'établissement de l'infection persistante par le FMDV. De plus, il a été proposé que le maintien de la persistance virale soit lié aux tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT, pour *Mucosa-associated lymphoid tissue*). Cette hypothèse a été supportée par la mise en évidence de preuves de la persistance du FMDV dans les ganglions lymphatiques et les centres germinatifs (279). Alors qu'aucune réplication virale n'a pu être observée dans ces structures, il se pourrait



qu'elles soient impliquées dans la survie de virus non réplicatifs responsables de la réponse immunitaire à long terme en cas d'infection persistante. Une telle hypothèse coïncide avec la co-localisation d'antigènes viraux 3D^{pol} et VP1 observée dans les MALT. Bien que la poursuite de ces travaux soit nécessaire pour conclure quant à cette hypothèse, il semblerait que les traces de virus retrouvées dans ces structures correspondent davantage à des produits de dégradation du virus qu'à de véritables formes de persistance virale (207,280). Il a également été avancé que l'infection persistante par le FMDV pourrait être associée à l'immunité adaptative mucoale de l'hôte. Cette théorie résulte de travaux ayant mis en lumière une production prolongée d'immunoglobulines IgA détectée dans les sécrétions orales et nasales, ainsi que dans le sérum des animaux porteurs, lors d'une infection persistante (207,281,282).

Face aux difficultés rencontrées dans la mise en évidence des mécanismes de persistance du FMDV, il a été envisagé que ce phénomène résulte d'une combinaison de facteurs. Ainsi, il a notamment été proposé que le virus affecte la réponse immunitaire de l'hôte en induisant à la fois une sous-expression de cytokines, à l'origine d'une limitation du recrutement des neutrophiles, des lymphocytes T et des cellules dendritiques, un blocage de la liaison des cellules *Natural Killer* (NK) à leurs cibles, ainsi que la suppression de l'apoptose nécessaire à la clairance virale (283).

Une coévolution entre le FMDV et son hôte a également pu être mise en exergue lors d'une infection persistante. Cette coévolution a premièrement été démontrée dans des fibroblastes de reins de bébé hamster (BHK21, pour *Baby Hamster Kidney*) par De La Torre *et al.* en 1988 (284). Au cours de l'infection, des mutations ont pu être détectées à la fois dans le génome cellulaire et dans le génome viral. Il a ainsi été mis en lumière que les cellules ont évolué pour devenir plus résistantes à la souche virale utilisée, tandis que le virus a évolué pour devenir plus virulent lors de l'infection de ces cellules. Cette coévolution a été confirmée par la suite lors d'infections en cellules primaires



issues de pharynx bovin par O'Donnell *et al.* en 2014 et dans une lignée cellulaire épithéliale bovine (MDBK, pour *Madin-Darby Bovine Kidney*) par Koplaku *et al.* en 2015 (285,286). Ces dernières années, Eschbaumer *et al.* et Pfaff *et al.* ont caractérisé les réponses transcriptionnelles de l'hôte bovin lors d'une infection persistante par le FMDV, respectivement *in vivo* et dans un modèle *in vitro* (287–289). Il en résulte que l'infection persistante par le FMDV chez le bovin *in vivo* pourrait être associée à une altération de l'apoptose et à une suppression locale de l'immunité antivirale. De plus, l'utilisation du modèle *in vitro* a permis d'identifier des différences majeures au niveau de la réponse antivirale entre la phase d'infection aiguë et la phase d'infection persistante. En effet, il a été observé que lors de l'infection aiguë, une centaine de gènes stimulés par l'interféron (ISG, pour *Interferon Stimulated Genes*) sont surexprimés et que la présence d'interférons de type I est largement détectée, signes d'une réponse antivirale et apoptotique importante. En revanche, dans le cadre de l'infection persistante, après vingt-huit jours post-infection, il a été observé que de nombreux ISG étaient toujours surexprimés mais que la présence d'interféron ne pouvait plus être détectée, signes d'une réponse antivirale innée durable mais diminuée, qualifiée de résiduelle, et qui est inefficace pour éliminer le virus (288). La modulation de la réponse antivirale de l'hôte, et notamment la réponse innée, par le FMDV pourrait ainsi être à l'origine ou contribuer à l'établissement et/ou au maintien de l'infection persistante.

c) Réponse de l'hôte & interactions FMDV

i. Immunité innée

Réponse interféron de type I

De nombreux travaux portant sur la modulation de la réponse immunitaire par le FMDV ont été menés. Ils ont notamment permis d'identifier un très grand nombre



d'interactions protéines-protéines entre le virus et ses différents hôtes. Il apparaît ainsi, qu'à l'image de la plupart des virus, le FMDV ait développé diverses stratégies pour contrer la réponse antivirale (290). Sachant que lors d'une infection par le FMDV, la réaction immunitaire de l'hôte repose en grande partie sur l'immunité innée, première ligne de défense de la cellule hôte, il n'est pas surprenant d'observer que la plupart des interactions mises en évidence concerne l'immunité innée, et plus particulièrement la réponse interféron de type I (42,62,86,291).

La revue qui suit, reprend les différentes études menées au sujet des interactions protéiques entre le virus et la réponse interféron de type I afin de recenser ces interactions de la manière la plus exhaustive possible et compléter les revues précédemment publiées (62,86). Cette revue a également vocation à replacer ces interactions dans le contexte biologique de l'infection par le FMDV, du rôle des différentes protéines virales et de la réponse immunitaire de l'hôte. En outre, elle se distingue par l'angle novateur qui a été utilisé dans la conceptualisation de cette revue, à savoir l'attention portée aux modèles d'étude. En effet, alors que de nombreuses interactions protéiques entre le FMDV et son hôte ont été mises en évidence dans des modèles peu adaptés à l'étude du FMDV, impliquant notamment des protéines humaines, il nous paraissait important de s'interroger quant à la pertinence des observations qui en découlent.

Revue : Sarry M, Vitour D, Zientara S, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model.** *Viruses*. 2022 Sep 27;14(10):2129. doi: 10.3390/v14102129. PMID: 36298684; PMCID: PMC9610432.



Review

Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model

Morgan Sarry ^{1,2,*}, Damien Vitour ¹, Stephan Zientara ¹, Labib Bakkali Kassimi ¹
and Sandra Blaise-Boisseau ^{1,*}

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

² AgroParisTech, 75005 Paris, France

* Correspondence: morgan.sarry@anses.fr (M.S.); sandra.blaise-boisseau@anses.fr (S.B.-B.)

Abstract: Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease of cloven-hoofed animals with a significant socioeconomic impact. One of the issues related to this disease is the ability of its etiological agent, foot-and-mouth disease virus (FMDV), to persist in the organism of its hosts via underlying mechanisms that remain to be elucidated. The establishment of a virus–host equilibrium via protein–protein interactions could contribute to explaining these phenomena. FMDV has indeed developed numerous strategies to evade the immune response, especially the type I interferon response. Viral proteins target this innate antiviral response at different levels, ranging from blocking the detection of viral RNAs to inhibiting the expression of ISGs. The large diversity of impacts of these interactions must be considered in the light of the in vitro models that have been used to demonstrate them, some being sometimes far from biological systems. In this review, we have therefore listed the interactions between FMDV and the interferon response as exhaustively as possible, focusing on both their biological effect and the study models used.

Keywords: protein–protein interactions; virus–host interactions; foot-and-mouth disease virus; interferon response; study models



Citation: Sarry, M.; Vitour, D.; Zientara, S.; Bakkali Kassimi, L.; Blaise-Boisseau, S. Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model. *Viruses* **2022**, *14*, 2129. <https://doi.org/10.3390/v14102129>

Academic Editor: Zhidong Zhang

Received: 16 August 2022

Accepted: 19 September 2022

Published: 27 September 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious disease affecting domestic and wild cloven-hoofed animals, namely productive animals, such as cattle, sheep, goats and swine. It remains a major threat to animal health since, in the event of an epizootic, its impact is considerable from both a societal and economic point of view. The etiological agent responsible for FMD is known as foot-and-mouth disease virus (FMDV). This pathogen is a positive-sense single-stranded RNA virus belonging to the genus *Aphthovirus* within the *Picornaviridae* family. The high mutation rate of the FMDV genome, due to poor fidelity of the RNA replication and lack of proofreading activity has led to the classification of the FMDV into seven different serotypes, namely A, O, C, Asia 1, South African Territories 1 (SAT1), SAT2 and SAT3, each subdivided into several subtypes. The antigenic diversity among these serotypes constitutes an obstacle to vaccine efficiency since there is no cross-protection between them [1]. The viral RNA genome is approximately 8 kb in length containing an open reading frame (ORF), flanked by untranslated regions (5'UTR and 3'UTR). The ORF encodes a single polyprotein precursor comprising four structural proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4) and eleven nonstructural proteins (Labpro, Lbpro, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C and 3D) (Figure 1).



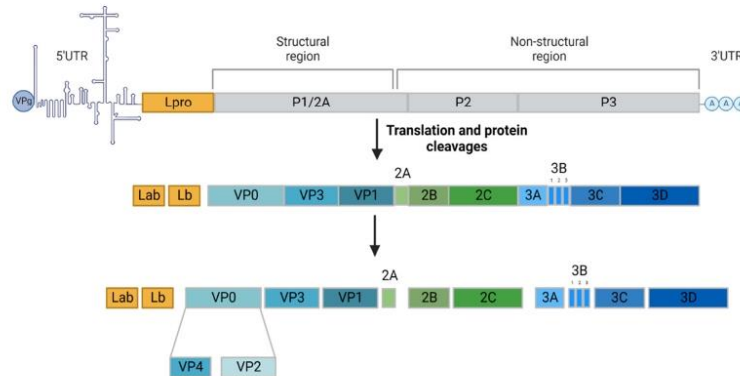


Figure 1. Foot-and-mouth disease virus genome structure and viral protein expression. The FMDV virus has a small genome (about 8.5 kb) encoding four structural proteins, VP4, VP2, VP3 and VP1, forming the capsid, and eleven nonstructural proteins, Labpro, Lbpro, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C and 3D, responsible for the infectious cycle. Adapted with permission from Belsham et al., 2020 [2]. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) (accessed on 15 August 2022).

2. FMDV Life Cycle

The FMDV replication cycle can be characterised by nine distinct phases, namely binding, internalization, uncoating, translation, processing, replication, encapsidation, morphogenesis and viral egress (Figure 2). Infection begins with capsid adsorption to membrane receptors via a highly conserved RGD motif (Arg-Gly-Asp) at the VP1 surface [3]. In most cases, the virus binds to receptors belonging to the integrin family, particularly to $\alpha V\beta 6$ integrins that are highly expressed in epithelial cells. Sometimes, FMDV also binds to other receptors, such as heparan sulphate (HS) [4]. Once adsorbed, virions are internalised, usually by clathrin-mediated endocytosis [5]. While the mechanisms of FMDV uncoating are still incompletely understood, it appears that endosomal acidification results in the uncoating of the viral capsid, leading to the release of the genomic RNA into the cytoplasm of the cell [6]. It has been indeed shown that at pH values corresponding to early endosomes, the aphthovirus capsid dissociates into pentameric subunits, releasing RNA and the internal protein VP4 [2,7]. The genomic RNA is then translated, beginning at the internal ribosome entry site (IRES) element, to produce a large polypeptide called precursor polyprotein. Viral genomic RNA is processed into mature polypeptides as well as a variety of partial cleavage intermediates to generate the fifteen final mature viral proteins mediated by the action of the two viral proteinases (Lpro and 3C) [2]. While the FMDV shuts down host translation thanks to Lpro activity, its replication is carried out by the 3D RNA-dependent RNA polymerase, along with the 2B, 2C and 3A proteins, in membrane structures derived from the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi [8,9]. A negative intermediate RNA is first synthesised from the positive strand. This antigenomic RNA serves as a template for the synthesis of genomic RNA. The completion of the infectious cycle then requires the assembly of structural proteins, which are organised into pentamers, associating together to form the capsid. The genomic RNA then binds with this immature capsid to form a provirion [10]. A final protein cleavage of the VP0 precursor into VP2 and VP4 then occurs, transforming the provirion into a mature virus particle. The virions rapidly accumulate in the cytoplasm of infected cells, inducing cell lysis and resulting in viral egress of the neoformed viruses.



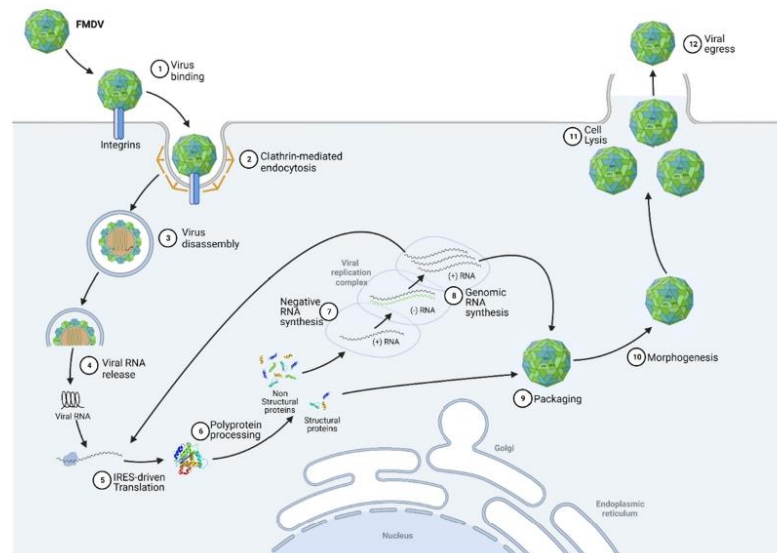


Figure 2. Foot-and-mouth disease virus replication cycle (See text for details). Created with [BioRender.com](#) (accessed on 15 August 2022).

3. FMDV Persistence in Its Hosts

The severity of clinical symptoms associated with FMD differs according to the species affected. However, they usually include fever, sudden lameness, lesions on the hooves, tongue and teats and reduced productivity [11]. After clinical recovery, FMDV persists in more than 50% of ruminants, without clinical signs, irrespective of their specific immune status towards this virus [12]. Persistent FMDV infection is currently defined as the detection of the infectious virus in the oropharynx for more than 28 days after infection [13]. However, this definition is challenged in the light of more recent studies that indicate that in the case of nonpersistent infection, viral clearance occurs within the first 21 days postinfection [14]. The persistence of the FMDV has been demonstrated in cattle and small ruminants but not in swine [15]. Domestic pigs are unlikely to be long-term carriers of the infectious FMDV, although persistent FMDV proteins and RNA are frequently detected after infection in lymphoid tissues [16]. In ruminants, viral proteins and RNA are also detected, in addition to infectious viruses in persistence sites [11,12]. Localisations of viral persistence have been described in several species. The FMDV has been thus detected in bovine nasopharyngeal tissues, particularly at the soft palate dorsal surface and in the adjoining dorsal nasopharynx [17]. In ovine, persistent virus is mainly located in the epithelial crypts within ovine oropharyngeal and laryngopharyngeal tonsils [18]. The anatomic sites of FMDV persistence in African buffalo are the pharyngeal and palatine tonsils as well as the dorsal soft palate [19]. Regarding the fact that they are not likely to excrete infectious virus in their environment, healthy carriers represent a transmission risk that is considered extremely low. However, it has recently been shown that in the case of superinfection, a frequent phenomenon in natural conditions, animals persistently infected can shed the infectious virus [20]. Furthermore, viral recombination phenomena have been evidenced during these experimental superinfections, thereby strengthening the importance of healthy carriers as actors in the emergence and dissemination of new recombinant strains of FMDV. Similarly, quite a high recombination rate could be observed in coinfections in African buffalo, indicating that recombination could play an important and unappreciated role in the evolution of FMDV [21]. These healthy carriers thus represent



a significant risk of new variants being transmitted to susceptible animals and therefore constitute an obstacle to the disease's control.

Although viral persistence was described in the 1950s, the mechanisms for establishing, maintaining and resolving the persistence of the FMDV remain unclear. The establishment of a persistently infected baby hamster kidney (BHK21) cell line has demonstrated coevolution between the FMDV and host cells [22]. As for many other virus–cell systems, this *in vitro* coevolution is characterised by a set of genetic variations of both virus and cells, leading to an increased resistance of the latter to infection and an increased infectivity of the persistent virus on naive cells. This investigation also revealed mutations in the persistent virus, particularly in the VP1 and VP3 sequences, which could be involved in the induction and/or maintenance of this persistence [23]. This coevolution phenomenon was then confirmed in a study based on a far more appropriate model for natural infection, namely primary cells derived from bovine pharynx, suggesting that viral persistence results from the combination of a highly specialised epithelial cell population and a specific cellular response, probably involving interferons and cytokines. Indeed, in this study, it has been shown that certain cytokines with a key role in the antiviral response are absent in persistent infection [24]. This coevolution between the FMDV and these primary bovine cells was also highlighted by the colocalisation between VP1 and the autophagy proteins ATG5 and ATG12 implicated in the antiviral response, making possible their potential interaction [24]. Similarly, the FMDV–host coevolution was demonstrated in persistently infected Madin–Darby Bovine Kidney (MDBK) epithelial cell lines. The sequencing of the VP1 protein of the persistent virus revealed a single-point mutation, consisting of an amino acid substitution from valine (V) to alanine (A) at position 50 that could disrupt a predicted SUMO-binding site. As SUMOylation phenomena are known to be exploited by some viruses to evade the immune response, it is possible that the persistent FMDV could also manipulate this pathway [25].

4. FMDV and Innate Immunity

In a more general perspective, it is thus conceivable that the FMDV, via a coevolution with its host, has become able to hijack the cellular machinery in order to protect itself against the antiviral response. The coevolution between viruses and their hosts is mainly driven by their opposite but also common interests focused on their respective survival [26]. Indeed, host cells need to detect pathogens efficiently and be able to react against infection. In order to do this, they generally trigger an inflammatory response that is strong enough to eliminate the viruses, but at the same time sufficiently moderate not to affect their own functions. On the virus side, they need to protect themselves from the immune response, without completely overpowering the host to keep it alive [27]. The antiviral innate immunity is largely based on the synthesis and secretion of type I interferons (IFNs) by the infected cells, which induce an antiviral state within infected and surrounding cells [28]. The type I IFN response is characterised by three successive phases, namely induction, production and signalling (Figure 3) [29]. Upon FMDV infection, viral RNA can be detected by cytosolic receptors, such as the retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), RIG-I and laboratory of genetics and physiology protein 2 (LGP2), as well as NOD-like-receptors (NLRs) [30]. RIG-I recognises cytoplasmic short double-stranded and 5'-triphosphate single-stranded viral RNAs, while MDA5 senses predominantly long double-stranded RNA [31]. LGP2 acts as a positive regulator of RIG-I and MDA5-mediated detection of exogenous RNA by complexing with double-stranded viral RNAs generated during the FMDV replication. The interaction between these cytosolic receptors and viral RNA results in the exposure of their CARD domains, which bind to mitochondrial antiviral signalling protein (MAVS) CARD domains by polymerisation. The NLR nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2), is also able to recognise certain viral recognition patterns, but interacts with MAVS independently of the CARD domains [32]. NOD2 binding to a viral ssRNA also induces its homo- or heterodimerisation with NOD1, allowing receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (RIP2)



recruitment via an interaction between their CARD domains and promoting its autophosphorylation [33]. Endosomal RNAs are detected by membrane toll-like receptors (TLRs) receptors, such as TLR3, TLR7 and TLR8, while the structural proteins VP1 and VP3 can be recognised by TLR2 and TLR4 receptors, respectively [34–37]. Upon activation by ligand recognition, these TLRs interact with adaptor proteins, namely TIR domain-containing adapter molecule 1 (TRIF) and myeloid differentiation primary response protein MyD88 (MYD88), itself associated with interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) and IRAK4. Interactions between cytoplasmic sensors and MAVS, autophosphorylation of RIP2, as well as conformational changes of TLR-associated adaptor proteins, are responsible for the enrolment of E3 ubiquitin ligases, namely tumour necrosis factor receptor-associated factors 3 and 6 (TRAF3 and TRAF6). These are involved in the polyubiquitination of TANK-binding kinase 1 (TBK1) and the inhibition of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha (IKK α). The polyubiquitin chains are recognised by the NF-kappa-B essential modulator (NEMO), allowing the binding of the attached proteins. The NEMO/TBK1 complex thus forms associates with IKK ϵ and the TRAF family member-associated NF-kappa-B activator (TANK) and induces the phosphorylation of interferon regulatory factors, in particular interferon regulatory factors 3 and 7 (IRF3 and IRF7) [38]. Once phosphorylated, IRFs organize into homo- or heterodimers and translocate to the nucleus [39]. The IKK complex, formed following recognition of polyubiquitinated IKK α by NEMO, is responsible for I κ B α phosphorylation. This phosphorylation event causes I κ B α degradation and thus nuclear factor NF-kB release which translocates to the nucleus [40]. Similar to the NEMO/TBK1 complex, the IKK complex can phosphorylate IRF7, leading to its dimerization and translocation of the neoformed dimer to the nucleus. In parallel, TRAF6 and NEMO are involved in the recruitment of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (MAP3K7), also known as TAK1 [41]. This kinase, which triggers the IKK α phosphorylation needed for NF-kB activation, is also the starting point of the MAPK pathway. This phosphorylation cascade involving various kinases, such as extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1), ERK2, stress-activated protein kinase 1 (JNK1) and JNK2, leads to the phosphorylation of both subunits of activator protein 1 (AP-1). Once phosphorylated, this transcription factor activator translocates to the nucleus.

Once in the nucleus, IRF3 and IRF7 homo- and heterodimers, as well as AP-1, associate with type I IFN promoter to stimulate their transcription. IRF1 and IRF5 dimers are able to boost the transcription of many proinflammatory cytokines, such as TNF α , IFN γ and interleukin IL-1, by binding to their promoters. Similarly, nuclear NF-kB can bind either to the promoter of type I IFNs or to the promoters of proinflammatory cytokines to promote transcription.

When synthesised by the ER, IFNs pass through the Golgi before diffusing into the cellular environment. IFNs can act both autocrine and paracrine. To do so, they are recognised by interferon alpha/beta receptors (IFNAR) [42]. The binding of IFN molecules to these membrane receptors induces the activation of the Janus kinase 1 (JAK1), JAK2 and nonreceptor tyrosine-protein kinase TYK2 proteins [43]. Once activated, these JAK proteins lead to a phosphorylation cascade resulting in the phosphorylation and association of the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT2 into homo- or heterodimers [44]. On the one hand, STAT1 homodimers thus assembled translocate to the nucleus where they bind to proinflammatory cytokine promoters to amplify the host inflammatory response. On the other hand, STAT1/STAT2 heterodimers form a complex with IRF9. This complex also translocates to the nucleus and binds specifically to the interferon-stimulated response element (ISRE), present in most IFN-stimulated (ISGs), to induce their expression and activate the antiviral response [27]. The detailed mechanisms involved in the IFN response are illustrated in Figure 2 of this review. Some acute infections can be cleared by the immune system within days, while other infections can be persistent and last for decades. This is because the efficiency of viral clearance depends on many factors, including the immune status of the host, the nature of the virus causing the infection and, most importantly, the virus–host interaction that is established. The IFN response and the resulting ISG expression are thus regulated, even hijacked by the viruses throughout



the infection in order to either stimulate it to promote passage into the surrounding cells or to decrease it to avoid being degraded [45].

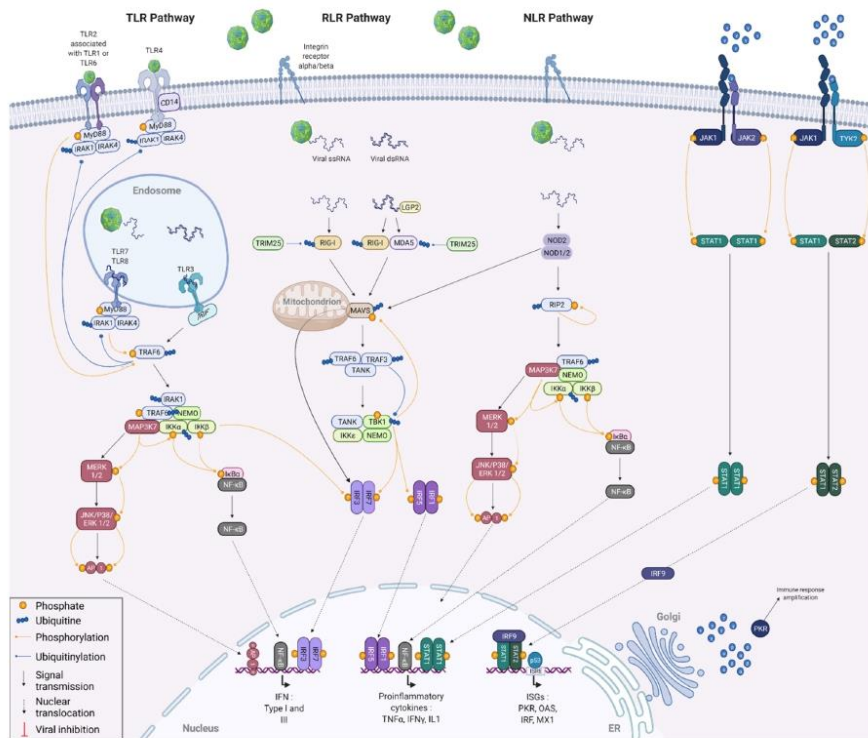


Figure 3. Innate antiviral immune responses against viral infection. The induction of the IFN response results from the recognition of characteristic viral patterns by cellular membranous or cytoplasmic receptors. Activation of these receptors triggers a signalling cascade in the cell, leading to the activation of transcription factors involved in IFN alpha and beta and proinflammatory cytokine production. Finally, the signalling phase consists of the binding of IFN-alpha and -beta to their receptors, which generates an activation signal that is propagated into the cell via the JAK/STAT pathway to enable the expression of numerous proteins with antiviral or immunomodulatory activity. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) (accessed on 15 August 2022).

Among the possibilities explored to explain FMDV persistence, the hypothesis of the modulation of the cellular response by the virus, leading to the establishment and maintenance of a balance between the virus and its host via the establishment of protein–protein interactions (PPI), seems thus interesting. Although many interactions have already been demonstrated between the FMDV and its host in different study models, it is not yet possible to clearly define a relationship between protein interactions and viral persistence [46–48]. This can be mainly because most studies of PPI are not performed in a context of acute or persistent infection, but in uninfected cells under overexpression conditions.

It appears interesting to wonder whether the persistence of the FMDV in the host could be explained by the interaction between host and virus proteins. It seems relevant to ask how the virus and its different hosts interact to reach a balanced situation and how these interactions differ between species. It is even possible to wonder whether these



differences in PPI could explain why ruminants can become healthy carriers while swine cannot [14–16].

To answer these questions, it seemed to us relevant to look at the FMDV /host PPI already described in the literature, considering the species used to demonstrate them. This review will provide an overview of the role of each of the FMDV proteins in its escape from the host immune response. The interactions between FMDV and cellular proteins involved in the type I interferon response will be particularly detailed. The viral proteins will be presented in order of relative importance with respect to their involvement in interactions with the IFN pathway. This decision was made in order to avoid the commonly made cleavage between structural and nonstructural proteins. Indeed, recent years have revealed an increasingly more important role for structural proteins in the subversion of the immune response, whereas their contribution was previously rather neglected. All protein interactions, involved in counteracting the immune response, mentioned in this review will be summarised in Table 1. The main ones will be illustrated in Figure 4.

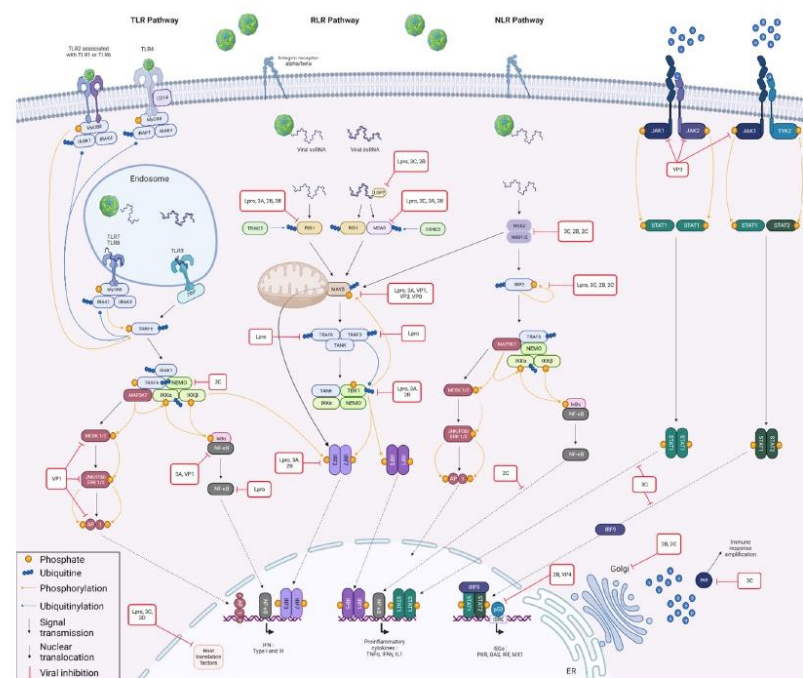


Figure 4. Innate antiviral immune responses and viral counteraction during FMDV infection. Coevolution between FMDV and its hosts has led the virus to adopt a number of strategies for limiting the antiviral immune response. For example, it is able to interfere with viral RNA detection by acting on the RIG-I, MDA5, LGP2 and NOD2 sensors via its Lpro, 2B, 2C, 3A, 3B and 3C proteins. FMDV also antagonises the host immune response by targeting proteins involved in signal transduction, such as MAVS, RIP2, NEMO and TBK1, interacting via its VP0, VP3, VP1, Lpro, 2B, 2C, 3A and 3C proteins. In addition, Lpro protein of FMDV degrades IRF3 and IRF7, while 2B and 3A target only IRF3. MAPK pathway is restricted by the action of VP1, while NF-κB pathway is impacted by VP1, Lpro, 2C and 3A. FMDV also counteracts JAK/STAT pathway via VP3/JAK interaction and by preventing nuclear translocation of STAT dimers through 3C. At a nuclear level, Lpro, 3C and 3D are involved in the inhibition of host translation factors, while VP4 and 2B negatively regulate ISG transcription. Golgi apparatus-associated molecular transport complexes are subverted by 2B and 2C, and some antiviral proteins, such as PKR, are degraded by 3C. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) (accessed on 15 August 2022).



Table 1. Protein–protein interactions described between EMDV 3D polymerase and type I IFN response.

Viral Protein		Cellular Target		Strategy		Reference	
Name	Nature	Viral Strain	Name	Impacted Biological Mechanism	Protein Origin	Action Mechanism	Title
Lpro	NS	O1K	LGP2	Signal transmitting	Human	Cleavage	Innate immune sensor LGP2 is cleaved by the Leader protease of foot-and-mouth disease virus Rodriguez Pulido (2018) [49]
Lpro	NS	A12	MAVS	Signal transmitting	Swine	N.D	Dissecting distinct proteolytic activities of FMDV Lpro implicates cleavage and degradation of RLR signaling proteins, not its deISGylase/DUB activity, in type I interferon suppression Visser (2020) [50]
Lpro	NS	O1K	MDA5	Signal transmitting	Human	Cleavage	MDA5 Cleavage by the Leader Protease of Foot-and-Mouth Disease Virus Reveals Its Pleiotropic Effect against the Host Antiviral Response Pulido (2020) [51]
Lpro	NS	O/ES/2001	RIG-I	Signal transmitting	Human	Cleavage	The leader protease of foot-and-mouth disease virus negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase Wang (2011) [52]
Lpro	NS	O/BY/CHA/2010	RIP2	Signal transmitting	Swine	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits RIP2 Protein Expression to Promote Viral Replication Liu (2021) [53]
Lpro	NS	O/ES/2001	TRAF3	Signal transmitting	Human	Deubiquitination	The leader protease of foot-and-mouth disease virus negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase Wang (2011) [52]
Lpro	NS	O/ES/2001	TRAF6	Signal transmitting	Human	Deubiquitination	The leader protease of foot-and-mouth disease virus negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase Wang (2011) [52]
Lpro	NS	O/ES/2001	IRF3	Transcription	Swine	Cleavage	Foot-and-mouth disease virus leader protease inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels Wang (2010) [54]
Lpro	NS	O/ES/2001	IRF7	Transcription	Swine	Cleavage	Foot-and-mouth disease virus leader protease inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels Wang (2010) [54]
Lpro	NS	A12	p65	Transcription	Goat	Cleavage	Degradation of Nuclear Factor Kappa B during Foot-and-Mouth Disease Virus Infection De Los Santos (2007) [55]
Lpro	NS	A12	ADNP	Transcription	Human	Regulatory binding	Interaction between FMDV L pro and transcription factor ADNP is required for optimal viral replication Medina (2017) [56]



Table 1. Cont.

Viral Protein		Cellular Target		Reference			
Name	Nature	Viral Strain	Name	Protein Origin	Strategy	Title	Author
			Impacted Biological Mechanism		Action Mechanism		
Lpro	NS	C-S8	eIF3a	Human	Cleavage	Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins	Rodriguez Pulido (2007) [57]
Lpro	NS	C-S8	eIF3b	Human	Cleavage	Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins	Rodriguez Pulido (2007) [57]
Lpro	NS	O6	eIF4GI	Human	Cleavage	Leader Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus Is Required for Cleavage of the p220 Component of the Cap-BindingProteinComplex	Devaney (1988) [58]
Lpro	NS	O6	eIF4GII	Human	Cleavage	Leader Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus Is Required for Cleavage of the p220 Component of the Cap-BindingProteinComplex	Devaney (1988) [58]
Lpro	NS	C-S8	Gemin-5	Human	Cleavage	Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L-protease targets	Pineiro (2012) [59]
Lpro	NS	C-S8	PABP	Human	Cleavage	Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins	Rodriguez Pulido (2007) [57]
Lpro	NS	C-S8	PTB	Human	Cleavage	Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins	Rodriguez Pulido (2007) [57]
Lpro	NS	A12	G3BP1	Human	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus Leader Protease Cleaves G3BP1 and G3BP2 and Inhibits Stress Granule Formation	Visser (2019) [60]
Lpro	NS	A12	G3BP2	Human	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus Leader Protease Cleaves G3BP1 and G3BP2 and Inhibits Stress Granule Formation	Visser (2019) [60]
Lpro	NS	O/Tibet/CHA/99	RNase L	Swine	Regulatory binding	Inhibition of Antiviral Innate Immunity by Foot-and-Mouth Disease Virus Lpro through Interaction with N-terminal Domain of Swine RNase L	Sut (2021) [61]
Lpro	NS	O/ES/2001	TBK1	Human	Deubiquitination and Cleavage	The leader protease of foot-and-mouth disease virus negatively regulates the type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase	Wang (2011) [52]

Table 1. Cont.

Name	Viral Protein		Cellular Target		Strategy		Reference	
	Nature	Viral Strain	Name	Impacted Biological Mechanism	Protein Origin	Action Mechanism	Title	Author
3C	NS	O/BY/CHA/2010	LGP2	Viral sensing	Swine	Inhibition of protein expression	Foot-and-mouth disease virus infection inhibits LGP2 protein expression to exaggerate inflammatory response and promote viral replication	Zhu (2017) [62]
3C	NS	O/SKR/2000	MDA5	Viral sensing	Swine	Inhibition of protein expression	Foot-and-Mouth Disease Virus Evades Innate Immune Response by 3C-Targeting of MDA5	Kim (2021) [63]
3C	NS	O/BY/CHA/2010	NOD2	Viral sensing	Swine	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes NOD2-Mediated Antiviral Effects by Inhibiting NOD2 Protein Expression	Liu (2019) [64]
3C	NS	O/BY/CHA/2010	DDX21	Viral sensing and Signal transmitting	Swine	Lysosomal degradation	DDX21, a Host Restriction Factor of FMDV IRES-Dependent Translation and Replication	Abdullah (2021) [65]
3C	NS	O/ES/2001	NEMO	Signal transmitting	Swine	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Cleaves NEMO To Impair Innate Immune Signaling	Wang (2012) [66]
3C	NS	O/BY/CHA/2010	RIP2	Signal transmitting	Swine	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits RIP2 Protein Expression to Promote Viral Replication	Liu (2021) [53]
3C	NS	O/BY/CHA/2010	PRDX6	Signal transmitting	Swine	Cleavage	Porcine Picornavirus 3C Protease Degrades PRDX6 to Impair PRDX6-mediated Antiviral Function	Wang (2021) [67]
3C	NS	O1K	H3	Transcription	Cattle	Cleavage	Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3	Falk (1990) [68]
3C	NS	CS8	eIF4A	Translation	Hamster	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Induces Cleavage of Translation Initiation Factors eIF4A and eIF4G within Infected Cells	Belsham (2000) [69]
3C	NS	CS8	eIF4G	Translation	Hamster	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Induces Cleavage of Translation Initiation Factors eIF4A and eIF4G within Infected Cells	Belsham (2000) [69]
3C	NS	O/YS/CHA/05	hnRNP K	Translation	Hamster	Cleavage	hnRNP K Is a Novel Internal Ribosomal Entry Site-Transacting Factor That Negatively Regulates Foot-and-Mouth Disease Virus Translation and Replication and Is Antagonized by Viral 3C Protease	Liu (2020) [70]
3C	NS	O/BY/CHA/2010	RPL13	Translation	Swine	Cleavage	Ribosomal Protein L13 Participates in Innate Immune Response Induced by Foot-and-Mouth Disease Virus	Guan (2021) [71]

Table 1. Cont.

Name	Viral Protein		Cellular Target		Strategy		Reference	
	Nature	Viral Strain	Name	Impacted Biological Mechanism	Protein Origin	Action Mechanism	Title	Author
3C	NS	A24/Cruzeiro/Brazil/1955	Sam68	Translation	Human	Cleavage	The nuclear protein Sam68 is cleaved by the FMDV 3C protease redistributing Sam68 to the cytoplasm during FMDV infection of host cells	Lawrence (2012) [72]
3C	NS	O/ES/2001	G3BP1	Response amplification	Swine	Cleavage	Foot-and-Mouth Disease Virus Counteracts on Internal Ribosome Entry Site Suppression by G3BP1 and Inhibits G3BP1-Mediated Stress Granule Assembly via Post-Translational Mechanisms	Ye (2018) [73]
3C	vS	O/BY/CHA/2010	PKR	Response amplification	Swine	Lysosomal degradation	Foot-and-mouth disease virus induces lysosomal degradation of host protein kinase PKR by 3C proteinase to facilitate virus replication	Li (2017) [74]
3C	NS	O/Tibet/CHA/99	STAT1	Response amplification	Human	Prevention of nuclear translocation	3Cpro of Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes the Interferon Signaling Pathway by Blocking STAT1/STAT2 Nuclear Translocation	Du (2014) [75]
3C	NS	O/Tibet/CHA/99	STAT2	Response amplification	Human	Prevention of nuclear translocation	3Cpro of Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes the Interferon Signaling Pathway by Blocking STAT1/STAT2 Nuclear Translocation	Du (2014) [75]
3A	NS	O/Tibet/CHA/99	RIG-I	Viral sensing	Human	Regulatory binding and reduction of RNA levels	Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3A inhibits the interferon- β signaling pathway	Li (2016) [76]
3A	NS	type-O	LRRC25	Signal transmitting	Swine	Protein upregulation	Foot-and-Mouth Disease Virus 3A Protein Causes Upregulation of Autophagy-Related Protein LRRC25 To Inhibit the G3BP1-Mediated RIG-like Helicase-Signaling Pathway	Yang (2020) [77]
3A	NS	O/Tibet/CHA/99	MAVS	Signal transmitting	Human	Regulatory binding and reduction of RNA levels	Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3A inhibits the interferon- β signaling pathway	Li (2016) [76]
3A	NS	O/Tibet/CHA/99	MDA5	Signal transmitting	Human	Regulatory binding and reduction of RNA levels	Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3A inhibits the interferon- β signaling pathway	Li (2016) [76]
3A	NS	O/BY/CHA/2010	ANXA1	Signal transmitting	Swine	Regulatory binding	FMDV 3A Antagonizes the Effect of ANXA1 to Positively Modulate Viral Replication	Ma (2022) [78]

Table 1. Cont.

Viral Protein		Cellular Target		Strategy		Reference		
Name	Nature	Viral Strain	Name	Impacted Biological Mechanism	Protein Origin	Action Mechanism	Title	
3A	NS	O/BY/CHA/2010	DDX56	Translation	Swine	Regulatory binding	DDX56 cooperates with FMDV 3A to enhance FMDV replication by inhibiting the phosphorylation of IRF3	Fu (2019) [79]
2B	NS	O/BY/CHA/2010	DDX21	Viral sensing	Swine	N.D	DDX21, a Host Restriction Factor of FMDV IRES-Dependent Translation and Replication	Abdullah (2021) [65]
2B	NS	O/Tibet/CHA/2010	LCF2	Viral sensing	Swine	N.D	Foot-and-mouth disease virus infection inhibits LCF2 protein expression to exaggerate inflammatory response and promote viral replication	Zhu (2017) [62]
2B	NS	O/MYA/01/1998	MDA5	Viral sensing	Human	Regulatory binding	Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2B negatively regulates the RLR-mediated IFN- β induction	Li (2018) [80]
2B	NS	O/BY/CHA/2010	NOD2	Viral sensing	Swine	N.D	Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes NOD2-Mediated Antiviral Effects by Inhibiting NOD2 Protein Expression	Liu (2019) [64]
2B	NS	O/BY/CHA/2010	RIG-I	Viral sensing	Swine	Inhibition of protein expression	Foot-and-Mouth Disease Virus Viroprotein 2B Antagonizes RIG-I-Mediated Antiviral Effects by Inhibition of Its Protein Expression	Zhu (2016) [81]
2B	NS	O/MYA/01/1998	RIG-I	Viral sensing	Human	Regulatory binding	Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2B negatively regulates the RLR-mediated IFN- β induction	Li (2018) [80]
2B	NS	O/BY/CHA/2010	Cyclophilin A	Signal transmitting	Swine	N.D	Foot-and-mouth disease virus nonstructural protein 2B interacts with cyclophilin A, modulating virus replication	Liu (2018) [82]
2B	NS	O/BY/CHA/2010	RIP2	Signal transmitting	Swine	N.D	Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits RIP2 Protein Expression to Promote Viral Replication	Liu (2021) [53]
2B	NS	O/BY/CHA/2010	NME1	Transcription	Swine	N.D	Foot-and-mouth disease virus induces lysosomal degradation of NME1 to impair p53-regulated interferon-inducible antiviral genes expression	Feng (2018) [83]
VP1	VP	O/Taiwan/97	TLR2	Viral sensing	Human	Regulatory binding	Capsid proteins of foot-and-mouth disease virus interact with TLR2 and T CD14 to induce cytokine production	Lin (2020) [36]

Table 1. Cont.

Name	Viral Protein		Cellular Target		Strategy		Reference	
	Nature	Viral Strain	Name	Impacted Biological Mechanism	Protein Origin	Action Mechanism	Title	Author
VP1	VP	O/Taiwan/97	CD14	Signal transmitting	Human	Regulatory binding	Capsid proteins of foot-and-mouth disease virus interact with TLR2 and T CD14 to induce cytokine production	Lin (2020) [86]
VP1	VP	O1/Manisa/Turkey/69	MAVS	Signal transmitting	N.D	Regulatory binding	Foot-and-mouth disease virus VP1 target the MAVS to inhibit type-I interferon signaling and VP1 E83K mutation results in virus attenuation	Ekamayaka (2020) [84]
VP1	VP	O/BY/CHA/2010	RPSA	Signal transmitting	Swine	Regulatory binding	Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Protein VP1 Interacts with Host Ribosomal Protein SA To Maintain Activation of the MAPK Signaling Pathway and Promote Virus Replication	Zhu (2020) [85]
VP1	VP	N.D	Sorcin	Signal transmitting	Swine	N.D	Engagement of soluble resistance-related calcium binding protein (sorcin) with foot-and-mouth disease virus (FMDV) VP1 inhibits type I interferon response in cells	Li (2013) [86]
VP1	VP	O/BY/CHA/2010	TPL2	Signal transmitting	Swine	Polyubiquitination	Foot-and-Mouth Disease Virus Structural Protein VP1 Destroys the Stability of TPL2 Trimer by Degradation TPL2 to Evade Host Antiviral Immunity	Zhang (2020) [87]
2C	NS	O/BY/CHA/2010	NOD2	Viral sensing	Swine	Inhibition of protein expression	Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes NOD2-Mediated Antiviral Effects by Inhibiting NOD2 Protein Expression	Liu (2019) [64]
2C	NS	O/BY/CHA/2010	DDX21	Viral sensing and Signal transmitting	Swine	Degradation via caspase pathway	DDX21, a Host Restriction Factor of FMDV IRES-Dependent Translation and Replication	Abdullah (2021) [65]
2C	NS	A/IND40/2000	MARCHF7	Signal transmitting	Swine	N.D	Identification of novel interactions between host and non-structural protein 2C of foot-and-mouth disease virus	Mahajan (2021) [88]
2C	NS	N.D	Nmi	Signal transmitting	Swine	Recruitment	A critical role of interferon-induced protein IFP35 in the type I interferon response in cells induced by foot-and-mouth disease virus (FMDV) protein 2C	Zeng (2014) [89]
2C	NS	O/BY/CHA/2010	RIP2	Signal transmitting	Swine	Inhibition of protein expression	Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits RIP2 Protein Expression to Promote Viral Replication	Liu (2021) [53]
2C	NS	N.D	IFP35	Signal transmitting and Transcription	Swine	Recruitment	A critical role of interferon-induced protein IFP35 in the type I interferon response in cells induced by foot-and-mouth disease virus (FMDV) protein 2C	Zeng (2014) [89]

Table 1. Cont.

Viral Protein		Cellular Target		Strategy		Reference		
Name	Nature	Viral Strain	Name	Impacted Biological Mechanism	Protein Origin	Action Mechanism	Title	Author
VP3	VP	O/Taiwan/97	TLR2	Viral sensing	Human	Regulatory binding	Capsid proteins of foot-and-mouth disease virus interact with TLR2 and T CD14 to induce cytokine production	Lin (2020) [36]
VP3	VP	O/Taiwan/97	CD14	Signal transmitting	Human	Regulatory binding	Capsid proteins of foot-and-mouth disease virus interact with TLR2 and T CD14 to induce cytokine production	Lin (2020) [36]
VP3	VP	O/Tibet/CHA/2010	MAVS	Signal transmitting	Human	Inhibition of mRNA synthesis	The VP3 structural protein of foot-and-mouth disease virus inhibits the IFN- β signaling pathway	Li (2016) [90]
VP3	VP	O/Tibet/CHA/99	JAK1	Response amplification	Human	Regulatory binding	Foot-and-mouth disease virus structural protein VP3 degrades Janus kinase 1 to inhibit IFN- γ signal transduction pathways	Li (2016) [91]
VP3	VP	O/Tibet/CHA/99	JAK2	Response amplification	Human	Regulatory binding	Foot-and-mouth disease virus structural protein VP3 degrades Janus kinase 1 to inhibit IFN- γ signal transduction pathways	Li (2016) [91]
VP0	VP	O/Tibet/CHA/99	PCBP2	Signal transmitting	Swine	Regulatory binding	Poly (rC) binding protein 2 interacts with VP0 and increases the replication of the foot-and-mouth disease virus	Li (2019) [92]
VP4	VP	O/BY/CHA/2010	NME1	Signal transmitting	Swine	Degradation via macroautophagy pathway	Foot-and-mouth disease virus induces lysosomal degradation of NME1 to impair p53-regulated interferon-inducible antiviral genes expression	Feng (2018) [83]
3B	NS	O/BY/CHA/2010	RIG-I	Signal transmitting	Swine	Regulatory binding	Foot-and-Mouth Disease Virus 3B Protein Interacts with Pattern Recognition Receptor RIG-I to Block RIG-I-Mediated Immune Signaling and Inhibit Host Antiviral Response	Zhang (2020) [93]
3D	NS	A24/Cruzeiro/Brazil 1955	Sam68	Translation	Mouse	Regulatory binding	Analysis of the interaction between host factor Sam68 and viral elements during foot-and-mouth disease virus infections	Ray (2015) [94]
3D	NS	O/BY/CHA/2010	DDX1	N.D	Swine	Regulatory binding	The DEAD-Box RNA Helicase DDX1 Interacts with the Viral Protein 3D and Inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus Replication	Xue (2019) [95]

4.1. Lpro

Leader protein, also called Lpro, the first protein of the FMDV to be translated, is a papain-like proteinase that releases itself from the polyprotein by cleavage during viral maturation [96]. There are two different forms of the Lpro protein, namely Labpro and Lbpro, depending on the start codon from which translation is initiated. Lbpro, which is shorter by 28 amino acids, is the predominant form *in vivo*.

Lpro is an important factor of virulence and is involved in many mechanisms against the host innate immune response, acting mainly at the transcription and translation steps [97]. Among the large number of genes regulated by Lpro, many are ISGs and include genes with antiviral activity, cytokines and transcription factors, involved in the regulation of apoptosis or IFN signalling [98]. Numerous interactions have been described between this proteinase and multiple host proteins involved in the IFN signalling pathway, notably in the induction and in the production phases.

The FMDV leader protein plays a major role in inhibiting host mRNA translation, including those of the IFN pathway. Indeed, the Lpro protein counteracts the immune response from the viral RNA sensing phase until the inhibition of the expression of ISGs. Many interactions have been described between this proteinase and multiple host translational factors, leading to the impairment of host mRNA translation and then to the global immune response shut-off [99]. Thus, it has been shown that Lpro directly cleaves human eukaryotic translation initiation factors 4 gamma I and II (eIF4G-I and eIF4G-II) [58,100]. Similar to human rhinovirus (HRV) infection, the Lpro cleavage of both eIF4G-I and eIF4G-II occurs very early in infection, simultaneously and can be achieved in the absence of viral RNA replication within infected cells [101]. eIF4G-I and eIF4G-II are components of the complex eukaryotic translation initiation factor 4F (eIF4F), which is involved in the recognition of the mRNA cap, ATP-dependent unwinding of 5'-terminal secondary structure and recruitment of mRNA to the ribosome [102]. As the FMDV initiates translation in a cap-independent way through the action of the IRES, the virus translation is not dependent on eIF4G-I and eIF4G-II [103]. Likewise, the Lpro cleavage of human polypyrimidine tract-binding protein (PTB), an RNA-binding protein that binds to intronic polypyrimidine tracts to negatively regulate exons splicing, also contributes to the translation shut-off in infected cells [57].

Lpro also cleaves the human gem-associated protein 5 (Gemin 5) at the RGRAR motif, a sequence present in several RNA-binding proteins. Gemin 5 is an essential protein for the formation of the survival of motor neuron (SMN) complex, which is involved in the assembly of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) forming the spliceosome. The interaction between Lpro and Gemin 5 thus disrupts the proper splicing of cellular premRNAs [59]. The Lpro processing of human eukaryotic translation initiation factor 3 subunits a and b (eIF3a and eIF3b), RNA-binding components of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) complex, prevents the assembly of 48S initiation complexes on host mRNAs [104].

The proteolytic cleavage of human polyadenylate-binding protein (PABP) inhibits its binding to the poly-A tail of mRNA and then the mediated-PABP regulation processes of mRNA metabolism, such as premRNA splicing and mRNA stability RNA binding [57]. Thus, the cleavage of these host factors allows the FMDV to make full use of the host cell machinery for viral protein synthesis [105].

In addition, Lpro is responsible for the degradation of accumulated p65 in goats, a subunit of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B), which contains a DNA-binding domain and a transactivation domain, responsible for the transcriptional regulatory activities of NF- κ B. This interaction between Lpro and p65 prevents the activation and translocation of NF- κ B through the canonical pathway, and thus inhibits the expression of many NF- κ B-dependent proinflammatory cytokines [55].

This viral protein can also efficiently reduce the production of interferons by blocking the induction of genes whose transcription depends on IRFs. Indeed, Lpro is responsible for the proteolytic degradation of porcine IRF3 and IRF7 in a dose-dependent manner, but does not affect their mRNA transcription [54]. IRF3 is a regulator of type I IFN gene



transcription, particularly activating IFN- β production during the early and late phases of induction. Its phosphorylation by the inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon (IKK ϵ) or TBK1 is responsible for a conformational change. This is followed by homo- or heterodimerization with IRF7, leading to the translocation of the dimers into the nucleus and allowing the transcription of the IFN genes [106]. IRF7 is also a regulator of type I IFN gene transcription that is mainly involved in the late phases of induction. Its activation is similar to IRF3, but unlike IRF3, this protein can activate IFN- β as efficiently as IFN α production after activation by the TLR or RLR pathways [38]. Additionally, it may have a role in regulating the adaptive immune response by inducing proteasome activation [107]. IRF3 and IRF7 are also involved in the activation of the ISG transcription by binding to an ISRE in their promoters. Similar observations have been reported in many picornaviruses. As an example, Theiler virus Lpro is able to block the translocation of mouse IRF3 to the nucleus, preventing its binding to IFN- α/β promoters [108]. Likewise, mengovirus Lpro blocks the induction of IFN- α/β by preventing both NF- κ B and IRF3 activity in mouse cells, while Seneca Valley virus 3C pro degrades human IRF3 and IRF7 to abrogate IFN production [109,110].

Lpro binds to human activity-dependent neuroprotector homeobox protein (ADNP), a neuroprotective protein that also has immunomodulatory activity [56]. The purpose of this interaction is to facilitate the ADNP-mediated downregulation of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-12 expression to optimise FMDV replication [111].

In order to prevent the detection of viral RNA, Lpro acts early on the cytoplasmic sensors. Thus, Lpro blocks the activation of the immune response mediated by RIG-I, by acting as a deubiquitination enzyme (DUB) that cleaves ubiquitin chains [52]. RIG-I is a receptor that senses cytoplasmic short double-stranded and 5'-triphosphate single-stranded viral RNAs and initiates the signalling cascade leading to the production of type I interferons and proinflammatory cytokines [30]. Upon RNA binding, the Lys 63 polyubiquitination of RIG-I, by the E3 ubiquitin ligase TRIM25, is necessary to bind to the MAVS CARD domain. The transfer of RIG-I to the mitochondrial membrane, via a translocation complex formed by the chaperone protein 14-3-3 ϵ , mediates the association of the RIG-I and MAVS CARD domains, inducing the activation of MAVS, a protein that triggers the downstream signalling cascade [112]. Lpro also inhibits the activation of MAVS mediated by the human MDA5 [51]. Indeed, the viral proteinase cleaves MDA5 at the RGRAR motif, preventing its binding to the CARD domain of MAVS. MDA5 is a member of the retinoic acid-inducible type I receptor family. Like RIG-I, this protein is a cytoplasmic sensor of viral RNA playing a major role in sensing viral infection. Unlike RIG-I, MDA5 recognises long double-stranded RNA. The activation of MDA5 also requires its polyubiquitination, by tripartite motif containing 25 (TRIM25), at Lys 743 [113]. However, it is interesting to note that, contrary to the case of RIG-I, no evidence was found for a possible deubiquitination of MDA5 by the FMDV [50].

In addition, it was established that Lpro is able to cleave human and swine LGP2, an RNA helicase that is also part of RLRs [49]. LGP2 cannot initiate antiviral signalling as it lacks the CARD domain required for activating MAVS-dependent signalling events, but it acts as a regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral signalling [114]. For this purpose, LGP2 forms a ribonucleoprotein complex with double-stranded viral RNA generated during picornavirus replication. The formation of this complex induces the recruitment of the E3 ubiquitin-protein ligase RNF135, which improves the detection of exogenous RNA by RIG-I and MDA5 [115]. The cleavage of LGP2 at the RGRAR sequence by Lpro, as with MDA5, results in the formation of truncated proteins that will accumulate in cytoplasm. As these cleavage products are inactive, the efficiency of the antiviral signalling is drastically reduced. While the cleavage of LGP2 by Lpro has also been reported during infection with the Equine Rhinitis A Virus (ERAV), it is interesting to notice that no evidence of this Lpro-LGP2 interaction has been found in other picornaviruses similar to the FMDV, such as the encephalomyocarditis virus (EMCV) or swine vesicular disease (SVDV). Since Lpro interacts with RIG-I, MDA5 and LGP2, the FMDV is able to prevent the antiviral response



induced by several proteins individually as well as synergistically, giving the virus a clear advantage for replication and spread in the host.

Although no direct interaction between Lpro and swine RIG-I or MDA5 proteins has been demonstrated, this viral protein inhibits the IFN- λ 1 expression pathway induced by RIG-I and MDA5 in pigs. Moreover, the catalytic activity and SAP domain of Lpro have been described to be necessary for suppressing dsRNA-induced IFN- λ 1 expression [116]. IFN λ 1 or type III interferons, also known as interleukin 28 (IL-28), share many biological characteristics with type I IFNs. Indeed, they are also produced as a result of the activation of the RLR pathway. Like type I IFNs, they enable an antiviral response in the cell and surrounding cells. However, there are differences since dendritic cells and macrophages mainly produce them, and IFN λ s bind to their own receptor, which is therefore different from that of IFN $\alpha\beta$ [28].

Lpro not only acts on the sensors responsible for triggering the IFN response. Indeed, this viral protein also counteracts proteins further down the signalling cascade to suppress IFN- α/β both at the mRNA and at the protein levels [117]. This is particularly the case for porcine MAVS, which is degraded by Lpro indirectly and by a mechanism that remains unknown to date. Although MAVS levels progressively decreased over time, no cleavage products nor signs of deubiquitination could be observed in FMDV-infected cells [50]. Peroxisomal and mitochondrial MAVS are necessary components of the innate immune defence against viruses. During viral infection, peroxisomal MAVS induces a rapid expression of defence factors that provide short-term protection, while mitochondrial MAVS activates an interferon-dependent signalling pathway that amplifies the immune response. Thus, the Lpro degradation of MAVS prevents its binding to TRAF3 and TRAF6 and to TRAF family member-associated NF-kappa-B activator (TANK) through its pattern recognition receptor (PRR) domain, and then it blocks the further development of the RLR pathway [106].

Lpro also cleaves swine RIP2. After recruitment by NOD2 and autophosphorylation, RIP2 undergoes polyubiquitination, which is necessary for the recruitment of NEMO and MAP3K7, whose activation triggers the signalling cascade responsible for NF-kB activation [53].

MAVS-activated human proteins, such as TRAF3 and TRAF6, are other targets of Lpro [52]. These E3 ubiquitin ligases mediate the synthesis of 'Lys-63'-linked polyubiquitin chains, which are recognised by proteins, such as NEMO and IRAK1. The binding of the polyubiquitin sensor domains of NEMO and IRAK1 to the ubiquitin chains allows the formation of protein complexes essential for IFN synthesis. The deubiquitination of TRAF3 and TRAF6 by Lpro thus leads to the inhibition of the formation of these protein complexes and to the proper functioning of the RLR pathway.

Lpro also deubiquitinates human serine/threonine-protein TBK1. TBK1 has a key role in the RLR pathway since, following its polyubiquitination by TRAF3 or TANK, its ubiquitin proteins are recognised by the polyubiquitin sensor domain of NEMO. As a result, TBK1 phosphorylates MAVS, leading to the recruitment of IRF3, which is then also phosphorylated by TBK1. Then, the deubiquitination of TBK1, TRAF3 and TRAF6 is an important mechanism in the Lpro-mediated suppression of the signal transduction of the RLR pathway. Since ubiquitination mechanisms are very important in antiviral signal transduction, many viruses have coevolved by developing deubiquitinase activities [118]. The case of FMDV is therefore far from being an exception. As an example, the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) protein Nsp2 inhibits NF-kB activation by acting on the ubiquitin chain of nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α), thus preventing its degradation [119]. The papain-like protease (PLpro) of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) also has deubiquitinase activity that is involved in subverting the immune response [120]. There are also a few similar cases of the deubiquitination phenomenon within the picornaviruses in which interactions have also been reported for the 3C protease of Seneca Valley virus (SVV), causing the deubiquitination of RIG-I, TBK1 and TRAF3, thereby blocking the expression



of IFN- β [121]. Lpro not only deubiquitinates TBK1, it also cleaves its human version towards its C terminus, more specifically in the coiled-coil 2 (CC2) domain, at residues 693–694. However, contrary to what one might think, this interaction does not abolish or even decrease interferon production. Indeed, it has been shown that the cleavage product of TBK1 is able to perform the same functions as the full-length protein regarding interferon production. Thus, the N-terminal residue of TBK1 is sufficient for the phosphorylation of MAVS, as well as IRF3. This implies that the Lpro-mediated cleavage of TBK1 does not contribute to the viral strategy of the suppression of RLR signalling [50]. The role of this interaction therefore remains to be elucidated.

In addition to its action on the induction and production phases of the IFN pathway, Lpro also acts on the amplification phase of the antiviral response by interacting with RNase L. RNase L, or 2-5A-dependent ribonuclease, is an endoribonuclease activated by the oligoadenylate synthetase (OAS) whose expression is notably induced by IRF3 via their promoters, the IRF-binding domain [122]. RNase L is the enzymatic effector of a viral and cellular single-stranded mRNA degradation pathway, inducing successive cleavages and playing a prominent role in innate immunity. This cellular protein has also been shown to be capable of cleaving viral RNAs to directly eliminate the genome of single-stranded RNA viruses, such as EMCV [123]. Thus, the FMDV leader protein interacts with the N-terminal domain of porcine RNase L to prevent both the degradation of its mRNA and its genome. RNase L is a crucial mediator of innate immunity and other cell functions [61,124]. It is important to notice that in the experiment carried out by Sui et al., the interaction between Lpro and RNase L seems to be species-specific. Indeed, this interaction was demonstrated in pigs but could not be observed with endogenous forms in human, simian or canine cells [61]. It is therefore important to wonder what the situation is in other susceptible species, namely cow, sheep or goat, and whether these differences in interactions could explain the differences observed in the pathogenesis of the FMDV in these species [61]. RNA cleavage products by RNase L induce the formation of antiviral stress granules (avSGs). This is also the case for the Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding proteins 1 and 2 (G3BP1 and G3BP2), scaffolding proteins that are essential for the stress granule formation mediated by the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR). SGs are storage sites for mRNAs released from disassembled polysomes under stressful conditions, such as during viral infection. RNase L-, G3BP1- and G3BP1-induced avSGs allow the recruitment of the antiviral proteins RIG-I, PKR, OAS and additional RNase L. Through the interaction of G3BP1 with RIG-I, stress granules appear to signal RNase L-cleaved dsRNAs to RLRs, resulting in amplified IFN production. G3BP1 also participates in the amplification of type I IFN production by assisting RIG-I through its helicase activity [125]. To avoid such an interferon response amplification, FMDV Lpro, as well as ERAV Lpro cleaves human G3BP1 and G3BP2, preventing the formation of stress granules [60]. Interestingly, the proteases of these two viruses do not appear to cleave nor dephosphorylate PKR, and therefore they do not affect the integrated stress response (ISR) signalling cascade that leads to avSG formation.

4.2. 3C

The FMDV 3C proteinase is a chymotrypsin-like cysteine protease [126]. This protein is responsible for most of the cleavages that occur during viral polyprotein processing [127]. In addition to this role, this protein is also involved in counteracting the cellular response by inhibiting the transcription and translation of its host.

To this end, 3C notably acts on the induction phase of the interferon response. Thus, this viral protein limits the detection of exogenous RNA by RIG-I and MDA5 by decreasing the expression of exogenous swine LGP2 [62]. MDA5 is also a target of 3C, which reduces its level of translation and degrades it by protease action, preventing it from fulfilling its role in viral mRNA sensing [63].

The sensing of viral RNAs is also prevented by the FMDV thanks to the formation of membrane vesicles derived from the ER and/or the Golgi that binds replicase proteins.



Indeed, these vesicles contain the neosynthesised viral RNA and protect it from helicases, such as RIG-I and MDA5 [128,129]. This remodelling of ER and Golgi membranes observed in simian cells results from a fragmentation of the early, middle and late Golgi compartments mediated by 3C proteolytic activity. This phenomenon also induces a blockage of the cell secretion system, which reduces the expression of the major histocompatibility complex (MHC) class I at the plasma membrane of infected cells. Furthermore, the consequences of these membrane rearrangements appear to be involved in facilitating the establishment of persistent FMDV infection [129].

The further induction of the IFN production pathway is also affected by swine NOD2- and RIP2 3C-mediated proteolytic cleavage [53,64]. NOD2 is able to detect both bacterial and viral recognition patterns. After binding to a viral ssRNA, NOD2 associates in a homo- or heterodimer with NOD1, allowing the recruitment of RIP2 via an interaction between their CARD domains. NOD2 contributes to the tyrosine phosphorylation of the rho guanine nucleotide exchange factor 2 (ARHGEF2), inducing the autophosphorylation of RIP2. After recruitment and autophosphorylation, RIP2 undergoes polyubiquitination, which is necessary for the recruitment of NEMO and MAP3K7, whose activation triggers the signalling cascade responsible for NF- κ B activation. After recognising an RNA ligand, NOD2 is also able to interact with MAVS by association between the CARD domains. This interaction leads to the activation of IRF3 and thus to the initiation of the rest of the TLR pathway [32].

The 3C protein also limits viral RNA detection by inducing lysosomal degradation of nucleolar RNA helicase 2 (DDX21) in pigs [65]. This protein is involved in both the sensing of viral RNA and DNA initiating the signalling cascade of the IFN response and in the processing of ribosomal RNAs [130]. DDX21, which is already known to inhibit viral replication of influenza A virus (IAV) and human cytomegalovirus (HCMV), is also a negative regulator of the FMDV IRES-dependent translation [131,132]. The 3C-mediated degradation of DDX21 via the lysosomal pathway thus counteracts its direct action on IRES and dampens the induction of the IFN response.

The proteolytic activity of the 3C protein is also responsible for the cleavage of swine NEMO, at the Gln383 residue [66]. NEMO is composed of two coiled-coil domains, a leucine zipper, a conserved domain located at the N terminus that has been reported to bind to polyubiquitin chains and a zinc finger located at the C-terminus. While the coiled-coil domains and the leucine zipper are involved in most interactions between NEMO and activators of the IKK complex (NEMO-IKK α -IKK β), it is interesting to note that this 3C-mediated cleavage targets a proline-rich region located just before the zinc finger domain [133]. This region, whose role is less known in NEMO, appears to be involved in MAP3K7 recruitment and in NF- κ B activation. The 3C-mediated cleavage of swine NEMO thus prevents the recruitment of MAP3K7 and then the proteasome-mediated degradation of I κ B required for NF- κ B activation [134].

Finally, 3C protease affects the induction phase of the IFN pathway by degrading peroxiredoxin-6 (PRDX6) in swine. PRDX6 plays a major role in the inhibition of reactive oxygen species (ROS) production by affecting the formation of the complex between TRAF6 and evolutionarily conserved signalling intermediate in the toll pathway (ECSIT). ECSIT is an adaptor protein of the TLR signalling pathway, involved in the activation of NF- κ B and the promotion of MAP3K7 proteolytic activation. The TRAF6-ECSIT complex is required for the generation of ROS activating the toll-like receptor 4 (TLR4) responsible for the activation of the NF- κ B and MAP3K pathways. To prevent the formation of this complex, PRDX6 interacts with the C-terminal domain of TRAF6, inducing its translocation into mitochondria. Therefore, PRDX6 reduces ROS production and thus TLR4-induced NF- κ B activation [135]. However, upon infection, extracellular PRDX6 can directly activate the TLR4 receptor, inducing a signalling cascade responsible for NF- κ B and AP-1-mediated proinflammatory cytokine production [136]. In addition, PRDX6 has been shown to inhibit FMDV replication via its acidic calcium-independent phospholipase A2 (aiPLA2) activity. This enzymatic activity is known to play an important role in phospholipid



metabolism [137]. As phospholipid metabolism is linked to virus release mechanisms, it would be relevant to investigate whether PRDX6 inhibits the release of reformed viruses. The FMDV 3C counteracts this antiviral response by cleaving swine PRDX6, as happens during SVV infection. This protein is also downregulated when pigs are infected with porcine circovirus 3 (PCV3) [67]. In contrast, in the case of classical swine fever virus (CSF) infection, PRDX6 was shown to be upregulated and to promote viral replication [138].

On the other hand, the FMDV 3C protease also targets the IFN production phase by blocking the transcription and translation steps. Indeed, 3C cleaves eIF4G (unmentioned host), but later than Lpro, targeting a different cleavage site [69]. In hamster cells, 3C cleaves another subunit of the eIF4 complex, namely the eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). eIF4A unwinds the secondary RNA structures at the 5'-UTR of mRNAs, which is necessary for the efficient binding of the small ribosomal subunit and subsequent search for the initiator codon. In the absence of integral eIF4A, mRNAs cannot be decondensed, they aggregate and result in the formation of stress granules [139]. The degradation of the eIF4 complex thus prevents the translation of host mRNAs to promote the translation of uncapped viral mRNAs [140].

Again, to inhibit the transcription of IFNs and other cytokines, 3C cleaves KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1, also known as Sam68. It is a positive regulator of mRNA stability, translation and nuclear export. It also binds to the poly(A) tail of mRNA to influence mRNA splice site selection and exon inclusion. The 3C-mediated cleavage of Sam68 induces the deletion of the C-terminal end containing the nuclear localization sequence (NLS), thus preventing its address to the nucleus. In addition, the approximately 50-kDa cleavage product, redistributed into the cytosol, interacts directly with the FMDV IRES and enhances viral RNA translation [72].

The mature ribosome (80S), a large ribonucleoprotein complex responsible for protein biosynthesis, is composed of a small ribosomal subunit (40S) and a large subunit (60S). The 60S subunit is composed of 49 ribosomal proteins (RPs), some of which are involved in the regulation of the NF- κ B pathway. For instance, ribosomal protein S3 (RPS3) directly participates in the NF- κ B complex by binding to the transcription factor p65 promoting the transcription of proinflammatory cytokines [141]. In contrast, ribosomal protein S27 (RPS27) blocks the phosphorylation of this same transcription factor, which reduces its DNA-binding capacity, and thus inhibits the transcription of cytokines. Ribosomal protein 60S L13 (RPL13) is known to interact with RIG-I and bind to the 3'-UTR region of NF- κ B1 mRNA to promote its translation and increase NF- κ B activity [142]. It has also been shown that RPL13, associated with the ATP-dependent RNA helicase DDX3, promotes the process of FMDV IRES-dependent translation required for its replication. However, this protein has an antiviral activity in response to FMDV infection as it can activate the promoters of NF- κ B and IFN- β genes as well as the production and secretion of IFN- β and IL-6. To counteract this antiviral activity, FMDV 3C protease directly interacts with swine RPL13, inhibiting both gene and protein expression. While the resulting cleavage product no longer has antiviral activity, it is still capable of promoting the IRES-dependent translation of FMDV [71].

As for other picornaviruses, FMDV 3C has the ability to enter the nucleus of its host cell, thanks to a NLS located in the N-terminus of the 3CD protein precursor. Once in the nucleus, this protein can cleave many factors regulating cellular transcription. This is notably the case for histone H3, which is cleaved at its N-terminus in cattle [68]. Histone H3 is a central component of the nucleosome. Nucleosomes are responsible for the formation of chromatin by enveloping and compacting DNA to regulate DNA replication and transcription. Post-translational modifications of histones allow nucleosome remodelling. This results in variations in the level of chromatin compaction and thus changes in the accessibility of DNA to the cellular machinery. Among the various post-translational modifications that can affect histone proteins, modifications of their N-terminus are essential for chromatin decondensation. Indeed, nucleosome remodelling allows the release of binding sites of several transcription factors and thus the promotion of transcription [143]. Cleavage of



H3 by 3C results in the removal of 20 N-terminal amino acids, preventing certain post-translational modifications from happening, thus shutting down host transcription.

The 3C protease is also able to cleave hamster heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) at the Glu-364 residue during FMDV infection [70]. This premRNA binding protein is an IRES-transacting factor that enables ribosome recruitment and regulation of IRES translation. This protein is responsible for the translation shutdown and viral replication of the FMDV. Indeed, it contains KH2 and KH3 domains that bind to the IRES domains II, III and IV, preventing the binding of PTB, a positive regulatory factor of IRES translation. The 3C-mediated cleavage of hnRNP K results in two truncated forms of the protein that still possess some activity. Thus, the N-terminal cleavage product retains the KH2 domain but not the KH3, which confers a reduced inhibitory effect on IRES translation. In contrast, the C-terminal cleavage product positively regulates the FMDV replication, possibly by interacting with viral RNA other than the IRES. hnRNP M, a ribonucleoprotein known to have a structure and functions similar to hnRNP K, could bind RNA via its KH3 domain to antagonise their detection by RIG-I. It is therefore conceivable that the C-terminal cleavage product of hnRNP K acts in a similar way to inhibit the cellular response [144].

FMDV 3C not only limits the activation of the cellular response and the production of IFN. It further targets the JAK–STAT stage of the IFN response. This signalling pathway consists of type I IFN-sensing IFNARs. These are actually dimers of IFNAR1 and 2, with IFNAR2 having the highest affinity for IFNs. Upon binding of the IFN α or β , produced by their cell or surrounding cells, these membrane receptors trigger a phosphorylation cascade [42]. Thus, the tyrosine-protein kinase JAK1, associated with the IFNAR2 subunit, leads to the activation of TYK2, linked to the IFNAR1 subunit, by transphosphorylation on Tyr-1054 or Tyr-1055. Once activated, TYK2 can autophosphorylate its other tyrosine and then phosphorylate JAK1 in return [43]. Once activated, these two cytoplasmic kinases phosphorylate the tyrosine of the STAT family proteins, in particular, STAT1 and STAT2. The phosphorylated STAT1 and STAT2 form heterodimers that are translocated to the nucleus where they associate with the IFN regulatory factor 9 (IRF9) to form the transcription complex IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3). This complex in turn binds specifically to ISRE, present in most ISGs, to induce their expression and activate the antiviral response [145]. Similarly, STAT1 can also form homodimers that, when translocated to the nucleus, can enhance the transcription of many proinflammatory cytokines. 3C prevents this signalling cascade by blocking the nuclear translocation of human STAT1 and STAT2 to inhibit ISG expression. Specifically, 3C acts by degrading karyopherin α 1 (KPNA1), the STAT1 NLS receptor, to prevent the translocation of STAT1–STAT2 or STAT1–STAT1 dimers to the nucleus and thus the activation of ISGs [75].

3C also targets interferon-induced proteins, such as PKR or G3BP1. PKR is a serine/threonine kinase that inhibits viral replication via the integrated stress response. This kinase is activated by the binding of the dsRNA or PKR activator protein (PACT), which leads to the phosphorylation of PKR. Once activated, it phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) to convert it into a global inhibitor of protein synthesis, stopping cellular and viral protein synthesis, while allowing the translation of ISR-specific mRNAs. PKR can also regulate the activation of signalling proteins and transcription factors, such as IRF3, NF- κ B, AP-1 and STAT1 [146]. PKR also has another means of activating the NF- κ B pathway in a manner independent of its kinase activity, namely interacting with the β -subunit of the IKK complex and binding to TRAF family proteins [147,148]. Many viruses have developed strategies to protect themselves from the antiviral effects of PKR. For example, the NS1 protein of IAV can bind to dsRNAs or even interact directly with PKR or prevent its activation [149]. Hepatitis C virus (HCV) IRES also inhibits PKR activation by competitively blocking its binding to its ligands [150]. Like these two viruses, the FMDV 3C counteracts the PKR-mediated antiviral response not via its proteolytic activity, but by inducing its lysosomal degradation in swine [74].

The ATP- and magnesium-dependent helicase G3BP1 is an antiviral factor capable, on the one hand, of enhancing the expression of RIG-I and MDA5 and, on the other hand,



of significantly inhibiting the IRES-dependent translation of FMDV. This second activity requires the hyperphosphorylation of G3BP1 Ser149 mediated by casein kinase 2 (CK2). In order to combat this IRES shutdown-dependent translation, the FMDV has developed several strategies. The first aims to sequester the regulatory β -subunit of CK2 to prevent G3BP1 phosphorylation, while the second involves the proteolytic cleavage of porcine G3BP1 by 3C at the Glu284 residue [151]. Since the sequence surrounding the cleavage site is highly conserved between G3BP1 and G3BP2, it is quite possible that G3BP2 is also cleaved by 3C. This cleavage thus prevents the induction of antiviral sensor expression and the inhibition of IRES-dependent translation as well as the assembly of stress granules responsible for PKR and NF- κ B activation [73].

4.3. 3A

FMDV 3A is a 153-amino-acid protein, the largest of the 3A proteins among the picornaviruses. This viral protein is particularly prone to point mutations in its C-terminal region that can affect the host specificity of the virus and its virulence. Thus, it was shown that a single mutation in the 3A sequence allowed the FMDV to infect guinea pigs, a non-natural host for the virus [152]. Other studies have shown that deletions and substitutions in the 3A sequence can result in virus attenuation and reduced replication efficiency in cattle [153,154]. This protein is one of the least-conserved between different strains of the FMDV with only 37% invariant amino acids [155]. However, its N-terminus encoding a hydrophilic domain and a hydrophobic domain capable of binding to membranes is highly conserved [156]. This transmembrane domain is notably involved in associations with the membranes of Golgi and ER, a critical organelle for FMDV replication [157,158].

This hydrophobic region is necessary for the 3A inhibitory binding of the human proteins RIG-I, MDA5 and MAVS [76]. Indeed, RIG-I and MAVS bind to mitochondria-associated membranes (MAMs), an ER subdomain bridging mitochondria and the ER to establish synapses involved in innate immunity [159]. Targeting these membrane complexes with 3A thus prevents the efficient organisation of RLR signalling pathways, as is the case for the NS3 protein of HCV [160]. 3A also affects the expression of human RIG-I, MDA5 and MAVS by inhibiting their mRNA levels [76]. This results in a reduction in RNA-sensing activity and thus an inhibition of the induction phase of the IFN response mediated by the RLR pathway.

This protein also interacts with the swine-probable ATP-dependent RNA helicase DDX56 (DDX56), an enzyme involved in RNA metabolism and the negative regulation of virus-triggered IFN production [161]. 3A is able to hijack the regulatory activity of DDX56 to facilitate viral replication and avoid detection by the immune system. Thus, the cooperation between 3A and DDX56 induces a decrease in the phosphorylation level of IRF3, preventing it from associating with importin-5 (Imp5) which serves as an NLS receptor. Furthermore, via their interactions with the viral structural proteins VP0, VP1 and VP2, the 3A-DDX56 complex is able to inhibit the phosphorylation of other factors involved in IFN production, such as TBK1, IRF3, p65 and I κ Ba [79].

Furthermore, 3A has recently been shown to play a critical role in FMDV replication by interacting with swine annexin A1 (ANXA1) [78]. This member of the annexin family is known to be an important modulator of the immune response and particularly of the IFN pathway, since it is able to interact with MAVS, NEMO, IRF3 or TBK1 [162–164]. Regarding the action of this protein with regard to the FMDV, it has been shown that ANXA1-mediated IFN β production significantly inhibits viral replication. The regulatory binding between 3A and ANXA1 enables the disruption of the ANXA1-TBK1 complex formation and thus limits the production of IFN β associated with ANXA1 activity. The activity of 3A also focuses on the amplification phase of the IFN response by targeting G3BP1, following a different strategy than the ones adopted by 3C and Lpro. Indeed, 3A prevents G3BP1 antiviral activity through upregulating Leucine-rich repeat-containing protein 25 (LRRC25) in swine. LRRC25 is involved in the inhibition of the LRR pathway by inducing autophagic degradation of RIG-I. To this end, it directly interacts with RIG-I associated with the



ubiquitin-like protein ISG15. The ubiquitination of RIG-I allows its interaction with the ubiquitin-binding protein p62, serving as a bridge between polyubiquitinated cargo and autophagosomes [165]. The upregulation of LRRC25 by 3A thus counteracts G3BP1-mediated IFN enhancement by helping RIG-I at sensing pathogenic RNA. This interaction between 3A and LRRC25, which was also demonstrated during EMCV and SVV infection, affects both the production of type I IFN and other proinflammatory cytokines [77].

4.4. 2B

Viroporin 2B is encoded by one of the most conserved regions of the FMDV genome, indicating its importance in the viral cycle [155]. This 154-amino-acid protein has two transmembrane domains involved in the rearrangement of host cell membranes. After 2B homodimerisation, its hydrophobic domains interact with the phospholipid bilayer to increase membrane permeability and facilitate the release of viral particles [166]. These membrane rearrangements are also involved in the formation of intracellular niches that prevent virus detection by the immune system. This protein is also involved in the disruption of cellular signalling pathways. Indeed, it mainly locates at the level of ER membranes where it interacts with 2C to block protein secretion, affecting the transport of MHC1 molecules [167]. 2B was also shown to interact with viral RNA sensors, such as swine LGP2. Thus, in porcine cells, 2B reduces the abundance of LGP2, while not affecting its transcription rate. This 2B-mediated degradation of LGP2 results from a yet unknown mechanism, independent of proteasome, lysosome and caspase pathways or the cleavage of eIF4G [62]. 2B also binds to human RIG-I and MDA5 resulting in a reduction in their viral detection ability [80]. Furthermore, these interactions result in the reduction of RIG-I and MDA5 expression in porcine cells [81]. Cyclophilin A (CypA) was recently shown to boost the RIG-I-mediated antiviral response by regulating the ubiquitination of RIG-I and MAVS [168]. Cyclophilin is also involved in reducing the abundance of viral proteins Lpro and 3A. 2B consequently targets swine CypA to prevent it from enhancing the IFN response [82]. 2B has also been reported to interact with other viral RNA sensors, such as swine NOD2 and DDX21 [64,65]. Given the wide range of viral sensors that this viral protein is capable of countering, it joins Lpro and 3C as frontline proteins against the IFN response initiation.

2B also acts on the signal transduction of the IFN pathway by targeting RIP2. The mechanism activated by 2B allowing the reduction of RIP2 abundance in pig cells still remains unknown and seems to be similar to that affecting RIG-I, LGP2 and NOD2. Nevertheless, this reduction in the RIP2 concentration limits the recruitment of MAP3K7 and NEMO and thus induces an inhibition of NF- κ B activation mediated by the NLR pathway [53]. Moreover, viroporin 2B has been shown to interact with human TBK1 and IRF3 by limiting their phosphorylation. Unphosphorylated TBK1 decreases its ability to phosphorylate MAVS and recruit IRF3, while the inhibition of IRF3 phosphorylation prevents it from associating with Imp5, which is involved in its nuclear translocation. These indirect interactions caused by 2B are thus of major importance since it blocks an important part of the initiation phase of the TLR pathway [80].

2B also inhibits ISG transcription. Indeed, during the early phase of infection, it interacts with swine nucleoside diphosphate kinase A (NME1) to prevent it from enhancing the cellular tumour antigen p53 (p53) transcriptional activity [83]. NME1 is able to interact with the macrophage migration inhibitory factor (MIF) and E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (MDM2), proteins with p53 downregulatory activity. The p53-mediated inhibition of ISG15, ISG20, IRF9 and RIG-I transcription thus allows the FMDV to initiate replication without being affected by IFN [169]. However, this interaction between 2B and NME1 has been shown to drop off during the late phase of infection, resulting in a basal level of p53-mediated transcription, which is necessary for viral replication to proceed [170].



4.5. VP1

Viral protein 1 is an extremely important structural protein in the FMDV viral cycle. It possesses an extended GH loop that includes an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif, which mediates integrin binding [171]. Although adhesion to surface integrins is not the only viral entry route to the cell, VP1 allows the attachment and internalisation of the FMDV in the majority of natural infections [172]. This protein is among the first to be detected by the host cell. Indeed, VP1, is specifically recognised by human TLR2, through cooperation with TLR1 and TLR6 [36]. After adhesion of the capsid protein to TLR2, MyD88, a receptor-associated protein induces the recruitment of IRAK1 IRAK4, leading to the IRAK1 phosphorylation by IRAK4 and subsequent autophosphorylation and kinase activation. Once activated, IRAK1 recruits TRAF3 and TRAF6, responsible for its polyubiquitination. The ubiquitin chain thus formed is recognised by the ubiquitin-binding domain of NEMO and results in the formation of the IRAK1–MAP3K7–TRAF6–NEMO–IKK α –IKK β complex. The formation of this complex then allows the activation of IKK α and IKK β , which phosphorylate NF-kappa-B inhibitor alpha (IKB α), in order to induce its degradation as well as the nuclear translocation and the activation of NF-kB [173]. Similarly, VP1 is recognised by the human monocyte differentiation antigen CD14 (CD14), associated with the membrane receptor TLR4, leading to an enhancement of NF-kB early activation mediated by TLR2 [174]. The respiratory syncytial virus (RSV) and HCV also involve these receptors, initially known to be associated with the detection of bacterial agents, in the induction of proinflammatory cytokines in response to infection [175,176].

The role of FMDV structural proteins in the subversion of the immune system has been poorly documented in the past, but remains crucial. This is particularly the case for the VP1 protein, which is involved in the suppression of type 1 IFN response and particularly in the inhibition of the induction phase. On the one hand, this viral protein interacts specifically with the MAVS C-terminus (species used in this study not mentioned) [84]. This has the effect of blocking the TRAF3 binding site within MAVS, thus preventing its recruitment and thus the interferon-mediated response. On the other hand, VP1 is able to regulate the level of activation of the MAPK pathway [85]. Indeed, it can interact with swine ribosomal protein SA (RPSA), a protein involved in the assembly and the stability of the 40S ribosomal subunit as well as in the regulation of signalling transduction pathways. RPSA was shown to be a negative regulator of MAPK pathways by inducing the dephosphorylation of kinases responsible for the activation of the transcription factor AP-1, such as ERK1 and ERK2; c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and 2 (JNK2); and p38 mitogen-activated protein kinase (p38). The interaction between VP1 and RPSA represses the RPSA-mediated function and maintains the MAPK pathway activation that is necessary for viral replication. Other viruses also rely on MAPK pathway activation to carry out viral replication. This is notably the case of the Ebola virus (EBOV), which persistently infects and escapes from cells through the activation of the MAPK pathway and IAV, which takes advantage of airway inflammation induced by the MAPK pathway [177,178].

Conversely, VP1 can also inhibit TLR4-mediated activation of the MAPK/ERK pathway in swine macrophages by targeting tumour progression locus 2 (TPL2). Thus, VP1 promotes the K48-linked polyubiquitination of TPL2 that is a serine/threonine kinase required for the activation of the MAPK/ERK pathway. TPL2 thus ubiquitinated is recognised and degraded by the proteasome pathway and therefore is not considered to be effective for enhancing MAPK/ERK-mediated IFN production [87].

VP1 also influences the amplification phase of the IFN pathway by stimulating the activity of swine soluble resistance-related calcium binding protein (sorcini) via a yet unknown mechanism [86]. Sorcini is a calcium-binding protein involved in the suppression of type I interferon response. Indeed, this protein enhances the phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) on Tyr705 residue. STAT3 is a protein coupled to IL-6 receptors produced by NF-kB and activated by JAK1 to induce ISG expression. Once phosphorylated by sorcini, STAT3 could induce a negative feedback loop leading to a slowdown of NF-kB activation [179]. As NF-kB is involved in the regulation of



many aspects of immune responses, a suppression of NF- κ B signalling by engagement of the VP1 with sorcin, avoiding a cytokine storm, is among the elements that could contribute to the persistent infection of FMDV.

4.6. 2C

Protein 2C, composed of 318 amino acids, is one of the highly conserved molecules among FMDV proteins. It is also one of the most conserved proteins among Picornaviridae [180]. 2C has an amphipathic helix in its N-terminus allowing it to bind to cell membranes, including those of the ER and Golgi [181]. This membrane-binding ability makes 2C an important player in FMDV replication as it participates in the membrane-bound replication complex [167]. In addition, its association with 2B is involved in membrane rearrangements and alterations as well as the disruption of MHC1 molecule transport.

2C is also involved in the regulation of the host immune response during FMDV infection. Indeed, it interferes with the induction phase of the IFN response by inducing a decrease in the expression of swine NOD2, which limits the detection of viral ssRNA [64]. The mechanism involved in this viral antagonism remains poorly understood, but it has been shown that it does not depend on proteasomes, lysosomes, caspases, cleavage of eIF4G or the induction of apoptosis. Furthermore, among the truncated mutants tested, none was able to induce NOD2 reduction, indicating that multiple regions of 2C are involved in this phenomenon.

This viral protein also prevents IFN response initiation by inhibiting the DDX21 sensor. Like 2B, 2C does not interact directly with this helicase but induces its degradation via the caspase pathway rather than the lysosomal pathway as is the case for 3C [65].

2C also interacts with the swine E3 ubiquitin–protein ligase MARCHF7 [88]. The exact role of this interaction in FMDV replication is still unclear. However, MARCHF7 is known to enhance E2 activity of the ubiquitin-conjugating enzyme E2 K (HIP2), an enzyme capable of catalysing the synthesis of the polyubiquitin chain by elongating a monoubiquitinated substrate. HIP2 is involved in the suppression of apoptosis through the ubiquitination and degradation of p53 and may participate in the proteolytic processing of NF- κ B by inducing its ubiquitination. It is thus possible to hypothesise that 2C promotes MARCHF7 activity to inhibit both autophagy and the NF- κ B-mediated IFN response.

The swine protein RIP2 is also impacted by the antiviral activities of 2C. Indeed, 2C has the ability to induce a reduction in the level of polyadenylate-binding protein 1 (PABPC1), via a mechanism dependent on its amphipathic helix, probably by associating with proteinases. PABPC1 is involved in the regulation of processes of mRNA metabolism, such as premRNA splicing and mRNA stability, by binding the poly(A) tail of mRNA, including that of its own transcript. This 2C-mediated decrease in cellular PABPC1 concentration is thus responsible for the reduction of the RIP2 expression level and thus for a shutdown of the NLR pathway [53].

Furthermore, the action of 2C extends to the signalling phase of the IFN pathway by interacting with swine N-myc and STAT interacting (Nmi) and IFN-induced 35-kDa protein (IFP35) [89]. 2C is able to recruit these two proteins to the intracellular membrane by changing their subcellular distribution. Nmi is a signalling pathway regulator interacting with STAT family proteins in response to the detection of interleukin-2 (IL-2) or IFN γ . In particular, it allows the recruitment of STAT1 and STAT5 coactivators, inducing an increase in STAT-mediated transcription. The joint recruitment of Nmi and IFP35 results in the formation of the 2C–Nmi–IFP35 complex. This complex prevents the proteasome-mediated degradation of IFI35 and correlates with IFI35 dephosphorylation, inducing the inhibition of the nuclear translocation, activation and transcription of the NF- κ B subunit p65.

4.7. VP3

Viral protein 3 is a structural protein that has been implicated in the pathogenicity of the FMDV. It has been shown that its amino acid at position 56, which can be a histidine, arginine or cysteine, influences pathogenesis in cattle and swine [182–184]. Indeed, the



presence of an arginine in this region participates in the binding to cellular HS, a coreceptor used by some strains, by increasing the positive charge of the viral surface. The binding with cellular HS, negatively charged, is thus reinforced, which may induce a sequestration of the virus at the level of these receptors and limit the propagation of the virus, explaining *in vivo* findings [185].

Similarly to VP1, VP3 is recognised by TLR2 and by CD14 as being associated with TLR4, thus triggering the signalling cascade of the TLR pathway, responsible for NF- κ B activation [36]. VP3 can also induce TLR4 overexpression by interacting with the human ras-related protein Rab-7b (Rab7b). To do so, VP3 drastically reduces the expression of this protein responsible for the lysosomal degradation of TLR4. This results in an enhancement of the FMDV-elicited inflammatory response mediated by TLR4 [37]. However, as well as other structural proteins, VP3 participates in the counteracting of host antiviral activity by diverting cellular chaperone proteins. In fact, the assembly of the FMDV capsid requires the intervention of cellular chaperone proteins. Thus, it has been shown that chaperones, such as heat shock protein HSP 90 (HSP90), initially involved in the immune response, are necessary for the assembly of the FMDV capsid [186]. One of the roles of these chaperones is to ensure the conformation of the pathogen recognition receptors. The occupation of these chaperone proteins by viral structural proteins therefore prevents the correct folding of these receptors and thus the detection of infection.

VP3 also acts by specifically targeting one of the most important elements in signal transduction, namely MAVS. Indeed, the C-terminal domain of VP3 has been shown to interact with the transmembrane domain of human and swine MAVS (amino acids 470–540) resulting in the disruption of MAVS mitochondrial localisation. [187] This interaction leads to the inhibition of MAVS expression by interfering with its mRNA synthesis. The decrease in the MAVS level thus constitutes an important brake in the signal transduction of the IFN pathway. It was thus observed that it notably led to a block of the phosphorylation and dimerization of IRF3 required for the production of IFN via the RLR pathway [90].

In addition, VP3 antagonises the host antiviral response by preventing signal amplification through the JAK/STAT pathway. Indeed, it is able to bind to JAK1 and JAK2 in order to induce the lysosome-mediated degradation of JAK1 and prevent the interaction between JAK1 and STAT1. This interaction is required for the phosphorylation and dimerization of STAT1 and thus results in the inhibition of ISG transcription. Surprisingly, it has also been shown that JAK1 and JAK2 can increase the expression of VP3, increasing the efficiency of its antiviral action. The mechanism responsible for this JAK-mediated overexpression of VP3 is not yet fully understood [91].

4.8. VP0

The cleavage of the intermediate protein VP0 into VP4 and VP2 is the result of a mechanism that is not yet fully understood. This event occurs in the late stages of the viral replication cycle, just before genomic RNA encapsidation [188].

The VP0 preprotein is able to bind to swine poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2) to prevent the establishment of the IFN response. PCBP2 is a single-stranded RNA and DNA-binding protein involved in the negative regulation of MAVS-mediated antiviral responses. Lacking a catalytic domain capable of directly degrading this protein, PCBP2 recruits the HECT domain-containing E3 ligase AIP4 to polyubiquitinate MAVS and to induce its degradation via the apoptotic pathway [189]. The interaction between VP0 and PCBP2 thus enhances the antiMAVS activity of the host cell [92]. It has also been shown that, upon poliovirus infection (PV), PCBP2 can stimulate the IRES-mediated translation and play a role in the initiation of viral RNA replication by interacting with the 3CD protein [190].

Viral protein 4 is the smallest of the FMDV capsid proteins and is located on the inner surface of the capsid. VP4 plays a key role in the pentamer assembly by modulating both antigenic status and receptor binding. It is also secondarily involved in the silencing of the immune response. To this end, VP4 induces the degradation of the swine transcriptional activator NME1 through the macroautophagy pathway [83]. This indirect interaction thus



promotes the association between p53 and its repressors MDM2 and MIF to decrease antiviral activity in host cells and promote viral replication. This downregulation of NME1 is also thought to activate the MAPK pathway and autophagy mechanisms that may promote FMDV replication [191].

4.9. 3B

3B, also known as VPg, is one of the viral proteins that is involved in initiating viral RNA synthesis. Unlike most other picornaviruses, the FMDV has not one but three similar copies of 3B, namely 3B1, 3B2 and 3B3. These three copies of 23 to 24 amino acids are very similar but not identical [154]. The first step of FMDV genome replication is the attachment of one copy of 3B to the RNA via its highly conserved tyrosine residue in the 3rd position. The 3D polymerase then catalyses the uridylylation of this amino acid to allow synthesis of the viral RNA. All three isoforms of 3B can serve as substrates for 3D. However, 3B3 has been shown to be the most efficient, to the extent that a virus deleted from 3B3 results in the production of noninfectious RNA [192]. Viruses lacking 3B1 and 3B2 can induce infectious RNA but with a low level of synthesis, resulting in reduced viral replication [193]. While all previously known strains had three copies of 3B, the O/SKR/01/2014 strain identified in South Korea contained a mutation deleting copy 3B1. Interestingly, it was shown that this strain appeared to be relatively nonvirulent in pigs, indicating that the presence of different copies of 3B could be a factor in determining the pathogenicity of the FMDV [194].

Few interactions between 3B and the immune response have yet been identified. However, this protein participates in the inhibition of the IFN response induction by interacting with swine RIG-I [93]. Indeed, 3B interacts with the RIG-I CARD domain to prevent its interaction with TRIM25. This E3 ubiquitin ligase cannot therefore induce the ubiquitination of RIG-I, which is necessary for the formation of the MAVS–RIG-I complex. It was also shown that 3B could bind to the RIG-I DEAD helicase domain, implicated in the IFN response in an ubiquitin-independent manner, to block its interaction with RIPLET E3 ligase [195].

4.10. 3D

3D is the last protein encoded by the FMDV genome. This region is highly conserved among different viral strains. 3D is an RNA-dependent RNA polymerase that becomes active once processing of the 3CD preprotein is complete [196]. This polymerase locates mainly near other nonstructural proteins in the ER and Golgi membranes. It is the catalytic component required for viral RNA replication and plays an important role in the virus life cycle. As with 3B, the involvement of the 3D protein in combating the antiviral response is considered secondary to its role in viral replication. Indeed, only two interactions have been demonstrated to date between this protein and the immune system of its hosts. Thus, like PV 3D, FMDV 3D is able to bind specifically with mouse Sam68 [197]. This binding, permitted by the charge complementarity between the binding surfaces of the two proteins, prevents Sam68 translocation to the nucleus [94]. Furthermore, 3D has been shown to interact with swine ATP-dependent RNA helicase DDX1 (DDX1) [95]. This protein is involved in both the inhibition of FMDV replication and the production of type I IFN. The biological significance of the 3D/DDX1 interaction remains unresolved to date.

5. Discussion and Concluding Remarks

As shown by the large number of studies cited in this review, the FMDV dedicates almost its entire small genome to fighting the immune system and especially the type I interferon response.

While some cellular proteins are targeted by a single viral protein, other targets are shared by several FMDV proteins. This is notably the case for the main proteins responsible for sensing viral RNAs and the associated signalling proteins involved in the RLR and NLR pathways, which are particularly targeted. As for the sensors, they have been described as interacting with various FMDV nonstructural proteins. Thus, RIG-I is targeted by Lpro, 2B,

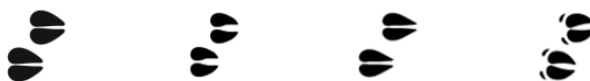


3A and 3B; MDA5 is affected by Lpro, 3B, 3A and 3C; LGP2 interacts with Lpro, 2B and 3C, while NOD2 is focused by 2B, 2C and 3C. Regarding signalling proteins, MAVS and RIP2 are targeted by Lpro, 3A, VP1 and VP3 and Lpro, 2B and 3C, respectively. In the framework of these interactions, the FMDV viral proteins involve various mechanisms, such as proteolytic cleavage, inhibitory binding, inhibition of mRNA transcription levels, deubiquitination and other unknown mechanisms. The diversity of viral proteins responsible for the inhibition of the induction phase of the IFN pathway, associated with the diversity of targeted cellular proteins, as well as the range of mechanisms used, allows the FMDV to bypass the immune response in an even more efficient way and, above all, to regulate the equilibrium with its host in an extremely fine manner. The interactions between the FMDV and the proteins located in the upstream phase of the induction of the IFN pathway seem all the more important as these proteins are also major targets for many other viruses, including the picornaviruses [198]. Thus, the critical role of MDA5 in the recognition of viral RNAs is also limited by the enterovirus 71 (EV71) via 2A and 3D polymerase [199,200]. The same happens with the coxsackievirus B3 [201]. The 3C of the coxsackievirus A6 and A16, as well as the enterovirus D68, have also been described as being able to perform inhibition-binding on MDA5 [202]. In addition, 2C and VP2 of EMCV have been shown to interact with MDA5, while 2A of PV also appears to be responsible for the degradation of this sensor [203,204]. A significant proportion of the above proteins are also reported to interact with other players involved in the IFN response induction phase, in particular RIG-I and MAVS. In the light of the current literature, some picornaviruses seem to focus more on these last two targets rather than on MDA5. This is notably the case of HRV-1A, which targets MAVS via 2A and 3C, hepatitis A virus (HAV), which also targets MAVS via 2B, and precursor 3ABC [205,206]. This is also the case for SVV, which blocks the action of RIG-I via 2C and 3C, a protein also capable of cleaving MAVS and other proteins situated further downstream of the IFN pathway [121,207,208]. Although the means used differ between viruses, these targets are nonetheless conserved, proving their importance in setting up the immune response.

While most of the escape strategies used by the FMDV are now well-characterised, others still require further research. In particular, it is essential to understand how and why the observations made differ from one cell line to another or from one species to another.

More than half of the interactions described in this review were demonstrated using the overexpression of proteins from species not susceptible to the FMDV, human in most cases (full list is available in Table 1). It is therefore interesting to ask whether these interactions exist in the natural hosts of the virus. Only a few articles mention having tested the interaction in other species. This is notably the case for the work of Sui et al. on the interaction between Lpro and RNase L [61]. This has been demonstrated in a porcine cell model but not in human, simian and canine models. The lack of conservation of this interaction from one species to another encourages us to take a step back from the interactions demonstrated with models that are not always adapted to the study of this virus. However, this questioning must be balanced by the conservation of other interactions between species. For instance, this is the case of the interaction between Lpro and LGP2, which has been demonstrated in swine and human models [49]. The same is true for the interaction between VP3 and MAVS, which is not species-specific as it was detected in both swine and human *in vitro* models by Ekanayaka et al. [187].

Questioning the host specificity of these interactions could contribute to the development of new hypotheses to explain the differential persistence of the FMDV. The mechanisms of establishment, maintenance and resolution of FMDV persistence remain indeed unresolved to date, but both *in vitro* and *in vivo* work indicates the coevolution of the FMDV and host cells during persistence [22,24,25]. It thus seems relevant to investigate whether virus–host interactions present in species for which persistence is described, such as cattle and small ruminants, are conserved or not in species, such as swine, for which viral persistence has not been described. The same is true for interactions that could be found in species that do not show persistence but not in species where persistence is described.



Moreover, it also seems important to ask in which infectious context these interactions can be identified. Indeed, according to the work of Hägglund et al. and Pfaff et al., which made it possible to characterise the signatures of a bovine epithelial cell model of FMDV infection, the host responses are not identical depending on whether the infection is acute or persistent [209,210]. It was found that in this model, acute infection is characterised by a high transcription of ISGs leading to high antiviral activity, whereas persistent infection is accompanied by a long-lasting but limited innate antiviral response that is ineffective at clearing the virus. Among the 73 ISGs whose expression is modified during persistent FMDV infection, 10 are different from those overexpressed during acute infection, potentially implying different interactions between the virus and its host depending on the context of the infection [210].

In order to better understand the persistence of the FMDV, other cellular mechanisms also deserve to be studied, namely autophagy and apoptosis. Autophagy is a highly conserved process in all eukaryotes. It is constitutively involved in the partial degradation of unnecessary cytosolic constituents or organelles via their engulfment within double-membraned vesicles named autophagosomes, which fuse with lysosomes to form autolysosomes where degradation occurs. Its main form, macroautophagy, can be upregulated upon virus detection by pathogen receptors to initiate the degradation of certain viruses, giving it a prominent role in the antiviral response [211,212].

One of the major pieces of evidence of the importance of autophagy regarding the antiviral response is probably the multitude of evasion and subversion mechanisms implemented by viruses. The FMDV is not an exception to this rule, since several of its proteins have been shown to be involved in interactions with autophagy proteins. In particular, DnaJ homolog subfamily A member 3 (DNAJA3) has been shown to interact with VP1, leading to its degradation by the lysosomal pathway [213]. This weakens the inhibition of the IFN response mediated by VP1. DNAJA3, notably through its interactions with Beclin-1 and autophagy-related protein LC3 (LC3), allows the induction of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in order to limit the development of the infection. The IFN response-boosting role of autophagy is also highlighted by the upregulation of NF- κ B and IRF3 activity by ATG5 and ATG12 during FMDV infection, as these autophagy proteins could also interact with VP1 [24]. Similarly, the interaction between 2C and MARCHF7 inhibits both autophagy and the NF- κ B-mediated IFN response. While autophagy might be thought to be an anti-FMDV action mechanism, there are IPP that greatly qualify this statement. For example, it has been shown that VP2 activates the cellular EIF2S1-ATF4 pathway and promotes autophagy via heat shock protein beta-1 (HSPB1) to facilitate viral replication [214]. Similarly, the interactions described between NME1 and the viral proteins 2B and VP4, in addition to their inhibitory effect on the IFN pathway, also appear to have a function in amplifying autophagy, allowing a better replication of the virus. The 2C protein seems to play an important role in the autophagy regulation by the FMDV. Indeed, its interaction with vimentin has been shown to be essential for FMDV replication. In addition, it is able to interact with Beclin-1 to prevent the lysosomes from fusing into autophagosomes [215]. This phenomenon, which has already been identified during infection by other RNA viruses, considerably promotes viral replication through a mechanism that is not yet understood [191]. Interestingly, some autophagy-mediated mechanisms of the facilitation of FMDV replication have been demonstrated in relevant models for the study of persistent infection [215,216]. This could suggest that under certain conditions, autophagy enables the nonlytic release of the virion from the cells. Autophagy could thus be involved in the establishment and/or maintenance of the virus-host balance that leads to persistent infections. The importance of autophagy should also be emphasised in view of its close interplay with the IFN pathway. Indeed, it has been shown that autophagy can regulate the IFN response, while IFNs and ISGs derived from this pathway can also act on autophagy [217,218]. Likewise, the interactions between the virus and the type I IFN response and autophagy are closely linked to apoptosis. Indeed, this programmed cell death process is exploited by the FMDV to eliminate some components of the IFN response.



This is particularly the case for MAVS whose degradation is mediated by the VP0-PCBP2 interaction [189]. In the case of DDX21, it is interesting to notice that its degradation can be due to apoptosis phenomena when mediated by 2B or autophagy-related mechanisms when mediated by 2C or 3C [65]. In contrast, many FMDV–host interactions aim to inhibit the establishment of apoptosis in cells by targeting the proapoptotic factor p53. This is, for example, the case of the 2B–NME1 interaction, which prevents the enhancement of p53 activity by NME1 [83]. The same is true for the interactions of VP4 and 2B with NME1. Apoptosis also plays an important position in the antiviral response as evidenced by the interaction between proapoptotic serine/threonine-protein kinase 3 (STK3) and VP1, which results in viral replication inhibition [219]. Although autophagy is more involved in the early response to double-stranded RNA detection, apoptosis takes over at prolonged stages of stress. RNase L is one of the key factors in this transition by activating the caspase-dependent proteolytic cleavage of Beclin-1 to terminate autophagy and promote apoptosis. RNase L is therefore a key player in the regulation of the antiviral response, explaining why it is targeted by Lpro.

The result of these intertwined signalling pathways is an extremely fine regulation of the antiviral response, but which can be hijacked at many positions by the virus. As the interactions described between the FMDV and the cellular response pathways sometimes have contradictory effects, it would be interesting to investigate, in addition to the models used, the chronological occurrence of these interactions. Some of them may only take place at the beginning of the infection, while others could participate in the maintenance of a virus–host balance in the longer term and potentially in the persistence of the FMDV. Studying the protein interactions between the FMDV and its different hosts, combined with transcriptomic analyses in relevant cell models from species of interest, could greatly contribute to the improvement of knowledge on the differential persistence of this virus. This could open up new therapeutic avenues for the control of safe carriers.

Author Contributions: Literature review, M.S. and S.B.-B.; Writing—original draft preparation M.S. and S.B.-B.; writing—review and editing, M.S., S.B.-B., L.B.K., D.V. and S.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This review work was funded by ANSES animal health laboratory's own funds and the European ICRAD FMDV_PersIstOmics project.

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

References

- Knowles, N.J.; Samuel, A.R. Molecular Epidemiology of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Virus Res.* **2003**, *91*, 65–80. [[CrossRef](#)]
- Belsham, G.J.; Kristensen, T.; Jackson, T. Foot-and-Mouth Disease Virus: Prospects for Using Knowledge of Virus Biology to Improve Control of This Continuing Global Threat. *Virus Res.* **2020**, *281*, 197909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- O'Donnell, V.; Pacheco, J.M.; Gregg, D.; Baxt, B. Analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Integrin Receptor Expression in Tissues from Naïve and Infected Cattle. *J. Comp. Pathol.* **2009**, *141*, 98–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jackson, T.; Ellard, F.M.; Ghazaleh, R.A.; Brookes, S.M.; Blakemore, W.E.; Corteyn, A.H.; Stuart, D.I.; Newman, J.W.; King, A.M. Efficient Infection of Cells in Culture by Type O Foot-and-Mouth Disease Virus Requires Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Virol.* **1996**, *70*, 5282–5287. [[CrossRef](#)]
- Martín-Acebes, M.A.; González-Magaldi, M.; Sandvig, K.; Sobrino, F.; Armas-Portela, R. Productive Entry of Type C Foot-and-Mouth Disease Virus into Susceptible Cultured Cells Requires Clathrin and Is Dependent on the Presence of Plasma Membrane Cholesterol. *Virology* **2007**, *369*, 105–118. [[CrossRef](#)]
- Vázquez-Calvo, Á.; Saiz, J.-C.; McCullough, K.C.; Sobrino, F.; Martín-Acebes, M.A. Acid-Dependent Viral Entry. *Virus Res.* **2012**, *167*, 125–137. [[CrossRef](#)]
- Groppelli, E.; Levy, H.C.; Sun, E.; Strauss, M.; Nicol, C.; Gold, S.; Zhuang, X.; Tuthill, T.J.; Hogle, J.M.; Rowlands, D.J. Picornavirus RNA Is Protected from Cleavage by Ribonuclease during Virion Uncoating and Transfer across Cellular and Model Membranes. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006197. [[CrossRef](#)]
- Polatnick, J.; Wool, S.H. Association of Foot-and-Mouth Disease Virus Induced RNA Polymerase with Host Cell Organelles. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **1983**, *6*, 265–272. [[CrossRef](#)]
- Loundras, E.-A.; Streetley, J.; Herod, M.R.; Thompson, R.; Harris, M.; Bhella, D.; Stonehouse, N.J. Higher-Order Structures of the Foot-and-Mouth Disease Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Required for Genome Replication. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 61. [[CrossRef](#)]



10. Grubman, M.J.; Morgan, D.O.; Kendall, J.; Baxt, B. Capsid Intermediates Assembled in a Foot-and-Mouth Disease Virus Genome RNA-Programmed Cell-Free Translation System and in Infected Cells. *J. Virol.* **1985**, *56*, 120–126. [\[CrossRef\]](#)
11. Arzt, J.; Juleff, N.; Zhang, Z.; Rodriguez, L.L. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease I: Viral Pathways in Cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 291–304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Arzt, J.; Baxt, B.; Grubman, M.J.; Jackson, T.; Juleff, N.; Rhyhan, J.; Rieder, E.; Waters, R.; Rodriguez, L.L. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine, Small Ruminants, and Wildlife; Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus–Host Interactions. *Transbound. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 305–326. [\[CrossRef\]](#)
13. Suttmoller, P.; McVicar, J.W.; Cottrill, G.E. The Epizootiological Importance of Foot-and-Mouth Disease Carriers. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **1968**, *23*, 227–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Stenfeldt, C.; Eschbaumer, M.; Rekant, S.I.; Pacheco, J.M.; Smoliga, G.R.; Hartwig, E.J.; Rodriguez, L.L.; Arzt, J. The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle. *J. Virol.* **2016**, *90*, 6344–6364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Burrows, R. The Persistence of Foot-and Mouth Disease Virus in Sheep. *J. Hyg.* **1968**, *66*, 633–640. [\[CrossRef\]](#)
16. Stenfeldt, C.; Pacheco, J.M.; Smoliga, G.R.; Bishop, E.; Pauszek, S.J.; Hartwig, E.J.; Rodriguez, L.L.; Arzt, J. Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State. *Transbound. Emerg. Dis.* **2016**, *63*, 152–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Pacheco, J.M.; Smoliga, G.R.; O'Donnell, V.; Brito, B.P.; Stenfeldt, C.; Rodriguez, L.L.; Arzt, J. Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in the Nasopharynx of Cattle; Tissue-Specific Distribution and Local Cytokine Expression. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125698. [\[CrossRef\]](#)
18. Stenfeldt, C.; Pacheco, J.M.; Singanallur, N.B.; Vosloo, W.; Rodriguez, L.L.; Arzt, J. Virulence beneath the Fleece; a Tale of Foot-and-Mouth Disease Virus Pathogenesis in Sheep. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0227061. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Maree, F.; de Klerk-Lorist, L.-M.; Gubbins, S.; Zhang, F.; Seago, J.; Pérez-Martín, E.; Reid, L.; Scott, K.; van Schalkwyk, L.; Bengis, R.; et al. Differential Persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in African Buffalo Is Related to Virus Virulence. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5132–5140. [\[CrossRef\]](#)
20. Arzt, J.; Fish, I.H.; Bertram, M.R.; Smoliga, G.R.; Hartwig, E.J.; Pauszek, S.J.; Holinka-Patterson, L.; Segundo, F.C.D.-S.; Sitt, T.; Rieder, E.; et al. Simultaneous and Staggered Foot-and-Mouth Disease Virus Coinfection of Cattle. *J. Virol.* **2021**, *95*, e01650-21. [\[CrossRef\]](#)
21. Ferretti, L.; Pérez-Martín, E.; Zhang, F.; Maree, F.; de Klerk-Lorist, L.-M.; van Schalkwyk, L.; Juleff, N.D.; Charleston, B.; Ribeca, P. Pervasive Within-Host Recombination and Epistasis as Major Determinants of the Molecular Evolution of the Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008235. [\[CrossRef\]](#)
22. De la Torre, J.C.; Martínez-Salas, E.; Díez, J.; Villaverde, A.; Gebauer, F.; Rocha, E.; Dávila, M.; Domingo, E. Coevolution of Cells and Viruses in a Persistent Infection of Foot-and-Mouth Disease Virus in Cell Culture. *J. Virol.* **1988**, *62*, 2050–2058. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Díez, J.; Dávila, M.; Escarmís, C.; Mateu, M.G.; Dominguez, J.; Pérez, J.J.; Giralt, E.; Melero, J.A.; Domingo, E. Unique Amino Acid Substitutions in the Capsid Proteins of Foot-and-Mouth Disease Virus from a Persistent Infection in Cell Culture. *J. Virol.* **1990**, *64*, 5519–5528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. O'Donnell, V.; Pacheco, J.M.; Larocco, M.; Gladue, D.P.; Pauszek, S.J.; Smoliga, G.; Krug, P.W.; Baxt, B.; Borca, M.V.; Rodriguez, L. Virus–Host Interactions in Persistently FMDV-Infected Cells Derived from Bovine Pharynx. *Virology* **2014**, *468–470*, 185–196. [\[CrossRef\]](#)
25. Kopliku, L.; Relmy, A.; Romey, A.; Gorna, K.; Zientara, S.; Bakkali-Kassimi, L.; Blaise-Boisseau, S. Establishment of Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Infection in MDBK Cells. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 2503–2516. [\[CrossRef\]](#)
26. Bonjardim, C.A. Interferons (IFNs) Are Key Cytokines in Both Innate and Adaptive Antiviral Immune Responses—And Viruses Counteract IFN Action. *Microbes Infect.* **2005**, *7*, 569–578. [\[CrossRef\]](#)
27. Ivashkiv, L.B.; Donlin, L.T. Regulation of Type I Interferon Responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 36–49. [\[CrossRef\]](#)
28. Lazear, H.M.; Schoggins, J.W.; Diamond, M.S. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* **2019**, *50*, 907–923. [\[CrossRef\]](#)
29. De Weerd, N.A.; Samarajiwa, S.A.; Hertzog, P.J. Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 20053–20057. [\[CrossRef\]](#)
30. Kato, H.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Matsui, K.; Uematsu, S.; Jung, A.; Kawai, T.; Ishii, K.J.; et al. Differential Roles of MDA5 and RIG-I Helicases in the Recognition of RNA Viruses. *Nature* **2006**, *441*, 101–105. [\[CrossRef\]](#)
31. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Sabbah, A.; Chang, T.H.; Harnack, R.; Frohlich, V.; Tominaga, K.; Dube, P.H.; Xiang, Y.; Bose, S. Activation of Innate Immune Antiviral Response by NOD2. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 1073–1080. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Pellegrini, E.; Signor, L.; Singh, S.; Boeri Erba, E.; Cusack, S. Structures of the Inactive and Active States of RIP2 Kinase Inform on the Mechanism of Activation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177161. [\[CrossRef\]](#)
34. Borrego, B.; Rodríguez-Pulido, M.; Revilla, C.; Álvarez, B.; Sobrino, F.; Domínguez, J.; Sáiz, M. Synthetic RNAs Mimicking Structural Domains in the Foot-and-Mouth Disease Virus Genome Elicit a Broad Innate Immune Response in Porcine Cells Triggered by RIG-I and TLR Activation. *Viruses* **2015**, *7*, 3954–3973. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



35. Lannes, N.; Python, S.; Summerfield, A. Interplay of Foot-and-Mouth Disease Virus, Antibodies and Plasmacytoid Dendritic Cells: Virus Opsonization under Non-Neutralizing Conditions Results in Enhanced Interferon-Alpha Responses. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lin, Y.-T.; Chen, Y.-P.; Fang, C.-H.; Huang, P.-Y.; Liang, S.-M. Capsid Proteins of Foot-and-Mouth Disease Virus Interact with TLR2 and CD14 to Induce Cytokine Production. *Immunol. Lett.* **2020**, *223*, 10–16. [[CrossRef](#)]
37. Zhang, J.; Li, D.; Yang, W.; Wang, Y.; Li, L.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus VP3 Protein Acts as a Critical Proinflammatory Factor by Promoting Toll-like Receptor 4-Mediated Signaling. *J. Virol.* **2021**, *95*, e01120-21. [[CrossRef](#)]
38. Ning, S.; Pagano, J.; Barber, G. IRF7: Activation, Regulation, Modification and Function. *Genes Immun.* **2011**, *12*, 399–414. [[CrossRef](#)]
39. Negishi, H.; Taniguchi, T.; Yanai, H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a028423. [[CrossRef](#)]
40. Pfeffer, L.M. The Role of Nuclear Factor KB in the Interferon Response. *J. Interf. Cytokine Res.* **2011**, *31*, 553–559. [[CrossRef](#)]
41. Walsh, M.C.; Lee, J.; Choi, Y. Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6 (TRAF6) Regulation of Development, Function, and Homeostasis of the Immune System. *Immunol. Rev.* **2015**, *266*, 72–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Novick, D.; Cohen, B.; Rubinstein, M. The Human Interferon A β Receptor: Characterization and Molecular Cloning. *Cell* **1994**, *77*, 391–400. [[CrossRef](#)]
43. Gauzzi, M.C.; Velazquez, L.; McKendry, R.; Mogensen, K.E.; Fellous, M.; Pellegrini, S. Interferon- α -Dependent Activation of Tyk2 Requires Phosphorylation of Positive Regulatory Tyrosines by Another Kinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20494–20500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Activation of JAK Kinases and STAT Proteins by Interleukin-2 and Interferon Alpha, but Not the T Cell Antigen Receptor, in Human T Lymphocytes. *EMBO J.* **1994**, *13*, 5605–5615. [[CrossRef](#)]
45. Beachboard, D.C.; Horner, S.M. Innate Immune Evasion Strategies of DNA and RNA Viruses. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *32*, 113–119. [[CrossRef](#)]
46. Gao, Y.; Sun, S.-Q.; Guo, H.-C. Biological Function of Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural Proteins and Non-Coding Elements. *Virol. J.* **2016**, *13*, 107. [[CrossRef](#)]
47. Medina, G.N.; Segundo, F.D.-S.; Stenfeldt, C.; Arzt, J.; de los Santos, T. The Different Tactics of Foot-and-Mouth Disease Virus to Evade Innate Immunity. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2644. [[CrossRef](#)]
48. Li, K.; Wang, C.; Yang, F.; Cao, W.; Zhu, Z.; Zheng, H. Virus–Host Interactions in Foot-and-Mouth Disease Virus Infection. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 571509. [[CrossRef](#)]
49. Lin, J.-Y.; Chen, T.-C.; Weng, K.-F.; Chang, S.-C.; Chen, L.-L.; Shih, S.-R. Viral and Host Proteins Involved in Picornavirus Life Cycle. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 103. [[CrossRef](#)]
50. Jamal, S.M.; Belsham, G.J. Foot-and-Mouth Disease: Past, Present and Future. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 116. [[CrossRef](#)]
51. Zhu, J.; Weiss, M.; Grubman, M.J. Differential Gene Expression in Bovine Cells Infected with Wild Type and Leaderless Foot-and-Mouth Disease Virus. *Virol. J.* **2010**, *404*, 32–40. [[CrossRef](#)]
52. Steinberger, J.; Skern, T. The Leader Proteinase of Foot-and-Mouth Disease Virus: Structure-Function Relationships in a Proteolytic Virulence Factor. *Biol. Chem.* **2014**, *395*, 1179–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kirchwegger, R.; Ziegler, E.; Lamphear, B.J.; Waters, D.; Liebig, H.D.; Sommergruber, W.; Sobrino, F.; Hohenadl, C.; Blaas, D.; Rhoads, R.E. Foot-and-Mouth Disease Virus Leader Proteinase: Purification of the Lb Form and Determination of Its Cleavage Site on EIF-4 Gamma. *J. Virol.* **1994**, *68*, 5677–5684. [[CrossRef](#)]
54. Devaney, M.A.; Vakharia, V.N.; Lloyd, R.E.; Ehrenfeld, E.; Grubman, M.J. Leader Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus Is Required for Cleavage of the P220 Component of the Cap-Binding Protein Complex. *J. Virol.* **1988**, *62*, 4407–4409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gradi, A.; Foeger, N.; Strong, R.; Svitkin, Y.V.; Sonenberg, N.; Skern, T.; Belsham, G.J. Cleavage of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4GII within Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cells: Identification of the L-Protease Cleavage Site In Vitro. *J. Virol.* **2004**, *78*, 3271–3278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Jackson, R.J.; Hellen, C.U.T.; Pestova, T.V. The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 113–127. [[CrossRef](#)]
57. Martínez-Salas, E.; Ramos, R.; Lafuente, E.; López de Quinto, S. Functional Interactions in Internal Translation Initiation Directed by Viral and Cellular IRES Elements. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 973–984. [[CrossRef](#)]
58. Rodríguez Pulido, M.; Serrano, P.; Sáiz, M.; Martínez-Salas, E. Foot-and-Mouth Disease Virus Infection Induces Proteolytic Cleavage of PTB, EIF3a,b, and PABP RNA-Binding Proteins. *Virology* **2007**, *364*, 466–474. [[CrossRef](#)]
59. Piñero, D.; Ramajo, J.; Bradrick, S.S.; Martínez-Salas, E. Gemin5 Proteolysis Reveals a Novel Motif to Identify L Protease Targets. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4942–4953. [[CrossRef](#)]
60. Hinnebusch, A.G. EIF3: A Versatile Scaffold for Translation Initiation Complexes. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 553–562. [[CrossRef](#)]
61. Belsham, G.J.; Brangwyn, J.K. A Region of the 5' Noncoding Region of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA Directs Efficient Internal Initiation of Protein Synthesis within Cells: Involvement with the Role of L Protease in Translational Control. *J. Virol.* **1990**, *64*, 5389–5395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. De los Santos, T.; Diaz-San Segundo, F.; Grubman, M.J. Degradation of Nuclear Factor Kappa B during Foot-and-Mouth Disease Virus Infection. *J. Virol.* **2007**, *81*, 12803–12815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



63. Wang, D.; Fang, L.; Luo, R.; Ye, R.; Fang, Y.; Xie, L.; Chen, H.; Xiao, S. Foot-and-Mouth Disease Virus Leader Proteinase Inhibits DsRNA-Induced Type I Interferon Transcription by Decreasing Interferon Regulatory Factor 3/7 in Protein Levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *399*, 72–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Liu, S.; Cai, X.; Wu, J.; Cong, Q.; Chen, X.; Li, T.; Du, F.; Ren, J.; Wu, Y.-T.; Grishin, N.V.; et al. Phosphorylation of Innate Immune Adaptor Proteins MAVS, STING, and TRIF Induces IRF3 Activation. *Science* **2015**, *347*, aaa2630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Sgarbanti, M.; Marsili, G.; Remoli, A.L.; Orsatti, R.; Battistini, A. Irf-7 New Role in the Regulation of Genes Involved in Adaptive Immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1095*, 325–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Delhaye, S.; van Pesch, V.; Michiels, T. The Leader Protein of Theiler's Virus Interferes with Nucleocytoplasmic Trafficking of Cellular Proteins. *J. Virol.* **2004**, *78*, 4357–4362. [[CrossRef](#)]
67. Hato, S.V.; Ricour, C.; Schulte, B.M.; Lanke, K.H.W.; de Bruijnt, M.; Zoll, J.; Melchers, W.J.G.; Michiels, T.; van Kuppeveld, F.J.M. The Mengovirus Leader Protein Blocks Interferon- α/β Gene Transcription and Inhibits Activation of Interferon Regulatory Factor 3. *Cell. Microbiol.* **2007**, *9*, 2921–2930. [[CrossRef](#)]
68. Xue, Q.; Liu, H.; Zhu, Z.; Yang, F.; Ma, L.; Cai, X.; Xue, Q.; Zheng, H. Seneca Valley Virus 3Cpro Abrogates the IRF3- and IRF7-Mediated Innate Immune Response by Degrading IRF3 and IRF7. *Virology* **2018**, *518*, 1–7. [[CrossRef](#)]
69. Medina, G.N.; Knudsen, G.M.; Greninger, A.L.; Kloc, A.; Diaz-San Segundo, F.; Rieder, E.; Grubman, M.J.; DeRisi, J.L.; de los Santos, T. Interaction between FMDV Lpro and Transcription Factor ADNP Is Required for Optimal Viral Replication. *Virology* **2017**, *505*, 12–22. [[CrossRef](#)]
70. Quintana, F.J.; Zaltzman, R.; Fernandez-Montesinos, R.; Herrera, J.L.; Gozes, I.; Cohen, I.R.; Pozo, D. NAP, a Peptide Derived from the Activity-Dependent Neuroprotective Protein, Modulates Macrophage Function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1070*, 500–506. [[CrossRef](#)]
71. Wang, D.; Fang, L.; Li, P.; Sun, L.; Fan, J.; Zhang, Q.; Luo, R.; Liu, X.; Li, K.; Chen, H.; et al. The Leader Proteinase of Foot-and-Mouth Disease Virus Negatively Regulates the Type I Interferon Pathway by Acting as a Viral Deubiquitinase. *J. Virol.* **2011**, *85*, 3758–3766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gack, M.U.; Shin, Y.C.; Joo, C.-H. TRIM25 RING-Finger E3 Ubiquitin Ligase Is Essential for RIG-I-Mediated Antiviral Activity. *Nature* **2007**, *446*, 916–920. [[CrossRef](#)]
73. Pulido, M.R.; Martínez-Salas, E.; Sobrino, F.; Sáiz, M. MDA5 Cleavage by the Leader Protease of Foot-and-Mouth Disease Virus Reveals Its Pleiotropic Effect against the Host Antiviral Response. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Lang, X.; Tang, T.; Jin, T.; Ding, C.; Zhou, R.; Jiang, W. TRIM65-Catalyzed Ubiquitination Is Essential for MDA5-Mediated Antiviral Innate Immunity. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 459–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Visser, L.J.; Aloise, C.; Swatek, K.N.; Medina, G.N.; Olek, K.M.; Rabouw, H.H.; de Groot, R.J.; Langereis, M.A.; de los Santos, T.; Komander, D.; et al. Dissecting Distinct Proteolytic Activities of FMDV Lpro Implicates Cleavage and Degradation of RLR Signaling Proteins, Not Its DeISGylase/DUB Activity, in Type I Interferon Suppression. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Rodríguez Pulido, M.; Sánchez-Aparicio, M.T.; Martínez-Salas, E.; García-Sastre, A.; Sobrino, F.; Sáiz, M. Innate Immune Sensor LGP2 Is Cleaved by the Leader Protease of Foot-and-Mouth Disease Virus. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007135. [[CrossRef](#)]
77. Murali, A.; Li, X.; Ranjith-Kumar, C.T.; Bhardwaj, K.; Holzenburg, A.; Li, P.; Kao, C.C. Structure and Function of LGP2, a DEX(D/H) Helicase That Regulates the Innate Immunity Response. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15825–15833. [[CrossRef](#)]
78. Bruns, A.M.; Horvath, C.M. LGP2 Synergy with MDA5 in RLR-Mediated RNA Recognition and Antiviral Signaling. *Cytokine* **2015**, *74*, 198–206. [[CrossRef](#)]
79. Wang, D.; Fang, L.; Liu, L.; Zhong, H.; Chen, Q.; Luo, R.; Liu, X.; Zhang, Z.; Chen, H.; Xiao, S. Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Leader Proteinase Negatively Regulates the Porcine Interferon- $\Lambda 1$ Pathway. *Mol. Immunol.* **2011**, *49*, 407–412. [[CrossRef](#)]
80. De los Santos, T.; de Avila Botton, S.; Weiblen, R.; Grubman, M.J. The Leader Proteinase of Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits the Induction of Beta Interferon mRNA and Blocks the Host Innate Immune Response. *J. Virol.* **2006**, *80*, 1906–1914. [[CrossRef](#)]
81. Liu, H.; Xue, Q.; Zhu, Z.; Yang, F.; Cao, W.; Liu, X.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits RIP2 Protein Expression to Promote Viral Replication. *Virol. Sin.* **2021**, *36*, 608–622. [[CrossRef](#)]
82. Bhoj, V.G.; Chen, Z.J. Ubiquitylation in Innate and Adaptive Immunity. *Nature* **2009**, *458*, 430–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Sun, Z.; Chen, Z.; Lawson, S.R.; Fang, Y. The Cysteine Protease Domain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nonstructural Protein 2 Possesses Deubiquitinating and Interferon Antagonism Functions. *J. Virol.* **2010**, *84*, 7832–7846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Barretto, N.; Jukneliene, D.; Ratia, K.; Chen, Z.; Mesecar, A.D.; Baker, S.C. The papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus has deubiquitinating activity. *J. Virol.* **2005**, *79*, 15189–15198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Xue, Q.; Liu, H.; Zhu, Z.; Yang, F.; Xue, Q.; Cai, X.; Liu, X.; Zheng, H. Seneca Valley Virus 3C Protease Negatively Regulates the Type I Interferon Pathway by Acting as a Viral Deubiquitinase. *Antivir. Res.* **2018**, *160*, 183–189. [[CrossRef](#)]
86. Andersen, J.; VanScoy, S.; Cheng, T.-F.; Gomez, D.; Reich, N.C. IRF-3-Dependent and Augmented Target Genes during Viral Infection. *Genes Immun.* **2008**, *9*, 168–175. [[CrossRef](#)]
87. Li, X.-L.; Blackford, J.A.; Hassel, B.A. RNase L Mediates the Antiviral Effect of Interferon through a Selective Reduction in Viral RNA during Encephalomyocarditis Virus Infection. *J. Virol.* **1998**, *72*, 2752–2759. [[CrossRef](#)]
88. Bisbal, C.; Salehzada, T. La RNase L, un acteur essentiel de la réponse cellulaire antivirale. *Med. Sci.* **2008**, *24*, 859–864. [[CrossRef](#)]



89. Sui, C.; Jiang, D.; Wu, X.; Liu, S.; Li, F.; Pan, L.; Cong, X.; Li, J.; Yoo, D.; Rock, D.L.; et al. Inhibition of Antiviral Innate Immunity by Foot-and-Mouth Disease Virus Lpro through Interaction with the N-Terminal Domain of Swine RNase L. *J. Virol.* **2021**, *95*, e00361-21. [\[CrossRef\]](#)
90. Kim, S.S.-Y.; Sze, L.; Liu, C.; Lam, K.-P. Correction: The Stress Granule Protein G3BP1 Binds Viral DsRNA and RIG-I to Enhance Interferon- β Response. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 9655. [\[CrossRef\]](#)
91. Visser, L.J.; Medina, G.N.; Rabouw, H.H.; de Groot, R.J.; Langereis, M.A.; de los Santos, T.; van Kuppeveld, F.J.M. Foot-and-Mouth Disease Virus Leader Protease Cleaves G3BP1 and G3BP2 and Inhibits Stress Granule Formation. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00922-18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Birtley, J.R.; Knox, S.R.; Jaulent, A.M.; Brick, P.; Leatherbarrow, R.J.; Curry, S. Crystal Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease: New Insights into Catalytic Mechanism and Cleavage Specificity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11520–11527. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Palmenberg, A.C. Proteolytic Processing of Picornaviral Polyprotein. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 603–623. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Zhu, Z.; Li, C.; Du, X.; Wang, G.; Cao, W.; Yang, F.; Feng, H.; Zhang, X.; Shi, Z.; Liu, H.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Infection Inhibits LGP2 Protein Expression to Exaggerate Inflammatory Response and Promote Viral Replication. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2747. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Kim, H.; Kim, A.-Y.; Choi, J.; Park, S.Y.; Park, S.H.; Kim, J.-S.; Lee, S.-I.; Park, J.-H.; Park, C.-K.; Ko, Y.-J. Foot-and-Mouth Disease Virus Evades Innate Immune Response by 3C-Targeting of MDA5. *Cells* **2021**, *10*, 271. [\[CrossRef\]](#)
96. Knox, C.; Moffat, K.; Ali, S.; Ryan, M.; Wileman, T. Foot-and-Mouth Disease Virus Replication Sites Form next to the Nucleus and Close to the Golgi Apparatus, but Exclude Marker Proteins Associated with Host Membrane Compartments. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 687–696. [\[CrossRef\]](#)
97. Zhou, Z.; Mogensen, M.M.; Powell, P.P.; Curry, S.; Wileman, T. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Induces Fragmentation of the Golgi Compartment and Blocks Intra-Golgi Transport. *J. Virol.* **2013**, *87*, 11721–11729. [\[CrossRef\]](#)
98. Liu, H.; Zhu, Z.; Xue, Q.; Yang, F.; Cao, W.; Zhang, K.; Liu, X.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes NOD2-Mediated Antiviral Effects by Inhibiting NOD2 Protein Expression. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00124-19. [\[CrossRef\]](#)
99. Abdullah, S.W.; Wu, J.; Zhang, Y.; Bai, M.; Guan, J.; Liu, X.; Sun, S.; Guo, H. DDX21, a Host Restriction Factor of FMDV IRES-Dependent Translation and Replication. *Viruses* **2021**, *13*, 1765. [\[CrossRef\]](#)
100. Calo, E.; Flynn, R.A.; Martin, L.; Spitale, R.C.; Chang, H.Y.; Wysocka, J. RNA Helicase DDX21 Coordinates Transcription and Ribosomal RNA Processing. *Nature* **2015**, *518*, 249–253. [\[CrossRef\]](#)
101. Chen, G.; Liu, C.-H.; Zhou, L.; Krug, R.M. Cellular DDX21 RNA Helicase Inhibits Influenza A Virus Replication but Is Counteracted by the Viral NS1 Protein. *Cell Host Microbe* **2014**, *15*, 484–493. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Hao, H.; Han, T.; Xuan, B.; Sun, Y.; Tang, S.; Yue, N.; Qian, Z. Dissecting the Role of DDX21 in Regulating Human Cytomegalovirus Replication. *J. Virol.* **2019**, *93*, e01222-19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Wang, D.; Fang, L.; Li, K.; Zhong, H.; Fan, J.; Ouyang, C.; Zhang, H.; Duan, E.; Luo, R.; Zhang, Z.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Cleaves NEMO To Impair Innate Immune Signaling. *J. Virol.* **2012**, *86*, 9311–9322. [\[CrossRef\]](#)
104. Sebban, H.; Yamaoka, S.; Courtois, G. Posttranslational Modifications of NEMO and Its Partners in NF-KB Signaling. *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 569–577. [\[CrossRef\]](#)
105. Yang, F.; Yamashita, J.; Tang, E.; Wang, H.; Guan, K.; Wang, C.-Y. The Zinc Finger Mutation C417R of I-KB Kinase γ Impairs Lipopolysaccharide- and TNF-Mediated NF-KB Activation through Inhibiting Phosphorylation of the I-KB Kinase β Activation Loop. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2446–2452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Min, Y.; Wi, S.M.; Shin, D.; Chun, E.; Lee, K.-Y. Peroxiredoxin-6 Negatively Regulates Bactericidal Activity and NF-KB Activity by Interrupting TRAF6-ECSIT Complex. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 94. [\[CrossRef\]](#)
107. Park, M.H.; Jo, M.; Kim, Y.R.; Lee, C.-K.; Hong, J.T. Roles of Peroxiredoxins in Cancer, Neurodegenerative Diseases and Inflammatory Diseases. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *163*, 1–23. [\[CrossRef\]](#)
108. Murakami, M.; Nakatani, Y.; Atsumi, G.; Inoue, K.; Kudo, I. Regulatory Functions of Phospholipase A₂. *Crit. Rev. Immunol.* **2017**, *37*, 127–195. [\[CrossRef\]](#)
109. Wang, C.; Feng, H.; Zhang, X.; Li, K.; Yang, F.; Cao, W.; Liu, H.; Gao, L.; Xue, Z.; Liu, X.; et al. Porcine Picornavirus 3C Protease Degrades PRDX6 to Impair PRDX6-Mediated Antiviral Function. *Virol. Sin.* **2021**, *36*, 948–957. [\[CrossRef\]](#)
110. He, L.; Zhang, Y.; Lin, Z.; Li, W.; Wang, J.; Li, H.-L. Classical Swine Fever Virus NS5A Protein Localizes to Endoplasmic Reticulum and Induces Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells. *Virus Genes* **2012**, *45*, 274–282. [\[CrossRef\]](#)
111. Belsham, G.J.; McInerney, G.M.; Ross-Smith, N. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Induces Cleavage of Translation Initiation Factors EIF4A and EIF4G within Infected Cells. *J. Virol.* **2000**, *74*, 272–280. [\[PubMed\]](#)
112. Tauber, D.; Tauber, G.; Khong, A.; Van Treeck, B.; Pelletier, J.; Parker, R. Modulation of RNA Condensation by the DEAD-Box Protein EIF4A. *Cell* **2020**, *180*, 411–426.e16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Ohlmann, T.; Rau, M.; Morley, S.J.; Pain, V.M. Proteolytic Cleavage of Initiation Factor EIF-4 Gamma in the Reticulocyte Lysate Inhibits Translation of Capped MRNAs but Enhances That of Uncapped MRNAs. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 334–340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Lawrence, P.; Schafer, E.A.; Rieder, E. The Nuclear Protein Sam68 Is Cleaved by the FMDV 3C Protease Redistributing Sam68 to the Cytoplasm during FMDV Infection of Host Cells. *Virology* **2012**, *425*, 40–52. [\[CrossRef\]](#)



115. Wan, F.; Anderson, D.E.; Barnitz, R.A.; Snow, A.; Bidere, N.; Zheng, L.; Hegde, V.; Lam, L.T.; Staudt, L.M.; Levens, D.; et al. Ribosomal Protein S3: A KH Domain Subunit in NF-KB Complexes That Mediates Selective Gene Regulation. *Cell* **2007**, *131*, 927–939. [\[CrossRef\]](#)
116. Zhang, H.-X.; Liu, Z.-X.; Sun, Y.-P.; Zhu, J.; Lu, S.-Y.; Liu, X.-S.; Huang, Q.-H.; Xie, Y.-Y.; Zhu, H.-B.; Dang, S.-Y.; et al. Rig-I Regulates NF-KB Activity through Binding to Nf-Kb1 3'-UTR mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6459–6464. [\[CrossRef\]](#)
117. Guan, J.; Han, S.; Wu, J.; Zhang, Y.; Bai, M.; Abdullah, S.W.; Sun, S.; Guo, H. Ribosomal Protein L13 Participates in Innate Immune Response Induced by Foot-and-Mouth Disease Virus. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 616402. [\[CrossRef\]](#)
118. Falk, M.M.; Grigera, P.R.; Bergmann, I.E.; Zibert, A.; Multhaup, G.; Beck, E. Foot-and-Mouth Disease Virus Protease 3C Induces Specific Proteolytic Cleavage of Host Cell Histone H3. *J. Virol.* **1990**, *64*, 748–756.
119. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **2007**, *128*, 693–705. [\[CrossRef\]](#)
120. Liu, W.; Yang, D.; Sun, C.; Wang, H.; Zhao, B.; Zhou, G.; Yu, L. HnRNP K Is a Novel Internal Ribosomal Entry Site-Transacting Factor That Negatively Regulates Foot-and-Mouth Disease Virus Translation and Replication and Is Antagonized by Viral 3C Protease. *J. Virol.* **2020**, *94*, e00803-20. [\[CrossRef\]](#)
121. Cao, P.; Luo, W.-W.; Li, C.; Tong, Z.; Zheng, Z.-Q.; Zhou, L.; Xiong, Y.; Li, S. The Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein HnRNP M Inhibits RNA Virus-Triggered Innate Immunity by Antagonizing RNA Sensing of RIG-I-like Receptors. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007983. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Darnell, J.E.; Kerr, L.M.; Stark, G.R. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* **1994**, *264*, 1415–1421. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
123. Du, Y.; Bi, J.; Liu, J.; Liu, X.; Wu, X.; Jiang, P.; Yoo, D.; Zhang, Y.; Wu, J.; Wan, R.; et al. 3Cpro of Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes the Interferon Signaling Pathway by Blocking STAT1/STAT2 Nuclear Translocation. *J. Virol.* **2014**, *88*, 4908–4920. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
124. McAllister, C.S.; Taghavi, N.; Samuel, C.E. Protein Kinase PKR Amplification of Interferon β Induction Occurs through Initiation Factor EIF-2 α -Mediated Translational Control. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36384–36392. [\[CrossRef\]](#)
125. Bonnet, M.C.; Weil, R.; Dam, E.; Hovanessian, A.G.; Meurs, E.F. PKR Stimulates NF-KB Irrespective of Its Kinase Function by Interacting with the I κ B Kinase Complex. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 4532–4542. [\[CrossRef\]](#)
126. Gil, J.; García, M.A.; Gomez-Puertas, P.; Guerra, S.; Rullas, J.; Nakano, H.; Alcamí, J.; Esteban, M. TRAF Family Proteins Link PKR with NF-KB Activation. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 4502–4512. [\[CrossRef\]](#)
127. Li, S.; Min, J.-Y.; Sen, G.C. Binding of the Influenza A Virus NS1 Protein to PKR Mediates the Inhibition of Its Activation by Either PACT or Double-Stranded RNA. *Virology* **2006**, *349*, 13–21. [\[CrossRef\]](#)
128. Vyas, J.; Elia, A.; Clemens, M.J. Inhibition of the Protein Kinase PKR by the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus Genomic RNA. *RNA* **2003**, *9*, 858–870. [\[CrossRef\]](#)
129. Li, C.; Zhu, Z.; Du, X.; Cao, W.; Yang, F.; Zhang, X.; Feng, H.; Li, D.; Zhang, K.; Liu, X.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Induces Lysosomal Degradation of Host Protein Kinase PKR by 3C Proteinase to Facilitate Virus Replication. *Virology* **2017**, *509*, 222–231. [\[CrossRef\]](#)
130. Galan, A.; Lozano, G.; Piñero, D.; Martínez-Salas, E. G3BP1 Interacts Directly with the FMDV IRES and Negatively Regulates Translation. *FEBS J.* **2017**, *284*, 3202–3217. [\[CrossRef\]](#)
131. Ye, X.; Pan, T.; Wang, D.; Fang, L.; Ma, J.; Zhu, X.; Shi, Y.; Zhang, K.; Zheng, H.; Chen, H.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Counteracts on Internal Ribosome Entry Site Suppression by G3BP1 and Inhibits G3BP1-Mediated Stress Granule Assembly via Post-Translational Mechanisms. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1142. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
132. Núñez, J.I.; Baranowski, E.; Molina, N.; Ruiz-Jarabo, C.M.; Sánchez, C.; Domingo, E.; Sobrino, F. A Single Amino Acid Substitution in Nonstructural Protein 3A Can Mediate Adaptation of Foot-and-Mouth Disease Virus to the Guinea Pig. *J. Virol.* **2001**, *75*, 3977–3983. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Beard, C.W.; Mason, P.W. Genetic Determinants of Altered Virulence of Taiwanese Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* **2000**, *74*, 987–991. [\[CrossRef\]](#)
134. Pacheco, J.M.; Henry, T.M.; O'Donnell, V.K.; Gregory, J.B.; Mason, P.W. Role of Nonstructural Proteins 3A and 3B in Host Range and Pathogenicity of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* **2003**, *77*, 13017–13027. [\[CrossRef\]](#)
135. Carrillo, C.; Tulman, E.R.; Delhon, G.; Lu, Z.; Carreno, A.; Vagnozzi, A.; Kutish, G.F.; Rock, D.L. Comparative Genomics of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* **2005**, *79*, 6487–6504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Knowles, N.J.; Davies, P.R.; Henry, T.; O'Donnell, V.; Pacheco, J.M.; Mason, P.W. Emergence in Asia of Foot-and-Mouth Disease Viruses with Altered Host Range: Characterization of Alterations in the 3A Protein. *J. Virol.* **2001**, *75*, 1551–1556. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Midgley, R.; Moffat, K.; Berryman, S.; Hawes, P.; Simpson, J.; Fullen, D.; Stephens, D.J.; Burman, A.; Jackson, T. A Role for Endoplasmic Reticulum Exit Sites in Foot-and-Mouth Disease Virus Infection. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 2636–2646. [\[CrossRef\]](#)
138. Moffat, K.; Howell, G.; Knox, C.; Belsham, G.J.; Monaghan, P.; Ryan, M.D.; Wileman, T. Effects of Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Proteins on the Structure and Function of the Early Secretory Pathway: 2BC but Not 3A Blocks Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport. *J. Virol.* **2005**, *79*, 4382–4395. [\[CrossRef\]](#)
139. Li, D.; Lei, C.; Xu, Z.; Yang, F.; Liu, H.; Zhu, Z.; Li, S.; Liu, X.; Shu, H.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural Protein 3A Inhibits the Interferon- β Signaling Pathway. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21888. [\[CrossRef\]](#)



140. Horner, S.M.; Wilkins, C.; Badil, S.; Iskarpatyoti, J.; Gale, M. Proteomic Analysis of Mitochondrial-Associated ER Membranes (MAM) during RNA Virus Infection Reveals Dynamic Changes in Protein and Organelle Trafficking. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117963. [CrossRef]
141. Horner, S.M.; Liu, H.M.; Park, H.S.; Briley, J.; Gale, M. Mitochondrial-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes (MAM) Form Innate Immune Synapses and Are Targeted by Hepatitis C Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14590–14595. [CrossRef] [PubMed]
142. Li, D.; Fu, S.; Wu, Z.; Yang, W.; Ru, Y.; Shu, H.; Liu, X.; Zheng, H. Correction: DDX56 Inhibits Type I Interferon by Disrupting Assembly of IRF3–IPO5 to Inhibit IRF3 Nucleus Import. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, jcs244681. [CrossRef] [PubMed]
143. Fu, S.; Yang, W.; Ru, Y.; Zhang, K.; Wang, Y.; Liu, X.; Li, D.; Zheng, H. DDX56 Cooperates with FMDV 3A to Enhance FMDV Replication by Inhibiting the Phosphorylation of IRF3. *Cell. Signal.* **2019**, *64*, 109393. [CrossRef] [PubMed]
144. Ma, X.; Zhang, K.; Luo, Z.; Nian, X.; Choudhury, S.K.M.; Zhu, Z.; Song, R.; Pei, J.; Huo, Y.; Li, Y.; et al. FMDV 3A Antagonizes the Effect of ANXA1 to Positively Modulate Viral Replication. *J. Virol.* **2022**, *96*, e00317-22. [CrossRef]
145. Bist, P.; Leow, S.C.; Phua, Q.H.; Shu, S.; Zhuang, Q.; Loh, W.T.; Nguyen, T.H.; Zhou, J.B.; Hooi, S.C.; Lim, L.H.K. Annexin-1 Interacts with NEMO and RIP1 to Constitutively Activate IKK Complex and NF- κ B: Implication in Breast Cancer Metastasis. *Oncogene* **2011**, *30*, 3174–3185. [CrossRef]
146. Bist, P.; Shu, S.; Lee, H.; Arora, S.; Nair, S.; Lim, J.Y.; Dayalan, J.; Gasser, S.; Biswas, S.K.; Fairhurst, A.-M.; et al. Annexin-A1 Regulates TLR-Mediated IFN- β Production through an Interaction with TANK-Binding Kinase 1. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 4375–4382. [CrossRef]
147. Yap, G.L.R.; Sachaphibulkij, K.; Foo, S.L.; Cui, J.; Fairhurst, A.-M.; Lim, L.H.K. Annexin-A1 Promotes RIG-I-Dependent Signaling and Apoptosis via Regulation of the IRF3-IFNAR-STAT1-IFIT1 Pathway in A549 Lung Epithelial Cells. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 463. [CrossRef]
148. Du, Y.; Duan, T.; Feng, Y.; Liu, Q.; Lin, M.; Cui, J.; Wang, R. LRRC25 Inhibits Type I IFN Signaling by Targeting ISG15-associated RIG-I for Autophagic Degradation. *EMBO J.* **2018**, *37*, 351–366. [CrossRef]
149. Yang, W.; Li, D.; Ru, Y.; Bai, J.; Ren, J.; Zhang, J.; Li, L.; Liu, X.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus 3A Protein Causes Upregulation of Autophagy-Related Protein LRRC25 To Inhibit the G3BP1-Mediated RIG-like Helicase-Signaling Pathway. *J. Virol.* **2020**, *94*, e02086-19. [CrossRef]
150. Nieva, J.L.; Madan, V.; Carrasco, L. Viroporins: Structure and Biological Functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 563–574. [CrossRef]
151. Moffat, K.; Knox, C.; Howell, G.; Clark, S.J.; Yang, H.; Belsham, G.J.; Ryan, M.; Wileman, T. Inhibition of the Secretory Pathway by Foot-and-Mouth Disease Virus 2B Protein Is Reproduced by Coexpression of 2B with 2C, and the Site of Inhibition Is Determined by the Subcellular Location of 2C. *J. Virol.* **2007**, *81*, 1129–1139. [CrossRef] [PubMed]
152. Li, M.; Xin, T.; Gao, X.; Wu, J.; Wang, X.; Fang, L.; Sui, X.; Zhu, H.; Cui, S.; Guo, X. Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural Protein 2B Negatively Regulates the RLR-Mediated IFN- β Induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *504*, 238–244. [CrossRef] [PubMed]
153. Zhu, Z.; Wang, G.; Yang, F.; Cao, W.; Mao, R.; Du, X.; Zhang, X.; Li, C.; Li, D.; Zhang, K.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Viroprotein 2B Antagonizes RIG-I-Mediated Antiviral Effects by Inhibition of Its Protein Expression. *J. Virol.* **2016**, *90*, 11106–11121. [CrossRef]
154. Liu, W.; Li, J.; Zheng, W.; Shang, Y.; Zhao, Z.; Wang, S.; Bi, Y.; Zhang, S.; Xu, C.; Duan, Z.; et al. Cyclophilin A-Regulated Ubiquitination Is Critical for RIG-I-Mediated Antiviral Immune Responses. *eLife* **2017**, *6*, e24425. [CrossRef] [PubMed]
155. Liu, H.; Xue, Q.; Cao, W.; Yang, F.; Ma, L.; Liu, W.; Zhang, K.; Liu, X.; Zhu, Z.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Protein 2B Interacts with Cyclophilin A, Modulating Virus Replication. *FASEB J.* **2018**, *32*, 6706–6723. [CrossRef] [PubMed]
156. Feng, H.-H.; Zhu, Z.-X.; Cao, W.-J.; Yang, F.; Zhang, X.-L.; Du, X.-L.; Zhang, K.-S.; Liu, X.-T.; Zheng, H.-X. Foot-and-Mouth Disease Virus Induces Lysosomal Degradation of NME1 to Impair P53-Regulated Interferon-Inducible Antiviral Genes Expression. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 885. [CrossRef]
157. Jung, H.; Seong, H.-A.; Ha, H. Direct Interaction between NM23-H1 and Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Is Critical for Alleviation of MIF-Mediated Suppression of P53 Activity. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 32669–32679. [CrossRef]
158. Zhang, T.; Chen, H.; Liu, X.; Qi, L.; Gao, X.; Wang, K.; Yao, K.; Zhang, J.; Sun, Y.; Zhang, Y.; et al. Basal Level P53 Suppresses Antiviral Immunity Against Foot-And-Mouth Disease Virus. *Viruses* **2019**, *11*, 727. [CrossRef]
159. Logan, D.; Abu-Ghazaleh, R.; Blakemore, W.; Curry, S.; Jackson, T.; King, A.; Lea, S.; Lewis, R.; Newman, J.; Parry, N.; et al. Structure of a Major Immunogenic Site on Foot-and-Mouth Disease Virus. *Nature* **1993**, *362*, 566–568. [CrossRef]
160. Wang, G.; Wang, Y.; Shang, Y.; Zhang, Z.; Liu, X. How Foot-and-Mouth Disease Virus Receptor Mediates Foot-and-Mouth Disease Virus Infection. *Virol. J.* **2015**, *12*, 9. [CrossRef]
161. Li, Q.; Verma, I.M. NF- κ B Regulation in the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 725–734. [CrossRef] [PubMed]
162. Wu, Z.; Zhang, Z.; Lei, Z.; Lei, P. CD14: Biology and Role in the Pathogenesis of Disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2019**, *48*, 24–31. [CrossRef] [PubMed]
163. Murawski, M.R.; Bowen, G.N.; Cerny, A.M.; Anderson, L.J.; Haynes, L.M.; Tripp, R.A.; Kurt-Jones, E.A.; Finberg, R.W. Respiratory Syncytial Virus Activates Innate Immunity through Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* **2009**, *83*, 1492–1500. [CrossRef] [PubMed]



164. Chang, S.; Dolganiuc, A.; Szabo, G. Toll-like Receptors 1 and 6 Are Involved in TLR2-Mediated Macrophage Activation by Hepatitis C Virus Core and NS3 Proteins. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *82*, 479–487. [\[CrossRef\]](#)
165. Ekanayaka, P.; Lee, S.-Y.; Herath, T.U.B.; Kim, J.-H.; Kim, T.-H.; Lee, H.; Chathuranga, K.; Chathuranga, W.A.G.; Park, J.-H.; Lee, J.-S. Foot-and-Mouth Disease Virus VP1 Target the MAVS to Inhibit Type-I Interferon Signaling and VP1 E83K Mutation Results in Virus Attenuation. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1009057. [\[CrossRef\]](#)
166. Zhu, Z.; Li, W.; Zhang, X.; Wang, C.; Gao, L.; Yang, F.; Cao, W.; Li, K.; Tian, H.; Liu, X.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Protein VP1 Interacts with Host Ribosomal Protein SA To Maintain Activation of the MAPK Signal Pathway and Promote Virus Replication. *J. Virol.* **2020**, *94*, e01350-19. [\[CrossRef\]](#)
167. Strong, J.E.; Wong, G.; Jones, S.E.; Grolla, A.; Theriault, S.; Kobinger, G.P.; Feldmann, H. Stimulation of Ebola Virus Production from Persistent Infection through Activation of the Ras/MAPK Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17982–17987. [\[CrossRef\]](#)
168. Mizumura, K.; Hashimoto, S.; Maruoka, S.; Gon, Y.; Kitamura, N.; Matsumoto, K.; Hayashi, S.; Shimizu, K.; Horie, T. Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in Influenza Virus Induction of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid in Bronchial Epithelial Cells. *Clin. Exp. Allergy* **2003**, *33*, 1244–1251. [\[CrossRef\]](#)
169. Zhang, K.; Yan, M.; Hao, J.; Shen, C.; Zhu, Z.; Zhang, D.; Hou, J.; Xu, G.; Li, D.; Zheng, H.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Structural Protein VP1 Destroys the Stability of the TPL2 Trimer by Degradation of TPL2 To Evade Host Antiviral Immunity. *J. Virol.* **2021**, *95*, e02149-20. [\[CrossRef\]](#)
170. Li, X.; Wang, J.; Liu, J.; Li, Z.; Wang, Y.; Xue, Y.; Li, X.; Cao, H.; Zheng, S.J. Engagement of Soluble Resistance-Related Calcium Binding Protein (Sorcin) with Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) VP1 Inhibits Type I Interferon Response in Cells. *Vet. Microbiol.* **2013**, *166*, 35–46. [\[CrossRef\]](#)
171. Yu, H.; Pardoll, D.; Jove, R. STATs in Cancer Inflammation and Immunity: A Leading Role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 798–809. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
172. Teterina, N.L.; Gorbalenya, A.E.; Egger, D.; Bienz, K.; Rinaudo, M.S.; Ehrenfeld, E. Testing the Modularity of the N-Terminal Amphipathic Helix Conserved in Picornavirus 2C Proteins and Hepatitis C NS5A Protein. *Virology* **2006**, *344*, 453–467. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
173. Lippincott-Schwartz, J. Bidirectional Membrane Traffic between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Trends Cell Biol.* **1993**, *3*, 81–88. [\[CrossRef\]](#)
174. Mahajan, S.; Sharma, G.K.; Bora, K.; Pattnaik, B. Identification of Novel Interactions between Host and Non-Structural Protein 2C of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Gen. Virol.* **2021**, *102*, 001577. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
175. Zheng, W.; Li, X.; Wang, J.; Li, X.; Cao, H.; Wang, Y.; Zeng, Q.; Zheng, S.J. A Critical Role of Interferon-Induced Protein IFP35 in the Type I Interferon Response in Cells Induced by Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Protein 2C. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 2925–2935. [\[CrossRef\]](#)
176. Borca, M.V.; Pacheco, J.M.; Holinka, L.G.; Carrillo, C.; Hartwig, E.; Garriga, D.; Kramer, E.; Rodriguez, L.; Piccone, M.E. Role of Arginine-56 within the Structural Protein VP3 of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) O1 Campos in Virus Virulence. *Virology* **2012**, *422*, 37–45. [\[CrossRef\]](#)
177. Sa-Carvalho, D.; Rieder, E.; Baxt, B.; Rodarte, R.; Tanuri, A.; Mason, P.W. Tissue Culture Adaptation of Foot-and-Mouth Disease Virus Selects Viruses That Bind to Heparin and Are Attenuated in Cattle. *J. Virol.* **1997**, *71*, 5115–5123. [\[CrossRef\]](#)
178. Rodriguez Pulido, M.; Sobrino, F.; Borrego, B.; Sáiz, M. Attenuated Foot-and-Mouth Disease Virus RNA Carrying a Deletion in the 3' Noncoding Region Can Elicit Immunity in Swine. *J. Virol.* **2009**, *83*, 3475–3485. [\[CrossRef\]](#)
179. Fry, E.E.; Lea, S.M.; Jackson, T.; Newman, J.W.; Ellard, F.M.; Blakemore, W.E.; Abu-Ghazaleh, R.; Samuel, A.; King, A.M.; Stuart, D.I. The Structure and Function of a Foot-and-Mouth Disease Virus-Oligosaccharide Receptor Complex. *EMBO J.* **1999**, *18*, 543. [\[CrossRef\]](#)
180. Newman, J.; Asfor, A.S.; Berryman, S.; Jackson, T.; Curry, S.; Tuthill, T.J. The Cellular Chaperone Heat Shock Protein 90 Is Required for Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Precursor Processing and Assembly of Capsid Pentamers. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01415-17. [\[CrossRef\]](#)
181. Ekanayaka, P.; Lee, B.-H.; Weerawardhana, A.; Chathuranga, K.; Park, J.-H.; Lee, J.-S. Inhibition of MAVS Aggregation-Mediated Type-I Interferon Signaling by Foot-and-Mouth Disease Virus VP3. *Viruses* **2021**, *13*, 1776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
182. Li, D.; Yang, W.; Yang, F.; Liu, H.; Zhu, Z.; Lian, K.; Lei, C.; Li, S.; Liu, X.; Zheng, H.; et al. The VP3 Structural Protein of Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits the IFN- β Signaling Pathway. *FASEB J.* **2016**, *30*, 1757–1766. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
183. Li, D.; Wei, J.; Yang, F.; Liu, H.-N.; Zhu, Z.-X.; Cao, W.-J.; Li, S.; Liu, X.-T.; Zheng, H.-X.; Shu, H.-B. Foot-and-Mouth Disease Virus Structural Protein VP3 Degrades Janus Kinase 1 to Inhibit IFN- γ Signal Transduction Pathways. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 850–860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
184. Han, S.-C.; Guo, H.-C.; Sun, S.-Q. Three-Dimensional Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus and Its Biological Functions. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
185. You, F.; Sun, H.; Zhou, X.; Sun, W.; Liang, S.; Zhai, Z.; Jiang, Z. PCBP2 Mediates Degradation of the Adaptor MAVS via the HECT Ubiquitin Ligase AIP4. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 1300–1308. [\[CrossRef\]](#)
186. Li, D.; Zhang, J.; Yang, W.; He, Y.; Ru, Y.; Fu, S.; Li, L.; Liu, X.; Zheng, H. Poly (RC) Binding Protein 2 Interacts with VP0 and Increases the Replication of the Foot-and-Mouth Disease Virus. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 516. [\[CrossRef\]](#)



187. Walter, B.L.; Parsley, T.B.; Ehrenfeld, E.; Semler, B.L. Distinct Poly(RC) Binding Protein KH Domain Determinants for Poliovirus Translation Initiation and Viral RNA Replication. *J. Virol.* **2002**, *76*, 12008–12022. [\[CrossRef\]](#)
188. O'Donnell, V.; Pacheco, J.M.; LaRocco, M.; Burrage, T.; Jackson, W.; Rodriguez, L.L.; Borca, M.V.; Baxt, B. Foot-and-Mouth Disease Virus Utilizes an Autophagic Pathway during Viral Replication. *Virology* **2011**, *410*, 142–150. [\[CrossRef\]](#)
189. Nayak, A.; Goodfellow, I.G.; Belsham, G.J. Factors Required for the Uridyllylation of the Foot-and-Mouth Disease Virus 3B1, 3B2, and 3B3 Peptides by the RNA-Dependent RNA Polymerase (3Dpol) In Vitro. *J. Virol.* **2005**, *79*, 7698–7706. [\[CrossRef\]](#)
190. Falk, M.M.; Sobrino, F.; Beck, E. VPg Gene Amplification Correlates with Infective Particle Formation in Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* **1992**, *66*, 2251–2260. [\[CrossRef\]](#)
191. Park, J.-H.; Tark, D.; Lee, K.-N.; Lee, S.-Y.; Ko, M.-K.; Lee, H.-S.; Kim, S.-M.; Ko, Y.-J.; Seo, M.-G.; Chun, J.-E.; et al. Novel Foot-and-Mouth Disease Virus in Korea, July–August 2014. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **2016**, *5*, 83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
192. Zhang, X.; Zhu, Z.; Wang, C.; Yang, F.; Cao, W.; Li, P.; Du, X.; Zhao, F.; Liu, X.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus 3B Protein Interacts with Pattern Recognition Receptor RIG-I to Block RIG-I-Mediated Immune Signaling and Inhibit Host Antiviral Response. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 2207–2221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
193. Cadena, C.; Ahmad, S.; Xavier, A.; Willemsen, J.; Park, S.; Park, J.W.; Oh, S.-W.; Fujita, T.; Hou, F.; Binder, M.; et al. Ubiquitin-Dependent and -Independent Roles of E3 Ligase RIPL1 in Innate Immunity. *Cell* **2019**, *177*, 1187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
194. Robertson, B.H.; Morgan, D.O.; Moore, D.M.; Grubman, M.J.; Card, J.; Fischer, T.; Weddell, G.; Dowbenko, D.; Yansura, D. Identification of Amino Acid and Nucleotide Sequence of the Foot-and-Mouth Disease Virus RNA Polymerase. *Virology* **1983**, *126*, 614–623. [\[CrossRef\]](#)
195. McBride, A.E.; Schlegel, A.; Kirkegaard, K. Human Protein Sam68 Relocalization and Interaction with Poliovirus RNA Polymerase in Infected Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2296–2301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
196. Rai, D.K.; Lawrence, P.; Kloc, A.; Schafer, E.; Rieder, E. Analysis of the Interaction between Host Factor Sam68 and Viral Elements during Foot-and-Mouth Disease Virus Infections. *Virol. J.* **2015**, *12*, 224. [\[CrossRef\]](#)
197. Xue, Q.; Liu, H.; Zeng, Q.; Zheng, H.; Xue, Q.; Cai, X. The DEAD-Box RNA Helicase DDX1 Interacts with the Viral Protein 3D and Inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus Replication. *Virol. Sin.* **2019**, *34*, 610–617. [\[CrossRef\]](#)
198. Feng, Q.; Langereis, M.A.; van Kuppeveld, F.J.M. Induction and Suppression of Innate Antiviral Responses by Picornaviruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 577–585. [\[CrossRef\]](#)
199. Kuo, R.-L.; Chen, C.-J.; Wang, R.Y.L.; Huang, H.-I.; Lin, Y.-H.; Tam, E.-H.; Tu, W.-J.; Wu, S.-E.; Shih, S.-R. Role of Enteroviral RNA-Dependent RNA Polymerase in Regulation of MDA5-Mediated Beta Interferon Activation. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00132-19. [\[CrossRef\]](#)
200. Feng, Q.; Langereis, M.A.; Lork, M.; Nguyen, M.; Hato, S.V.; Lanke, K.; Emdad, L.; Bhoopathi, P.; Fisher, P.B.; Lloyd, R.E.; et al. Enterovirus 2Apro Targets MDA5 and MAVS in Infected Cells. *J. Virol.* **2014**, *88*, 3369–3378. [\[CrossRef\]](#)
201. Wang, J.P.; Cerny, A.; Asher, D.R.; Kurt-Jones, E.A.; Bronson, R.T.; Finberg, R.W. MDA5 and MAVS Mediate Type I Interferon Responses to Coxsackie B Virus. *J. Virol.* **2010**, *84*, 254–260. [\[CrossRef\]](#)
202. Rui, Y.; Su, J.; Wang, H.; Chang, J.; Wang, S.; Zheng, W.; Cai, Y.; Wei, W.; Gordy, J.T.; Markham, R.; et al. Disruption of MDA5-Mediated Innate Immune Responses by the 3C Proteins of Coxsackievirus A16, Coxsackievirus A6, and Enterovirus D68. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00546-17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
203. Han, Y.; Xie, J.; Xu, S.; Bi, Y.; Li, X.; Zhang, H.; Idris, A.; Bai, J.; Feng, R. Encephalomyocarditis Virus Abrogates the Interferon Beta Signaling Pathway via Its Structural Protein VP2. *J. Virol.* **2021**, *95*, e01590-20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
204. Li, L.; Fan, H.; Song, Z.; Liu, X.; Bai, J.; Jiang, P. Encephalomyocarditis Virus 2C Protein Antagonizes Interferon- β Signaling Pathway through Interaction with MDA5. *Antivir. Res.* **2019**, *161*, 70–84. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
205. Drahos, J.; Racaniello, V.R. Cleavage of IPS-1 in Cells Infected with Human Rhinovirus. *J. Virol.* **2009**, *83*, 11581–11587. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
206. Cao, X.; Xue, Y.; Du, J.; Xu, Q.; Yang, X.; Zeng, Y.; Wang, B.; Wang, H.; Liu, J.; Cai, K.; et al. Induction and Suppression of Innate Antiviral Responses by Hepatitis A Virus. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1865. [\[CrossRef\]](#)
207. Wen, W.; Yin, M.; Zhang, H.; Liu, T.; Chen, H.; Qian, P.; Hu, J.; Li, X. Seneca Valley Virus 2C and 3C Inhibit Type I Interferon Production by Inducing the Degradation of RIG-I. *Virology* **2019**, *535*, 122–129. [\[CrossRef\]](#)
208. Qian, S.; Fan, W.; Liu, T.; Wu, M.; Zhang, H.; Cui, X.; Zhou, Y.; Hu, J.; Wei, S.; Chen, H.; et al. Seneca Valley Virus Suppresses Host Type I Interferon Production by Targeting Adaptor Proteins MAVS, TRIF, and TANK for Cleavage. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00823-17. [\[CrossRef\]](#)
209. Hägglund, S.; Laloy, E.; Näslund, K.; Pfaff, F.; Eschbaumer, M.; Romey, A.; Relmy, A.; Rikberg, A.; Svensson, A.; Huet, H.; et al. Model of Persistent Foot-and-mouth Disease Virus Infection in Multilayered Cells Derived from Bovine Dorsal Soft Palate. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 133–148. [\[CrossRef\]](#)
210. Pfaff, F.; Hägglund, S.; Zoli, M.; Blaise-Boisseau, S.; Laloy, E.; Koethe, S.; Zühlke, D.; Riedel, K.; Zientara, S.; Bakkali-Kassimi, L.; et al. Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus. *Viruses* **2019**, *11*, 53. [\[CrossRef\]](#)
211. Parzych, K.R.; Klionsky, D.J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 460–473. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
212. Yorimitsu, T.; Klionsky, D.J. Autophagy: Molecular Machinery for Self-Eating. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 1542–1552. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



213. Zhang, W.; Yang, F.; Zhu, Z.; Yang, Y.; Wang, Z.; Cao, W.; Dang, W.; Li, L.; Mao, R.; Liu, Y.; et al. Cellular DNAJA3, a Novel VP1-Interacting Protein, Inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus Replication by Inducing Lysosomal Degradation of VP1 and Attenuating Its Antagonistic Role in the Beta Interferon Signaling Pathway. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00588-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Sun, P.; Zhang, S.; Qin, X.; Chang, X.; Cui, X.; Li, H.; Zhang, S.; Gao, H.; Wang, P.; Zhang, Z.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Protein VP2 Activates the Cellular EIF2S1-ATF4 Pathway and Induces Autophagy via HSPB1. *Autophagy* **2018**, *14*, 336–346. [[CrossRef](#)]
215. Gladue, D.P.; O'Donnell, V.; Baker-Branstetter, R.; Holinka, L.G.; Pacheco, J.M.; Fernandez-Sainz, I.; Lu, Z.; Brocchi, E.; Baxt, B.; Piccone, M.E.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Protein 2C Interacts with Beclin1, Modulating Virus Replication. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12080–12090. [[CrossRef](#)]
216. Ma, X.; Ling, Y.; Li, P.; Sun, P.; Cao, Y.; Bai, X.; Li, K.; Fu, Y.; Zhang, J.; Li, D.; et al. Cellular Vimentin Interacts with Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Protein 3A and Negatively Modulates Viral Replication. *J. Virol.* **2020**, *94*, e00273-20. [[CrossRef](#)]
217. Choi, Y.; Bowman, J.W.; Jung, J.U. Autophagy during Viral Infection—A Double-Edged Sword. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 341–354. [[CrossRef](#)]
218. Tian, Y.; Wang, M.-L.; Zhao, J. Crosstalk between Autophagy and Type I Interferon Responses in Innate Antiviral Immunity. *Viruses* **2019**, *11*, 132. [[CrossRef](#)]
219. Liu, H.; Xue, Q.; Zeng, Q.; Zhu, Z.; Zheng, H. The Kinase STK3 Interacts with the Viral Structural Protein VP1 and Inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus Replication. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 2481348. [[CrossRef](#)]



Autophagie

Comme cela est mentionné dans la discussion de la revue présentée ci-dessus, les interactions protéiques entre le virus et la voie IFN de type I ne suffisent pas à expliquer les phénomènes de persistance du FMDV. Le virus subvertit ainsi probablement d'autres mécanismes de défense cellulaire en interrelation avec la voie IFN de type I, tels que l'autophagie et l'apoptose. A l'image de ce qui a été fait concernant les interactions entre le FMDV et la voie interféron, de plus en plus d'études portant sur les interactions entre les protéines virales et les protéines impliquées dans les mécanismes d'autophagie sont publiées. L'autophagie est un processus hautement conservé parmi les eucaryotes, constitutivement impliqué dans la dégradation partielle et dans le recyclage des constituants du cytosol et des organites (292). Il existe trois voies distinctes de l'autophagie, à savoir l'autophagie coordonnée par des protéines chaperonnes responsables de l'adressage de protéines du cytosol vers le lysosome, la micro-autophagie induisant la dégradation de fragments du cytosol par invagination de la membrane du lysosome et la macro-autophagie, forme principale aussi appelée autophagosome (293,294). La macro-autophagie repose sur l'englobement de constituants, devenus inutiles à la cellule, dans des vésicules à double membrane, nommés autophagosomes (Figure 11). Ceux-ci fusionnent ensuite avec des lysosomes afin de former des autolysosomes où se produit la dégradation. Cette forme d'autophagie est notamment connue comme pouvant être stimulée lors de la détection de certains pathogènes par les senseurs immunitaires de l'hôte.



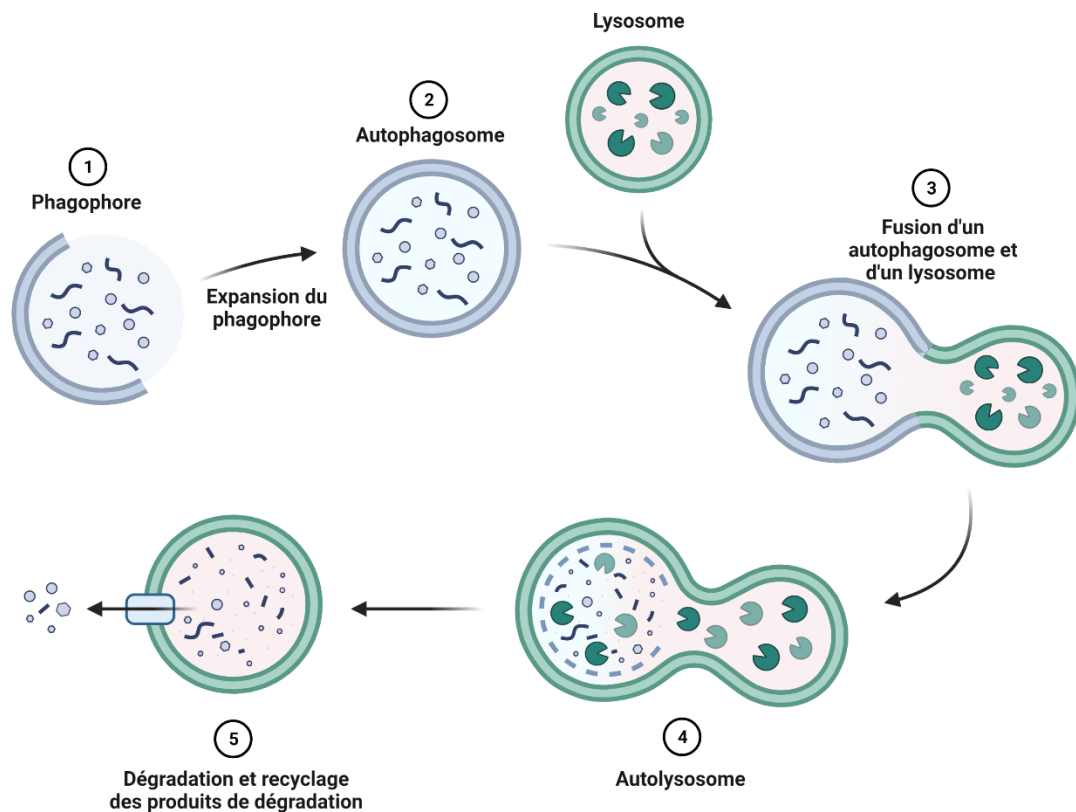


Figure 11 : **Principe de fonctionnement de la macro-autophagie.**

Cette forme principale de l'autophagie repose sur l'englobement de constituants cellulaires inutiles dans des autophagosomes. Après fusion avec de ces derniers avec des lysosomes, les constituants cellulaires sont dégradés dans des autolysosomes avant d'être recyclés. Créé avec Biorender.com

L'autophagie constitue ainsi un des moyens majeurs de dégradation des virus, mis en place dans le cadre de la réponse immunitaire innée lors des phases précoces de l'infection (295,296). Il a par exemple été démontré chez le porc que la protéine DNAJA3 (*DnaJ homolog subfamily A member 3*) était capable d'inhiber la réplication du FMDV en induisant la dégradation de VP1 par la voie du lysosome (297). De même, la vimentine associée aux RE, a été décrite comme capable d'inhiber la réplication virale en bloquant l'activité de la protéine virale 3A (298). L'une des preuves les plus évidentes dénotant de l'importance de l'autophagie dans la réponse antivirale est probablement le nombre important de mécanismes d'évasion et de subversion développés par les virus pour y échapper. C'est notamment le cas des picornavirus et particulièrement du FMDV, pour lesquels de nombreuses interactions entre leurs protéines virales et les protéines de



l'autophagie sont décrites (299). Il semblerait même que certaines de ces interactions soient essentielles à la réplication virale. En effet, d'important faisceaux de présomption existent au sujet du lien entre la formation des complexes de réplication des picornavirus et l'autophagie. Il a ainsi été mis en évidence par Gladue *et al.* que la protéine 2C du FMDV, impliquée dans le remodelage des membranes de l'hôte, était capable d'interagir avec la protéine Beclin-1 (300). De cette interaction physique résultent deux conséquences majeures, à savoir une stimulation de l'activité d'initiation des autophagosomes médiée par Beclin-1, et une inhibition de son rôle dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Le remodelage membranaire associé à l'augmentation du nombre d'autophagosomes produits, permet au virus de s'abriter au sein de ces organelles, tandis que le blocage de la fusion des autophagosomes aux lysosomes empêche la dégradation des virus qui y sont contenus. L'interaction entre L_{pro} et TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) pourrait également intervenir dans la formation des complexes de réplication (301). En effet, le clivage de TBK1 médié par la protéase virale pourrait bloquer l'activité kinase de TBK1 et ainsi empêcher la phosphorylation de la protéine d'autophagie LC3 (*Microtubule-associated protein 1 light chain 3*), impliquée dans la maturation des autophagosomes. D'autres interactions peuvent également faciliter la réplication du FMDV telles que 3A-LRRC25 (*Leucine-rich repeat-containing protein 25*), 3C-ATG5 (*Autophagy related 5*) et ATG12 ou encore VP2- eIF2 α -ATF4 (*Activating transcription factor 4*) (68,302,303).

Il paraît à travers ces quelques exemples que, tout comme la voie IFN de type I, les mécanismes de l'autophagie peuvent tantôt être favorables à la réplication et à la prolifération du FMDV et tantôt lui être défavorables. Les interactions protéiques entre le FMDV et la cellule hôte permettent ainsi la mise en place d'un système de



modulation particulièrement fin afin de permettre au virus de se développer sans entraîner ni mort cellulaire trop rapide, ni réponse immunitaire trop massive.

Apoptose

Un constat similaire peut être fait au sujet des mécanismes de mort cellulaire programmés tels que l'apoptose (299). En effet, ce phénomène hautement conservé au cours de l'évolution, reposant sur la dégradation progressive des cellules par des caspases, est impliqué dans la réponse antivirale de l'hôte, à des phases plus tardives de l'infection par rapport à l'autophagie. Il est parfaitement adapté à la lutte contre les agents pathogènes puisqu'il n'induit pas le déversement du contenu cellulaire vers l'extérieur, évitant ainsi l'activation de l'inflammation et la propagation des pathogènes présents dans la cellule (304). Cependant, même si la littérature n'est pas très fournie à ce sujet, le FMDV, comme de nombreux autres virus, a su développer des mécanismes de subversion de l'apoptose qui lui sont très utiles. Le FMDV se sert notamment du phénomène d'apoptose pour induire la dégradation de multiples protéines cellulaires possédant un effet néfaste pour sa réplication. Ainsi, la dégradation de MAVS (*Mitochondrial Antiviral Signalling protein*), protéine clé de la réponse IFN de type I, est dégradée par un mécanisme ubiquitine-dépendant suite à l'interaction entre le précurseur VPO et PCBP2 (*Poly(rC)-binding Protein 2*) (305). Il en est de même pour la dégradation de DDX21 (*Nucleolar RNA helicase 2*) médiée par 2B (306). De manière intéressante, il a été montré que lorsque sa dégradation est médiée par 2C ou 3C, et non 2B, DDX21 est éliminée par la voie de l'autophagie, montrant la complémentarité de ces différentes voies cellulaires. A l'inverse, il arrive que le FMDV bloque l'activation de l'apoptose lorsque celle-ci ne lui est pas favorable. C'est notamment le cas de l'interaction de VP4 et de 2B avec NME1 (*Nucleoside diphosphate kinase A*), qui a pour



but d'empêcher la stimulation de l'activité pro-apoptotique du facteur p53 médiée par NME1, en induisant la dégradation de ce dernier par la voie du lysosome (307). A l'image de son rôle dans la subversion de la réponse IFN de type I et de l'autophagie, la protéine 2C du FMDV agit également comme un régulateur majeur de l'apoptose, notamment *via* son interaction avec Nmi (*N-myc and STAT interacting*), responsable de l'induction de l'apoptose (308). Cette protéine semble ainsi occuper un rôle global dans l'instauration d'un équilibre entre le FMDV et son hôte.

ii. Immunité adaptative

Lors d'une infection, la réponse immunitaire innée se prolonge par la mise en place de l'immunité adaptative notamment activée par la réponse inflammatoire de l'hôte et la détection de pathogènes par les TLR (*Toll-Like Receptors*) (309). Dans le cas d'une infection par le FMDV, la réponse humorale est rapidement déclenchée, aboutissant à la production d'anticorps dirigés spécifiquement contre le virus. Chez les bovins, l'infection se traduit par la production d'IgM anti-FMDV dès trois jours post-infection au niveau du ganglion lymphatique (310). Cette production rapide fait des IgM le principal composant de l'activité neutralisante durant les premiers jours de l'infection. La concentration de ces anticorps circulants, synthétisés par les lymphocytes B, est maximale entre quatre et quatorze jours post-infection, puis décline jusqu'à revenir à un niveau basal après plus de cinquante jours post-infection. Des quantités importantes d'IgG, notamment des IgG1 et IgG2, peuvent également être détectées à partir de quatre jours post-infection. La concentration maximale de ces anticorps sécrétés par les plasmocytes est atteinte après quatorze jours chez les bovins (311,312). Comme c'est le cas pour la plupart des infections, la détection du FMDV par l'organisme entraîne une production plus tardive d'IgA, immunoglobulines à l'action locale, principalement situées au niveau des muqueuses. Les IgA ne sont ainsi détectées qu'à partir de sept jours lors d'une infection par le FMDV (313). Le pic de



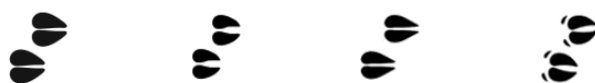
production d'IgA est généralement associé au pic d'IgG, puis décline progressivement. Il est intéressant de noter qu'un second pic de production d'IgA a été décrit après vingt-huit jours post-infection chez les animaux infectés de manière persistante, signe que l'immunité adaptative pourrait également être modulée par le virus pour assurer le maintien de l'infection persistante (314). De nombreux travaux portant sur les interactions entre le FMDV et l'immunité adaptative ont été menés. Il a ainsi été démontré que le FMDV pouvait échapper à la réponse immunitaire de l'hôte en inhibant l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺). Cette inhibition est due, d'une part, à l'infection non lytique de cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages et les cellules dendritiques (290,315,316). Ces cellules impliquées dans la transition entre l'immunité innée et l'immunité adaptative, sont connues comme pouvant être détournées et pouvant servir de structures de réplication à certains virus dont le FMDV (317). L'infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes, cellules produisant de grandes quantités d'IFN α , semble être facilitée par une faible concentration d'anticorps spécifiques (318). En effet, il a été montré que lors de la phase précoce de l'infection, le niveau d'anticorps spécifiques du FMDV est trop faible pour induire une protection contre le virus mais suffit à son opsonisation par les cellules dendritiques, nécessaire à l'infection (319,320). Le FMDV est ainsi capable de perturber la réponse immunitaire médiée par les cellules présentatrices d'antigènes, entraînant une immunité sous-optimale et un retard des réponses spécifiques par les lymphocytes, favorisant de fait sa réplication (321). Un rôle des cellules dendritiques et macrophages infectés dans la dissémination du FMDV a également été mis en évidence lors de leur circulation dans l'organisme de l'hôte (315). L'infection des monocytes par le FMDV induit également une stimulation de la production d'interleukines-10 (IL-10) (86,322). La sécrétion d'IL-10 est à l'origine d'une réduction de l'activité des lymphocytes T et semble impliquée dans la



lymphopénie observée lors des phases précoces de l'infection (323). En effet, il a été montré lors d'infections expérimentales chez la souris, que le taux d'IL-10 était corrélé à la diminution de la quantité de lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) et CD8⁺, de lymphocytes B et de cellules NK (324). Ces travaux ont également mis en lumière le fait que la quantité d'IL-10 et de lymphocytes étaient associés à la gravité des signes cliniques observés chez les souris. Ce constat peut notamment être expliqué par la facilitation de la propagation systémique du virus due à la lymphopénie. La stimulation de la production d'IL-10 induit également l'inhibition du CMH-II, complexe occupant une place prépondérante dans le déclenchement des réponses immunitaires de l'hôte, la clairance virale et l'induction d'une immunité protectrice (325).

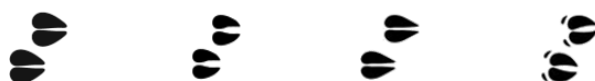
D'autre part, le FMDV est capable d'induire l'inhibition de l'activité des lymphocytes T en les infectant, créant de fait un état immunosuppresseur permettant au virus de se répliquer (326). Tandis qu'il a été montré que le sérotype C du FMDV était capable d'infecter puis d'induire la lyse des lymphocytes, plusieurs souches du sérotype O n'ont pas permis la mise en place d'une infection productive (327). Les mêmes observations ont été rapportées au sujet des lymphocytes B. L'activité des lymphocytes T est également perturbée suite au blocage du système de sécrétion du CMH-I médié par les protéines virales 2B et 2C (93). En effet, le récepteur situé sur la membrane des cellules T reconnaît les antigènes se liant aux molécules du CMH-I. Le blocage du CMH-I empêche ainsi la reconnaissance des cellules présentatrices d'antigènes nécessaire à la destruction des cellules infectées (328).

Le blocage du CMH-I par le FMDV au cours de l'infection est par ailleurs responsable de l'activation de cellules NK (329). Ces cellules, à l'interface entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative, produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ ainsi que des molécules cytolytiques comme la perforine, induisent l'apoptose des cellules infectées et interagissent avec les cellules



dendritiques afin d'influencer la polarisation des lymphocytes T (330). En revanche, il a été démontré chez le porc que les cellules NK deviennent peu à peu dysfonctionnelles lors d'une infection par le FMDV. Ainsi, au stade aiguë de l'infection, l'activité pro-inflammatoire et cytolytique des cellules NK est presque entièrement inhibée suite à une interruption de la production de cytokines et de perforine, tandis que la sécrétion d'IFN γ est fortement réduite (331). De plus, il a été montré que l'inhibition des cellules NK par le FMDV était corrélée à une augmentation des titres viraux, démontrant ainsi l'importance de ce phénomène dans l'échappement du virus à l'immunité innée et adaptative (332).

A l'image des interactions entre le FMDV et la réponse immunitaire innée, les divers mécanismes de subversion de la réponse immunitaire adaptative pourraient également participer à l'établissement et au maintien de la persistance virale dans l'organisme de l'hôte. Il est ainsi envisageable, lors d'une infection persistante, que le virus survive et se réplique à bas bruit dans les cellules de l'immunité telles que les macrophages ou les lymphocytes afin d'échapper aux senseurs immunitaires. De tels phénomènes pourraient notamment être localisés dans les MALT et plus particulièrement aux tissus lymphoïdes associés au nasopharynx (NALT, pour *Nasopharyng-associated lymphoid tissue*) (263,323,333). Les MALT sont des tissus localisés à proximité des épithéliums et composés d'une grande quantité de lymphocytes T et B, ainsi que de plasmocytes et de macrophages, où du FMDV persistant a déjà été détecté (207,334).



IV. Méthodes de lutte contre la fièvre aphteuse



Figure 12 : **Prophylaxie de la fièvre aphteuse.**
De Sarry et al. 2022. (232). Créé avec Biorender.com.

1) Prophylaxie sanitaire

a) Coordination internationale

La lutte contre la fièvre aphteuse s'articule en grande partie autour d'un réseau de lutte à différentes échelles : internationale, continentale, nationale et régionale. Le partage d'informations en temps réel et la coordination des moyens de lutte contre la fièvre aphteuse au niveau international sont régis par l'OMSA et la FAO. Afin de faciliter les échanges et l'harmonisation des méthodes de diagnostic à travers le monde, ces deux organisations ont mis en place, en 2004, un réseau des Laboratoires de Référence pour la fièvre aphteuse (*OMSA/FAO FMDV Reference Laboratories*) regroupant seize laboratoires centraux basés au Canada, aux Etats-Unis, au Brésil, en Argentine, au Botswana, en Afrique du Sud, en Chine, en Corée du Sud, en Inde, en Thaïlande, en



Russie, en Italie, au Royaume-Uni, aux Pays-Bas, en Belgique et en France, ainsi que six laboratoires affiliés situés en Turquie, au Sénégal, au Nigéria, en Ethiopie, au Kenya et en Australie (335). La fièvre aphteuse fait partie des maladies répertoriées dans la Liste des maladies majeures de l'OMSA et doit faire l'objet de notifications obligatoires auprès de l'organisation lorsqu'elle est détectée dans un des pays membres. De plus, l'OMSA a établi une procédure permettant la reconnaissance officielle du statut indemne des pays membres vis-à-vis de la maladie. Un pays n'ayant pas recensé de cas de fièvre aphteuse durant une période définie et étant en capacité de prouver l'existence d'un réseau de surveillance et de contrôle adapté peut ainsi déposer un dossier auprès des autorités compétentes afin de voir son statut indemne être officiellement reconnu. Alors qu'une centaine de pays ne sont pas encore exempts de fièvre aphteuse, l'OMSA, associée à la FAO, a dévoilé en 2009 un plan de lutte visant à éradiquer la maladie au niveau mondial sur le modèle du programme d'éradication de la peste bovine déjà mis en place (188). Dans cette optique, les deux organisations ont notamment participé à l'amélioration des services vétérinaires, à la mise en place de financements, à l'instauration de stratégies de vaccination ainsi qu'à la construction de laboratoires et d'unités de production de vaccins dans les pays du sud (336). Dans la plupart des cas, la production de vaccins n'a cependant pas perduré du fait d'un manque de financements nationaux et de soucis structurels. Face aux nombreux obstacles rencontrés, la politique mondiale contre la fièvre aphteuse affiche désormais l'ambition de contrôler efficacement la maladie avant de pouvoir l'éradiquer complètement. D'autres réseaux collaboratifs tels que l'alliance globale pour la recherche contre la fièvre aphteuse (GFRA, pour *Global Foot-and-Mouth Research Alliance*), fondée en 2003 par le département de l'Agriculture des Etats-Unis, participent également activement à la lutte contre cette maladie.



Des réseaux régionaux sont également impliqués dans la coordination de la lutte contre la fièvre aphteuse. C'est notamment le cas de la commission européenne de contrôle et de lutte contre la fièvre aphteuse (EuFMD, pour *European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*), fondée en 1954 par la FAO et aujourd'hui administrée par la Commission Européenne. L'EuFMD, comptant trente-neuf pays membres, joue un rôle majeur dans la réduction des risques d'introduction de la fièvre aphteuse et d'autres maladies transfrontalières, dans la préparation à la gestion d'épizooties et dans l'approvisionnement en vaccins efficaces, renforçant ainsi la stratégie de lutte mondiale *via* l'organisation de formations et le financement de projets de recherche (337). Au niveau national, l'EuFMD est soutenue par les Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) qui exercent des activités d'épidémiologie, de diagnostic et de recherche au sujet de la fièvre aphteuse et des maladies apparentées.

b) Epidémiologie et contrôle des importations

Que ce soit à l'échelle internationale, régionale ou nationale, les laboratoires de référence sont impliqués dans la production et le partage de données épidémiologiques. Cette surveillance constitue un point majeur dans la lutte globale menée contre la fièvre aphteuse puisqu'elle permet de distinguer les zones indemnes des zones affectées par la maladie (338). La connaissance des zones à risques permet notamment d'adapter la stratégie concernant les importations d'animaux vivants ou de produits d'origine animale. Des dispositions peuvent ainsi être prises, allant d'une demande de sérologie négative avant import, à un embargo total, en passant par une mise en quarantaine des importations, en fonction du niveau de risque associé au pays d'origine et à la nature de l'import (28,339). Dans le cas de l'import de bétail, source à risque élevé de contamination, une période de quarantaine doit généralement être respectée avant qu'il ne soit intégré à un troupeau. Les études épidémiologiques



menées permettent également de connaître les souches de virus circulant à travers le monde. Ces connaissances sont primordiales à l'adaptation des stratégies de vaccination dans les régions endémiques étant donné l'absence d'immunité croisée entre les différents sérotypes du FMDV (340) (*cf.* Vaccination). Elles permettent également une meilleure compréhension des dynamiques d'évolution et de déplacement des différentes souches virales. Comme pour de nombreux autres pathogènes, il est ainsi possible de corrélérer l'émergence ou la réémergence de certaines souches dans certaines régions à des facteurs humains ou encore géographiques, constituant le socio-pathosystème (341,342).

En cas d'introduction de fièvre aphteuse dans un pays indemne, l'épidémiosurveillance joue également un rôle très important (343). En effet, lorsqu'elle est associée à une identification et à une traçabilité efficace des animaux, elle permet généralement de retrouver l'origine de l'introduction ainsi que les animaux ayant été en contact récent avec le foyer identifié, permettant, de fait, une prise en charge rapide de ces derniers (344).

2) Gestion des cas de suspicion

a) Protocole d'alerte en cas de suspicion

En cas de suspicion d'un cas de fièvre aphteuse sur le territoire français, l'éleveur, sensibilisé aux risques liés à la maladie, est tenu de contacter son vétérinaire de proximité et de lui faire part de sa suspicion (Figure 13). Le praticien doit alors prendre des mesures de biosécurité pour pénétrer dans l'exploitation, effectuer un examen clinique des animaux et prévenir en urgence les Services vétérinaires *via* leur numéro d'urgence. Ces derniers, en collaboration avec un vétérinaire spécialiste, membre de la cellule d'alerte, décident ensuite de confirmer ou d'infirmer la suspicion clinique. Dans le cas où la suspicion est confirmée, l'exploitation concernée est immédiatement placée



sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance. De plus, une zone de contrôle temporaire peut être mise en place aux alentours de l'exploitation pendant soixante-douze heures. Le vétérinaire praticien recense alors toutes les espèces animales présentes au sein de l'exploitation et réalise les prélèvements nécessaires au diagnostic de la fièvre aphteuse. Pour les animaux présentant des signes cliniques, les échantillons préférentiels sont le liquide vésiculaire et l'épithélium provenant de vésicules non rompues (261). Dans le cas contraire, des échantillons de salive, de lait ou de sérum ainsi que des écouvillons pharyngés peuvent être récoltés. Si de jeunes animaux sont décédés au sein de l'exploitation concernée, il est également possible de prélever leur muscle cardiaque. Des travaux récents, relatifs à la nouvelle Loi de Santé Animale parue en 2021, ont indiqué que pour une efficacité maximale, les prélèvements doivent porter principalement sur les animaux présentant des signes cliniques de la fièvre aphteuse (345). Il a été estimé que, pour détecter un animal infecté au sein d'un troupeau naïf, à un intervalle de confiance de 95%, le prélèvement d'épithélium provenant de lésions d'au moins quatre animaux est nécessaire chez le bovin et le porc, contre sept à huit prélèvements chez les ovins et les caprins. Une fois les prélèvements réalisés, ils doivent être envoyés au plus vite vers le LNR pour l'établissement d'un diagnostic. Le FMDV étant sensible à la température et surtout aux pH acides et basiques, les échantillons doivent être réfrigérés et transportés dans un milieu tamponné à pH 7.2-7.6 spécifique (346). Conformément aux règles de biosécurité en vigueur, les échantillons potentiellement infectés doivent être transportés dans un triple emballage dans des conteneurs dédiés et doivent être acheminés par des transporteurs agréés (347).



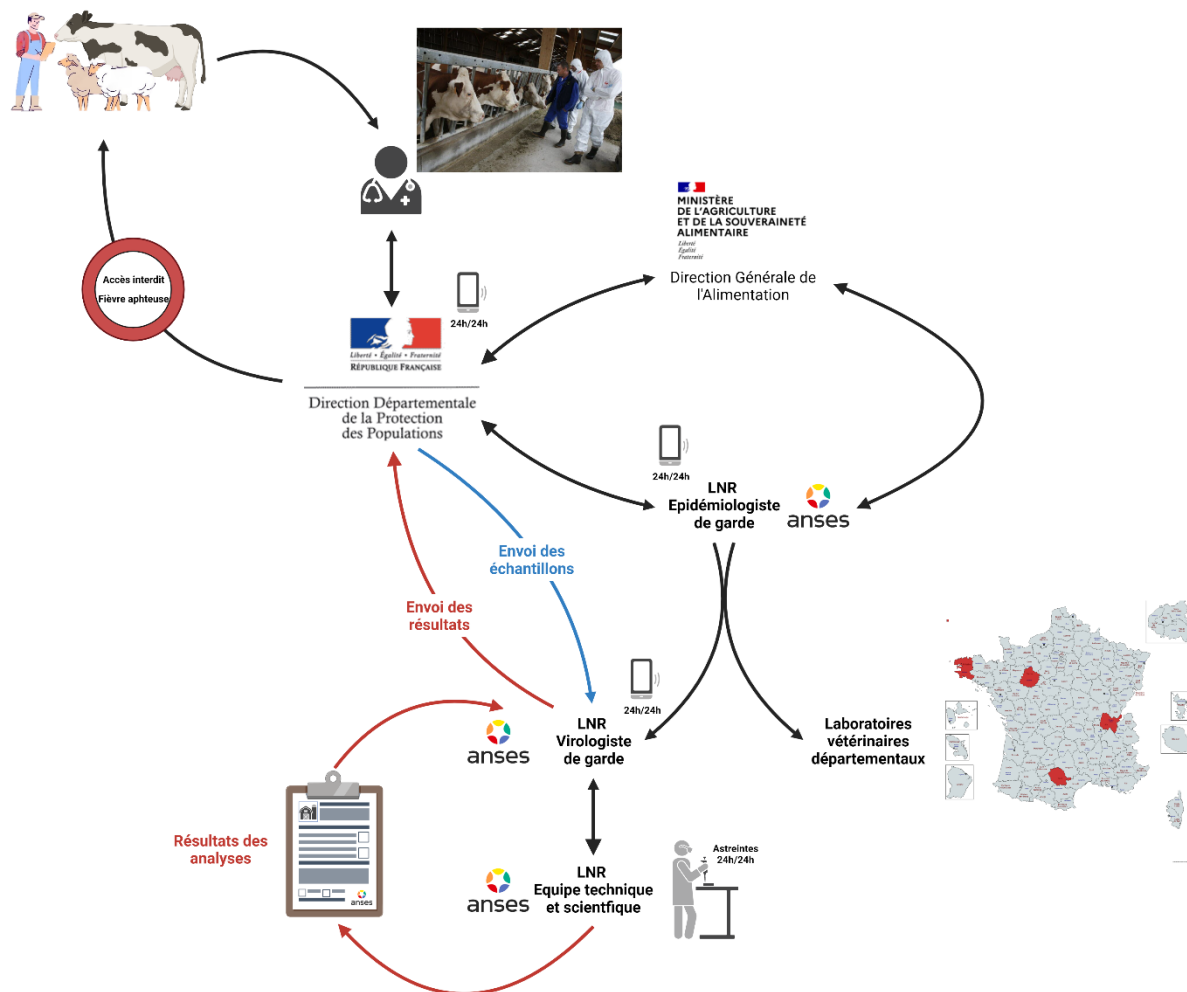


Figure 13 : **Dispositif d'alerte français en cas de suspicion de fièvre aphteuse.**
 LNR : laboratoire national de référence. Adapté de Sarry et al. 2022 (232). Créé avec Biorender.com.

b) Méthodes de diagnostic

i. Diagnostic de terrain

Bien que le diagnostic clinique ne soit pas suffisant pour confirmer un cas de fièvre aphteuse, le terrain reste une source d'informations non négligeable. En effet, l'identification de signes cliniques tels qu'une baisse de la production laitière, un affaiblissement de l'animal associé à une hyperthermie, une hypersalivation, une boiterie, et l'apparition d'aphtes sont des signes évocateurs de la fièvre aphteuse. Ces manifestations cliniques peuvent toutefois être dus à d'autres maladies similaires pour lequel le diagnostic différentiel ne peut être réalisé qu'en laboratoire. Il existe ainsi



plusieurs maladies pouvant ressembler cliniquement à la fièvre aphteuse, telles que la stomatite vésiculeuse, l'exanthème vésiculeux, la maladie vésiculeuse du porc ou encore une infection au SVV. Le diagnostic clinique peut également permettre la datation des lésions, information pouvant se révéler extrêmement utile dans la détermination de l'origine de l'infection (348). La connaissance de cas de fièvre aphteuse dans les exploitations à proximité ou en relation avec les animaux suspectés, additionnée aux signes cliniques de la maladie peut aider à poser le diagnostic avant même la réalisation des analyses en laboratoire. En cas de mortalité chez les jeunes animaux, l'autopsie peut se révéler être un excellent moyen de diagnostic de la fièvre aphteuse. En effet, les lésions cardiaques associées à l'infection chez les jeunes ruminants sont assez spécifiques à la fièvre aphteuse (349).

En outre, il existe également des outils de diagnostic pouvant être utilisés directement sur le terrain. En effet, l'utilisation de tests de détection rapides permet d'obtenir, directement à la ferme, une indication quant à la présence ou l'absence de FMDV dans un troupeau (350). La facilité de transport et le coût relativement limité de ces tests rapides par rapport aux analyses en laboratoire rend notamment possible leur utilisation dans des zones reculées depuis lesquels le transport d'échantillons n'est pas toujours aisé. Ces tests ne présentent toutefois pas la sensibilité suffisante pour établir un diagnostic définitif et doivent être complétés par des analyses approfondies. De plus, Romey *et al.* ont montré que ces dispositifs de test rapide, chargés avec un échantillon positif pour la fièvre aphteuse, peuvent être ensuite inactivés par immersion dans de l'acide citrique, rendant ainsi possible leur envoi à moindre coût vers les laboratoires de référence (351).

ii. Diagnostic en laboratoire

Une fois les échantillons acheminés vers le laboratoire de référence national, ils sont pris en charge en urgence 24h/24 et 7j/7. Le diagnostic de la fièvre aphteuse repose à



la fois sur un diagnostic virologique, moléculaire et sérologique et dépend grandement de la nature et de la qualité des prélèvements (352). Dans le cas où ces derniers ont été réalisés et transportés de manière optimale, le diagnostic en laboratoire est très rapide. En effet, les premiers résultats préliminaires peuvent être fournis en moins de six heures. Ces résultats préliminaires reposent principalement sur la détection d'ARN viral par RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) en temps réel. Cette méthode sensible et spécifique permet de détecter le génome de tous les sérotypes du FMDV (353). La recherche d'ARN viral est complétée par la détection des protéines virales par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de capture d'antigène permettant l'identification du sérotype de manière assez rapide (354,355). Des isollements viraux sur cellules sensibles peuvent également être réalisés afin de déterminer la présence ou non de virus infectieux (356). Ainsi, si du virus infectieux est présent dans les échantillons à analyser, il se réplique dans les cellules, induisant un effet cytopathique (ECP) visible entre six et quarante-huit heures post inoculation. En fonction de la charge virale de l'échantillon, un deuxième passage sur cellules peut être réalisé. Après isolement, la présence de FMDV est confirmée par rtRT-PCR et/ou ELISA de capture antigène. Une fois la présence de FMDV confirmée, il est nécessaire de caractériser la souche à l'origine de l'infection. Pour cela, des RT-PCR sérotype-spécifiques sont réalisées en association à du séquençage et à une analyse phylogénétique. Le séquençage du gène VP1 permet notamment de déterminer le sérotype ainsi que le topotype de la souche virale (357). Les animaux infectés peuvent également être identifiés par la détection d'anticorps dirigés contre les protéines non structurales par test ELISA (358,359). Des tests de séroneutralisation peuvent également être effectués sur cellules sensibles afin de vérifier si des anticorps présents dans le sérum testé bloquent la réplication virale. Si tel est le cas, aucun ECP n'est observé. Ordinairement, ces différents types de méthodes de diagnostic sont associés



afin de garantir une détection optimale et la caractérisation moléculaire de la souche identifiée (360).

c) Dispositif de lutte en cas d'épizootie

Au sein des pays membres de l'OMSA, lorsqu'un cas de fièvre aphteuse est confirmé après diagnostic en laboratoire, il doit être déclaré aux autorités compétentes. Le pays concerné doit également mettre en place un plan d'urgence adapté pour faire face à la maladie. Le plan d'urgence est propre à chaque pays. Cependant, au sein de l'Union Européenne, des mesures minimales à mettre en place sont définies dans la Loi de Santé Animale parue en 2021. Ainsi, en France, si un cas est confirmé, tous les animaux sensibles de la propriété sont abattus sur place. Ceux-ci sont ensuite envoyés à l'équarrissage, puis les cadavres sont incinérés ou enfouis avec de la chaux pour réduire au maximum les risques de contamination. L'éleveur, qui sera indemnisé par l'état pour les pertes subies, doit immédiatement procéder à une désinfection totale de son exploitation, qui sera suivie par une autre désinfection une fois l'exploitation entièrement nettoyée et une troisième quinze jours après. Dès la déclaration du cas effective, une zone réglementée est mise en place par la préfecture autour du foyer, comprenant une zone de protection de trois kilomètres de rayon à l'intérieur de laquelle aucun mouvement, ni humain ni animal, n'est autorisé, ainsi qu'une zone de surveillance de sept kilomètres de rayon dans laquelle les rassemblements ainsi que la sortie d'animaux sont interdits. Si d'autres foyers sont déclarés à proximité, la zone réglementée est étendue tandis que des mesures complémentaires peuvent être appliquées. Il est ainsi possible de procéder à la dépopulation préventive des espèces sensibles ayant un lien géographique ou épidémiologique avec les foyers détectés ou à la vaccination en anneau autour des foyers avec des vaccins DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) hautement purifiés, permettant de différencier les



animaux vaccinés des animaux infectés. L'OMSA propose plusieurs stratégies pour l'éradication de la fièvre aphteuse, reposant sur un abattage sanitaire strict tel qu'utilisé au Royaume-Uni en 2001, un abattage sanitaire associé à une vaccination d'urgence suivie de l'abattage des animaux vaccinés comme ce fut le cas au Japon en 2010, un abattage sanitaire associé à une vaccination d'urgence tel que cela é été le cas en Corée du Sud en 2010 et 2011, ou encore une vaccination d'urgence sans abattage comme ce fut le cas en Equateur en 2011 (361–364). Les stratégies de lutte impliquant la vaccination d'urgence sont rarement utilisées dans les pays occidentaux, notamment ceux de l'Union Européenne puisque le statut indemne vis-à-vis de la fièvre aphteuse ne peut être recouvré qu'au moins six mois après la fin du protocole de vaccination ou trois mois après l'abattage du dernier animal vacciné, ce qui représente une période plus longue que les trois mois suivant le dernier cas confirmé en cas d'éradication sans recours à la vaccination.

3) Vaccination

La vaccination n'est plus pratiquée, voire plus autorisée, dans la plupart des pays possédant le statut indemne de fièvre aphteuse. Elle constitue cependant un moyen de lutte largement répandu dans les pays touchés de manière endémique ou sporadique, et désireux de lutter contre cette maladie.

Le vaccin dirigé contre la fièvre aphteuse, parmi les premiers vaccins développés en santé animale, consiste traditionnellement en un virus inactivé (365). La mise au point d'un tel vaccin repose notamment sur les travaux de Vallée, Carré et Rinjard, qui, dès 1926, ont démontré que les virus provenant d'épithéliums linguaux de bovins infectés pouvaient être inactivés par traitement au formol (366). Ces travaux, couplés à ceux de Schmidt portant sur l'adsorbabilité du FMDV sur hydroxyde d'aluminium, ainsi qu'à ceux de Waldmann et Köbe au sujet de l'immunisation active des bovins contre la fièvre



aphteuse, ont permis d'obtenir un virus inactivé au formol, adsorbé sur hydroxyde d'aluminium et chauffé, pouvant servir à l'immunisation du bétail (367,368).

Au cours du XX^e siècle, plusieurs épizooties ont pu être directement rattachées à des souches vaccinales incomplètement inactivées (369). Afin de pallier ce problème d'inactivation, le formol a été remplacé par l'éthylèneimine binaire (BEI, pour *Binary Ethylenimine*) plus efficace (370). L'utilisation de ces vaccins, produits en cellules de hamster, a grandement permis d'endiguer la prolifération de la fièvre aphteuse. Alors que l'immunité conférée par les vaccins adsorbés sur hydroxyde d'aluminium était satisfaisante chez les bovins ainsi que chez les petits ruminants, des difficultés ont été rapportées concernant le contrôle des foyers de fièvre aphteuse chez les porcs, notamment en Allemagne et aux Pays-Bas (371). De nouvelles méthodes d'adjuvantation ont alors été testées telles que l'émulsion d'eau dans l'huile, conférant une protection satisfaisante chez le porc et les ruminants (372,373). Aujourd'hui encore, la plupart des vaccins dirigés contre la fièvre aphteuse commercialisés dans le monde consistent en des virus inactivés au BEI, plus ou moins purifiés, et adjuvantés (374). La purification des vaccins consiste à concentrer les particules virales et à éliminer les protéines non structurales du FMDV (261). Cette étape est nécessaire à la distinction des animaux vaccinés par rapport aux animaux naturellement infectés et ne présentant pas de signes cliniques (concept DIVA) (375). Cette distinction repose sur l'utilisation de tests sérologiques permettant la détection des anticorps dirigés contre les protéines non structurales, notamment le précurseur 3ABC (376). Ainsi, seuls les vaccins hautement purifiés garantissent une distinction ultérieure entre un animal vacciné, présentant uniquement des anticorps dirigés contre les protéines structurales du FMDV, et un animal infecté, présentant à la fois des anticorps dirigés contre les protéines structurales et non structurales du virus.



La faible conservation intersérotypique, voire intrasérotypique des épitopes du FMDV, à l'origine de l'absence de protection croisée entre les différents sérotypes, implique une adaptation constante des vaccins aux souches de terrain (377). En effet, si la plupart des vaccins commercialisés sont des vaccins multivalents, *i.e.* composés de plusieurs souches virales, leur nombre reste limité. La surveillance épidémiologique constitue ainsi un facteur primordial dans l'élaboration d'une stratégie vaccinale adaptée. Il existe également des analyses sérologiques de concordance vaccinale (*Vaccine matching* en anglais), reposant notamment sur des test ELISA réalisés à partir d'isolats de terrain visant à déterminer quelles souches vaccinales devraient être utilisées sur un territoire donné (378). Lors de l'incursion d'une nouvelle souche, et *a fortiori* d'un nouveau sérotype dans une région, comme ce fut le cas du sérotype SAT2 détecté pour la première fois en Iraq et en Jordanie début 2023, la capacité de réaction des pouvoirs publics et des producteurs de vaccins est essentielle afin d'endiguer l'épizootie en déterminant les souches vaccinales à utiliser et en les distribuant au plus vite (21).

Bien que la vaccination contre la fièvre aphteuse, en association avec d'autres méthodes de lutte, ait contribué à l'éradication de la maladie dans de nombreuses régions du globe, les vaccins couramment utilisés présentent des limites non négligeables (379). En effet, si la vaccination prévient l'apparition des manifestations cliniques, elle n'empêche pas complètement une surinfection et la multiplication du virus dans l'organisme hôte, et n'impacte pas l'établissement d'une infection persistante (66,380). Elle ne bloque pas non plus les phénomènes de recombinaison et d'encapsidation hétérologue à l'origine de nouveaux variants pouvant potentiellement échapper aux anticorps vaccinaux (132,134). Par ailleurs, il a été montré que les vaccins actuellement utilisés n'induisent qu'une réponse immunitaire incomplète. En effet, alors que des IgA, IgM et IgG spécifiques du FMDV sont rapidement détectés dans le



sérum d'un animal infecté, la vaccination n'entraîne qu'une réponse IgM et IgG et pas de réponse IgA, signe d'une immunité mucoale déficiente (310,313). En attendant de développer des vaccins induisant une réponse immunitaire complète, il a été suggéré de se servir de l'absence d'IgA chez les animaux vaccinés afin de différencier les animaux vaccinés des animaux porteurs du virus. Ainsi, la recherche d'IgA salivaires spécifiques du FMDV dans la salive des bovins pourrait permettre de détecter les animaux infectés de manière persistante parmi les populations vaccinées, tout en s'affranchissant des problèmes de suivi sérologique liés à l'utilisation de vaccins non purifiés (381). L'absence de réponse IgA ne semble pas être le seul facteur induisant une réponse immunitaire incomplète chez les animaux vaccinés. En effet, il a également été montré que, chez les bovins, les vaccins traditionnels ne stimulent pas l'activité cytolytique des cellules NK, qui occupent pourtant un rôle important dans la réponse naturelle au FMDV (330). Enfin, les vaccins actuellement commercialisés, bien que globalement efficaces dans la lutte contre la fièvre aphteuse, n'induisent qu'une immunité à court terme (382). En effet, la plupart des vaccins nécessitent un rappel annuel, voir pluriannuel selon la qualité du produit et le contexte sanitaire.

De nombreux essais de développement de nouveaux adjuvants ainsi que de vaccins innovants ont été menés et sont encore réalisés à travers le monde, portant sur l'utilisation de virus inactivés, de virus vivants atténués, de virus tronqués, de virus chimériques, de vaccins ADN, de vaccins ARN, de vaccins vectorisés, de peptides viraux, de particules pseudovirales (VLP, pour *Virus-Like Particle*) ou encore de vaccins « marqueurs » (66,379,383–388). Pour l'heure, aucune de ces études n'a permis de répondre à l'ensemble des besoins liés à la vaccination contre la fièvre aphteuse, à savoir l'induction d'une réponse immunitaire forte et rapide afin de limiter l'apparition des signes cliniques et la propagation du virus, l'induction d'une réponse immunitaire complète, spécifique et durable capable d'entraîner une réponse IgA et la



stimulation des cellules NK. Le vaccin idéal devrait également permettre de bloquer la multiplication du virus dans l'hôte et l'établissement d'infections persistantes. Il se doit également d'être sans risque, immunogène pour toutes les espèces d'intérêt, rapide à produire en grande quantité, peu coûteux, adapté à un stockage sur le terrain, facile à administrer et permettant la différenciation des animaux vaccinés vis à vis des animaux naturellement infectés (374,380).

Au regard des difficultés rencontrées dans la mise au point d'un vaccin répondant à tous les besoins énoncés, de nombreuses études ont été entreprises afin de développer des traitements antiviraux à visée curative afin de remplacer et/ou de compléter la prophylaxie vaccinale (389–391). L'effet sur le FMDV de différentes molécules antivirales déjà utilisées dans la lutte contre d'autres virus a été testé. C'est notamment le cas de la ribavirin, molécule utilisée dans le traitement contre le virus de l'hépatite C (HCV, pour *Hepatitis C virus*), qui a été montrée comme capable d'induire une diminution importante de la réplication du FMDV *in vitro* en favorisant l'apparition de mutations (392,393). L'utilisation de favipiravir, molécule à l'action démontrée contre le virus Zika, ainsi que d'inhibiteurs non-nucléosidiques a également permis de mettre en évidence une augmentation de la fréquence d'apparition de mutations au sein du génome du FMDV, affectant notamment la polymérase (394,395). Des dérivés de pyrazole, pour lesquels des applications anti-HIV, anti-HCV et antituberculeux ont déjà été identifiées, ont été montrés comme possédant une activité antivirale contre le FMDV à la fois *in vitro* et *in vivo* (396,397). Des études portant sur des traitements basés sur les interférons α et β ont également montré qu'une stimulation de la réponse immunitaire innée pouvait être une alternative thérapeutique efficace face à l'infection par le FMDV (398,399). L'action anti-FMDV d'inhibiteurs de biosynthèse des pyrimidines et d'autres immunosuppresseurs connus pour leur activité antivirale a



également pu être mise en lumière *in vitro* et *in vivo* (400–403). Des composés naturels ont aussi été testés. C'est notamment le cas du manganèse qui a été décrit comme impliqué dans la stimulation de la réponse immunitaire innée et plus particulièrement de NF- κ B lors de l'infection par le FMDV (404). L'activité anti-FMDV du pleconaril, pourtant utilisé dans le cadre d'infection des voies respiratoires par d'autres picornavirus, n'a en revanche pas pu être démontrée. Tout comme il existe des freins au développement d'un vaccin dirigé contre la fièvre aphteuse, de nombreux obstacles se dressent face aux laboratoires ambitionnant de mettre au point des antiviraux efficaces. Ainsi, étant donné l'extrême rapidité du FMDV à se répliquer, un traitement curatif doit non seulement être capable d'induire une action antivirale rapide et massive, mais doit aussi être associé à une surveillance épidémiologique constante pour être administré dans les plus brefs délais après l'infection. De plus, les stratégies de dépopulation actuellement adoptées dans la plupart des pays indemnes en cas d'incursion du FMDV, ne sont pas adaptées à l'administration d'un traitement. Enfin, les coûts de production associés aux composés antiviraux ne sont pour l'heure pas compatibles avec les financements alloués à la lutte contre la fièvre aphteuse dans la plupart des pays endémiques.

4) Modèles d'étude

S'il est aujourd'hui difficile pour les producteurs de vaccin de proposer des solutions répondant à tous les critères énoncés précédemment, c'est en partie du fait de méconnaissances liées à la physiopathologie de la fièvre aphteuse. A titre d'exemple, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien de la persistance du FMDV reste lacunaire malgré des décennies de recherche. L'amélioration des connaissances globales concernant le virus et la maladie constitue ainsi un axe de progression capital dans la lutte contre la fièvre aphteuse. Pour cela, il



convient d'étudier le virus dans des circonstances adaptées, afin d'être au plus près de ce qu'il se passe lors d'une infection naturelle. Il paraît ainsi assez évident de se tourner en premier lieu vers des études *in vivo* impliquant des animaux naturellement sensibles à l'infection par le FMDV. Bien que l'infection de bovins ou d'autres animaux de production puisse être particulièrement informative, si tant est que l'infection soit réalisée de manière similaire à une infection naturelle, elle nécessite des infrastructures hautement confinées adaptées à l'hébergement d'animaux assez imposants. Seuls quelques laboratoires dans le monde disposent de telles animaleries. De plus, la réalisation de telles expérimentations est associée à des problématiques éthiques importantes, ainsi qu'à un coût élevé correspondant notamment à l'achat des animaux, leur entretien, leur mise à mort ou encore l'élimination des déchets. Enfin, l'étude de la réponse immunitaire à l'infection par le FMDV chez les Artiodactyles est compliquée par le manque de réactifs immunitaires spécifiques tels que des anticorps et d'outils d'analyse adaptés à ces espèces.

a) Modèles d'étude *in vivo*

Afin de pallier certaines des problématiques rencontrées et faciliter l'étude du FMDV, d'autres modèles *in vivo* ont pu être utilisés au cours du temps (310,405). Il a tout d'abord été démontré dès 1920 par Waldman et Pape que les cochons d'Inde pouvaient être infectés par inoculation sous-cutanée et présenter des symptômes semblables à ceux observés chez les Artiodactyles (salivation, perte de poids, vésicules sur les pattes et dans la cavité buccale) (5,406). Il a également été mis en évidence qu'à l'issue de la phase clinique d'infection, ces cochons d'Inde avaient développé une immunité efficace contre une nouvelle infection par la même souche virale, constituant ainsi un modèle peu onéreux et intéressant pour la caractérisation de la réponse immunitaire ainsi que l'évaluation de candidats vaccins. D'autres modèles telles que la souris, le rat, le lapin



et le poulet ont également été montrés comme sensibles à l'infection expérimentale par le FMDV (407–410). Alors que les jeunes souriceaux, succombant généralement après seulement quelques jours, semblent particulièrement sensibles à l'infection intrapéritonéale, la susceptibilité des souris diminue rapidement avec l'âge et résulte généralement en une infection subclinique chez les individus âgés de plus de trois semaines (411). Le modèle souris a constitué un outil de recherche extrêmement important puisqu'il a servi à la mise au point de procédés d'isolement viraux, de titrages ainsi que de tests de neutralisation (412). Les lapereaux, âgés de quelques jours semblent également hautement sensibles à l'infection par le FMDV puisqu'ils succombent généralement en moins de deux jours post-infection. L'infection expérimentale de rats a permis de mettre en évidence leur susceptibilité irrégulière vis-à-vis du FMDV, donnant parfois lieu à l'apparition de vésicules podales et buccales. D'autres espèces ont également été étudiées comme le hamster, pour lequel une inoculation *via* le coussinet plantaire est souvent mortelle, les œufs de poule embryonnés, susceptibles d'être infectés uniquement après une adaptation des souches virales, le hérisson, dont la susceptibilité dépend des souches utilisées, ou encore certains carnivores comme le chien et le chat, qui peuvent parfois être sensibles à l'infection selon la voie d'inoculation employée et la souche utilisée.

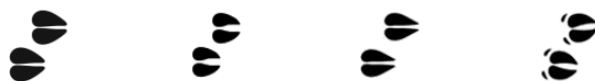
Toutefois, aucune de ces espèces ne semble constituer un meilleur modèle que le cobaye chez qui la physiopathologie du FMDV est assez similaire à celle observée chez les bovins (413). L'étude de la fièvre aphteuse chez le cobaye est cependant limitée par une réponse immunitaire différente de celle des espèces naturellement infectées, ainsi que le besoin d'adaptation des souches virales à cet animal, induisant des modifications de l'antigénicité du virus.



b) Modèles d'étude *in vitro*

i. Cellules primaires

Le développement de méthodes de culture *in vitro* du FMDV, dans des tissus embryonnaires de cobaye, dans les années 1930, a non seulement œuvré à la production de vaccins, mais s'est également avéré décisif pour l'étude du virus et le dosage de l'infectiosité associée (414,415). Les travaux de Frenkel, publiés en 1947, montrant que l'épithélium lingual bovin mis en culture permettait la production d'une grande quantité de virus, ont permis la montée en échelle de la production vaccinale (416). D'autres cellules primaires ont ensuite été utilisées pour l'isolement et/ou la culture du FMDV, notamment des cellules primaires de reins de veaux ou des cellules primaires de thyroïdes de bovins (BTY, pour *Bovine Thyroid*) (417,418). Pendant de nombreuses années, ces dernières ont été considérées comme le modèle cellulaire le plus sensible pour isoler le virus, cependant, les difficultés rencontrées lors de la mise en culture de ces cellules ainsi que pour l'approvisionnement en thyroïdes de bovins négatifs au FMDV dans certaines régions du monde ont parfois limité leur utilisation. De plus, il a été montré que la sensibilité de ces cellules vis-à-vis du FMDV diminuait grandement au cours des passages cellulaires et lors de leur congélation (419). De manière plus occasionnelle, des cellules primaires dérivées d'épithélium de langue de fœtus de bovins (BTE, pour *Bovine fetal Tongue Epithelium*), de reins de fœtus de bovins (BFK, pour *Bovine Fetal Kidney*), de pharynx bovin, de cellules dendritiques bovines, de reins de moutons (OVK, pour *Ovine Kidney*), de pancréas de souris et de coussinet métatarsien de cobaye ont aussi pu être utilisées (286,418,420–424). Malgré une sensibilité variable au virus d'un lot à l'autre, des cellules primaires de reins d'agneaux ont notamment été utilisées par le laboratoire de référence de l'OMSA pour la fièvre aphteuse au Botswana (425). Ces dernières années, un modèle de cellules épithéliales issues de palais mou dorsal de bovins (DSP, pour *Dorsal Soft Palate*),



sensibles au FMDV, a été développé au sein de notre laboratoire, en collaboration avec l'Université Suédoise des sciences agricoles (SLU) dans le cadre du projet européen Transcriptovac (289). De la même façon, un modèle de cellules épithéliales issues de DSP ovins, ainsi que des cellules épithéliales provenant d'amygdales palatines d'ovins sensibles au FMDV ont également été initiés dans notre laboratoire.

Alors qu'historiquement la plupart des laboratoires de référence se servaient de cellules primaires pour isoler le FMDV, certaines contraintes telles que des problématiques éthiques, des difficultés de conservation des cellules primaires au fur et à mesure des passages et/ou lors de la congélation, une variabilité des cellules d'un prélèvement à l'autre, ou encore des défauts de caractérisation des cellules utilisées, ont incité les laboratoires à se tourner vers des lignées cellulaires.

ii. Cellules de lignées

De très nombreuses lignées cellulaires ont été décrites comme étant susceptibles au FMDV. Certaines lignées telles que les hTERT-BTY ont été directement stabilisées à partir de cellules primaires couramment utilisées pour la culture du FMDV, en l'occurrence les BTY (426). Certaines lignées cellulaires permissives à de nombreux virus sont fréquemment utilisées. C'est notamment le cas des BHK21 qui ne sont pourtant pas issues d'espèces naturellement sensibles au FMDV (284,427). D'autres lignées cellulaires établies à partir de cellules de hamster peuvent également être utilisées, à savoir les HmLu (pour *Hamster Lung*) ou les cellules embryonnaires NIL-2 (428). Une large proportion des cellules pouvant être utilisées pour la culture du FMDV provient toutefois de tissus d'Artiodactyles. Des cellules épithéliales de reins de porcs, particulièrement sensibles au virus, telles que les IBRS-2 (*Instituto Biologico-Rim Suino-2*), les SK6 (*Swine Kidney-6*), les PK15 (*Porcine Kidney-15*) ou encore les MVPK-1 (*Mengeling-Vaughn Porcine Kidney-1*) servent à étudier l'infection (428–430). Il en est de même pour les cellules épithéliales de reins de bovins comme les



MDBK et les cellules endothéliales bovines provenant des ganglions lymphatiques mésentériques (BLMNMEC, pour *Bovine mesenteric lymph node microvascular endothelial cells*), du cordon ombilical (BUcEC, pour *Bovine umbilical cord endothelial cells*) et des poumons (BLUMEC, pour *Bovine lung microvascular endothelial cells*) (285,431,432). Des cellules épithéliales provenant de petits ruminants sont également utilisées, à savoir les cellules de langue de fœtus de chèvre (ZZ-R127) ayant remplacé les BTY dans de nombreux laboratoires, les cellules de reins de chèvre noire (BGK, pour *Black Goat Kidney*), ainsi que les cellules de reins de mouton (MDOK, pour *Madin-Darby Ovine Kidney*) (356,432–434). Certaines lignées cellulaires ont même été génétiquement adaptées à la culture du FMDV. Il a ainsi été entrepris à plusieurs reprises de favoriser la réplication de ce virus en exprimant ses récepteurs principaux, à savoir les intégrines $\alpha\beta 6$ à la surface des cellules. C'est notamment le cas des cellules de reins de fœtus bovins LFBK $\alpha\beta 6$, qui figurent parmi les cellules les plus sensibles au FMDV (356). Alors que l'utilisation de ces cellules a longtemps été freinée du fait d'une contamination par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV, pour *Bovine Viral Diarrhea virus*), des travaux récents ont permis de résoudre ce problème (435,436).

De même, une population de cellules BGK a été modifiée afin d'exprimer la sous-unité de l'intégrine bovine $\beta 6$, la rendant plus sensible que les cellules originelles (433). Des cellules BHK21 ont également été rendues plus sensibles en induisant l'expression d'intégrines $\alpha\beta 6$ à leur surface (437). L'expression du récepteur principal du FMDV a même permis de rendre sensibles à l'infection certaines cellules qui ne l'étaient pas comme les cellules SW480 issues d'un adénocarcinome humain ou les fibroblastes de reins de singe vert Africain COS-1 (438).



iii. Limites des modèles cellulaires utilisés

La quasi-totalité des lignées mentionnées ci-dessus sont des cellules dites adhérentes, *i.e.* des cellules nécessitant un support solide sur lequel se développer, et formant des jonctions les unes avec les autres. Ce type de cellules n'est toutefois pas le plus adapté à la production de virus à l'échelle industrielle. En effet, elles nécessitent un entretien régulier afin de les décoller et de les mettre en culture sur un nouveau support solide, et ne peuvent être cultivées que dans des formats restreints comme les flacons roulants. A l'inverse, les cellules qui se développent en suspension, c'est-à-dire sans support solide, présentent l'avantage de pouvoir être cultivées dans des bioréacteurs de plusieurs dizaines de litres, dans des conditions contrôlées et nécessitent un investissement humain largement inférieur. Alors que diverses lignées cellulaires adhérentes ont pu être adaptées à la culture en suspension, peu d'essais se sont avérés concluants concernant les cellules sensibles au FMDV. Des cellules BHK21 ont néanmoins été adaptées avec succès à la culture en suspension et sont aujourd'hui couramment utilisées dans le cadre de la production de vaccins anti-fièvre aphteuse. Dans certains cas, il a cependant été montré que l'adaptation des BHK21 à la culture en suspension pouvait réguler à la baisse leur expression d'intégrines $\alpha\beta_6$, menant à une sélection de certaines souches virales (439,440). La majorité des cellules sensibles au FMDV étant des cellules épithéliales, elles possèdent une forte propension à s'associer les unes aux autres, ainsi qu'à leur support, par le biais de jonctions impliquant des protéines du cytosquelette, rendant leur adaptation à la culture en suspension assez complexe.

En outre, les cellules épithéliales, de surcroît lorsqu'il s'agit de cellules primaires, plus instables, sont connues pour perdre rapidement leur phénotype épithélial lorsqu'elles sont cultivées (441). En effet, ces cellules subissent spontanément une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) réversible, entraînant la perte des marqueurs



épithéliaux tels que l'occludine et la cytokératine. Ces modifications s'accompagnent d'une altération de l'adhérence cellulaire, d'un remodelage du cytosquelette, ainsi que d'une modification de la polarité apico-basale des cellules (442,443). *In fine*, ce processus, aboutit à l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, la fibronectine ou certaines intégrines dans les cellules, les éloignant de fait du phénotype isolé à l'origine.

Par ailleurs, certaines des lignées cellulaires considérées comme particulièrement sensibles à l'infection par le FMDV telles que les cellules IBRS2 et SK6 ont été caractérisées comme présentant des réponses immunitaires incomplètes (444,445). Il a, par exemple, été montré assez récemment que les IBRS2 présentaient une déficience au niveau de la voie des RLR (*RIG-I-Like Receptors*), due à un dysfonctionnement de la transmission du signal médié par TBK1, remettant ainsi en cause de nombreuses études portant sur les picornavirus et réalisées dans cette lignée cellulaire. De manière plus générale, l'étude de la réponse immunitaire de l'hôte face à l'infection aiguë ou persistante par le FMDV, à travers l'infection de cellules cultivées en monocouches sur un support plastique peut paraître lacunaire au vu de la complexité des systèmes biologiques.

iv. Modèles cellulaires complexes

Le développement de modèles *in vitro* permettant de se rapprocher au maximum des conditions biologiques constitue un enjeu majeur des futurs progrès relatifs à l'étude du FMDV. En effet, cela répond au besoin énoncé, dès les années 1960, d'étudier l'infection dans des conditions qui ressemblent davantage à ce qu'il se passe *in vivo*, plutôt que dans des cultures cellulaires en monocouches (421). A l'époque, l'unique alternative à l'expérimentation *in vivo* et à la culture cellulaire en monocouches était le maintien en culture d'organes, notamment de coussinet métatarsien de cobaye, dans lequel le virus pouvait se multiplier. Depuis quelques années, des modèles cellulaires



innovants ont été mis au point dans le cadre d'études oncologiques ainsi qu'au sujet d'autres infection virales, et commencent à être adaptés pour l'étude du FMDV (446–451). Dans cette optique, un modèle de cellules épithéliales nasales primaires porcines cultivées à l'interface air-liquide a été proposé dès les années 2010 (452). L'infection par le FMDV de ce modèle, basé sur la reconstitution d'un épithélium nasal stratifié, n'a toutefois permis d'observer qu'une réplication transitoire du virus et pas de véritable infection. De manière similaire, un modèle de DSP bovines cultivées en multicouches à l'interface air-liquide a été mis au point grâce à la collaboration entre notre laboratoire et le SLU (289). Ce modèle de culture des cellules, sur une fine membrane de collagène à l'interface air-liquide, permet la superposition de couches de cellules épithéliales, recréant un système constitué de cellules polarisées formant des jonctions intracellulaires, assez similaire aux épithéliums stratifiés observés *in vivo* (Figure 14) (453,454). L'infection de ce modèle par le FMDV a notamment permis de caractériser les réponses transcriptionnelles de l'hôte lors de l'infection aiguë et également dans le cas d'infection persistante (288).

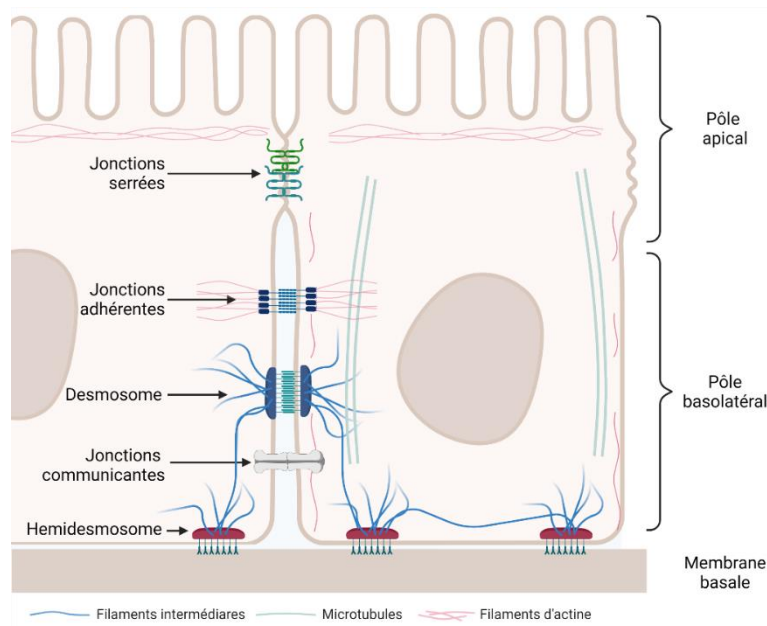


Figure 14 : **Jonctions caractéristiques des cellules épithéliales et protéines du cytosquelette associées.**
 Adapté de https://rnbio.upmc.fr/cellules_epitheliales [Consulté le 25/03/2023]. Créé avec Biorender.com.



Objectifs des travaux de thèse

Bien que la fièvre aphteuse soit une maladie virale ancienne, elle n'en reste pas moins une menace importante dans le domaine de la santé animale. La persistance de son agent étiologique après l'infection chez les ruminants participe grandement à la difficulté du contrôle de cette maladie. Comme évoqué précédemment, malgré des décennies de recherche, les mécanismes impliqués dans la mise en place d'une infection persistante par le FMDV sont encore largement méconnus. Parmi les hypothèses envisagées, la création d'un équilibre entre la multiplication du virus et la réponse antivirale de l'hôte semble particulièrement prometteuse. Cette hypothèse est notamment soutenue par les conclusions du projet européen Transcriptovac (2015-2019), indiquant que l'infection persistante s'accompagne d'une réponse antivirale innée durable mais diminuée et inefficace pour éliminer le virus.

L'objectif principal de cette thèse a ainsi été l'étude des interactions protéine-protéine pouvant être impliquées dans l'établissement et le maintien d'un équilibre virus-hôte lors d'une infection persistante par le FMDV. Plus précisément, ces travaux se sont focalisés sur la mise en évidence d'interactions protéiques entre le FMDV et la voie interféron de type I, composante majeure de la réponse antivirale innée. Une attention particulière a été portée à la détermination de la spécificité d'hôte de ces interactions, afin de tenter d'expliquer pourquoi le FMDV persiste chez le bovin, l'ovin et le caprin mais pas chez le porcin. Pour cela, les interactions entre les protéines d'un FMDV de sérotype O et seize protéines majeures de la voie IFN, décrites comme étant impliquées dans plus de 75% des interactions virus-hôte, issues des quatre espèces susmentionnées, ont été testées par approche « interférentomique ». Les interactions protéines-protéines entre le virus et ses différents hôtes ont, dans un premier temps,



été identifiées à travers des cribles Nanoluciférase double-hybride, nécessitant la construction de banques de vecteurs permettant l'expression des protéines virales et des protéines cellulaires d'intérêt. Dans un second temps, les interactions les plus prometteuses au regard des résultats des cribles Nanoluciférase ont été éprouvées par chromatographie d'affinité par GST (Glutathion S-transférase) pull-down. L'impact phénotypique des interactions mises en évidence sur la réponse antivirale a également été étudié à travers la réalisation d'essais rapporteurs luciférase. Les domaines minimums d'interaction des protéines d'intérêt sont en cours de caractérisation par des cribles double-hybride en levures.

L'objectif secondaire de ces travaux de thèse a été de développer des modèles cellulaires adaptés à l'étude de l'infection par le FMDV, afin d'œuvrer à l'amélioration des conditions de recherche et de diagnostic de ce virus. Cet objectif, s'inscrit dans la lignée de travaux menés dans l'équipe depuis plusieurs années qui ont permis, dans le cadre du projet Transcriptovac, la mise au point d'un modèle d'infection persistante par le FMDV dans des cellules épithéliales primaires bovines, provenant du palais mou dorsal, cultivées en multicouches à l'interface air-liquide. Dans cette partie de la thèse, il convenait plus spécifiquement de mettre au point un modèle cellulaire analogue, adapté à l'étude du FMDV chez le porc, animal pour lequel les seules cellules utilisées actuellement sont des lignées de cellules rénales. Dans cette optique, les amygdales oropharyngées, ainsi que le palais mou dorsal, principaux sites de réplication primaire du FMDV chez le porc, ont été identifiés comme les structures d'intérêt pour ce modèle. Ces tissus ont été prélevés, puis les cellules épithéliales associées ont été cultivées. Ces cellules ont ensuite été caractérisées puis infectées par le FMDV en monocouches et en multicouches cultivées à l'interface air-liquide. Il convenait également de poursuivre les travaux précédemment initiés dans le cadre du projet EpithelOV (2019-2020),



concernant le développement d'un modèle cellulaire ovin, similaire à ce qui avait déjà été réalisé chez le bovin. Pour cela, les cellules déjà isolées et mises en culture ont été caractérisées puis infectées par le FMDV en monocouches et en multicouches cultivées à l'interface air-liquide.

L'objectif tertiaire, à l'interface des objectifs primaire et secondaire de cette thèse, a été de confirmer les interactions protéines-protéines mises en évidence dans les modèles cellulaires d'intérêt en contexte infectieux. Pour cela, il a fallu identifier des réactifs d'immunodétection pouvant être utilisés lorsqu'ils étaient disponibles dans le commerce, ou tenter de les produire lorsque ce n'était pas le cas. Différents anticorps dirigés contre les protéines impliquées dans la voie IFN de type I ont ainsi été testés afin de détecter les protéines orthologues des quatre espèces d'intérêt. Les anticorps ayant été jugés comme utilisables dans les modèles cellulaires développés au laboratoire ont ensuite servi à la réalisation de réactions d'immunoprécipitation afin de permettre la validation fonctionnelle des interactions.



Résultats

I. Mise en évidence d'interactions protéine-protéine entre le virus de la fièvre aphteuse et la voie interféron de type I

Introduction de la partie I

La persistance du FMDV dans l'organisme de ses hôtes figure parmi les principales problématiques associées à ce virus (152). En effet, ces phénomènes concernant plus de 50 % des ruminants infectés, constituent à la fois un risque de transmission du virus, une source d'émergence de nouveaux recombinauts en cas de co-infections, un obstacle au contrôle de la maladie, ainsi qu'un frein au commerce international pour les pays touchés (131,135,209). Malgré plusieurs décennies consacrées à des travaux de recherche concernant la persistance du FMDV, les mécanismes sous-jacents restent largement méconnus (455). De même, il n'a pour l'heure, pas été possible d'expliquer pourquoi ce virus est capable de persister chez les ruminants mais pas chez les porcins (209,226). Alors que diverses hypothèses sont envisagées afin de tenter de comprendre les mécanismes inhérents à la persistance du FMDV, la mise en place d'un équilibre entre présence virale et réponse de l'hôte figure parmi les plus prometteuses. En effet, plusieurs données suggèrent l'existence d'un tel équilibre. Dans le cadre d'une infection persistante, il a ainsi été montré que le FMDV est à l'origine de phénomènes de modulation de l'immunité cellulaire (287). La caractérisation des réponses transcriptionnelles d'un modèle de cellules épithéliales primaires bovines cultivées en multicouches, lors de l'infection persistante par le FMDV a mis en évidence la présence d'une réponse immunitaire innée durable mais diminuée et inefficace pour éliminer le virus (288). Alors que de très nombreuses interactions protéine-protéine ont déjà été décrites entre le FMDV et la réponse immunitaire, et notamment la réponse interféron



de type I, il est envisagé que ces interactions puissent être en partie responsables de la création de l'équilibre virus-hôte, et puissent donc être impliquées dans la mise en place de l'infection persistante (42).

La plupart des interactions, entre protéines du FMDV et protéines impliquées dans la réponse immunitaire, décrites dans la littérature sont issues d'expériences menées à partir de protéines ne provenant pas d'espèces sensibles au virus, beaucoup étant des protéines humaines. Au regard de la littérature, peu de données sont actuellement disponibles concernant les interactions entre les protéines du FMDV et les protéines issues d'espèces sensibles. Ce constat est d'autant plus vrai lorsque se pose la question de la conservation de ces interactions d'une espèce à l'autre.

L'objectif de cette partie a ainsi été de mettre en évidence des interactions protéine-protéine entre le FMDV et la voie interféron de type I et d'étudier leur spécificité d'hôte, afin d'établir un éventuel lien entre interactions protéiques et persistance virale. Pour cela, les régions codantes correspondant à seize protéines de la voie interféron de type I, impliquées dans plus de 75 % des interactions entre les virus et leurs hôtes, ont été clonées à partir de quatre espèces sensibles au FMDV, à savoir le bovin domestique (*Bos taurus*), l'ovine (*Ovis aries*), le caprin (*Capra hircus*) et le porc domestique (*Sus scrofa*). Ces séquences ont ensuite été utilisées afin de construire des banques de vecteurs d'expression nécessaires au criblage d'interactions protéiques. Des interactions entre les protéines du FMDV et les seize protéines de la voie interféron étudiées ont pu être mises en évidence par approche NanoLuc-double-hybride, puis confirmées par GST pull-down. Ces travaux, en particulier ceux concernant la 3D^{pol}, ont fait l'objet d'un article publié dans la revue « Viruses » (456).



1) Construction des banques de vecteurs

Le flux de travaux suivi pour l'ensemble des banques de vecteurs construites pendant ma thèse est présenté de manière détaillée dans la Figure 15.

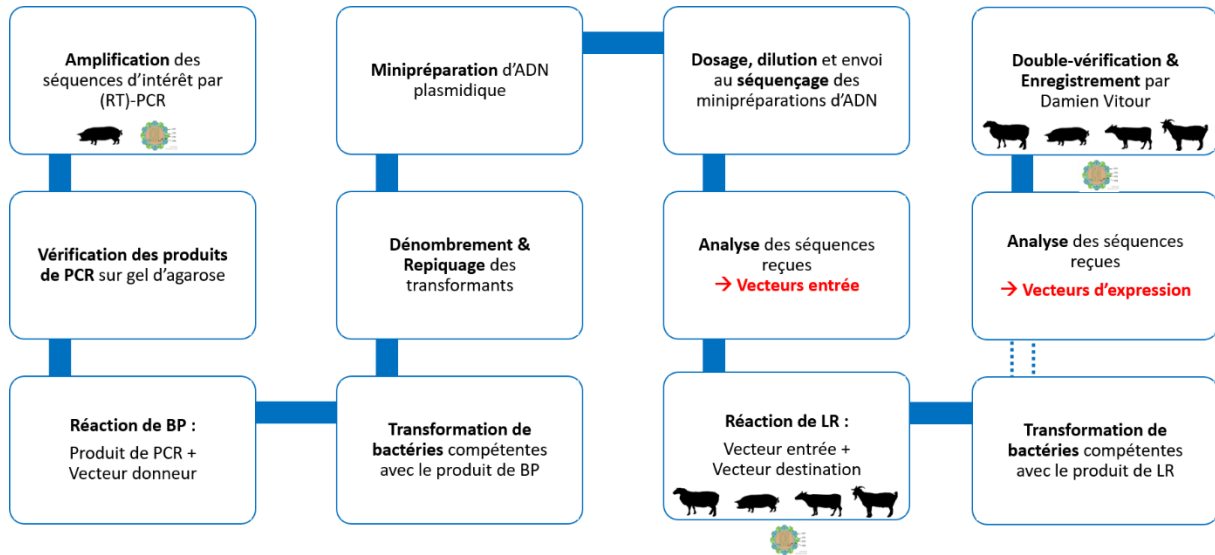


Figure 15 : **Processus de construction par clonage Gateway® des banques de vecteurs d'expression correspondant aux séquences virales et cellulaires d'intérêt.**

Les vecteurs correspondant viraux et porcins ont été produits à partir de l'amplification des séquences d'intérêt, tandis que les vecteurs entrée bovins, ovins et caprins ont été produits par synthèse de gènes par des prestataires de service.

Les séquences correspondant aux différentes protéines du FMDV O/FRA/1/2001

Clone 2.2 (GenBank: OV121130.1) ont été amplifiées par RT-PCR à partir d'ARN viral (cf. Mise en évidence d'interactions protéine-protéine entre le virus de la fièvre aphteuse et la voie interféron de type I et détermination de leur spécificité d'hôte). Les séquences relatives aux protéines Lab_{pro}, Lb_{pro}, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C et 3D^{pol} ont ainsi pu être amplifiées. Une séquence appelée 3Bt, correspondant à l'ensemble des trois copies non identiques de 3B, a également fait l'objet d'une amplification. Au cours de l'étape d'amplification, chacune des séquences a été flanquée de séquences de recombinaison, compatibles avec la technologie de clonage Gateway®. Les séquences virales ainsi amplifiées ont ensuite été introduites dans un vecteur donneur pDONR207 par recombinaison homologe (*BP reaction*) afin d'obtenir les vecteurs entrée (Figure 16 (A)). Des transformations bactériennes,



associées à une sélection des bactéries compétentes transformées, grâce à un gène de résistance à un antibiotique contenu dans le pDONR207, ont permis de ne conserver que les bactéries ayant intégré le vecteur entrée recombinant. Ces bactéries ont été utilisées dans le cadre de minipréparations d'ADN afin d'extraire et purifier l'ADN plasmidique d'intérêt. Après vérification par séquençage réalisée par le prestataire Eurofins Genomics, les vecteurs entrée ainsi amplifiés ont servi à l'obtention des vecteurs d'expression correspondant par recombinaison homologue (*LR reaction*) (Figure 16 (B)). De manière similaire à ce qui a été fait à partir des produits de *BP reaction*, les produits de *LR reaction* ont été utilisés dans le cadre de transformations bactériennes permettant de sélectionner et d'amplifier les vecteurs d'expression d'intérêt.

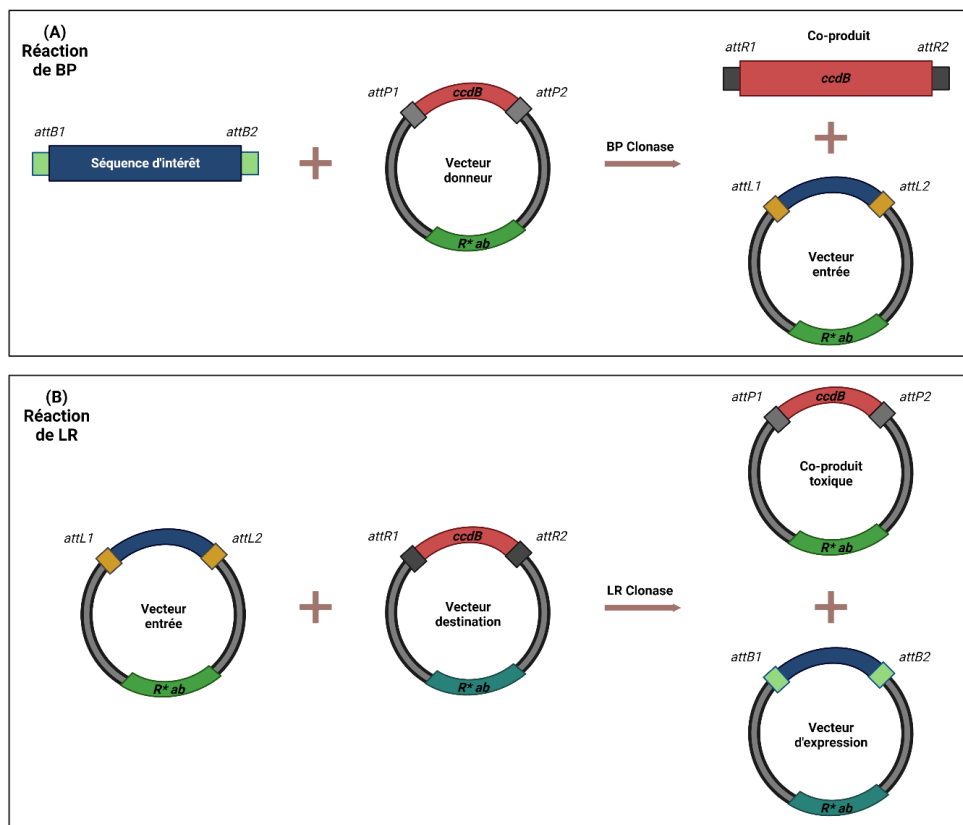


Figure 16 : **Principe du clonage Gateway®.**

(A) Recombinaison homologue par réaction de BP. (B) Recombinaison homologue par réaction de LR. Créé avec Biorender.com.



Les séquences correspondant aux protéines du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 ont ainsi pu être insérées dans différents vecteurs d'expression, tels que les quatre types de vecteurs Nanoluciférase (N1, N2, C1, C2) ayant servi à la réalisation des cribles Nanoluciférase, un vecteur porteur d'une étiquette GST (pDEST27) nécessaire au GST pull-down, un vecteur porteur d'une étiquette Flag (pCi-Neo-3xFlag) utilisé dans le cadre des essais rapporteurs luciférase, des vecteurs permettant l'expression de protéines fluorescentes (peGFP) ayant servi lors des essais de microscopie confocale, ou encore des vecteurs permettant l'expression de protéines-fusion (pVenusCFN et pVenusNFN) à partir desquels nous souhaitons réaliser des essais Split-Venus (Figure 17). Le vecteur entrée correspondant à la protéine 2A n'ayant pas pu être obtenu, ni par nous-mêmes, ni par un prestataire en raison de sa courte séquence comprenant une structure en épingle, il a été décidé de construire les vecteurs correspondant aux séquences VP1-2A et 2A-2B afin d'être en capacité d'exprimer la protéine 2A.

Les vecteurs entrée correspondant aux protéines 3A, 3C et 3D de la souche SAT1 KPN/196/91/1, décrite par Maree *et.al.* comme étant une souche particulièrement virulente et possédant une propension à persister sur le long terme, ont été produits par synthèse de gènes, puis les vecteurs d'expression 3xFlag, GST et GFP correspondant ont été construits au laboratoire (145).



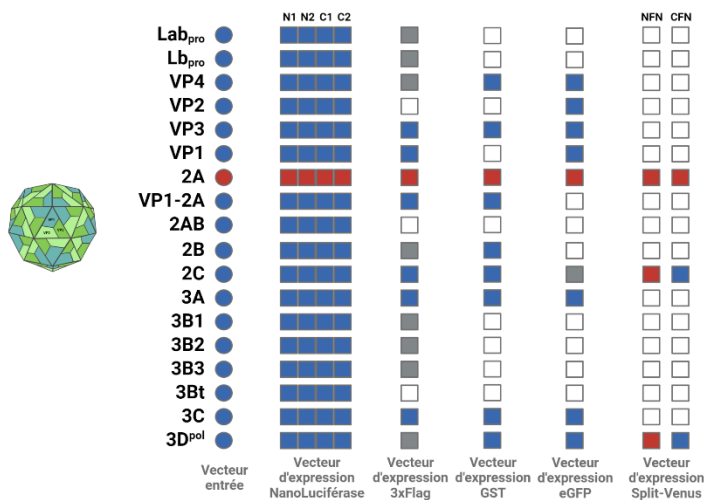


Figure 17 : Vecteurs entrée et vecteurs d'expression correspondant aux protéines du virus de la fièvre aphteuse, construits par clonage Gateway® au cours de la thèse PersIFA.

De la même façon, les séquences codantes correspondant aux seize protéines de la voie IFN de type I impliquées dans plus de 75 % des interactions virus-hôtes (IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MAVS, MDA5, NEMO, PKR, RIG-I, STAT1, STAT2, STING, TBK1, TRAF3, TRIF, TYK2), ont été clonées par clonage Gateway® dans différents vecteurs d'expression, à partir des séquences bovine, ovine, caprine et porcine (Figure 18). Les vecteurs entrée correspondant aux seize protéines bovines, ovines et caprines ont été sous-traités à des prestataires spécialisés dans la synthèse de gènes (Genecust, Twist Bioscience), tandis que les vecteurs entrée porcins ont été obtenus à partir d'une amplification par PCR des séquences contenues dans d'autres vecteurs produits par synthèse de gènes, mais qui n'étaient pas utilisables en raison d'un décalage du cadre de lecture. Parmi les nombreux clonages réalisés au cours de ce projet, seuls ceux relatifs à la construction TRIF ovine n'ont pas pu être obtenus du fait de soucis rencontrés lors de la ré-amplification du vecteur entrée.



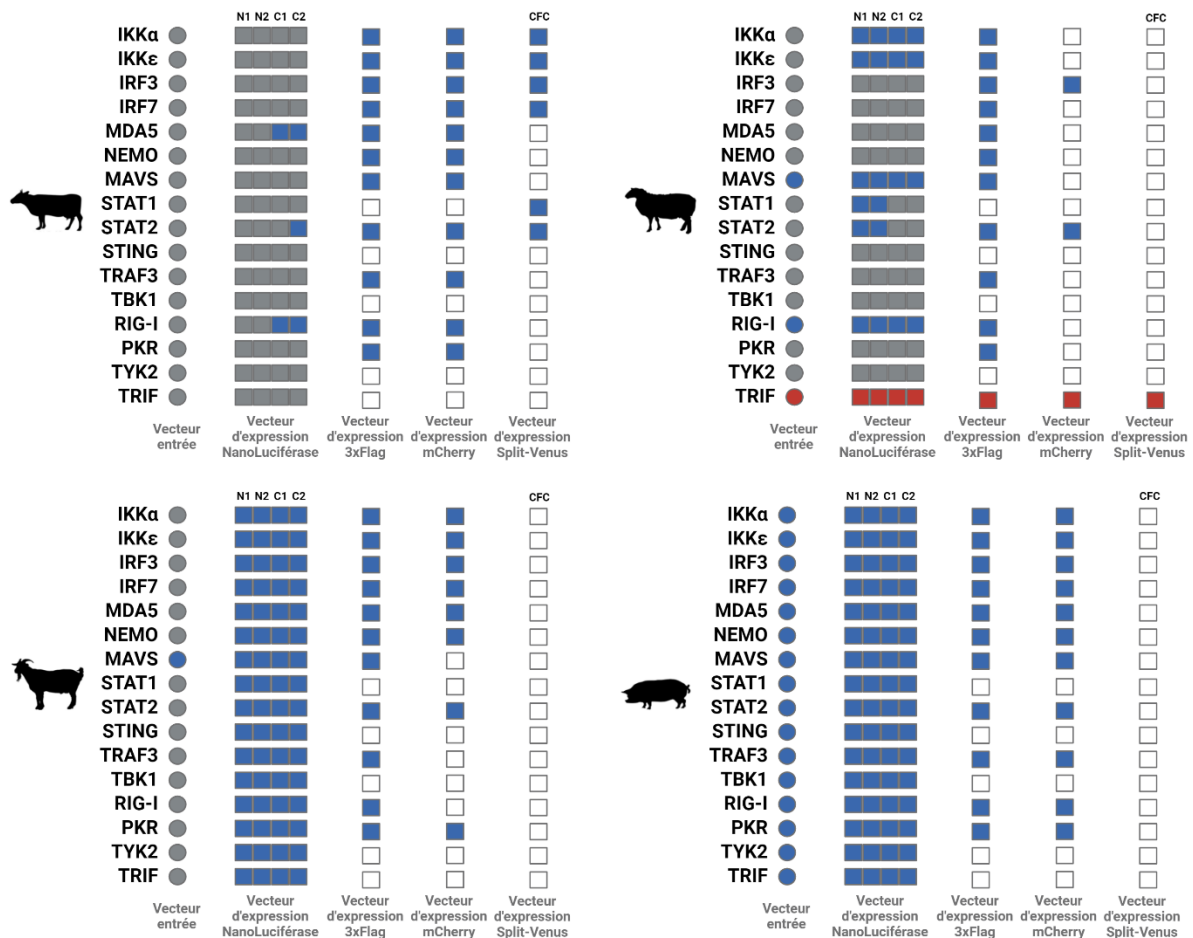


Figure 18 : Vecteurs entrée et vecteurs d'expression correspondant aux seize protéines de la voie IFN de type I impliquées dans plus de soixante-quinze pour cent des interactions virus-hôte, construits par clonage Gateway® au cours de la thèse PersIFA.

Au total, près de trois cents constructions ont pu être obtenues au laboratoire grâce à l'utilisation de la méthode de clonage Gateway® offrant une multitude d'applications à partir des banques de vecteurs d'entrée. De nouveaux clonages sont actuellement en cours afin d'obtenir des vecteurs viraux et cellulaires compatibles avec l'expression des protéines d'intérêt en levures (*cf.* Détermination des domaines minimums d'interaction de la 3Dpol par approche « fragmentome »).



2) Mise en évidence d'interactions protéine-protéine entre le virus de la fièvre aphteuse et la voie interféron de type I et détermination de leur spécificité d'hôte

La construction des banques de vecteurs, en particulier les vecteurs d'expression Nanoluciférase, a rendu possible le criblage des interactions protéiques entre les protéines du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 et les seize protéines de la voie IFN de type I sélectionnées dans le cadre du projet et provenant de quatre espèces sensibles au virus, à savoir le bovin, l'ovin et le caprin chez qui le virus est capable de persister, ainsi que le porc pour lequel aucune persistance du virus infectieux n'a pu être démontrée. Afin d'identifier de nouvelles interactions entre le virus et la réponse immunitaire innée, onze des quinze protéines du FMDV ont ainsi pu être testées face aux seize protéines bovines par approche *NanoLuc-2-Hybrid*. Les protéines virales 3A, 3C et 3D^{pol}, figurant parmi les plus intéressantes au regard des résultats des cribles réalisés avec la banque bovine, ont ensuite été testées face à la banque porcine afin de déterminer la spécificité d'hôte des interactions observées. Dans cette optique, la protéine 3D^{pol}, pour laquelle les résultats des cribles bovins et porcins semblaient les plus prometteurs et pour laquelle aucune interaction avec la réponse IFN de type I n'avait été décrite jusque-là, a également été testée face aux banques ovine et caprine. Les interactions identifiées par approche *NanoLuc-2-Hybrid* ont ensuite été éprouvées par chromatographie d'affinité par GST pull-down impliquant les protéines issues des quatre espèces d'intérêt. La 3D^{pol} a ainsi été montrée comme interagissant avec les formes bovines, ovines, caprines et porcines de IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, NEMO, et MDA5 ainsi qu'avec la forme porcine de MAVS. Enfin, l'impact phénotypique de la 3D^{pol} sur la voie IFN de type I a été évalué à travers la réalisation d'essais rapporteurs luciférase dans trois modèles cellulaires, démontrant un effet inhibiteur de cette protéine virale sur la phase d'induction de cette voie. L'ensemble de ces travaux a fait



l'objet d'une publication portant un regard particulier sur le potentiel rôle de la 3D^{pol} dans la subversion de la réponse immunitaire innée médiée par le FMDV.

Article : Sarry M, Caignard G, Dupré J, Zientara S, Vitour D, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway.** *Viruses*. 2023 Mar 1;15(3):666. doi: 10.3390/v15030666. PMID: 36992375; PMCID: PMC10054395.



Article

Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway

Morgan Sarry ^{1,2,*}, Grégory Caignard ¹, Juliette Dupré ¹, Stephan Zientara ¹, Damien Vitour ¹, Labib Bakkali Kassimi ¹ and Sandra Blaise-Boisseau ^{1,*}

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France

² AgroParisTech, 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

* Correspondence: morgan.sarry@anses.fr (M.S.); sandra.blaise-boisseau@anses.fr (S.B.-B.)

Abstract: Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease affecting cloven-hoofed animals. One of the issues related to this disease is the persistence of its causative agent, foot-and-mouth disease virus (FMDV). While the mechanisms of FMDV persistence remain unclear, there are clues that it may be related to protein–protein interactions (PPI) between viral proteins and cellular proteins involved in the interferon (IFN) response. Since FMDV persistence has been described in cattle, sheep and goats but not in swine, we screened PPI involving FMDV proteins and sixteen major type-I IFN pathway proteins from these four species by nanoluciferase-2-hybrid complementation assay, in order to identify new PPI and determine their host specificity. As the results concerning the 3D^{pol} were the most interesting in view of the limited data concerning its role in immune escape, we decided to focus particularly on this protein. The identified PPI were confirmed by GST pull-down. We identified PPI between 3D^{pol} and seven IFN pathway proteins, namely, IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, NEMO, MDA5 and MAVS. These PPI are conserved among the four studied species, with the exception of the one between 3D^{pol} and MAVS, which was only found with the swine protein. We also showed, using luciferase reporter assays, that 3D^{pol} could inhibit the induction phase of the IFN pathway. These results demonstrate, for the first time, a putative role for 3D^{pol} in FMDV innate immune escape.

Keywords: protein–protein interactions; virus–host interactions; foot-and-mouth disease virus (FMDV); 3D polymerase; interferon pathway; host specificity



Citation: Sarry, M.; Caignard, G.; Dupré, J.; Zientara, S.; Vitour, D.; Bakkali Kassimi, L.; Blaise-Boisseau, S. Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway. *Viruses* **2023**, *15*, 666. <https://doi.org/10.3390/v15030666>

Academic Editor: Grzegorz Wozniakowski

Received: 20 December 2022

Revised: 17 February 2023

Accepted: 24 February 2023

Published: 1 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious disease that affects domestic and wild cloven-hoofed animals, in particular livestock such as cattle, sheep, goats, and pigs. It represents a major threat to animal health because its outbreak impact is considerable from both societal and economic points of view. The etiological agent causing FMD is known as foot-and-mouth disease virus (FMDV). This pathogen is a single-stranded positive RNA virus, which belongs to the genus *Aphthovirus* within the *Picornaviridae* family [1]. The FMDV genome exhibits a high mutation rate leading to seven different serotypes, namely, A, O, C, Asia 1, SAT1, SAT2 and SAT3, each subdivided into several subtypes [2]. The FMDV genome contains an open reading frame (ORF) around 7 kb in length, flanked by untranslated regions (5'UTR and 3'UTR). The ORF encodes a unique polyprotein precursor consisting of four structural proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4) and eleven non-structural proteins (Lab_{pro}, Lb_{pro}, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C and 3D^{pol}) [3]. There are two different forms of the Lpro protein, namely Lab_{pro} and Lb_{pro}, depending on the start codon from which translation is initiated. Lb_{pro}, shorter by 28 amino acids, is the predominant form in vivo. FMDV has three very similar, but not identical, copies of 3B, namely 3B1, 3B2 and 3B3 [4].



FMDV-related clinical symptoms differ between affected species. Generally, they include fever, sudden lameness, lesions on the hooves, tongue and udders and a drop in productivity [5]. After clinical recovery, FMD virus persists beyond 28 days post infection in the pharynx of more than 50% of ruminants without clinical signs, regardless of their specific FMD immune status [6,7]. Over the last few years, this 28-day arbitrary threshold has been controverted. Indeed, according to some experiments, it appears that viral clearance occurs earlier than previously assumed, between 10 to 21 days beyond infection, reflecting the animal's vaccination status [8–10]. Healthy carriers represent a potential threat of transmission of FMDV to susceptible animals and hence an obstacle to successful control of the disease [8,11]. Indeed, it has recently been shown that healthy carriers, who are frequently co-infected, are likely to be the source of inter-typical recombination of FMDV. It has also been demonstrated that these reassortant viruses have a high propensity to escape the immune system, facilitating their spread in the infected population [12,13].

More than 50 years after its first description, the establishment, maintenance and resolution mechanisms of FMDV persistence remain unclear [14]. Among the missing information, there is no explanation as to why FMDV persistence is not described in all susceptible species. For example, FMDV persistence has been reported in cattle and sheep, but not in pigs [15,16]. Many studies have already been carried out to advance knowledge regarding FMDV persistence. Thus, co-evolution between the virus and its host has been demonstrated in hamster kidney cells, as well as in a bovine kidney cell line and pharynx primary cells during a persistent infection [17–19]. In addition, modulation of cellular immunity has been associated with FMDV in a bovine in vivo model, while the role of multiple FMDV proteins has been described as being involved in interferon (IFN) response subversion [20,21]. Comparison of transcriptional responses during acute and long-term infection of a bovine primary cell model close to the biological system revealed a diminished IFN response that was ineffective in eliminating the virus during persistent infection [22,23]. Among the hypotheses explored to explain FMDV persistence, modulation of the cellular response, leading to the establishment and maintenance of an equilibrium between the virus and its host via the establishment of protein–protein interactions, seems interesting. Moreover, numerous interactions have already been demonstrated between FMDV and a range of cellular proteins involved in the immune response and, more particularly, in the type-I interferon pathway [21,24,25]. IFN production relies on virus detection by membrane and cytoplasmic sensors. These sensors allow the activation of signalling cascades via the TLR, RLR or NLR pathway, leading to the activation of transcription factors involved in the production of IFN- α/β and pro-inflammatory cytokines in the production phase. Finally, the signalling phase consists of the binding of IFN-a/b to its receptor, which generates an activation signal that propagates in the infected cell and the surrounding ones via the JAK/STAT pathway to express numerous interferon-regulated genes (ISG) and activate the antiviral response. Among the proteins of the type-I IFN pathway, 16 have been shown to be involved in more than 75% of protein interactions between viruses and their hosts (review in preparation). We will therefore focus on these proteins in this study. This study will also explore the study model's impact, using proteins from four FMD-susceptible species for which persistence of the virus has either been described or not, namely, cattle, sheep, goat and swine.

Like many viruses, FMDV has evolved many strategies for evading the antiviral immune response. Numerous interactions have been identified between FMDV proteins and cellular proteins involved in the innate immune responses of its different hosts. Several reviews have also been written to list these interactions [21,25,26]. According to these reviews, it appears that not all viral proteins are equally important in viral escape from the host's antiviral action. Indeed, Lpro and 3C seem to be the most important in terms of interaction quantity and diversity, followed by 3A, 2B and 2C. In contrast, proteins 2A, 3B and 3D^{pol} are not acknowledged as importantly involved in immune escape, since no interactions have been described so far for 2A, while very few data are available for FMDV



3B and 3D^{Pol}. To date, the only known interactions for FMDV 3D^{Pol} are its binding with mouse protein Sam68 and swine ATP-dependent RNA helicase DDX1 [27,28].

The protein 3D polymerase (3D^{Pol}) is the last protein encoded by the FMDV genome. This RNA-dependent RNA polymerase is encoded by a highly conserved region within the FMDV serotypes. It becomes active after 3CD precursor processing and plays a major role in FMDV RNA replication and thus in the viral cycle [29]. As FMDV polymerase is associated with a high error rate due to its low fidelity and lack of proof-reading activity, it contributes to the virus's high genetic and antigenic diversity [30]. FMDV RNA polymerase catalyses the synthesis of negative-strand genomic intermediates and the subsequent new positive strands in replication organelles derived from the membranes of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus [31]. To carry out viral replication, 3D^{Pol} complexes with other non-structural proteins, such as 2C, 3A, 3B and 3CD precursors or other 3D^{Pol} [32,33]. The interaction domains carried by FMDV 3D^{Pol}, as well as its nuclear localization sequence (NLS), combined with its ability to interact with other viral proteins and the interactions described between other picornavirus 3D^{Pol} and cellular proteins, may indicate that the non-catalytic role of FMDV 3D^{Pol} could currently be underestimated. Our work has supported this hypothesis by revealing new protein–protein interactions involving FMDV 3D^{Pol} and IFN type-I pathway proteins.

2. Materials and Methods

2.1. Cells

Human embryonic kidney (HEK-293T) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + GlutaMAX™ (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS, Eurobio Scientific, Les Ulis, France), 100 mg/mL penicillin–streptomycin (Gibco) and 1% sodium pyruvate (Gibco) at 37 °C and 5% CO₂.

BUcEC, endothelial primary cells derived from bovine umbilical cord, were maintained in improved minimum essential media (OptiMEM) + GlutaMAX™ (Gibco) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS, Eurobio), 100 mg/mL penicillin–streptomycin (Gibco) and 100 µg/mL streptomycin and 0.8 µg/mL fungizone (Gibco,) at 37 °C and 5% CO₂ [34].

Porcine kidney (PK-15) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + GlutaMAX™ (Gibco) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS, Eurobio Scientific), 100 mg/mL penicillin–streptomycin (Gibco), 1% of non-essential amino acids (Gibco) and 1% sodium pyruvate (Gibco) at 37 °C and 5% CO₂.

2.2. Plasmid Libraries

2.2.1. Viral Plasmids Library

The viral plasmids library used in this study was built from FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 (GenBank: OV121130.1). Viral RNA was extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit for purification of viral RNA and the QIAcube® workstation (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations for the manual lysis protocol. Viral RNA was eluted in 60 µL of RNase-free water. Reverse transcription was done using the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland). Briefly, viral RNA was incubated with random hexamer primers (60 µM) for 10 min at 65 °C to denature the RNA and then cooled on ice for 1 min. Transcriptase reaction buffer (1X), RNase inhibitor (20 U), dNTPs (100 µM of each), dTT (50 mM) and Transcriptor High Fidelity reverse transcriptase (22 U) were added to the template–primer mixture. Reverse transcription was performed by a 30 min incubation at 55 °C, then reverse transcriptase inactivation was done by a 5 min incubation at 85 °C. Each viral target of interest was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) using the primers described in the Supplementary Data (Table S1).

These primers have flanking regions at their 3' and 5' terminus, enabling the insertion of each viral sequence into a pDONR207 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) using the Gateway® recombination cloning system (Invitrogen). PCR was run with 1 µL of cDNA in



Q5 reaction buffer (1X), adding 0.02 U/ μ L of Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polymerase, 200 μ M of dNTPs and 0.5 μ M of forward and reverse primers. Amplification was performed for 35 cycles as follows: 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 2 min, followed by a 10 min final elongation at 72 °C.

All amplified viral sequences were then cloned into pDONR207 by Gateway® cloning technology. A total of 500 ng of pDONR207 vector was incubated overnight at room temperature with 500 ng of PCR product and 2 μ L BP Clonase™ to obtain an entry vector. The concentration of each entry vector was measured (NanoDrop™ One, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), before they were diluted and sent to sequencing for verification of the resulting constructs (Eurofins Genomics). Entry vectors corresponding to Lab_{pro}, Lb_{pro}, VP4, VP2, VP3, VP1, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C and 3D^{pol} of FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 were obtained. A construct including all three copies of 3B was also prepared and named 3Btotal (3Bt). Only the construct corresponding to protein 2A could not be obtained. This is probably due to the short sequence of the 2A protein, which has a hairpin structure making it difficult to integrate into a plasmid. To overcome this problem, constructs including 2A were made from broader sequences, namely VP1-2A and 2A-2B. The sequences included in these entry vectors were then recombined into various expression vectors related to the methods further used in this study.

Viral sequences cloned into pDONR207 were transferred into a Gateway®-compatible destination vector. For this purpose, 500 ng of entry vector was incubated overnight at room temperature with 500 ng of destination vector and 2 μ L of LR Clonase™. Thus, viral sequences were included in the nanoluciferase expression plasmids (pDESTN2H-N1, -N2, -C1 and -C2) for the NanoLuc-2-hybrid, GST-tag plasmid (pDEST27) for the GST pull-down and FLAG-tag plasmid (pCI-Neo-3xflag) for the luciferase reporter assays [35].

2.2.2. Cattle, Sheep, Goat and Swine Plasmid Libraries

Entry vectors expressing sixteen proteins of the type-I IFN pathway (IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5, NEMO, MAVS, TRAF3, STING, TYK2, TRIF, STAT1, STAT2, TBK1, PKR and RIG-I) were produced by gene synthesis by service providers (Genecust, Twist Bioscience) from cattle, sheep, goat and swine sequences available in the literature (Genbank references provided in Table S2). Sequences from entry vectors were transferred into a Gateway®-compatible destination vector following the same protocol as previously described.

With the exception of the ovine TRIF vector, which could not be successfully re-amplified, all sequences present in these entry vectors were then recombined into various expression vectors relevant to the methods implemented in this study. Thus, these sequences were included in the nanoluciferase expression plasmids (pDESTN2H-N1, -N2, -C1 and -C2) for the NanoLuc-2-hybrid screenings and FLAG-tag plasmid (pCI-Neo-3xflag) for the GST pull-down.

2.3. Protein–Protein Interaction (PPI) Assays

2.3.1. Nanoluciferase-2-Hybrid Complementation Assay

Interactions between FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. proteins and the sixteen type-I IFN pathway proteins from the four study species were identified by NanoLuc-2-hybrid assay. To maximise the chances of visualising a PPI, we wanted to minimise the steric hindrance impact of the enzyme subunits. Therefore, subunits of nanoluciferase, a small 19.1 kDa protein, were fused to the proteins of interest at their N or C terminus. This screening was performed according to the method established by Choi et al., 2019 to maximise the sensitivity and specificity of the method [35].

HEK293T cells were seeded twenty-four hours before transfection at 100,000 cells per well in 96-well, flat-bottom cell culture microplates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). Plasmid mixes corresponding to the interactions to be tested were made in 96 semi-skirted PCR plates (Thermo Fisher Scientific) by mixing 100 ng of the viral construct carrying one of the two nanoluciferase subunits, 100 ng of the cellular construct carrying the other subunit and 10 ng of Renilla luciferase expression plasmid (pCMV-Luc) used



for result normalisation, in a final volume of 15 μL of Jet Prime buffer (Polyplus, Illkirch, France). The Jet Prime solution was prepared by diluting the Jet Prime reagent in Jet Prime buffer at a rate of 0.4 μL Jet Prime and 5 μL buffer per well. This Jet Prime solution was then added to the wells containing the plasmid mixes at a rate of 5.4 μL per well. The 96-well plates were then centrifuged before incubation at RT for 10 min. After incubation, 18 μL of the plasmid–Jet Prime mix was added to the cells.

Forty-eight hours after transfection, the culture medium was removed and 50 μL of passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA) diluted 1:5 with mili-Q[®] water (Millipore Corporation, Burlington, MA, USA) was added to each well containing the transfected cells. After 10 min of incubation under maximum agitation at RT, 60 μL of hikarazine-103 (Z103) solution diluted to 1:100 in MES buffer (Promega) were added to each well. Z103 substrate was obtained from Yves L. Janin (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris). This O-acetylated luciferin was hydrolysed prior to its use using a mixture of DMSO and ethanolic hydrochloride as previously described [36,37]. This procedure provided a stock solution of the corresponding luciferin which could be used immediately or stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The bioluminescence associated with the enzymatic activity of nanoluciferase was measured using an EnSpire[®] Alpha luminometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, 0.1 s integration time). The bioluminescence associated with the enzymatic activity of the Renilla luciferase transfection control was also measured using this instrument after addition of 60 μL of Renilla luciferase Glo substrate (Promega) diluted to 1:100 in Renilla-glow buffer, followed by a 10 min incubation at room temperature sheltered from the light. Positive controls involving the interaction between the human proteins STAT1 and STAT2, which are known to interact very strongly, were performed in each screening to validate the method [38]. Similarly, negative controls involving the absence of interaction between the viral proteins tested and the empty nanoluciferase vectors were performed.

Normalised luminescence ratios (NLR) were calculated using nanoluciferase-complementation-associated luminescence value, negative-control-associated luminescence value and Renilla-luciferase-transfection-control-associated luminescence value. The NLR for a given interacting protein pair A-B was calculated by dividing the luminescent signal by the highest value of luminescence measured in negative controls involving cells co-transfected with viral vectors and nanoluciferase vectors without cellular protein sequences. A second normalisation was performed by dividing the previously obtained results by the Renilla-luciferase-associated luminescence value. To be as stringent as possible, we chose a threshold higher than the usual limit of 3 and set a threshold of NLR equal to 4 in order to discriminate the presence or absence of interaction [39,40]. The choice of this threshold is part of a positive screening approach aimed at reducing the number of proteins targeted for further investigations.

2.3.2. GST Pull-Down Assays

The candidate interactions identified by the NanoLuc-2-hybrid approach were biochemically investigated by GST-pull-down assays. For this purpose, the viral entry vectors were recombined into pDEST27 (Invitrogen) encoding a GST tag, while the vectors containing the cellular protein sequences were recombined into pCI-Neo-3xflag encoding a FLAG tag (kindly provided by Dr Yves Jacob) [41].

Twenty-four hours before transfection, HEK293T cells were seeded at 2,000,000 cells per well in 6-well, flat-bottom cell culture plates (Falcon, Corning, NY, USA). Plasmid mixes corresponding to the interactions to be tested were made by mixing the viral construct carrying a GST tag and the cellular construct carrying a FLAG tag, following the protocol provided by Polyplus. Thirty-six hours post-transfection, the culture medium was removed, and the cells were rinsed and harvested into 1.4 mL of phosphate-buffered saline (PBS, Euromedex, Souffelweyersheim, France). This material was centrifuged for 5 min at $1500\times g$. The supernatants were removed and the pellet resuspended in 300 μL of previously prepared, in-house 120 mM KCl lysis buffer (20 mM MOPS, 120 mM KCl pH



7.4, 2 mM β -mercaptoethanol, 0.5% NP40) and supplemented with anti-protease Complete tablets (Roche) according to the supplier's recommendations. Cells were lysed on ice for 20 min before being centrifuged for 20 min at $13,000\times g$ at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatants containing total proteins were then recovered.

A total of 20 μL of these lysates were retained and diluted in 20 μL of $2\times$ loading buffer previously prepared from $4\times$ NuPage Blue (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:2 and $10\times$ reducing agent (Life Technologies) diluted 1:5 in distilled water. The remaining 260 μL of lysates were used for GST pull-down affinity chromatography. For this, the lysates were incubated for 2 h at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ on a slow stirring wheel, in the presence of 500 μL of 120 mM KCl lysis buffer and 35 μL of Sepharose Glutathione beads (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) previously washed in 120 mM KCl lysis buffer. The samples were then subjected to a 3-repeat cycle of one-minute centrifugation at $13,000\times g$ at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, removal of the supernatant, washing with 900 μL of 120 mM KCl lysis buffer and 5 min incubation on a slow speed impeller. At the end of these wash cycles, the supernatant was removed, and the pellet re-suspended in 35 μL of $2\times$ loading buffer. The samples (lysates and immunoprecipitation) thus obtained were then used for SDS-PAGE followed by a western blot analysis. For this purpose, 30 μL of these samples and 4 μL of ladder Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were deposited on 10-well Bolt Gradient 4–12% Bis-Tris Plus Polyacrylamide Gel (Life Technologies) and separation of the proteins was carried out in Bolt Running Buffer (Life Technologies) diluted 1:20 in distilled water, 10 min at 120 V then 40 min at 180 V. Once migration was complete, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Life Technologies) by liquid transfer in Bolt Transfer Buffer (Life Technologies) diluted 1:20 in distilled water with 20% ethanol (Euromedex) and 0.1% antioxidant (Life), for 1 h at 30 V.

The resulting nitrocellulose membranes were saturated by incubation for 30 min in 5% milk solution (Regilait, Saint-Martin-Belle-Roche; France) diluted in PBS-Tween previously prepared by mixing 7.2 L of distilled water, 800 mL PBS $10\times$ and 8 mL of Tween20 (Euromedex). Half of the membranes were then subjected to an anti-FLAG antibody produced in mouse and conjugated with HRP (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), used at 1:10,000, while the other half were subjected to an anti-GST antibody produced in rabbit, used at 1:2500. After incubation, the membranes were washed 3 times for 5 min in PBS-Tween buffer. They were incubated for 1 h at RT with an HRP-coupled anti-rabbit secondary antibody (Sigma-Aldrich) used at 1:5000. These membranes were again washed 3 times for 5 min in PBS-Tween buffer. The revelation was performed using a Clarity Western ECL kit (Bio-Rad) at a rate of 3 mL per membrane. The membranes were read using a ChemiDoc device (Bio-Rad). Chemiluminescence acquisition was used to reveal the bands associated with the HRP-coupled antibodies, while colorimetric acquisition was used to reveal the ladder.

Positive controls involving the interaction between FMDV 2C and bovine Beclin1 protein, which are known to interact in a very strong manner, were performed every single time in order to further validate the experiments [42]. Similarly, negative controls involving the cellular proteins to be tested were performed using the GST tag but without any viral protein in order to ensure that the cellular proteins did not aspecifically bind to the Glutathione Sepharose beads. The images obtained in negative were inverted, and brightness and contrast were adjusted using the ImageJ processing freeware.

2.4. Luciferase Reporter Assays

The phenotypic impacts of the 3D^{pol} protein of FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. and 3D^{pol} protein of FMDV SAT1/KNP/196/91/1 on the type-I IFN pathway were measured by luciferase reporter assays. FMDV 3Bt protein impact was also measured to be used as a control. Two assays were used to study the induction and amplification phases of the pathway, respectively, using HEK293T, BUCeC and PK-15 cells seeded twenty-four hours before transfection at 300,000 cells per well in 24-well, flat-bottom cell culture plates (Falcon).



For the induction phase study, the non-induced control was obtained by mixing 550 ng of pCI-Neo-3xflag, 300 ng of plasmid encoding IFN β -Firefly luciferase reporter gene (IFN-Beta_pGL3) and 30 ng of pCMV Renilla luciferase. The induction control was obtained by mixing 300 ng of pCI-Neo-3xflag, 300 ng of IFN-Beta_pGL3, 30 ng of pCMV Renilla luciferase and 250 ng of a plasmid (pN Δ RIG-I) encoding a constitutively active RIG-I protein. The positive control was achieved by mixing 300 ng IFN-Beta_pGL3, 30 ng of pCMV Renilla luciferase, 250 ng of pN Δ RIG-I and 300 ng of a plasmid encoding the fusion protein Non-Structural 3 from bluetongue virus 8 carrying a FLAG tag (BTV8-NS3-3xflag). NS3 of BTV8 is known to be a potent inhibitor of the induction phase of the IFN pathway [43]. The 3D^{pol} protein test was performed by mixing 300 ng IFN-Beta_pGL3, 30 ng of pCMV Renilla luciferase, 250 ng of pN Δ RIG-I and 300 ng of a plasmid encoding a fusion protein FMDV 3D^{pol} containing a FLAG tag (destination plasmid pCI-Neo-3xflag). Each condition was performed in triplicate.

For the amplification phase study, non-induced and induction controls were obtained by mixing 300 ng of pCI-Neo-3xflag, 300 ng of plasmid encoding ISRE-Firefly luciferase reporter gene (pISRE-Luc) and 30 ng of pCMV Renilla luciferase. The positive control was achieved by mixing 300 ng of a plasmid encoding the ISRE-luciferase reporter gene, 30 ng of pCMV Renilla luciferase and 300 ng of a plasmid encoding a fusion protein, measles virus V protein carrying a FLAG tag (pMV-V). Measles virus V protein is known to be a potent inhibitor of the signalling phase of the IFN pathway [37]. The 3D^{pol} protein test was performed by mixing 300 ng of plasmid encoding the ISRE-luciferase reporter gene, 30 ng of pCMV Renilla luciferase and 300 ng of a plasmid encoding a fusion protein FMDV 3D^{pol} carrying a FLAG tag. Each condition was performed in triplicate.

The plasmid mixes were systematically incubated for 10 min at RT in the presence of 1 μ L of Jet Prime reagent per well. A total of 100 μ L of the plasmid–Jet Prime mixes were deposited on the cell monolayers. The induction control, positive control and 3D^{pol} test conditions of the amplification phase assay were treated at twenty-four hours post-transfection with 1000 U of IFN-Beta 1A Human (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) to trigger the amplification phase of the IFN pathway. Forty-eight hours post-transfection, the culture medium was gently removed and 200 μ L of lysis buffer diluted 1:5 with mili-Q[®] water was added to each well containing the transfected cells. After 10 min of incubation under maximal agitation at RT, 50 μ L of each lysate was distributed to two wells of 96-well plates. One of the plates was used for Firefly-luciferase-associated bioluminescence readout after addition of 50 μ L per well of Firefly luciferase Bright Glo substrate (Promega). The other plate was used to measure Firefly-luciferase-associated bioluminescence after the addition of 50 μ L per well of Renilla luciferase Glo substrate. Both plates were incubated for 5 min at RT in the dark. Bioluminescence readings were taken using an EnSpire[®] Alpha luminometer. Bioluminescence values associated with Firefly luciferase were normalised by dividing by the bioluminescence value associated with the Renilla luciferase transfection control. The triplicates were then averaged. The percentages of IFN pathway induction were calculated for each condition by dividing the previously normalised bioluminescence values by the mean of the induction controls. The significance of 3D^{pol}-associated relative inhibition from the induction control was determined using GraphPad Prism (9.5.0 version, Dotmatics, Boston, MA, USA).

3. Results

Among the sixty-eight NanoLuc expression vectors obtained by the Gateway[®] recombination cloning system, forty-four corresponding to Lab_{pro}, Lb_{pro}, VP3, VP1, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3Bt, 3C and 3D^{pol} were used to screen PPI with the sixteen cattle IFN pathway proteins. Altogether, one hundred and seventy-six different interactions were assessed between FMDV proteins and bovine IFN pathway proteins. On the basis of these results, the most interesting viral proteins were used to screen PPI with the sixteen swine IFN pathway proteins. Taking into account the different constructs of the system developed by Choi et al., each interaction was tested under eight combinations, resulting in a total of more than two



thousand combinations tested. PPI between the most interesting FMDV proteins and the sixteen selected IFN pathway proteins were screened using the ovine and caprine libraries. The overall effect of viral proteins on the IFN pathway was then characterised by luciferase reporter assays, while the PPI identified by the NanoLuc-2-hybrid assay were challenged by GST pull-down assay (Figure 1).

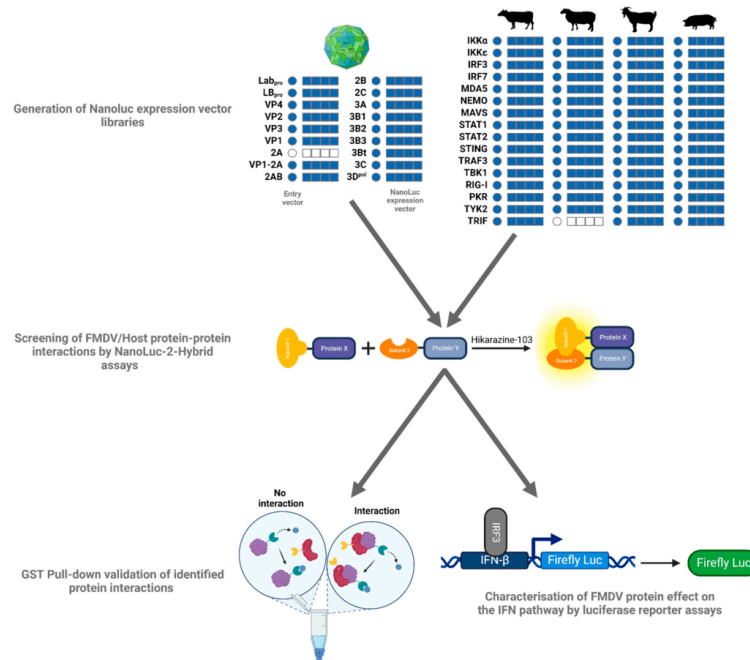


Figure 1. Identification of PPI between FMDV proteins and major IFN pathway proteins. NanoLuc expression vector constructs by Gateway[®] cloning. The circles represent the entry vectors. The squares represent the four configurations of the NanoLuc expression vectors (N1, N2, C1 and C2). In blue: the constructs that were successfully obtained; in white: the constructs that could not be obtained. These vectors were used to perform NanoLuc-2-hybrid screens between 11 FMDV proteins and the 16 IFN pathway proteins selected from the four study species (cattle, sheep, goat and swine). The overall effect of 3D^{pol} on the IFN pathway was characterised by luciferase reporter assays.

3.1. NanoLuc-2-Hybrid Assays for Binary Protein–Protein Interactions FMDV/Host Screening

3.1.1. Evidence of PPI between FMDV Viral Proteins and Cattle, Sheep, Goat and Swine IFN Proteins

Eleven FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 proteins have been tested against the IFN proteins from the cattle library. The overall results of these screenings are presented in Figure 2. The detailed results of each screening are available in the Supplementary Data (Figure S1). The screenings performed with VP3, 2B, 2C, 3B1 and 3Bt did not confirm existing interactions or reveal new ones, as none of the tested interactions was associated with an NLR higher than 4 (Figure S1c,e,f,h,i). The screening involving the VP1 revealed a weak interaction between VP1 and IRF7 (NLR_{max} = 4.22) (Figures 2 and S1d). Screening of PPI between Lab_{pro} and the bovine library highlighted an interaction between Lab_{pro} and IRF7 (NLR_{max} = 10.14) (Figures 2 and S1a). The latter also appeared to interact with the Lpro shorter form (Lb_{pro}) in this study. Seven other Lb_{pro} interactors were also identified, namely, STAT2, IRF3, IRF7, MDA5, IKKε, NEMO, TRAF3 and IKKα (Figures 2 and S1b).



Interactions involving Lb_{pro} appeared to be relatively important, especially those with STAT2 ($NLR_{max} = 19.59$) and IRF7 ($NLR_{max} = 14.74$). Numerous interaction signals have been spotted during 3A protein assays, including $IKK\alpha$, NEMO, IRF7, MAVS, IRF3, STAT2, TRAF3, MDA5, RIG-I, TRIF, TYK2 and $IKK\epsilon$ (Figures 2 and S1g). Very strong interactions have been demonstrated with $IKK\alpha$ ($NLR_{max} = 19.59$), NEMO ($NLR_{max} = 19.59$) and IRF7 ($NLR_{max} = 19.59$). A very strong interaction with $IKK\alpha$ was also revealed with 3C ($NLR_{max} = 31.90$). Seven additional interactions were revealed using this viral protein, namely TYK2, MDA5, TRAF3, NEMO, TBK1, MAVS and PKR (Figures 2 and S1j). Finally, as shown in Figures 2 and 3, screening performed with the $3D^{pol}$, for which no interaction with IFN pathway proteins has been described so far, revealed eight potential interactors: $IKK\alpha$, IRF7, $IKK\epsilon$, IRF3, MDA5, TRAF3, STAT2 and NEMO. The interactions involving $IKK\alpha$ ($NLR_{max} = 20.94$), $IKK\epsilon$ ($NLR_{max} = 12.03$), IRF3 ($NLR_{max} = 11.24$) and IRF7 ($NLR_{max} = 16.83$) were again particularly strong.

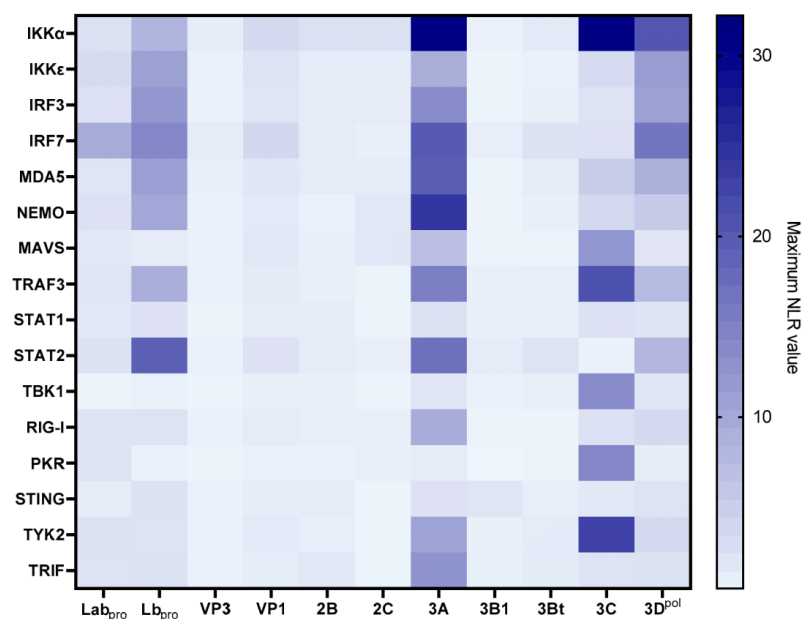


Figure 2. Screening for protein–protein interactions between eleven FMDV proteins and the sixteen selected IFN pathway proteins from the cattle library. HEK293T cells were co-transfected with a vector encoding a luminescent protein used for normalisation, as well as one of the four vectors corresponding to each protein, enabling the expression of proteins carrying one of the two nanoluciferase subunits at their N-ter or C-ter extremity. For each pair of interactors, eight combinations were assessed. The bioluminescence values associated with each interactor pair were measured and then normalised in order to limit the biases related to background noise and variations in transfection efficiency. The values provided correspond to the average of three independently performed experiments.

As the assays based on the viral proteins Lb_{pro} , 3A, 3C and $3D^{pol}$ were the most interesting in terms of the quantity of potential interactions revealed and in view of the significant variability observed within the Lb_{pro} assays, it was decided to pursue the investigations only on the 3A, 3C and $3D^{pol}$ proteins.



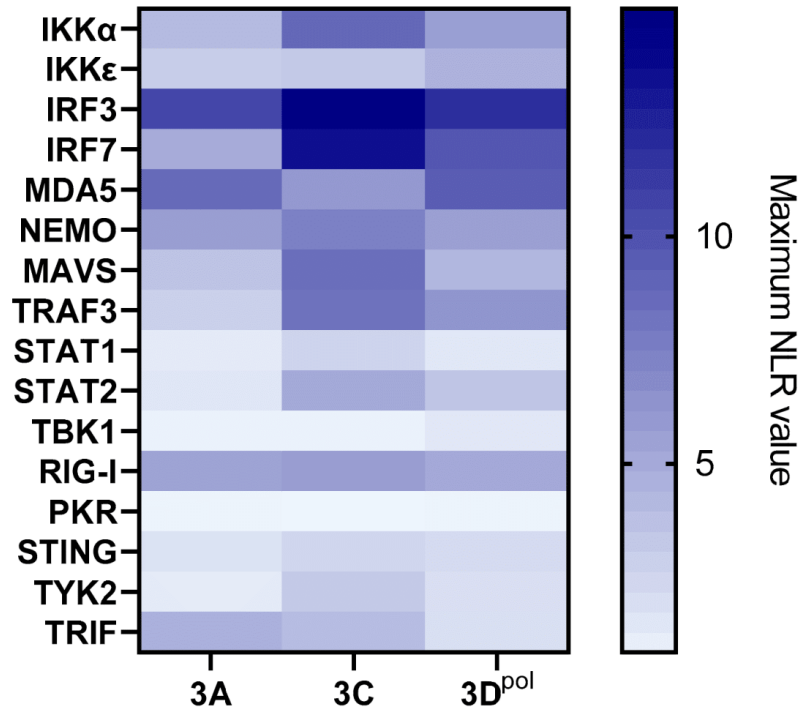


Figure 3. Screening for protein–protein interactions between FMDV 3A, 3C and 3D^{pol} and the sixteen selected IFN pathway proteins from the swine library. HEK293T cells were co-transfected with a vector encoding a luminescent protein used for normalisation, as well as one of the four vectors corresponding to each protein, enabling the expression of proteins carrying one of the two nanoluciferase subunits at their N-ter or C-ter extremity. For each pair of interactors, eight combinations were assessed. The bioluminescence values associated with each interactor pair were measured and then normalised in order to limit the biases related to background noise and variations in transfection efficiency. The values provided correspond to the average of three independently performed experiments.

The three selected proteins were used to screen the swine protein library. The overall results of these screenings are presented in Figure 3. The detailed results of each screening are available in the Supplementary Data (Figure S2). The assays performed with 3A revealed interactions with IRF3, MDA5, NEMO, RIG-I, TRIF, IKKα and IRF7 (Figures 3 and S2a). 3A-IRF3 interaction ($NLR_{max} = 10.81$) is among the most important interactions observed in this screening, followed by 3A-MDA5 ($NLR_{max} = 6.38$) and 3A-NEMO ($NLR_{max} = 5.87$). Screening of 3C evidenced interactions between this protease and swine IRF3, IRF7, MAVS, TRAF3, IKKα, IKKε, STAT2, MDA5, RIG-I and TYK2 as well as with NEMO (Figures 3 and S2b). According to the screening results, the interactions between 3C and IRF3 ($NLR_{max} = 15.00$) as well as IRF7 ($NLR_{max} = 13.63$) are the stronger ones. Screening of 3D^{pol} against the porcine library highlighted numerous interactors, such as IRF3, IRF7, MDA5, NEMO, MAVS, IKKα, TRAF3, RIG-I and IKKε (Figure 3). Similarly to 3C, the strongest interactions from these screens involve the swine proteins IRF3 ($NLR_{max} = 12.09$) and IRF7 ($NLR_{max} = 9.89$). MDA5 ($NLR_{max} = 9.53$) also appears to be an important 3D^{pol} interactor.



As 3D^{P_{ol}} is particularly interesting in regard to its little-known role in the molecular interplay with the IFN pathway, and as the associated screenings are the least prone to high variability, it was decided in the context of this study to continue the experiments exclusively on this protein.

The 3D^{P_{ol}} protein was used to screen the sheep protein library (Figure 4c). This revealed interactions between 3D^{P_{ol}} and sheep IKK α , IRF7, IRF3, IKK ϵ , NEMO, STAT2 and MDA5. Interactions involving IKK α (NLR_{max} = 15.07), IRF3 (NLR_{max} = 9.34) and IRF7 (NLR_{max} = 11.95) appear to be particularly important in these screens. As a reminder, the absence of a TRIF-associated vector construct in the ovine library (due to technical issues) does not allow us to conclude on a potential interaction with FMDV 3D^{P_{ol}}.

Similarly, the 3D^{P_{ol}} protein was used to screen the goat protein library (Figure 4d). This time, eight interactors were identified, namely IKK α , IRF7, IRF3, IKK ϵ , MDA5, RIG-I and NEMO. Similar to the screenings against the sheep protein library, the goat proteins IKK α (NLR_{max} = 11.75), IRF3 (NLR_{max} = 8.65) and IRF7 (NLR_{max} = 6.95) appear to interact most strongly with 3D^{P_{ol}}.

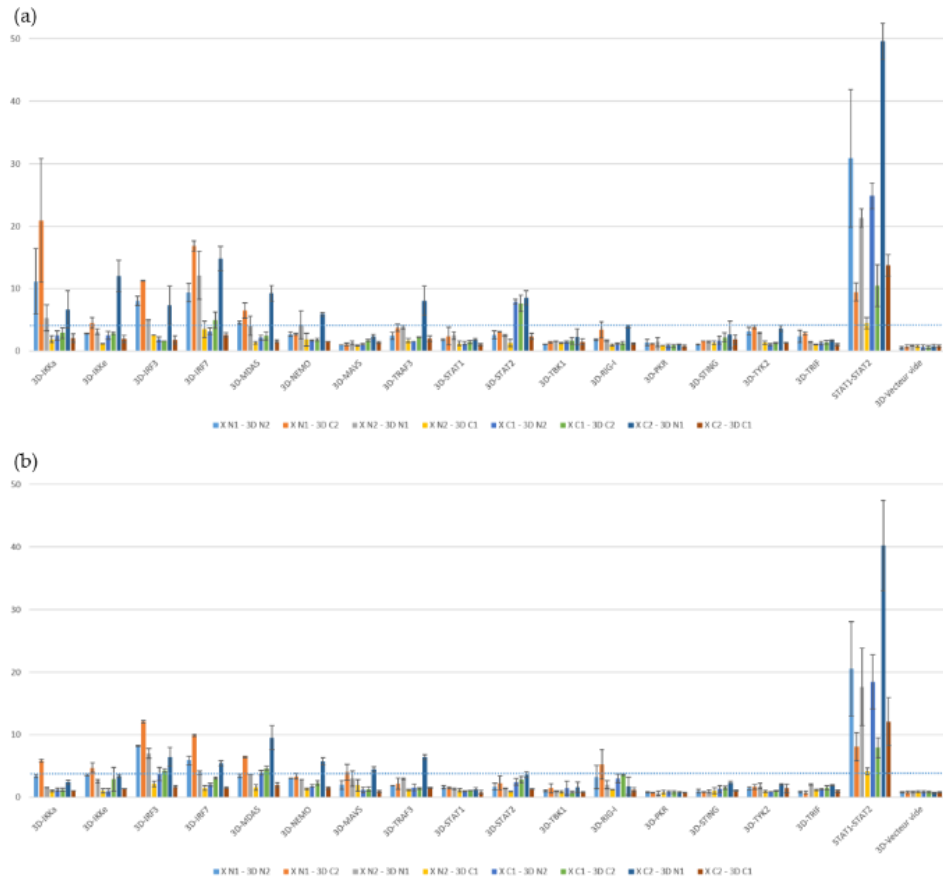


Figure 4. Cont.



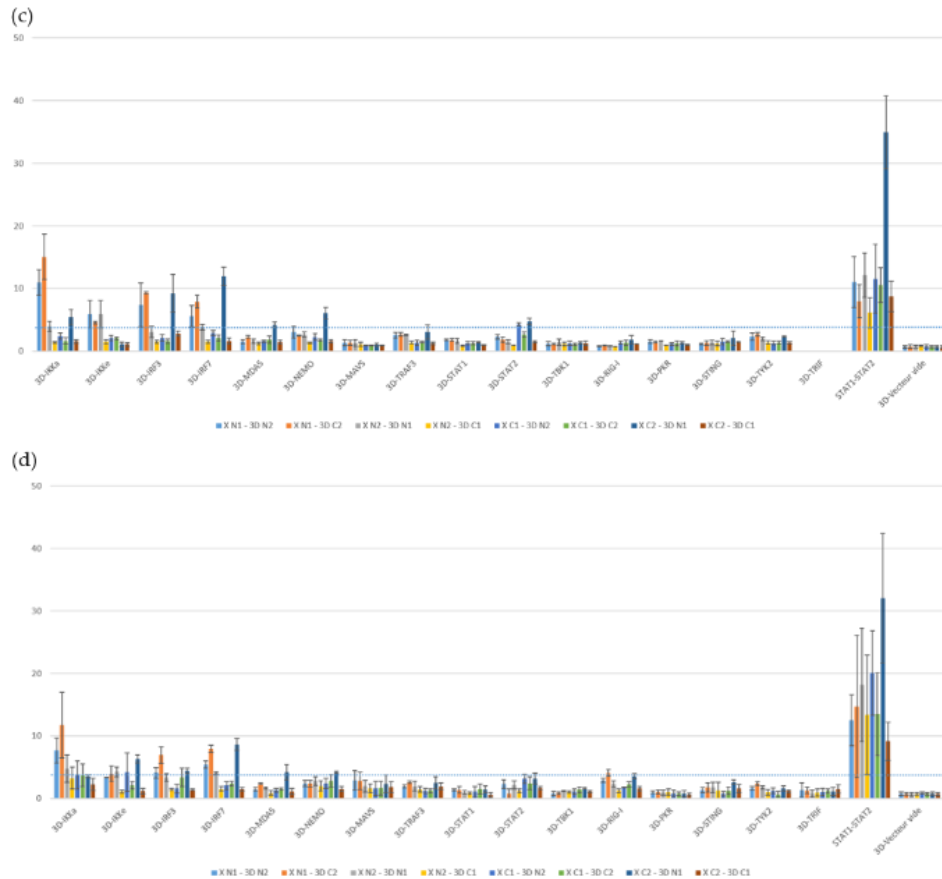


Figure 4. Screening for protein–protein interactions between FMDV 3D^{pol} and the sixteen selected IFN pathway proteins from the cattle, sheep, goat and swine libraries. HEK293T cells were co-transfected with a vector encoding a luminescent protein used for normalisation, as well as one of the four vectors corresponding to each protein, enabling the expression of proteins carrying one of the two nanoluciferase subunits at their N-ter or C-ter extremity. For each pair of interactors, eight combinations were assessed. The bioluminescence values associated with each interactor pair were measured and then normalised in order to limit the biases related to background noise and variations in transfection efficiency. The bioluminescence values associated with the human STAT1–STAT2 interaction serve as a positive control, while those associated with the empty 3D^{pol}–vector pairs constitute a negative control, indicative of background. A threshold of NLR = 4 was defined to discriminate the interactions that were considered positive. The values provided correspond to the average of three independently performed experiments. (a) Screening for protein–protein interactions between FMDV 3D^{pol} and the sixteen selected IFN pathway proteins from the cattle library. (b) Screening for protein–protein interactions between FMDV 3D^{pol} and the sixteen selected IFN pathway proteins from the swine library. (c) Screening for protein–protein interactions between FMDV 3D^{pol} and the sixteen selected IFN pathway proteins from the sheep library. (d) Screening for protein–protein interactions between FMDV 3D^{pol} and the sixteen selected IFN pathway proteins from the goat library.



3.1.2. Screening Comparison between the Different Protein Libraries Derived from Four FMD-Susceptible Species

Results from the 3D^{PoI} screening with the cattle, swine, sheep and goat protein libraries were compared to construct the following heatmap (Figure 5). It seems obvious that a majority of the interactions are conserved among the tested species. Thus, bovine, porcine, ovine and caprine versions of IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 and NEMO interact with 3D^{PoI}. STAT2-3D^{PoI} interaction is evidenced through cattle and sheep IFN pathway proteins screenings, but not in goat and swine. The interaction between 3D^{PoI} and TRAF3 is identified using the bovine and swine libraries, while the interaction between 3D^{PoI} and RIG-I is identified using the goat and swine libraries. We also evidenced that only the porcine version of MAVS interacts with FMDV polymerase (NLR_{max} = 4.45). Although most of the interactions appear to be conserved within the study species, it is interesting to consider the relative importance that these interactions may have in each model used. Thus, a heatmap showing these interactions' relative strengths in the different 3D^{PoI} screenings is presented to best visualise the findings (Figure 5). The maximum NLR values associated with each tested interactor were used to build this figure.

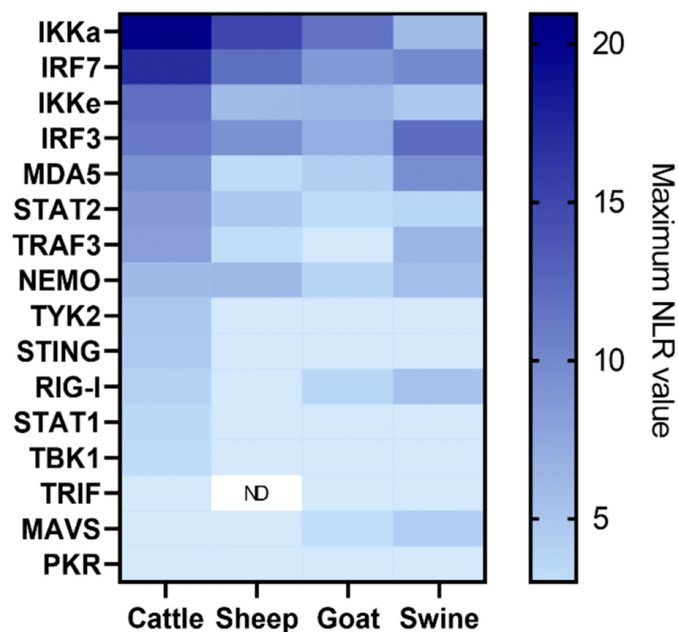


Figure 5. Heatmap comparing the relative strengths associated with each interaction tested by NanoLuc-2-hybrid screening between FMDV 3D^{PoI} and the sixteen selected IFN pathway proteins from the cattle, sheep, goat and swine libraries. HEK293T cells were co-transfected with a vector encoding a luminescent protein used for normalisation, as well as one of the four vectors corresponding to each protein, enabling the expression of proteins carrying one of the two nanoluciferase subunits at their N-ter or C-ter extremity. For each pair of interactors, eight combinations were assessed. The bioluminescence values associated with each interactor pair were measured and then normalised in order to limit the biases related to background noise and variations in transfection efficiency. Here, only the maximum NLR values have been considered to rank the interactions' relative strength. The values provided correspond to the average of three independently performed experiments.



It appears that, while the relative importance of some interactors, such as IRF7, the second-highest NLR value in the four screens, appears to be conserved across species, this is not the case for all. In particular, significant disparities appear to exist between the cattle, sheep and goat versions of the screening compared to those involving swine proteins. For example, IKK α is the interactor associated with the highest NLR value for the bovine (NLR_{max} = 20.94), ovine (NLR_{max} = 15.07) and caprine (NLR_{max} = 11.75) models, but only ranks fifth for the porcine model (NLR_{max} = 5.82). The same applies to IKK ϵ , which is among the five most important interactors in ruminants but only has the eighth-highest NLR value in swine, or STAT2, which is not among the eight-highest NLR values in the swine library screens, in contrast to the other ones tested. Conversely, IRF3, which appears to be the most important interactor in pigs, is only the third-most important among ruminants. The interaction between RIG-I and 3D^{pol} also appears to be relatively more important in swine than in other species.

3.2. FMDV 3D^{pol} Inhibits the IFN Pathway Induction Phase

The significant number of 3D^{pol} protein interactors identified in this study among the major type-I IFN pathway proteins suggests that this viral polymerase has an impact on the pathway. To further investigate the effect of PPI between FMDV 3D^{pol} and type-I IFN pathway proteins, relevant luciferase reporter assays were therefore performed, the first focusing on the induction phase, upstream of IFN production, and the second focusing on the amplification phase, downstream of IFN production. In order to determine the associated interserotypic variability, we have decided to do such an experiment with type O FMDV 3D^{pol}, as well as type SAT1 FMDV 3D^{pol}.

3.2.1. 3D^{pol} Effects on the IFN Pathway Induction Phase

To assess the ability of 3D^{pol} to interfere in the IFN induction phase, luciferase reporter assays have been performed in HEK 293T cells as described in Figure 6a. The controls used validated these luciferase reporter assays, as the induction control resulted in bioluminescence values approximately a hundred times stronger than the background associated with the method (Figure 6b). In addition, inhibition control using the BTV8 NS3 protein also worked, with a reduction of over 90% in the induction of the IFN pathway compared to the induction control. Finally, this test showed an almost 40% reduction in the signal when FMDV 3D^{pol} is expressed. This indicates that, under these experimental conditions, FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. 3D^{pol} (36% inhibition) as well as FMDV SAT1/KNP/196/91/1 3D^{pol} (34% inhibition) have an inhibitory activity on the IFN pathway activation phase. After statistical analysis of the data set, it appears that this inhibitory effect is significant.

In view of these results in a cell model particularly suited to the implementation of luciferase reporter assays but not really more relevant to studying FMDV, similar assays were performed in cells described as susceptible to the virus, namely BUcEC and PK-15. In these reporter assays, the induction control resulted in bioluminescence values approximately five times stronger than the background associated with the method (Figure 6c,d). Inhibition control using the BTV8 NS3 protein was associated with a respective reduction of almost 60% and 40% in the induction of the IFN pathway compared to the induction control. When the FMDV type O 3D^{pol} was expressed, the luminescence signal was reduced by nearly 27% in BUcEC and 21% in PK-15. Furthermore, when the FMDV type O 3Bt was expressed, the luminescence signal did not change significantly compared to the induction control.

3.2.2. 3D^{pol} Effects on the IFN Pathway Amplification Phase

In order to study the impact of 3D^{pol} on the IFN pathway amplification phase, another luciferase reporter assay was performed, as described in in Figure 6e. The controls carried out for this test validated the method used. Indeed, the bioluminescence values associated with the induction control of the amplification phase were more than sixty times higher than those associated with the background (Figure 6f). IFN amplification phase inhibition



control using measles virus protein V resulted in an almost 90% reduction in IFN pathway induction compared to the induction control. In contrast to luciferase reporter assays that focus on the induction phase of the IFN pathway, this assay did not demonstrate a significant effect of 3D^{P^{ol}} on the amplification phase of the IFN pathway under the experimental conditions.

Based on these assays, the 3D^{P^{ol}} of FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 and SAT1/KNP/196/91/1 appear to be able to inhibit the induction phase of the IFN pathway but do not appear to have an effect on the amplification phase. Furthermore, under these experimental conditions, no significant difference could be observed between 3D^{P^{ol}} from FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 and FMDV SAT1/KNP/196/91/1.

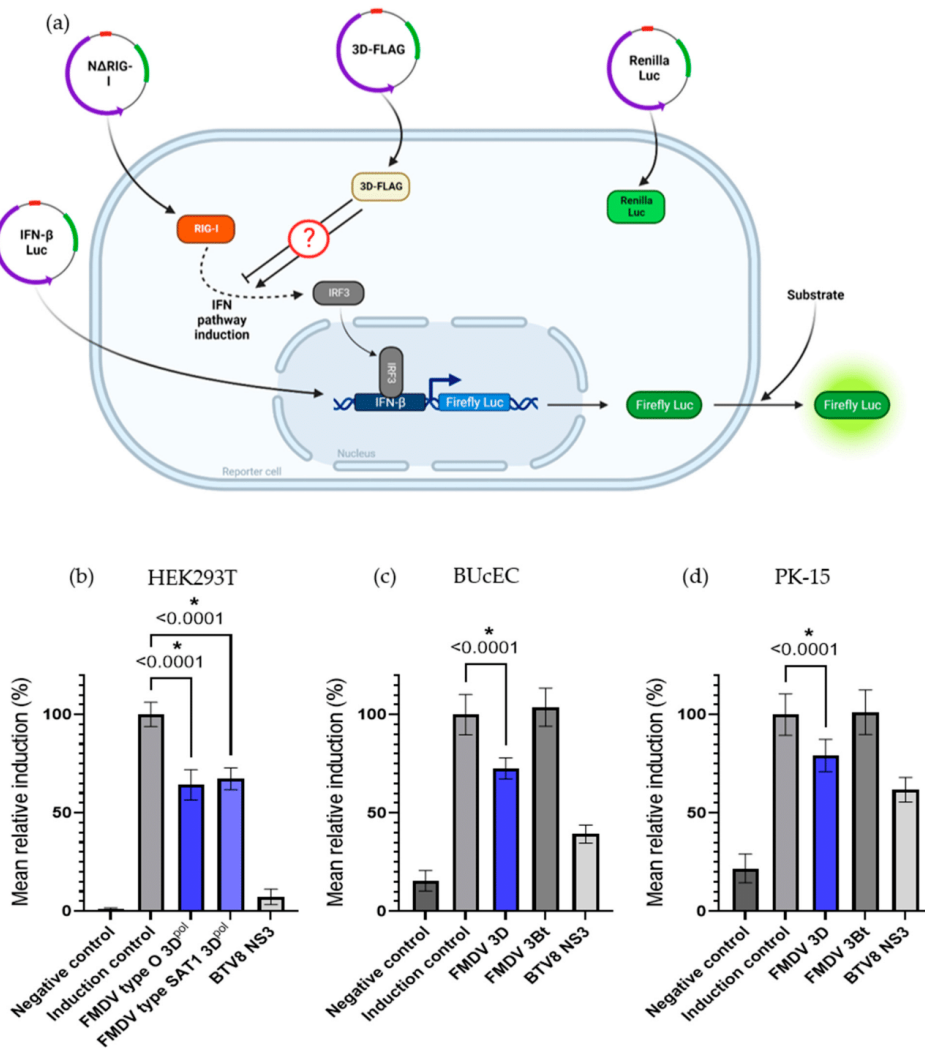


Figure 6. Cont.



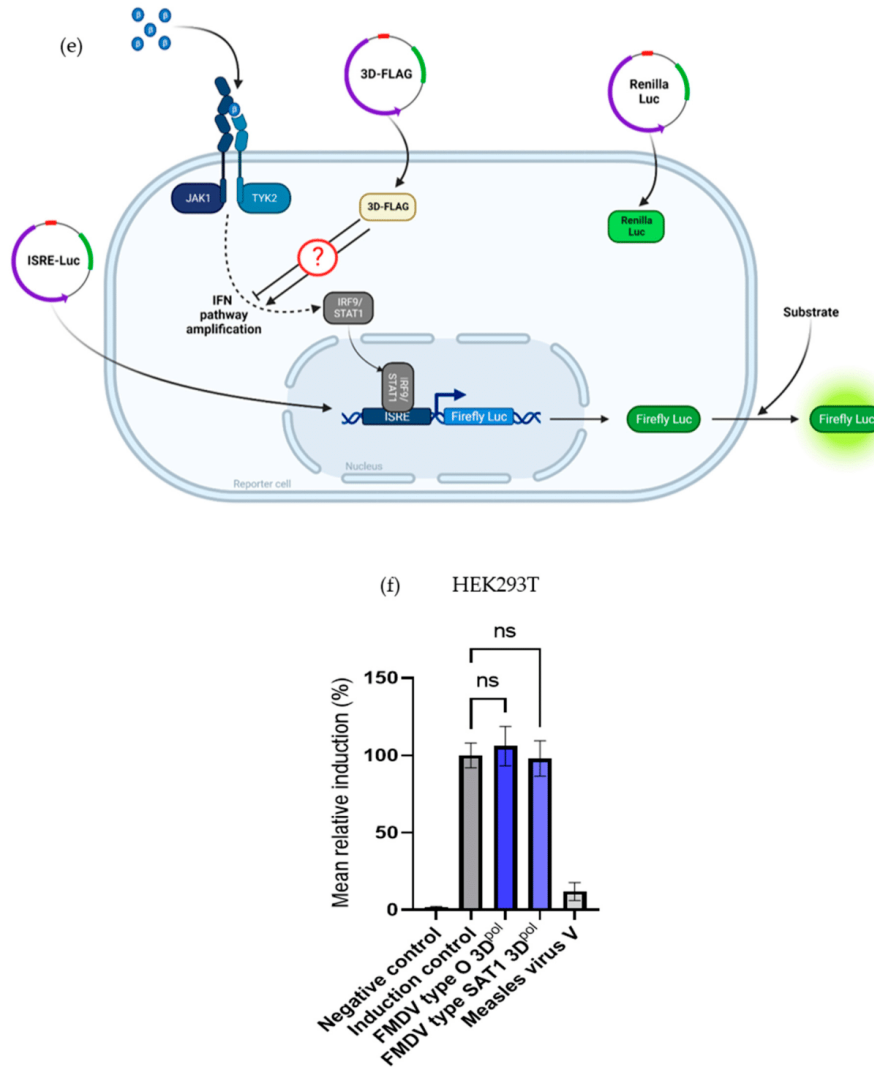


Figure 6. Investigating the effect of FMDV 3Dpol on the IFN pathway. (a) Principles of luciferase reporter assays, focusing on the effect of FMDV 3Dpol on the IFN pathway induction phase. HEK293T, BUcEC and PK-15 cells were co-transfected with a vector encoding an IFN- β -luciferase reporter gene, a vector responsible for the expression of a constitutively activated RIG-I protein, a vector encoding a FLAG-tagged FMDV 3Dpol and a normalisation vector. The activated RIG-I protein triggers IFN pathway induction, leading to the activation of transcription factors such as IRF3. These transcription factors induce the expression of the reporter gene, resulting in luminescent protein expression. The addition of a substrate allows this luminescence to be read out. After comparison with controls, the luminescence quantified in presence of FMDV 3Dpol indicates whether FMDV 3Dpol has an effect on the IFN pathway induction phase and whether its effect is more inhibitory or activating of this pathway. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) (accessed on 11 October 2022). (b) Effect of



FMDV 3Dpol on the IFN pathway induction phase in HEK293T cells. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed, and the bioluminescence was quantified. Reporter-gene-associated luminescence values were normalised regarding normalisation-protein-associated luminescence values, as well as the induction-control-associated values. Results are expressed as a percentage of relative induction compared to the induction control. Here are represented the average results from six independent experiments, each including three technical replicates. An ANOVA test was performed (FMDV O 3Dpol and FMDV SAT1 3Dpol $p_{\text{value}} < 0.0001$). **(c) Effect of FMDV 3Dpol on the IFN pathway induction phase in BUC2C cells.** Forty-eight hours after transfection, cells were lysed, and the bioluminescence was quantified. Reporter-gene-associated luminescence values were normalised regarding normalisation-protein-associated luminescence values, as well as the induction-control-associated values. Results are expressed as a percentage of relative induction compared to the induction control. Here are represented the average results from six independent experiments, each including three technical replicates. An ANOVA test was performed (FMDV O 3Dpol $p_{\text{value}} < 0.0001$ and FMDV O 3Bt non-significant $p_{\text{value}} = 0.30$). **(d) Effect of FMDV 3Dpol on the IFN pathway induction phase in PK-15 cells.** Forty-eight hours after transfection, cells were lysed, and the bioluminescence was quantified. Reporter-gene-associated luminescence values were normalised regarding normalisation-protein-associated luminescence values, as well as the induction-control-associated values. Results are expressed as a percentage of relative induction compared to the induction control. Here are represented the average results from six independent experiments, each including three technical replicates. An ANOVA test was performed (FMDV O 3Dpol $p_{\text{value}} < 0.0001$ and FMDV O 3Bt non-significant $p_{\text{value}} = 0.99$). **(e) Principles of luciferase reporter assays, focusing on the effect of FMDV 3Dpol on the IFN pathway amplification phase.** HEK293T cells were co-transfected with a vector responsible for the expression of an ISRE-luciferase reporter gene, a vector encoding a FLAG-tagged FMDV 3Dpol and a normalisation vector. Cells were then treated with recombinant IFN β in order to trigger the JAK/STAT pathway, leading to the activation of transcription factors such as IRF9 and STAT1/2. These transcription factors induce the expression of the reporter gene, resulting in luminescent protein expression. The addition of a substrate allows this luminescence to be read out. After comparison with controls, the luminescence quantified in presence of FMDV 3Dpol indicates whether FMDV 3Dpol has an effect on the IFN pathway amplification phase and whether its effect is more inhibitory or activating of this pathway. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) (accessed on 11 October 2022). **(f) Effect of FMDV 3Dpol on the IFN pathway amplification phase.** Forty-eight hours after transfection, cells were lysed, and the bioluminescence was quantified. Reporter-gene-associated luminescence values were normalised regarding normalisation-protein-associated luminescence values, as well as the induction-control-associated values. Results are expressed as a percentage of relative induction compared to the induction control. Here are represented the average results from six independent experiments, each including three technical replicates. An ANOVA test was performed (FMDV O 3Dpol $p_{\text{value}} = 0.18$ and FMDV SAT1 3Dpol $p_{\text{value}} = 0.94$). * indicates a statistically significant p -value, ns indicates a non-significant p -value.

3.3. Biochemical Assessment of Candidate Protein–Protein Interaction by GST–Pull Down

In order to confirm the interactions, highlighted by the NanoLuc-2-hybrid approach and strengthened by the luciferase reporter assays, these were biochemically confirmed by GST pull-down affinity chromatography. In this assay, interaction between FMDV 3Dpol, fused to a GST tag, and proteins involved in the IFN pathways from the four study species, fused to a FLAG tag, results in their co-precipitation. Interactor couples to be tested were incubated on Glutathione Sepharose beads. GST tag affinity for these beads allowed GST-fusion proteins to be bound to the beads. When physical interaction exists between the GST-fusion protein and another protein, the latter is also indirectly bound to the beads. After successive washes, the remaining proteins were then unbound to the beads in order to perform an SDS-PAGE followed by a western blot analysis. These analyses were performed on both post-affinity chromatography samples, called IP, and pre-affinity chromatography samples, called Input. Twenty-eight interactions were thus



tested, involving FMDV polymerase and cattle, sheep, goat and pig versions of the proteins IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5, NEMO for which all four forms tested were shown to interact with 3D^{pol} by NanoLuc-2-hybrid assay, and MAVS for which only the porcine form appeared to interact with 3D^{pol}. All results have been summarised in the figure below (Figure 7).

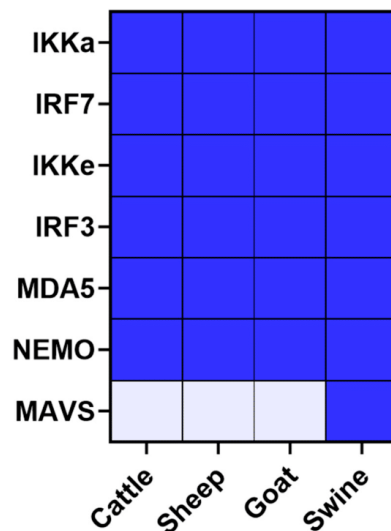


Figure 7. Overview of GST pull-down validation of previously identified protein–protein interactions between FMDV 3Dpol and seven IFN pathway proteins derived from cattle, sheep, goat and swine. Protein–protein interaction involving FMDV 3Dpol were assessed by GST pull-down. HEK293T cells were co-transfected with one vector encoding FMDV protein fused to a GST tag, or a control GST, and one vector encoding IFN pathway protein fused to a FLAG tag. In blue, the interactions that were identified by GST pull-down. In white, the interactions not found by GST pull-down.

Only the western blot analysis resulting from the assays using the swine forms of the IFN pathway proteins are presented in this section (Figure 8). The other western blot analysis are available as Supplementary Data (Figure S3). Despite some disparities regarding visualised band intensity, all overexpressed proteins were detected in the inputs. Anti-FLAG immunoblotting revealed bands corresponding to cellular proteins, and anti-GST immunoblotting revealed viral protein or empty-GST associated bands. (Figures 8 and S3a–c)–Input anti-FLAG and anti-GST). For the pull-down (PD) samples, 2C-GST, 3D-GST and empty-GST bands were detected. Except for the empty-GST control involving the bovine version of NEMO, the affinity chromatography step is validated for all tested conditions (Figures 8 and S3a–c)–PD anti-GST and Input anti-GST). The empty GST-protein interaction controls did not show aspecific binding of IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 and MAVS proteins (Figures 8 and S3a–c)–PD anti-FLAG). In contrast, weak bands associated to the goat and sheep versions of NEMO were observed among the negative controls. It suggests that these proteins partly binds in a non-specific manner to the Glutathione Sepharose beads or to the GST tag alone, even in absence of the 3D^{pol} protein. As this aspecific binding is less important than the specific binding, it is nevertheless possible to conclude to an interaction between 3D^{pol} and NEMO. With regard to the interaction tests between these IFN pathway proteins and the 3D^{pol} FMDV, bands related to the different proteins studied could be visualised after labelling the PD samples with a FLAG



antibody (Figures 8 and S3a–c)-PD anti-FLAG). Bands matching IKK α and IKK ϵ proteins were observed. The same was true for IRF7, whose post-pull-down presence was revealed. Bands corresponding to IRF3, NEMO and MDA5 were also found. These signals, alongside the lack of a specific physical interaction between the GST vector itself and the proteins IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 and NEMO, suggest that there are effective interactions between these cellular proteins and FMDV 3D^{pol}. In contrast, while the interaction assay between 3D^{pol} and the swine MAVS protein showed a band corresponding to MAVS, no signal consistent with this protein was observed for the interaction tests conducted with its bovine, ovine and caprine versions (Figure 9).

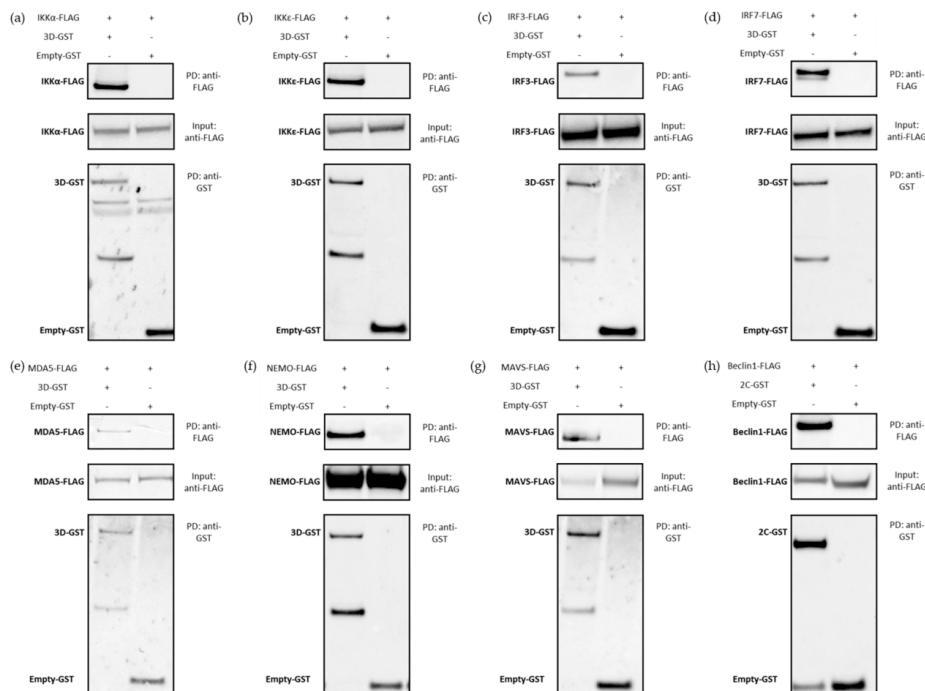


Figure 8. GST Pull-down validation of previously identified protein–protein interactions between FMDV 3D^{pol} and seven IFN pathway proteins derived from swine. Protein–protein interactions involving FMDV 3D^{pol} were assessed by GST pull-down. HEK293T cells were co-transfected, with one vector encoding FMDV protein fused to a GST tag or a control GST, and one vector encoding IFN pathway protein fused to a FLAG tag. Thirty-six hours post-transfection, the cells were lysed, and the total proteins fraction, corresponding to the “input”, was collected. A part of this fraction was used to perform pull-down assays on Glutathione Sepharose beads. Proteins collected after pull-down were defined as the “PD” condition. Both “input” and “PD” proteins were used to perform western blot analysis. FMDV proteins were identified using an anti-GST antibody. IFN pathway proteins were identified using an anti-FLAG antibody. (a) Assessment of 3D^{pol} and IKK α interaction. (b) Assessment of 3D^{pol} and IKK ϵ interaction. (c) Assessment of 3D^{pol} and IRF3 interaction. (d) Assessment of 3D^{pol} and IRF7 interaction. (e) Assessment of 3D^{pol} and MDA5 interaction. (f) Assessment of 3D^{pol} and NEMO interaction. (g) Assessment of 3D^{pol} and MAVS interaction. (h) Positive control involving the interaction between FMDV 2C and the bovine Beclin1 protein, which are known to interact in a very strong manner.



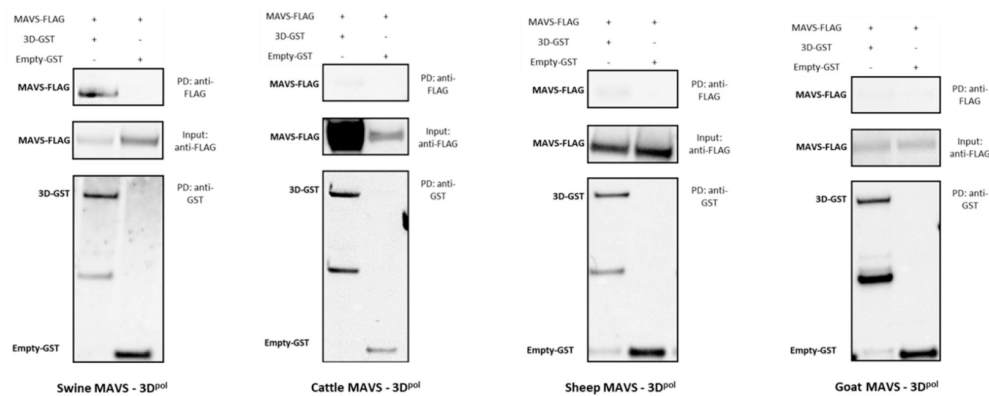


Figure 9. GST pull-down validation of previously identified host-specific interactions between FMDV 3Dpol and cattle, sheep, goat and swine MAVS. Protein–protein interactions involving FMDV 3Dpol were assessed by GST pull-down. HEK293T cells were co-transfected with one vector encoding 3Dpol fused to a GST tag and one vector encoding MAVS fused to a FLAG tag. Thirty-six hours post-transfection, the cells were lysed, and the total proteins fraction, corresponding to the “input”, was collected. A part of this fraction was used to perform pull-down assays on Glutathione Sepharose beads. Proteins collected after pull-down were defined as the “PD” condition. Both “input” and “PD” proteins were used to perform western blot analysis. 3Dpol was identified using an anti-GST antibody. MAVS was identified using an anti-FLAG antibody.

Overall, the GST pull-down affinity chromatography tests carried out in this study thus confirmed a large part of the potential interactions highlighted by the NanoLuc-2-hybrid approach and thus confirmed the choice made concerning the positivity threshold set for these screens. Under the experimental conditions tested, 3D^{pol} interacts with bovine, ovine, caprine and porcine forms of IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, NEMO and MDA5. Lastly, it was confirmed that only the swine form of MAVS protein interacts with the FMDV polymerase.

4. Discussion

Virus survival depends on its ability to adapt to its host in order to facilitate replication and evade the immune response. To do so, viruses manipulate the host’s cellular machinery and hijack natural cellular pathways. These cellular manipulation mechanisms can notably rely on protein interactions between the virus and its host. Thus, through this study, we report that FMDV 3D polymerase is able to interact with several proteins involved in the innate immune response, specifically in the type-I IFN pathway.

Among the numerous interactions highlighted by the NanoLuc-2-hybrid assays are some confirmed interactions already described in the literature (Table 1). Indeed, the interactions between Lb_{pro} and TRAF3 and MDA5, and between 3A and MAVS, MDA5 and RIG-I, already shown in a human model, were confirmed from their bovine versions for the first ones, and from bovine and porcine versions for the three others [44–47]. The same is true for the 3C–MDA5, 3C–NEMO, Lb_{pro}–STAT1/2 and Lb_{pro}–IRF7 interactions, which were already demonstrated using porcine proteins and which were found in both the screenings carried out within this study using the porcine and bovine libraries [48–51]. While the interaction described between Lb_{pro} and swine IRF3 was not found using its bovine version, bovine IRF3 was identified as interacting with the alternative leader protein form Lb_{pro} [50]. It would therefore appear that these interactions are conserved between the different study species.



Table 1. Putting into perspective the protein–protein interactions already described in the literature between FMDV proteins and proteins that are part of the sixteen IFN pathway proteins we are focusing on, with regards to our nanoluciferase screening results. N.A. = Information not available No* = Found with Lb_{pro} but not Lab_{pro}.

Viral Protein	Cellular Target	Direct or Indirect InterAction?	Study Model	Reference	Found by NanoLuc Approach (Cattle)
2B	MDA5	direct	Human	[52]	No
	RIG-I	direct	Swine	[53]	No
	MAVS	direct	Human	[44]	No
3A	MDA5	direct	Human	[44]	Yes
	RIG-I	direct	Human	[44]	Yes
3B	RIG-I	direct	Swine	[54]	No
	MDA5	direct	Swine	[48]	Yes
3C	STAT1/2	co-factor(s)	Human	[55]	No
	NEMO	direct	Swine	[49]	Yes
	PKR	indirect	Swine	[56]	No
	MDA5	direct	Human	[47]	Yes
Lb _{pro}	STAT1/2	direct	Swine	[51]	Yes
	TRAF3	direct	Human	[46]	No
	TBK1	direct	Human	[46]	No
	RIG-I	direct	Human	[46]	No
Lab _{pro}	IRF3	direct	Swine	[50]	No*
	IRF7	direct	Swine	[50]	No*
	TBK1	direct	Swine	[57]	No
	MAVS	N.A.	Swine	[57]	No
VP1	MAVS	direct	N.A.	[58]	No
VP3	MAVS	direct	Human	[59]	No

However, these tests did not confirm all of the interactions already described between FMDV and the IFN pathway players. This could be explained partly by the non-conservation of these interactions, which was highlighted by the use of proteins from different species. For example, the interaction already documented between 3B and the swine version of RIG-I could not be confirmed in the assay using the bovine version [54]. Similarly, it was not possible to confirm the interaction between RIG-I and 2B in the screening based on the cattle library [53]. It is therefore quite conceivable that these interactions could also have been revealed by testing the pig version of this sensor. The situation is exactly the same for the interactions described between Lab_{pro} and the swine forms of TBK1 and MAVS, interactions that were not found with their bovine version [57]. The interactions Lb_{pro}-TBK1, Lb_{pro}-RIG-I, 2B-MDA5, VP3-MAVS and VP1-MAVS could not be confirmed either [46,52,58,59]. These interactions, which were identified from the human versions of the proteins mentioned, with the exception of VP1-MAVS for which the origin of MAVS is not mentioned, do not seem to be conserved in cattle. As expected, phylogenetic analysis of proteins from the different study species showed significant differences between FMDV-susceptible species and humans. It is thus quite possible that the interactions observed between the virus and human proteins are not conserved in ruminants, and in this case, cattle.

The previously described interactions between 3C and the STAT1 and STAT2 proteins are somewhat different from the other cases mentioned [55]. Thus, even if these interactions highlighted from a human model could not be confirmed through the bovine library screening, it is not possible to conclude that they are not conserved, since it was shown that these interactions were indirect and dependent on co-factors. Without a physical interaction between the proteins tested, the nanoluciferase subunits cannot reassemble and no signal can be detected. The interaction between 3C and STAT2 observed in the porcine library screening, reflecting a physical interaction between the two parts, cannot therefore correspond to the PPI already described. Similarly, the interaction described between 3C and the swine PKR was not found in the porcine assay, which is consistent with the indirect



nature of this interaction leading to the 3C-mediated lysosomal degradation of PKR [56]. The interaction found with the bovine version of PKR cannot therefore be related to the interaction described above.

The conclusions concerning the conservation or not of the interactions already described in the literature thus seem to depend on various factors. In view of the results obtained during our screening, it seems relevant to consider the importance of the models used for the identification of PPI, since some of them do not seem to be conserved from one species to another. This problem seems all the more important as a large proportion of the PPI identified were obtained with expressed proteins that were not derived from species sensitive to FMD, such as humans, a species that is not necessarily the most suitable for studying a virus affecting artiodactyls [26]. Furthermore, it seems that other variables also have a role to play. Indeed, the choice of the method appears to be decisive, since, in the case of the NanoLuc-2-hybrid approach, it is only possible to detect interactions if they involve physical proximity of the two partners [35]. Indirect PPI are therefore not detectable by this type of method. Conversely, it is likely that the methods used in this study, involving overexpressed proteins, induce PPI that may not exist between endogenous proteins in an infectious context. As with the species used to obtain the cellular proteins, the FMDV strain used differs from one study to another, and this choice could have a major impact on the PPI detected, particularly those involving the least conserved viral sequences.

Indeed, due to mutations, some strains will affect certain species to a greater or lesser extent. In particular, it was shown that the strain O/SKR/01/2014, containing a mutation-deleting copy of 3B1, was shown to be relatively non-virulent in pigs [60]. Furthermore, it was shown that a single mutation in the 3A sequence permitted an FMDV strain to infect guinea pigs, a non-natural host for the virus, whereas other deletions and substitutions in the 3A sequence can result in virus attenuation and reduced replication efficiency in cattle [61]. The impact of these mutations on the existing PPI between the virus and its hosts could help explain this phenomenon. It would therefore be extremely interesting to combine interaction tests including cell proteins from different susceptible species and viral proteins from different FMDV strains.

Our screenings also revealed new potential interactions involving the proteins VP1, Lab_{pro}, Lb_{pro}, 3A, 3C and 3D^{pol}. According to cattle screening, it was shown that VP1 interacts with IKK α and IRF7, while Lb_{pro} interacts with STAT2, IRF7, IKK ϵ , NEMO, TRAF3 and IKK α . New bovine interactors were also identified for 3A and 3C, respectively, IKK α , NEMO, IRF7, STAT2, TRAF3, TRIF, TYK2 and IKK ϵ and IKK α , TYK2, TRAF3, TBK1, MAVS and IKK ϵ . Meanwhile, numerous interactions were found for 3D^{pol} with IKK α , IRF7, IKK ϵ , IRF3, MDA5, TRAF3, STAT2, NEMO, RIG-I and TYK2. Concerning proteins 3A and 3C, while five of their newly identified interactions with the bovine library are respectively conserved among the porcine library, it appears that some swine proteins do not interact with these two viral proteins. For example, no interactions could be identified between 3A and STAT2, TRAF3 and TYK2, nor between 3C and PKR and TBK1 in the screenings with the porcine protein library. While there does not appear to be a link between the proteins involved in the above-mentioned non-conserved interactions, STAT2 happens to be one of the targets for which the results of the bovine and porcine screening diverge. Thus, while 3A interacts with the bovine form of STAT2 but not its porcine form, the opposite case is observed for 3C. It would thus be relevant to study in more detail the conservation of this protein between cattle and swine. Even if there are point mutations between the bovine and porcine forms observed using the Constraint-based Multiple Alignment Tool (NCBI), it seems that numerous STAT2 activity domains are conserved (Smart-emb1). Thus, the N-terminal domain, which is responsible for protein interactions, the all-alpha helical domain, the DNA-binding domain and the C-terminal domain of STAT2, which allows export of STAT2 into the cytoplasm, do not seem to be determinant in the PPI evidenced with 3A and 3C [62].

Interestingly, IRF3 is one of the proteins for which an interaction could be observed when its porcine form was used, unlike its bovine version, with 3C. While some mutations



are noticeable between the bovine and porcine sequences, at the domain tryptophan pentad repeat, which is involved in DNA binding, they do not seem to alter the functioning of this activity domain. Differences in interactions between the bovine and porcine forms could also be demonstrated for TYK2. Indeed, the bovine form was identified as an interactor of 3A and 3D^{PoI}, but not the swine one. TYK2 was also not found to interact with 3D^{PoI} in its ovine and caprine versions. As with most of the proteins focused on in this study, bovine, ovine and caprine forms are highly conserved, whereas divergences appear when ruminant-derived protein sequences are aligned with porcine ones. This could again help to explain the observed differential interactions. However, among the known TYK2 activity domains, all appear to be conserved, namely, the membrane attachment domain, Src homology 2 domains, phosphotransferases and the tyrosine-kinase domain (Smart-embl). Other discrepancies were revealed between the 3D^{PoI} polymerase screens performed within our study. For example, MAVS was only shown to interact with 3D^{PoI} in its porcine version in the screenings performed. Such differences could be associated with the numerous mutations observed between ruminants and porcine MAVS forms. However, as these mutations do not seem to affect the caspase activation and recruitment domains (CARD), a key region of MAVS activity, other domains that may affect MAVS activity could be involved. The study of the relative importance of the PPI identified through the nanoluciferase screening allowed us to separate the swine model from the ruminant ones. Indeed, among the most important interactors in cattle, sheep and goats, IKK ϵ and IKK α do not seem to be as important in pigs. These discrepancies could be explained by some point mutations between the ruminant and porcine protein sequences. However, these mutations do not seem to have an impact on the known activity domains of these proteins, respectively, tyrosine kinase and serine/threonine kinase. The interactions between the different versions of STAT2 and 3D^{PoI} also seem to follow the same pattern. Conversely, according to our study, IRF3 and RIG-I have been shown to be much more important interactors in swine than in ruminants. However, it would appear that IRF7, which is shown as the second-most important interactor for all four species, is involved in a conserved interaction, indicating a possible high importance of this interaction. These interpretations should be taken cautiously, since the relative strength associated with each interaction depends partly on the protein expression efficiency. Furthermore, it is quite possible that a weak interaction may correlate with a significant transient biological function.

The combination of nanoluciferase assays and GST pull-down affinity chromatography enabled the identification and confirmation of numerous interactions involving the 3D^{PoI} protein of FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. Indeed, we have shown that viral polymerase interacts with bovine, ovine, caprine and swine forms of IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7 and MDA5, the bovine, ovine and porcine forms of NEMO, and the swine form of MAVS. The performance of the IFN pathway luciferase reporter assays has shown that these PPI, identified at the molecular level, translate into a global phenotypic effect. Thus, it was shown that FMDV 3D^{PoI} significantly inhibited the induction phase of the IFN pathway. However, this protein does not appear to have an impact on the amplification phase of the IFN pathway. Although these assays have been conducted in human cells, a model which is not FMDV-susceptible, the resulting observations fully corroborate the findings of the interaction studies, since the 3D^{PoI} interactors confirmed by affinity chromatography, IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 and MAVS, are involved upstream in IFN production.

Given the large number of interactors identified for 3D^{PoI} in this study, we would have expected to observe a greater effect on the induction phase of the IFN pathway than the 36% inhibition observed with 3D^{PoI} from FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 or the 34% observed with 3D^{PoI} from FMDV SAT1/KNP/196/91/1 in HEK293T cells. Several hypotheses can be put forward to explain these mild results. On the one hand, it is quite conceivable that not all the protein interactions highlighted in this study act in the same way. Indeed, FMDV is known to either activate or inhibit the immune response depending on what is favourable to its replication. Thus, some interactions could tend towards the activation of the host response, as is the case of the interaction between 2B and LGP2, which



enhances the inflammatory response, and others could, in contrast, induce an inhibition of the induced immune response [63]. Moreover, it is possible that not all these interactions are involved in blocking the IFN pathway. On the other hand, if we put ourselves in the global context of infection, FMDV is known to involve almost all of its proteins in fighting against the host cellular response [21,25,26]. It would thus seem to be logical that each protein is not capable, by itself, of inducing a strong inhibition of the immune response, but that the subversion of the immune response induced by FMDV is due to a synergic action between the different viral proteins. It would thus seem extremely interesting to measure the capacities of each of the FMDV proteins, as well as their combined action by performing new luciferase reporter assays. Finally, given the lack of a significant difference in the effect of 3D^{P_{ol}} between FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 and FMDV SAT1/KNP/196/91/1, which is described as a strain with a high propensity to persist, it does not seem possible to establish a direct relationship between 3D^{P_{ol}}-mediated inhibition of the IFN pathway and FMDV persistence [64]. In addition, HEK293T cells, non-susceptible to FMDV infection, might not enable the establishment of the interactions identified in our study between the FMDV 3D^{P_{ol}} and cellular proteins. This is why we performed luciferase reporter assays in bovine (BUcEC) and porcine (PK-15) cells, which are sensitive to FMDV. By using these cells derived from species of interest, we were able to confirm the tendency observed in HEK293T cells, since a 3D^{P_{ol}} inhibitory effect on the IFN response induction phase was observed. This effect is, however, less pronounced than for HEK293T, resulting in respective inhibitions of 27% and 21%. Nevertheless, it is interesting to note that the observed effect is related to the 3D^{P_{ol}} and not to the method's noise, since the overexpression of FMDV 3Bt, for which we did not identify any interaction, did not induce any significant inhibition of the IFN response. As the transfection efficiency associated with these cells is considerably lower than for HEK293T, the results obtained are potentially under-representative of the biological reality. Thus, the induction of interferon response is reduced compared to the HEK293T assays, as well as the inhibition associated with the BTv8 NS3 control. These mild results can also be explained through the fact that our reporter system, like most of those used in the literature, is adapted to human cells and may underperform in other cell models. The challenge of finding cells that are both efficiently transfectable and relevant to the virus underlines the importance of developing suitable *in vitro* models.

This study has thus shed light on the putative role of FMDV 3D^{P_{ol}} in subverting the immune system of its hosts. Until now, this protein, essentially known for its major role in the viral cycle as an RNA-dependent RNA polymerase, has been the subject of very few studies concerning its action against the antiviral response.

Indeed, to date, only two interactions have been described for 3D^{P_{ol}}, with mouse protein Sam68 [27] and swine ATP-dependent RNA helicase DDX1 [28]. Sam68 is a positive regulator of mRNA stability also targeted by 3C, and DDX1 is a factor involved in both the inhibition of FMDV replication and the production of type-I IFN. While the 3D^{P_{ol}}-Sam68 interaction has been characterised as a specific binding to prevent Sam68 translocation to the nucleus, both the mode of interaction and the biological significance of 3D^{P_{ol}}-DDX1 have not been explored, indicating that this newly discovered role of 3D^{P_{ol}} is still understudied [27]. Similarly, after having long been side-lined in favour of their importance in viral structure, the impact of FMDV structural proteins in fighting the immune system has recently been shown to be much more important than the scientific community had thought. More generally, the large number of studies on FMDV-associated PPI show that this virus dedicates almost its entire small genome to fighting the immune system and especially the type-I interferon pathway [26,65].

The 3D^{P_{ol}} interactors identified in this study are among the IFN pathway proteins involved in more than 75% of virus-host interactions (review in preparation). They are thus major proteins of the IFN pathway, whose subversion is extremely important for FMDV. This is evidenced by the fact that MAVS, a central protein in IFN pathway signalling, is also targeted at the RNA VP1, and protein levels via different mechanisms by FMDV VP1, L_{pro} and 3A [44,57,58]. Many other viruses have made MAVS one of the key points in the



fight against the antiviral response, including picornaviruses such as HRV-1A, hepatitis A virus (HAV) and SVV, which target MAVS via the 2A and 3C; 2B and precursor 3ABC; and 3C proteins, respectively [66–68]. Similarly, NEMO, the protein responsible for the formation of the IKK complex, is also impacted by FMDV 3C, responsible for its swine form cleavage, at the Gln383 residue, to prevent NF- κ B activation [49,59,69]. The proteins IRF3 and IRF7, which, after dimerization and translocation into the nucleus, associate with type-I IFN promoter to stimulate their transcription, are all targets of Lpro. Indeed, the FMDV leader protein is responsible for the proteolytic degradation of porcine IRF3 and IRF7 in a dose-dependent manner, but does not affect their mRNA transcription [50]. While no interaction between FMDV and IKK α nor IKK ϵ has been demonstrated to date, this is not the case for other viruses. Indeed, EV71 2C has already been shown to suppress IKK α phosphorylation by recruiting IKK β and IKK α into viral inclusion bodies [70]. Similarly, encephalomyocarditis virus 3C has been shown to target IKK ϵ through disrupting the TANK-TBK1-IKK ϵ -IRF3 complex to limit IFN I production [71]. Finally, MDA5, which is a cytoplasmic sensor of viral RNA playing a major role in sensing viral infection by recognising long double-stranded RNA, is also targeted by FMDV L_{pro}, 2B, 3A and 3C [44,47,48,52]. Interestingly, it turns out that MDA5 is one of the few IFN pathway proteins for which interactions with the 3D^{pol} of other picornaviruses have been demonstrated. Indeed, it has been shown that the 3D^{pol} of coxsackievirus B3 interacts directly with human MDA5 [72]. Similarly, the 3D^{pol} of enterovirus EV71 has also been described as interacting with the human MDA5 CARD domain [72]. Comparison of the protein sequences of coxsackievirus B3 and EV71 3D^{pol} with that of FMDV 3D^{pol} showed few conserved regions. Among these regions, none corresponds to a known motif that could be related to the interaction with MDA5. Therefore, it is not possible to determine at this time whether the FMDV 3D–MDA5 interaction is similar to that of the other two picornaviruses. Other studies concerning picornavirus 3D^{pol} have shown an interaction between EV71 and another important player in the IFN pathway, namely STAT1 [73]. A 3D^{pol}–Sam68 poliovirus (PV) interaction could also be demonstrated, a sign of conservation of certain interactions between the viruses of this family [74]. Virus-type-I IFN pathway interactions are also associated with autophagy and apoptosis, as these programmed cell death processes are activated by FMDV to facilitate viral replication and to clear certain components of the IFN pathway [75]. MAVS protein is an interesting example, since FMDV VP0 induces its degradation via the apoptotic pathway [76].

Although globally quite conserved, it is conceivable that the differences in interspecific PPI revealed might contribute to explaining some of the differences observed between cattle, sheep, goats and swine during infection with the same strain of FMDV, such as varying degrees of infectivity, different pathogenesis, and differential persistence [5,6,77]. In general, and as expected from the evolutionary dynamics between ruminants and swine, sequence alignments showed high conservation of type-I IFN pathway proteins among ruminants, whereas considerably more mutations were observed between ruminants and swine. The evidence of an interaction between 3D^{pol} and MAVS in swine, a species unlikely to be persistently infected, but not in ruminants, in which FMDV can persist, could be an opportunity to investigate a potential link between PPI and viral persistence [14–16]. Nevertheless, in view of the numerous studies carried out regarding the differential persistence of FMDV, it seems obvious that this phenomenon cannot be based exclusively on a single protein interaction but rather on the establishment of an extremely complex equilibrium involving numerous viral and cellular factors.

5. Conclusions

In conclusion, the present study reveals novel interactions between FMDV 3D^{pol} and type-I IFN pathway proteins from cattle, sheep, goat and swine. These interactions have been represented in a summary scheme (Figure 10), focusing on the putative role of FMDV 3D^{pol} in subverting the immune response. This represents one of the first studies to demonstrate interactions between FMDV polymerase and the host immune response. It is



also the first study to show an effect of 3D^{P01} on the major actors of the IFN pathway and, more precisely, an inhibitory effect of the viral protein on the IFN induction phase. Our study reveals that most of the observed interactions are conserved between the species of interest. However, their relative strength was not necessarily conserved from one species to another. Such differences could be considered as a potential partial clue to answer some questions concerning the pathogenesis as well as differential persistence of FMDV and should be investigated under infectious conditions to clarify these PPI biological functions. In view of the PPI recently discovered based on other picornaviruses' 3D^{P01}, it would appear that the identification of PPI is far from reaching a saturation point. It therefore seems essential to continue investigations in order to improve our knowledge of the fine molecular dialogue established between the virus and its hosts. Given the results obtained, it seems extremely important to choose study models that are as close as possible to biological systems, with the ultimate objective of studying these interactions in an infection context.

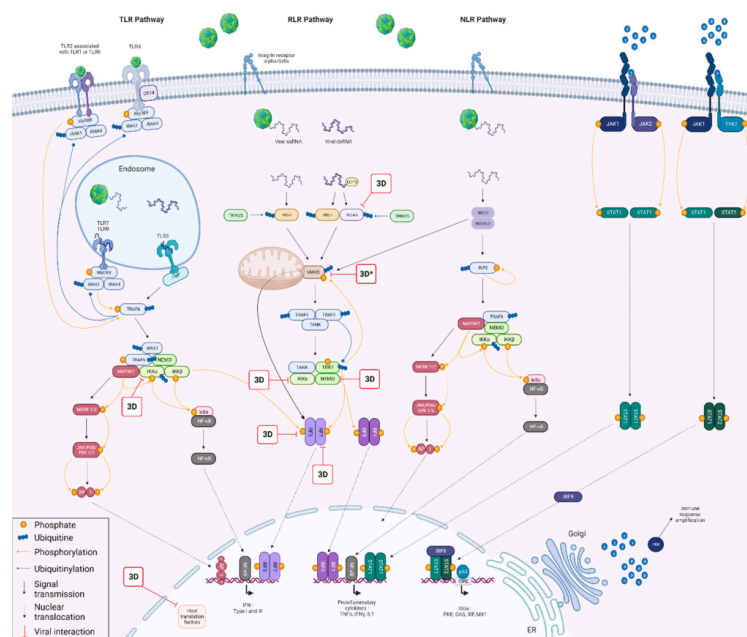


Figure 10. Innate antiviral immune responses and FMDV 3D^{P01} counteraction. The induction of the IFN response results from the recognition of characteristic viral patterns by cellular membrane or cytoplasmic receptors. Activation of these receptors triggers a signalling cascade in the cell, leading to the activation of transcription factors involved in the production of IFN-alpha and IFN-beta and pro-inflammatory cytokines. Finally, the signalling phase consists of the binding of IFN-alpha and beta to their receptors, which generates an activation signal that propagates through the cell via the JAK/STAT pathway to allow the expression of numerous proteins with antiviral or immunomodulatory activity. It has been shown in this study that FMDV 3D^{P01} has an inhibitory effect on the IFN pathway induction phase. This inhibitory effect could be related to its ability to interact *in vitro* with numerous IFN pathway proteins derived from cattle, sheep, goat and swine, namely, IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 and NEMO, as well as with the swine version of MAVS (represented by 3D*). Adapted from Sarry et al [26]. Created with BioRender.com (accessed on 11 October 2022).



Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15030666/s1>, Table S1: Primers used for viral sequence amplification; Table S2: IFN pathway protein Genbank references; Figure S1: nanoluciferase screenings against the bovine library; Figure S2: nanoluciferase screenings against the swine library; Figure S3: GST pull-down analysis of PPI between FMDV 3D^{Pol} and cattle, sheep, and goat protein libraries.

Author Contributions: Conceptualization—S.B.-B., D.V. and G.C.; methodology—G.C. and M.S.; investigation—M.S. and J.D.; writing—original draft preparation—M.S.; supervision—S.B.-B. and L.B.K.; writing—review and editing—S.B.-B., D.V., G.C., L.B.K. and S.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This original study work was funded by ANSES animal health laboratory's own funds.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are given in the Results section.

Acknowledgments: Thanks to Yves Jacob who kindly provided us with the pDESTN2H-N1, -N2, -C1 and -C2 vectors, adapted to the Gateway[®] system. Thanks to Yves Janin who kindly provided the Z103 substrate used in the NanoLuc-2-hybrid screens. Thanks to Anne-Claire Lagrée and Clothilde Rouxel who provided the primary bovine cells BUC^{EC}.

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

References

- Jamal, S.M.; Belsham, G.J. Foot-and-mouth disease: Past, present and future. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 116. [CrossRef] [PubMed]
- Knowles, N.; Samuel, A. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* **2003**, *91*, 65–80. [CrossRef] [PubMed]
- Belsham, G.J.; Kristensen, T.; Jackson, T. Foot-and-mouth disease virus: Prospects for using knowledge of virus biology to improve control of this continuing global threat. *Virus Res.* **2020**, *281*, 197909. [CrossRef] [PubMed]
- Pacheco, J.M.; Henry, T.M.; O'Donnell, V.K.; Gregory, J.B.; Mason, P.W. Role of Nonstructural Proteins 3A and 3B in Host Range and Pathogenicity of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* **2003**, *77*, 13017–13027. [CrossRef] [PubMed]
- Arzt, J.; Juleff, N.; Zhang, Z.; Rodriguez, L.L. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease I: Viral Pathways in Cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 291–304. [CrossRef]
- Arzt, J.; Baxt, B.; Grubman, M.J.; Jackson, T.; Juleff, N.; Rhyhan, J.; Rieder, E.; Waters, R.; Rodriguez, L.L. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine, Small Ruminants, and Wildlife; Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus-Host Interactions. *Transbound. Emerg. Dis.* **2011**, *58*, 305–326. [CrossRef]
- World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 3.1.8: Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*; World Organization for Animal Health (OIE): Paris, France, 2021; Available online: https://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/3.01.08_fmd.pdf (accessed on 11 April 2022).
- Stenfeldt, C.; Arzt, J. The Carrier Conundrum; A Review of Recent Advances and Persistent Gaps Regarding the Carrier State of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Pathogens* **2020**, *9*, 167. [CrossRef]
- Stenfeldt, C.; Belsham, G.J. Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in pharyngeal epithelium biopsy samples obtained from infected cattle: Investigation of possible sites of virus replication and persistence. *Vet. Microbiol.* **2012**, *154*, 230–239. [CrossRef]
- Stenfeldt, C.; Eschbaumer, M.; Rekant, S.I.; Pacheco, J.M.; Smoliga, G.R.; Hartwig, E.J.; Rodriguez, L.L.; Arzt, J. The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle. *J. Virol.* **2016**, *90*, 6344–6364. [CrossRef]
- Arzt, J.; Belsham, G.J.; Lohse, L.; Bötner, A.; Stenfeldt, C. Transmission of Foot-and-Mouth Disease from Persistently Infected Carrier Cattle to Naive Cattle via Transfer of Oropharyngeal Fluid. *Mosphere* **2018**, *3*, e00365-18. [CrossRef]
- Fish, I.; Stenfeldt, C.; Spinard, E.; Medina, G.N.; Azzinaro, P.A.; Bertram, M.R.; Holinka, L.; Smoliga, G.R.; Hartwig, E.J.; Santos, T.D.L.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Interserotypic Recombination in Superinfected Carrier Cattle. *Pathogens* **2022**, *11*, 644. [CrossRef]
- Childs, K.; Jackson, B.; Harvey, Y.; Seago, J. Trans-Encapsidation of Foot-and-Mouth Disease Virus Genomes Facilitates Escape from Neutralizing Antibodies. *Viruses* **2022**, *14*, 1161. [CrossRef] [PubMed]
- Van Bekkum: Observations on the Carrier State of-Google Scholar. Available online: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Observations+on+the+carrier+state+of+cattle+exposed+to+foot-and-mouth+disease+virus&author=van+Bekkum+J.+G.&author=Frenkel+H.+S.&author=Frederiks+H.+H.+J.&author=Frenkel+S.&publication+year=1959&journal=Tijdschr.+Diergeneesk.&volume=84 (accessed on 19 January 2022).
- Burrows, R. The persistence of foot-and-mouth disease virus in sheep. *Epidemiol. Infect.* **1968**, *66*, 633–640. [CrossRef] [PubMed]



16. Stenfeldt, C.; Pacheco, J.M.; Smoliga, G.R.; Bishop, E.; Pauszek, S.J.; Hartwig, E.J.; Rodriguez, L.L.; Arzt, J. Detection of Foot-and-mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State. *Transbound. Emerg. Dis.* **2014**, *63*, 152–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. de la Torre, J.C.; Martínez-Salas, E.; Diez, J.; Villaverde, A.; Gebauer, F.; Rocha, E.; Dávila, M.; Domingo, E. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* **1988**, *62*, 2050–2058. [[CrossRef](#)]
18. O'Donnell, V.; Pacheco, J.; Larocco, M.; Gladue, D.; Pauszek, S.; Smoliga, G.; Krug, P.; Baxt, B.; Borca, M.; Rodriguez, L. Virus–host interactions in persistently FMDV-infected cells derived from bovine pharynx. *Virology* **2014**, *468*, 185–196. [[CrossRef](#)]
19. Kopliku, L.; Relmy, A.; Romey, A.; Gorna, K.; Zientara, S.; Bakkali-Kassimi, L.; Blaise-Boisseau, S. Establishment of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection in MDBK cells. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 2503–2516. [[CrossRef](#)]
20. Eschbaumer, M.; Stenfeldt, C.; Smoliga, G.R.; Pacheco, J.M.; Rodriguez, L.L.; Li, R.W.; Zhu, J.; Arzt, J. Transcriptomic Analysis of Persistent Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus in Cattle Suggests Impairment of Apoptosis and Cell-Mediated Immunity in the Nasopharynx. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162750. [[CrossRef](#)]
21. Medina, G.N.; Segundo, F.D.-S.; Stenfeldt, C.; Arzt, J.; Santos, T.D.L. The Different Tactics of Foot-and-Mouth Disease Virus to Evade Innate Immunity. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2644. [[CrossRef](#)]
22. Hägglund, S.; Laloy, E.; Näslund, K.; Pfaff, F.; Eschbaumer, M.; Romey, A.; Relmy, A.; Rikberg, A.; Svensson, A.; Huet, H.; et al. Model of persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *67*, 133–148. [[CrossRef](#)]
23. Pfaff, F.; Hägglund, S.; Zoli, M.; Blaise-Boisseau, S.; Laloy, E.; Koethe, S.; Zühlke, D.; Riedel, K.; Zientara, S.; Bakkali-Kassimi, L.; et al. Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus. *Viruses* **2019**, *11*, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gao, Y.; Sun, S.-Q.; Guo, H.-C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virol. J.* **2016**, *13*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Li, K.; Wang, C.; Yang, F.; Cao, W.; Zhu, Z.; Zheng, H. Virus–Host Interactions in Foot-and-Mouth Disease Virus Infection. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 571509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sarry, M.; Vitour, D.; Zientara, S.; Kassimi, L.B.; Blaise-Boisseau, S. Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model. *Viruses* **2022**, *14*, 2129. [[CrossRef](#)]
27. Rai, D.K.; Lawrence, P.; Kloc, A.; Schafer, E.; Rieder, E. Analysis of the interaction between host factor Sam68 and viral elements during foot-and-mouth disease virus infections. *Virol. J.* **2015**, *12*, 1–17. [[CrossRef](#)]
28. Xue, Q.; Liu, H.; Zeng, Q.; Zheng, H.; Xue, Q.; Cai, X. The DEAD-Box RNA Helicase DDX1 Interacts with the Viral Protein 3D and Inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus Replication. *Virol. Sin.* **2019**, *34*, 610–617. [[CrossRef](#)]
29. Robertson, B.; Morgan, D.; Moore, D.; Grubman, M.; Card, J.; Fischer, T.; Weddell, G.; Dowbenko, D.; Yansura, D. Identification of amino acid and nucleotide sequence of the foot-and-mouth disease virus RNA polymerase. *Virology* **1983**, *126*, 614–623. [[CrossRef](#)]
30. Domingo, E.; Escarmis, C.; Sevilla, N.; Moya, A.; Elena, S.F.; Quer, J.; Novella, I.S.; Holland, J.J.; Shi, J.; Sun, J.; et al. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J.* **1996**, *10*, 859–864. [[CrossRef](#)]
31. Ferrer-Orta, C.; Ferrero, D.; Verdaguer, N. RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms. *Viruses* **2015**, *7*, 4438–4460. [[CrossRef](#)]
32. Nayak, A.; Goodfellow, I.G.; Belsham, G.J. Factors Required for the Uridylylation of the Foot-and-Mouth Disease Virus 3B1, 3B2, and 3B3 Peptides by the RNA-Dependent RNA Polymerase (3D^{Pol}) In Vitro. *J. Virol.* **2005**, *79*, 7698–7706. [[CrossRef](#)]
33. Loundras, E.-A.; Streetley, J.; Herod, M.R.; Thompson, R.; Harris, M.; Bhella, D.; Stonehouse, N.J. Higher-order structures of the foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase required for genome replication. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lagrée, A.-C.; Fasani, F.; Rouxel, C.; Pivet, M.; Pourcelot, M.; Fablet, A.; Romey, A.; Caignard, G.; Vitour, D.; Blaise-Boisseau, S.; et al. Bovine Organospecific Microvascular Endothelial Cell Lines as New and Relevant In Vitro Models to Study Viral Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Choi, S.G.; Olivet, J.; Cassonnet, P.; Vidalain, P.-O.; Luck, K.; Lambourne, L.; Spirohn, K.; Lemmens, I.; Dos Santos, M.; Demeret, C.; et al. Maximizing binary interactome mapping with a minimal number of assays. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Coutant, E.P.; Goyard, S.; Hervin, V.; Gagnot, G.; Baatallah, R.; Jacob, Y.; Rose, T.; Janin, Y.L. Gram-scale synthesis of luciferins derived from coelenterazine and original insights into their bioluminescence properties. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 3709–3713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Coutant, E.P.; Gagnot, G.; Hervin, V.; Baatallah, R.; Goyard, S.; Jacob, Y.; Rose, T.; Janin, Y.L. Bioluminescence Profiling of NanoKAZ/NanoLuc Luciferase Using a Chemical Library of Coelenterazine Analogues. *Chem. Eur. J.* **2019**, *26*, 948–958. [[CrossRef](#)]
38. Li, X.; Leung, S.; Qureshi, S.; Darnell, J.E.; Stark, G.R. Formation of STAT1-STAT2 Heterodimers and Their Role in the Activation of IRF-1 Gene Transcription by Interferon- α . *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5790–5794. [[CrossRef](#)]
39. Cassonnet, P.; Rolloy, C.; Neveu, G.; Vidalain, P.-O.; Chantier, T.; Pellet, J.; Jones, L.; Muller, M.; Demeret, C.; Gaud, G.; et al. Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 990–992. [[CrossRef](#)]



40. Morel, J.; Sedano, L.; Lejal, N.; Da Costa, B.; Batsché, E.; Muchardt, C.; Delmas, B. The Influenza Virus RNA-Polymerase and the Host RNA-Polymerase II: RPB4 Is Targeted by a PB2 Domain That Is Involved in Viral Transcription. *Viruses* **2022**, *14*, 518. [[CrossRef](#)]
41. Mendoza, J.-A.; Jacob, Y.; Cassonnet, P.; Favre, M. Human Papillomavirus Type 5 E6 Oncoprotein Represses the Transforming Growth Factor β Signaling Pathway by Binding to SMAD3. *J. Virol.* **2006**, *80*, 12420–12424. [[CrossRef](#)]
42. Gladue, D.P.; O'Donnell, V.; Baker-Branstetter, R.; Holinka, L.G.; Pacheco, J.M.; Fernandez-Sainz, I.; Lu, Z.; Brocchi, E.; Baxt, B.; Piccone, M.E.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Protein 2C Interacts with Beclin1, Modulating Virus Replication. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12080–12090. [[CrossRef](#)]
43. Chauveau, E.; Doceul, V.; Lara, E.; Breard, E.; Sailleau, C.; Vidalain, P.-O.; Meurs, E.F.; Dabo, S.; Schwartz-Cornil, I.; Zientara, S.; et al. NS3 of Bluetongue Virus Interferes with the Induction of Type I Interferon. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8241–8246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Li, D.; Lei, C.; Xu, Z.; Yang, F.; Liu, H.; Zhu, Z.; Li, S.; Liu, X.; Shu, H.; Zheng, H. Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 3A inhibits the interferon- β signaling pathway. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wang, D.; Fang, L.; Liu, L.; Zhong, H.; Chen, Q.; Luo, R.; Liu, X.; Zhang, Z.; Chen, H.; Xiao, S. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) leader proteinase negatively regulates the porcine interferon- λ 1 pathway. *Mol. Immunol.* **2011**, *49*, 407–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, D.; Fang, L.; Li, P.; Sun, L.; Fan, J.; Zhang, Q.; Luo, R.; Liu, X.; Li, K.; Chen, H.; et al. The Leader Proteinase of Foot-and-Mouth Disease Virus Negatively Regulates the Type I Interferon Pathway by Acting as a Viral Deubiquitinase. *J. Virol.* **2011**, *85*, 3758–3766. [[CrossRef](#)]
47. Pulido, M.R.; Martínez-Salas, E.; Sobrino, F.; Sáiz, M. MDA5 cleavage by the Leader protease of foot-and-mouth disease virus reveals its pleiotropic effect against the host antiviral response. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 1–13. [[CrossRef](#)]
48. Kim, H.; Kim, A.-Y.; Choi, J.; Park, S.; Park, S.; Kim, J.-S.; Lee, S.-I.; Park, J.-H.; Park, C.-K.; Ko, Y.-J. Foot-and-Mouth Disease Virus Evades Innate Immune Response by 3C-Targeting of MDA5. *Cells* **2021**, *10*, 271. [[CrossRef](#)]
49. Wang, D.; Fang, L.; Li, K.; Zhong, H.; Fan, J.; Ouyang, C.; Zhang, H.; Duan, E.; Luo, R.; Zhang, Z.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Cleaves NEMO To Impair Innate Immune Signaling. *J. Virol.* **2012**, *86*, 9311–9322. [[CrossRef](#)]
50. Wang, D.; Fang, L.; Luo, R.; Ye, R.; Fang, Y.; Xie, L.; Chen, H.; Xiao, S. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *399*, 72–78. [[CrossRef](#)]
51. Ma, X.; Luo, Z.; Song, R.; Nian, X.; Choudhury, S.M.; Ru, Y.; Yang, F.; Zhang, Y.; Zeng, Z.; Cao, W.; et al. The Foot-and-Mouth Disease Virus Lb Protease Cleaves Intracellular Transcription Factors STAT1 and STAT2 to Antagonize IFN- β -Induced Signaling. *J. Immunol.* **2023**, *210*, 283–296. [[CrossRef](#)]
52. Li, M.; Xin, T.; Gao, X.; Wu, J.; Wang, X.; Fang, L.; Sui, X.; Zhu, H.; Cui, S.; Guo, X. Foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2B negatively regulates the RLR-mediated IFN- β induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *504*, 238–244. [[CrossRef](#)]
53. Zhu, Z.; Wang, G.; Yang, F.; Cao, W.; Mao, R.; Du, X.; Zhang, X.; Li, C.; Li, D.; Zhang, K.; et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Viroporin 2B Antagonizes RIG-I-Mediated Antiviral Effects by Inhibition of Its Protein Expression. *J. Virol.* **2016**, *90*, 11106–11121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhang, X.; Zhu, Z.; Wang, C.; Yang, F.; Cao, W.; Li, P.; Du, X.; Zhao, F.; Liu, X.; Zheng, H. Foot-and-Mouth Disease Virus 3B Protein Interacts with Pattern Recognition Receptor RIG-I to Block RIG-I-Mediated Immune Signaling and Inhibit Host Antiviral Response. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 2207–2221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Du, Y.; Bi, J.; Liu, J.; Liu, X.; Wu, X.; Jiang, P.; Yoo, D.; Zhang, Y.; Wu, J.; Wan, R.; et al. 3C^{PRO} of Foot-and-Mouth Disease Virus Antagonizes the Interferon Signaling Pathway by Blocking STAT1/STAT2 Nuclear Translocation. *J. Virol.* **2014**, *88*, 4908–4920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Li, C.; Zhu, Z.; Du, X.; Cao, W.; Yang, F.; Zhang, X.; Feng, H.; Li, D.; Zhang, K.; Liu, X.; et al. Foot-and-mouth disease virus induces lysosomal degradation of host protein kinase PKR by 3C proteinase to facilitate virus replication. *Virology* **2017**, *509*, 222–231. [[CrossRef](#)]
57. Visser, L.J.; Aloise, C.; Swatek, K.N.; Medina, G.N.; Olek, K.M.; Rabouw, H.H.; de Groot, R.J.; Langereis, M.A.; Santos, T.D.L.; Komander, D.; et al. Dissecting distinct proteolytic activities of FMDV Lpro implicates cleavage and degradation of RLR signaling proteins, not its deISGylase/DUB activity, in type I interferon suppression. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008702. [[CrossRef](#)]
58. Ekanayaka, P.; Lee, S.-Y.; Herath, T.U.B.; Kim, J.-H.; Kim, T.-H.; Lee, H.; Chathuranga, K.; Chathuranga, W.A.G.; Park, J.-H.; Lee, J.-S. Foot-and-mouth disease virus VP1 target the MAVS to inhibit type-I interferon signaling and VP1 E83K mutation results in virus attenuation. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1009057. [[CrossRef](#)]
59. Li, D.; Yang, W.; Yang, F.; Liu, H.; Zhu, Z.; Lian, K.; Lei, C.; Li, S.; Liu, X.; Zheng, H.; et al. The VP3 structural protein of foot-and-mouth disease virus inhibits the IFN- β signaling pathway. *FASEB J.* **2016**, *30*, 1757–1766. [[CrossRef](#)]
60. Park, J.-H.; Tark, D.; Lee, K.-N.; Lee, S.-Y.; Ko, M.-K.; Lee, H.-S.; Kim, S.-M.; Ko, Y.-J.; Seo, M.-G.; Chun, J.-E.; et al. Novel foot-and-mouth disease virus in Korea, July–August 2014. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **2016**, *5*, 83–87. [[CrossRef](#)]
61. Núñez, J.I.; Baranowski, E.; Molina, N.; Ruiz-Jarabo, C.M.; Sánchez, C.; Domingo, E.; Sobrino, F. A Single Amino Acid Substitution in Nonstructural Protein 3A Can Mediate Adaptation of Foot-and-Mouth Disease Virus to the Guinea Pig. *J. Virol.* **2001**, *75*, 3977–3983. [[CrossRef](#)]
62. Banninger, G.; Reich, N.C. STAT2 Nuclear Trafficking. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39199–39206. [[CrossRef](#)]



63. Zhu, Z.; Li, C.; Du, X.; Wang, G.; Cao, W.; Yang, F.; Feng, H.; Zhang, X.; Shi, Z.; Liu, H.; et al. Foot-and-mouth disease virus infection inhibits LGP2 protein expression to exaggerate inflammatory response and promote viral replication. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Maree, F.; de Klerk-Lorist, L.-M.; Gubbins, S.; Zhang, F.; Seago, J.; Pérez-Martín, E.; Reid, L.; Scott, K.; van Schalkwyk, L.; Bengis, R.; et al. Differential Persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in African Buffalo Is Related to Virus Virulence. *J. Virol.* **2016**, *90*, 5132–5140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kloc, A.; Rai, D.K.; Rieder, E. The Roles of Picornavirus Untranslated Regions in Infection and Innate Immunity. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Drahos, J.; Racaniello, V.R. Cleavage of IPS-1 in Cells Infected with Human Rhinovirus. *J. Virol.* **2009**, *83*, 11581–11587. [[CrossRef](#)]
67. Cao, X.; Xue, Y.-J.; Du, J.-L.; Xu, Q.; Yang, X.-C.; Zeng, Y.; Wang, B.-B.; Wang, H.-Z.; Liu, J.; Cai, K.-Z.; et al. Induction and Suppression of Innate Antiviral Responses by Hepatitis A Virus. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1865. [[CrossRef](#)]
68. Qian, S.; Fan, W.; Liu, T.; Wu, M.; Zhang, H.; Cui, X.; Zhou, Y.; Hu, J.; Wei, S.; Chen, H.; et al. Seneca Valley Virus Suppresses Host Type I Interferon Production by Targeting Adaptor Proteins MAVS, TRIF, and TANK for Cleavage. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00823-17. [[CrossRef](#)]
69. Yang, F.; Yamashita, J.; Tang, E.; Wang, H.-L.; Guan, K.; Wang, C.-Y. The Zinc Finger Mutation C417R of I- κ B Kinase γ Impairs Lipopolysaccharide- and TNF-Mediated NF- κ B Activation through Inhibiting Phosphorylation of the I- κ B Kinase β Activation Loop. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2446–2452. [[CrossRef](#)]
70. Ji, L.; Yang, E.; He, S.; Jin, Y.; Chen, D. Enterovirus 2C Protein Suppresses IKK α Phosphorylation by Recruiting IKK β and IKK ϵ into Viral Inclusion Bodies. *Viral Immunol.* **2021**, *34*, 218–226. [[CrossRef](#)]
71. Huang, L.; Xiong, T.; Yu, H.; Zhang, Q.; Zhang, K.; Li, C.; Hu, L.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Liu, Q.; et al. Encephalomyocarditis virus 3C protease attenuates type I interferon production through disrupting the TANK–TBK1–IKK ϵ –IRF3 complex. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 2051–2065. [[CrossRef](#)]
72. Kuo, R.-L.; Chen, C.-J.; Wang, R.Y.L.; Huang, H.-I.; Lin, Y.-H.; Tam, E.-H.; Tu, W.-J.; Wu, S.-E.; Shih, S.-R. Role of Enteroviral RNA-Dependent RNA Polymerase in Regulation of MDA5-Mediated Beta Interferon Activation. *J. Virol.* **2019**, *93*. [[CrossRef](#)]
73. Wang, L.-C.; Chen, S.-O.; Chang, S.-P.; Lee, Y.-P.; Yu, C.-K.; Chen, C.-L.; Tseng, P.-C.; Hsieh, C.-Y.; Chen, S.-H.; Lin, C.-F. Enterovirus 71 Proteins 2A and 3D Antagonize the Antiviral Activity of Gamma Interferon via Signaling Attenuation. *J. Virol.* **2015**, *89*, 7028–7037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. McBride, A.E.; Schlegel, A.; Kirkegaard, K. Human protein Sam68 relocalization and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2296–2301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. O'Donnell, V.; Pacheco, J.M.; LaRocco, M.; Burrage, T.; Jackson, W.; Rodriguez, L.L.; Borca, M.V.; Baxt, B. Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology* **2011**, *410*, 142–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Li, D.; Zhang, J.; Yang, W.; He, Y.; Ru, Y.; Fu, S.; Li, L.; Liu, X.; Zheng, H. Poly (rC) binding protein 2 interacts with VP0 and increases the replication of the foot-and-mouth disease virus. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Stenfeldt, C.; Diaz-San Segundo, F.; de Los Santos, T.; Rodriguez, L.L.; Earzt, J. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs. *Front. Vet. Sci.* **2016**, *3*, 41. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Supplementary Materials

S1 - Primers used for viral sequences amplification

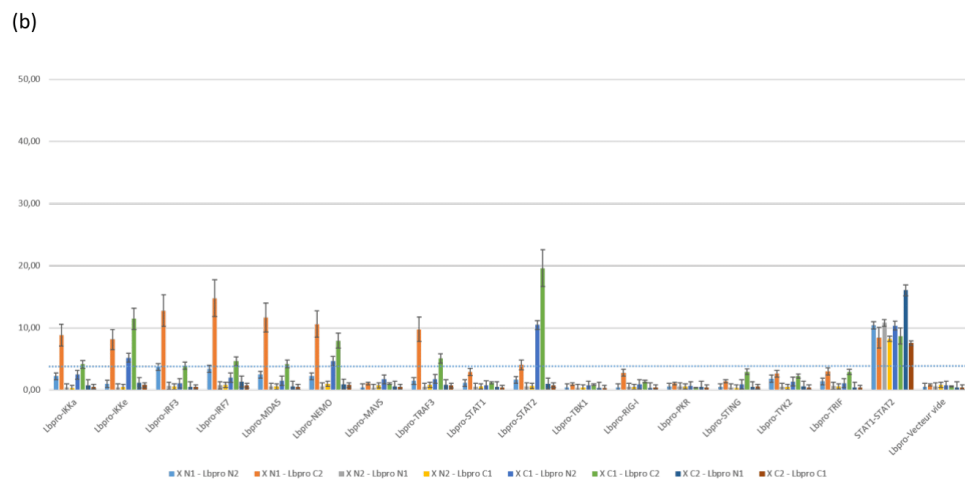
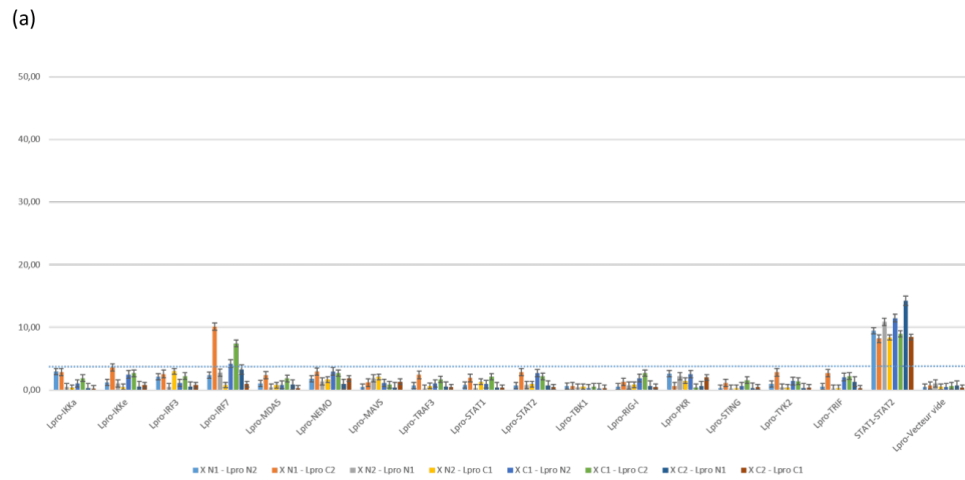
FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 amplified coding region	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
Labpro	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTCTGAGTCGTTTCTGAACCTTTG	CCAACCTTCTGTACAAGTTGTCCCC
Lbpro	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGTTCACACTTCACAACCGTG	CCAACCTTCTGTACAAGTTGTCCCC
VP4	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGCGCCGGCAATCCAGCCGG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGAGCAAGAAGAGCGCCGAAAAGACC
VP2	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGACAAGAAAACCGAGGAGACCAC	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTCCTTAGAAGGGAACTCACCC
VP3	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGGATCTTCCCGTGGCATGTAG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTGCGTGCAGCGTCAACTGGC
VP1	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCACCACCTCCGAGGTGAGTCGG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTGTTTCCAGCGCCACAATC
VP1-2A	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCACCACCTCCGAGGTGAGTCGG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCCAGGGTTGGACTCGACGTC
2A	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCTTTTGAACCTTGGACTCGTC	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCCAGGGTTGGACTCGACGTC
2B	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCCTTCTTCTCTCTGACG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTGTTTCTCCGCTCTCTCAAG
2AB	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCTTTTGAACCTTGGACTCGTC	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTGTTTCTCCGCTCTCTCAAG
2C	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCCTCAAGCACGTGACATC	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTGCTTGAATAATCGGGTGG
3A	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCATCTCAACTCTTCCAAAAGG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTCAGCTTGTGGTGTCTTCC
3B1	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGACCTACACCGGTCCACTC	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTCCTGCTGTGGGAGCTTGGC
3B2	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGCCCTACGCTGGTCCGATG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTTCCTTAACGACCGGGCTTTC
3B3	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGACCTTACGAAGGACCGGTG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTCAGTGACAATCAAGTTC
3Bt	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGACCTACACCGGTCCACTC	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTCAGTGACAATCAAGTTC
3C	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCAGTGGTCTCCCCGACTGAC	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGCTGCTGGTGTGGTTCGGGATCG
3D	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGTGCCTCACCGCACCGCGTTCACCC

S2 - IFN pathway proteins Genbank references

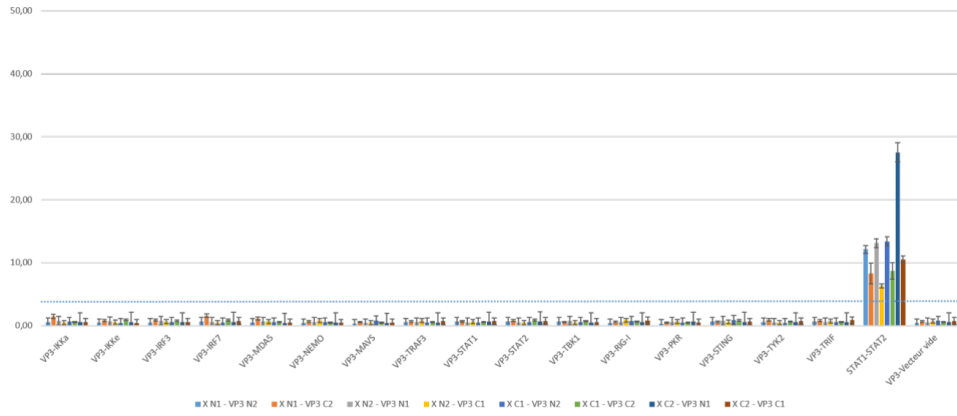
Species	Gene	Genbank reference	Species	Gene	Genbank reference
Cattle	IKK α	NM_174021.2	Goat	IKK α	XM_018041347.1
	IKK ϵ	NM_001046345		IKK ϵ	XM_018060083.1
	IRF3	AJ879589		IRF3	XM_013971473.2
	IRF7	BC151518		IRF7	XM_018043034.1
	MAVS	NM_001046620		MAVS	XM_018057391.1
	MDA5	XM_010802053		MDA5	XM_018063834.1
	NEMO	NM_174354.3		NEMO	XM_005701339.3
	PKR	BC126646		PKR	XM_018055121.1
	RIG-I	XM_580928		RIG-I	XM_005683566.3
	STAT1	BC151378		STAT1	XM_018061547.1
	STAT2	NM_001205689		STAT2	XM_018048069.1
	STING	NM_001046357.2		STING	NM_001319278.1
	TBK1	NM_001192755		TBK1	KU182750.1
	TRAF3	NM_001205586.2		TRAF3	XM_005695421.3
TRIF	NM_001030301.1	TRIF	XM_013965259.2		
TYK2	XM_005208737.4	TYK2	XM_018051036.1		
Sheep	IKK α	XM_027960581.1	Swine	IKK α	NM_001114279_1
	IKK ϵ	XM_004013567		IKK ϵ	XM_021063307.1
	IRF3	XM_012157809		IRF3	NM_213770_1
	IRF7	XM_012168607		IRF7	NM_001097428.1
	MAVS	XM_004014360		MAVS	NM_001097429_1
	MDA5	XM_012166329		MDA5	NM_001100194_1
	NEMO	XM_027963329.1		NEMO	NM_001113053.1
	PKR	KT272868		PKR	XM_021085862.1
	RIG-I	XM_004005323		RIG-I	NM_213804_2
	STAT1	GQ221061		STAT1	NM_213769_1
	STAT2	XM_012174751		STAT2	NM_213889.1
	STING	XM_004008857.3		STING	NM_001142838.1
	TBK1	XM_015094769		TBK1	NM_001105292_1
	TRAF3	XM_027957434.1		TRAF3	XM_005666444.3
TRIF	XM_004023497.4	TRIF	NM_001315738.2		
TYK2	XM_027969624.1	TYK2	NM_001114670.1		



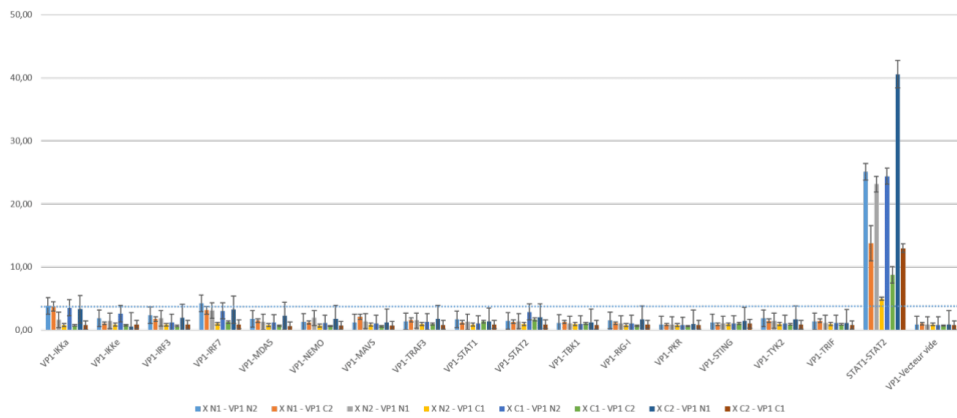
S3 - NanoLuciferase screenings against bovine library



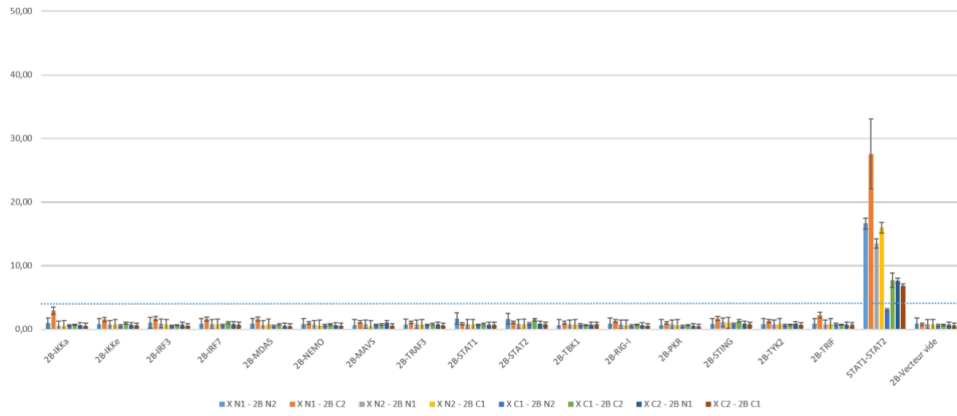
(c)



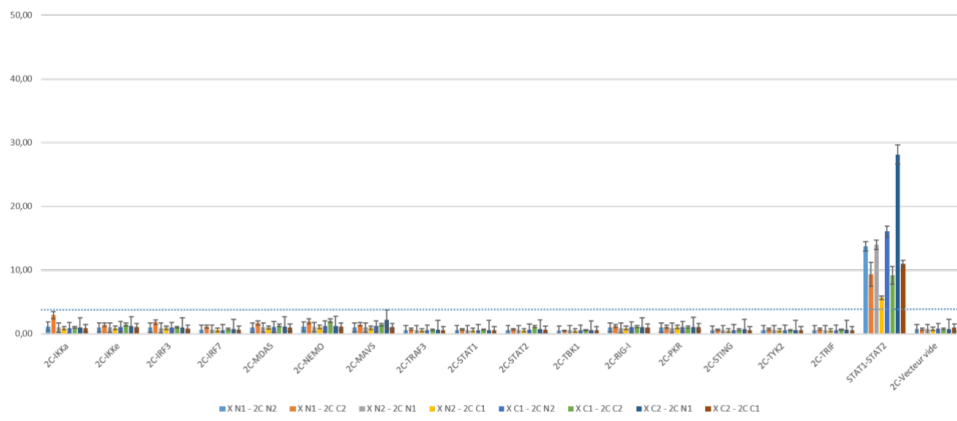
(d)



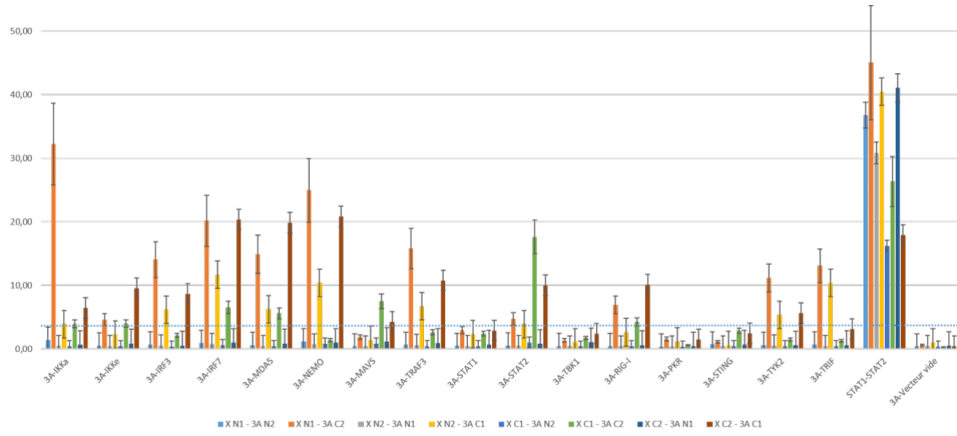
(e)



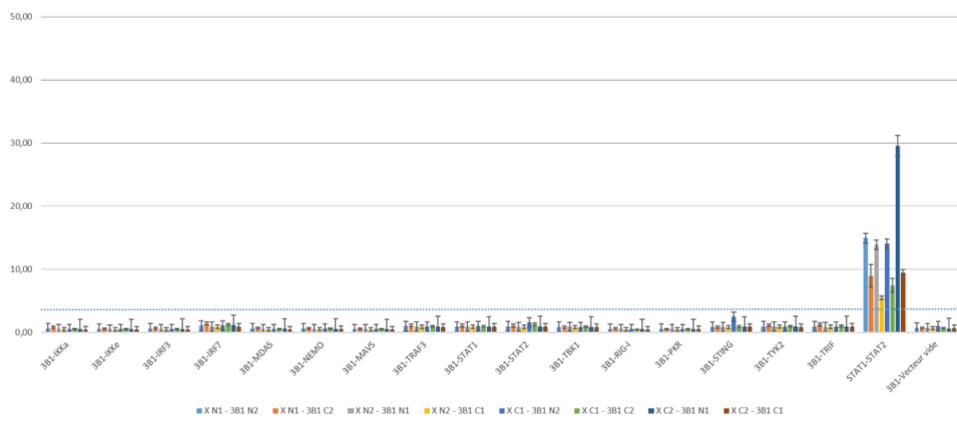
(f)



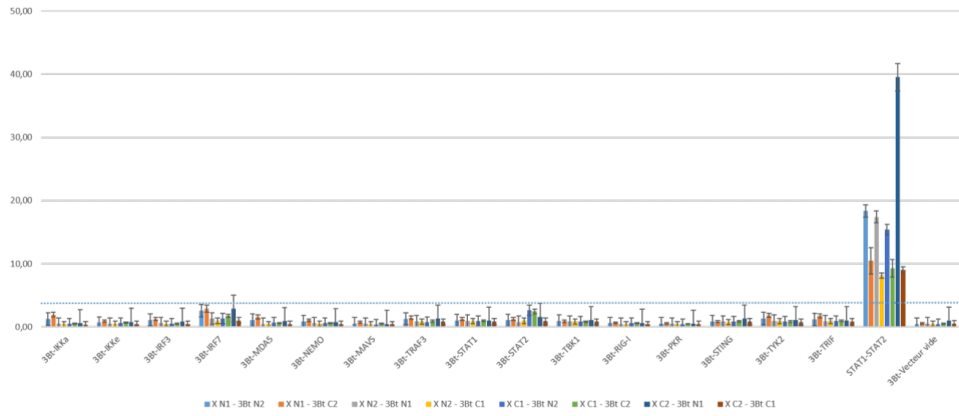
(g)



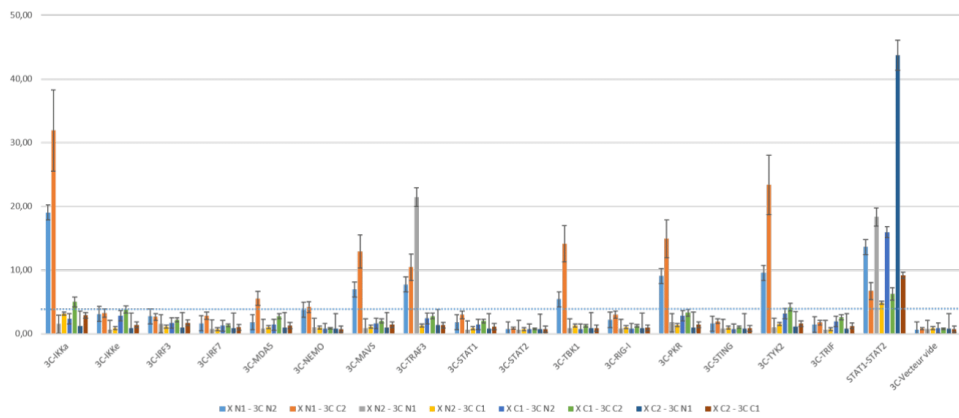
(h)



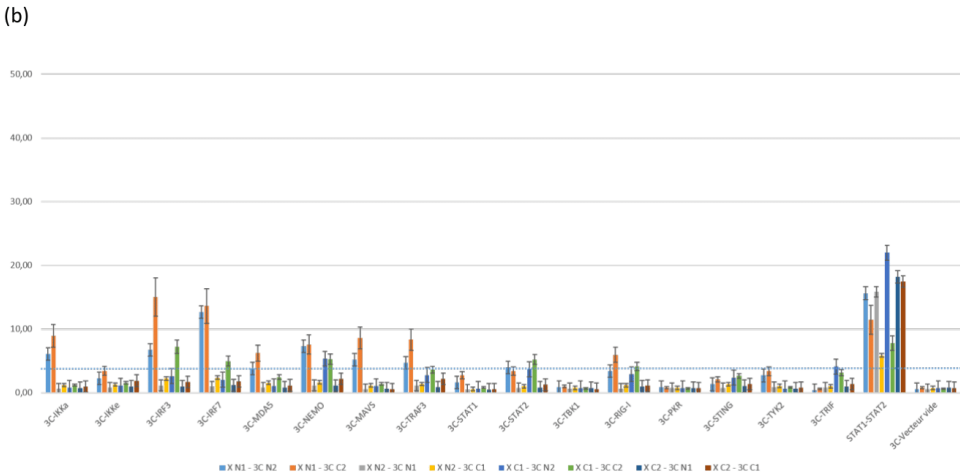
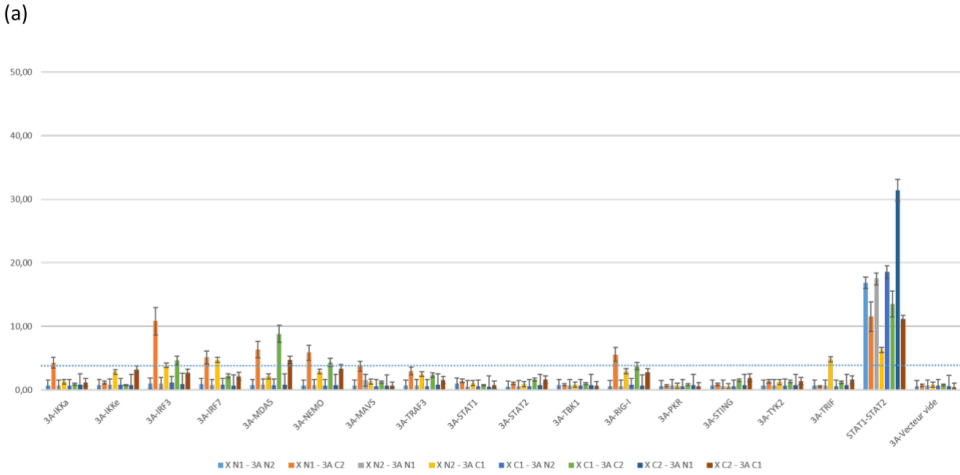
(i)



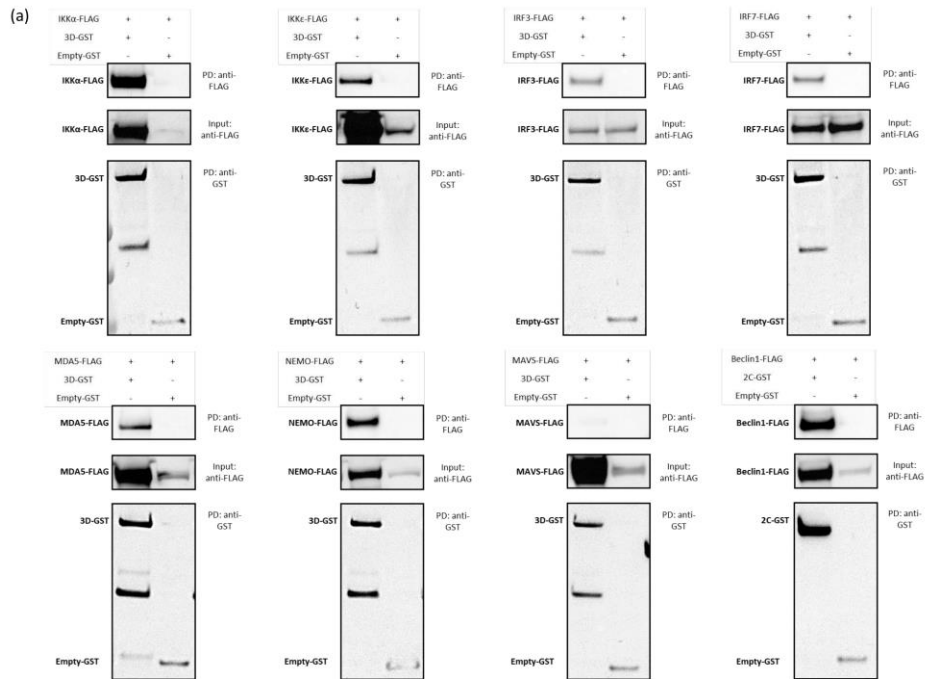
(j)



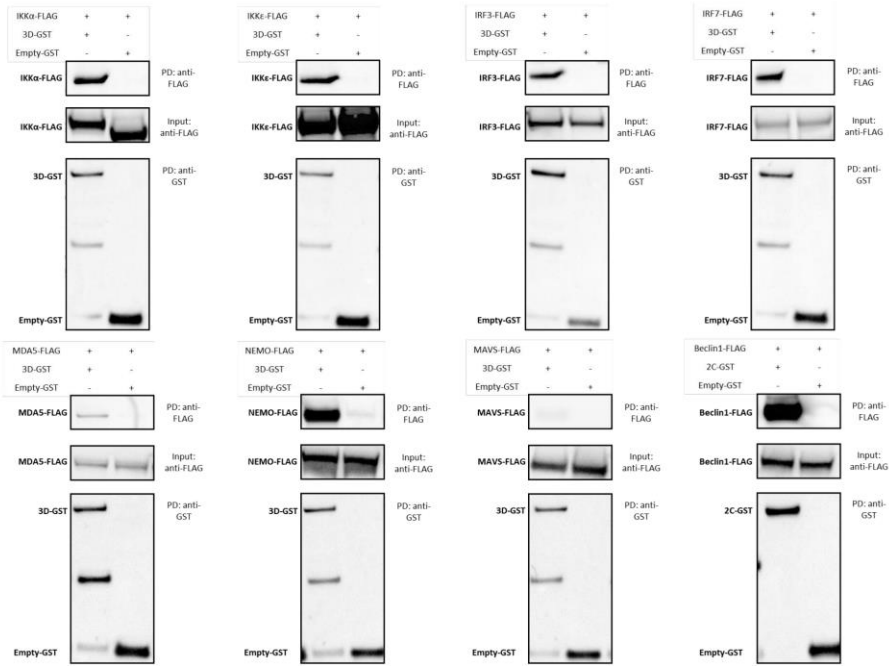
S4 - NanoLuciferase screenings against swine library



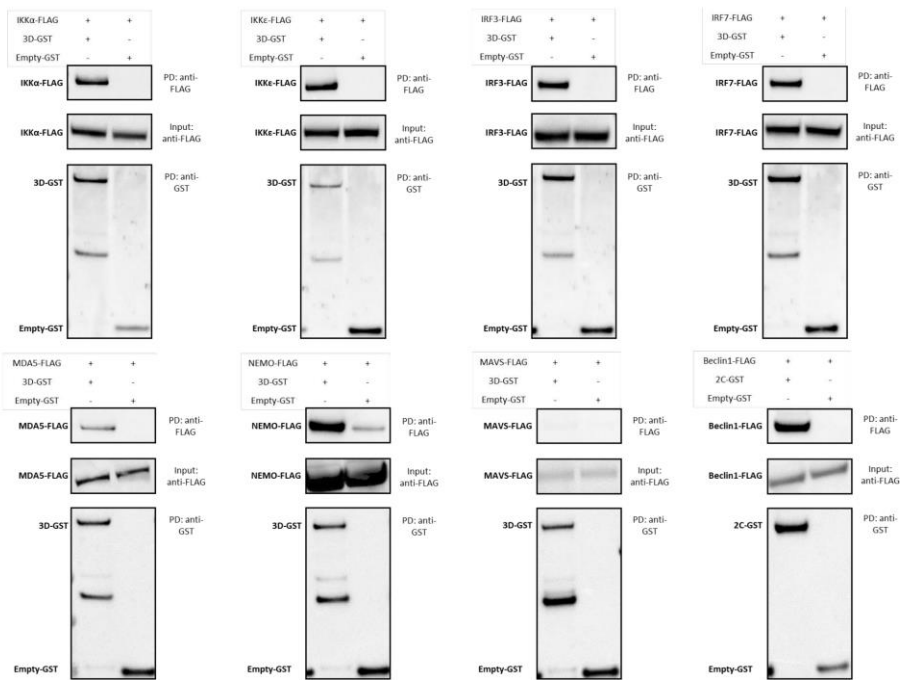
S5 - GST Pull-down analysis on PPI between FMDV 3D and cattle, sheep, and goat protein libraries



(b)



(c)



3) Détermination des domaines minimums d'interaction de la 3D^{pol} par approche « fragmentome »

Les travaux présentés dans l'article ci-dessus indiquent que la 3D^{pol} pourrait être impliquée dans la subversion de la réponse immunitaire innée, en particulier la réponse IFN de type I, médiée par le FMDV. Alors que très peu de publications existent pour l'heure concernant des interactions entre cette protéine virale et la réponse immunitaire innée, avec seulement deux interactions mises en évidence, impliquant respectivement la protéine murine Sam68 et la protéine porcine DDX1, aucune publication ne fait mention des domaines impliqués dans ces interactions (457,458). Toutefois, il existe des articles relatant des interactions protéiques entre la réponse immunitaire innée et la 3D^{pol} d'autres picornavirus, pouvant apporter des indications quant à ce qu'il pourrait se passer pour le FMDV. Ainsi, des interactions ont notamment été mises en évidence entre la 3D^{pol} du Poliovirus et Sam68, la 3D^{pol} du CVB3 et MDA5, la 3D^{pol} de EV71 et MDA5 ainsi que NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*), ou encore la 3D^{pol} du SVV et NLRP3 (459–462). Alors que des domaines d'interactions ont pu être identifiés au sein des protéines cellulaires MDA5 et NLRP3, à savoir respectivement le domaine CARD et le domaine NACHT, seuls les travaux de Choudhury *et al.* ont abouti à l'identification du domaine de la 3D^{pol} du SVV impliqué dans l'interaction avec NLRP3, à savoir la partie N-terminale de la protéine (1-154 aa) (459). De manière générale, la communauté scientifique s'accorde sur le fait que les interactions impliquant les polymérases virales ont plutôt tendance à reposer sur leur domaine N-terminal, constitué de nombreux domaines désorganisés, tandis que leur domaine C-terminal est davantage consacré à l'activité catalytique (463,464).

Nous avons ainsi décidé de poursuivre nos recherches concernant les interactions identifiées entre la 3D^{pol} du FMDV et les protéines de la voie IFN de type I, afin de



déterminer les domaines minimums de la polymérase qui sont nécessaires à ces interactions. Dans cette optique, la structure de la 3D^{pol} du FMDV a été étudiée par des analyses bio-informatiques (*Alphafold* et *Pondr*). Il a ainsi été possible d'obtenir une prédiction de la structure de la 3D^{pol} du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 et d'identifier les principaux domaines désorganisés de la protéine (Figure 19 & Tableau 3).

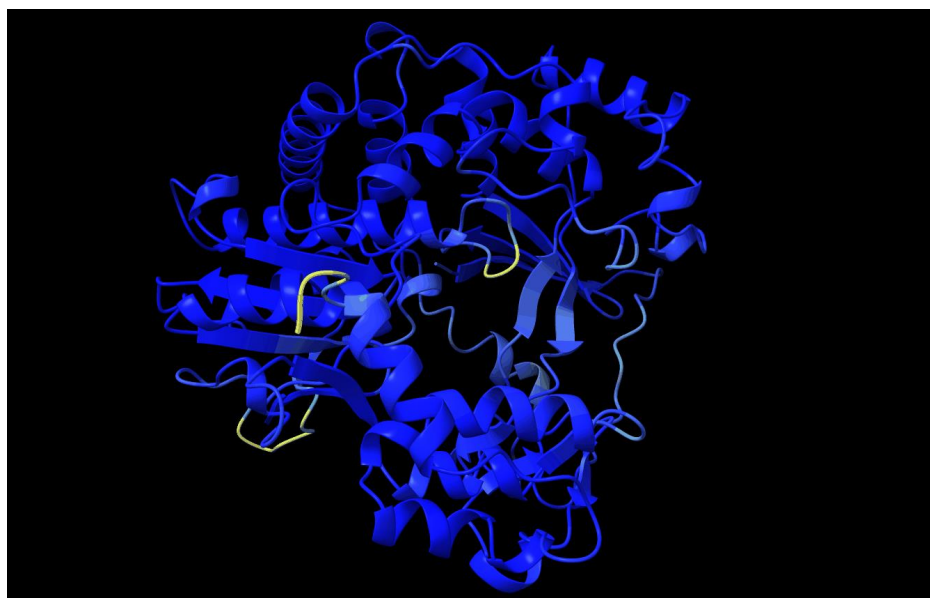


Figure 19 : Prédiction de la structure tridimensionnelle de la 3D^{pol} du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2.
Créée avec *Alphafold*.

Tableau 3 : Prédiction des domaines désorganisés de la 3D^{pol} du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. Selon les données obtenues par analyses bio-informatiques à l'aide du logiciel *Pondr*.

	Début du domaine		Fin du domaine	
	aa	Position	aa	Position
Domaines désorganisés de la 3D ^{pol} du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2	Asp	8	Leu	21
	Pro	36	Leu	52
	Phe	57	Glu	68
	Leu	89	Thr	98
	Lys	103	Ala	122
	Ala	130	Pro	141
	Glu	151	Gln	160
	Arg	174	Ile	180
	Asn	206	Pro	219
	Glu	293	Thr	303
	Asp	345	Lys	354
	Pro	366	Ile	380
	Phe	446	Tyr	455



Conformément à ce qui était attendu, la majorité des domaines désorganisés est localisée dans la partie N-terminale de la 3D^{pol}, en particulier entre les acides aminés en position 1 et 181, correspondant approximativement au premier tiers de cette protéine de 470 aa. A l'égard de ces données prédictives, il a été décidé d'investiguer les domaines minimums impliqués dans les interactions, que nous avons mises en évidence entre la 3D^{pol} et les protéines de la voie IFN de type I, par approche « fragmentome ». Ce projet a notamment fait l'objet d'un stage de 1^{ère} année de Master. Cette stratégie consiste en un fractionnement de la 3D^{pol} en deux sous-unités, à savoir une sous-unité N-terminale correspondant aux acides aminés 1 à 181 et une sous-unité C-terminale correspondant aux acides aminés 182 à 470. La première sous-unité, contenant de nombreux domaines désorganisés et pressentie comme pouvant être impliquée dans les interactions avec les protéines de la réponse immunitaire innée, a également été subdivisée en une vingtaine de constructions tronquées afin de pouvoir déterminer la région minimale nécessaire aux interactions étudiées (Figure 20). Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR de ces différentes régions de la 3D^{pol} sont détaillées dans le Tableau 4.



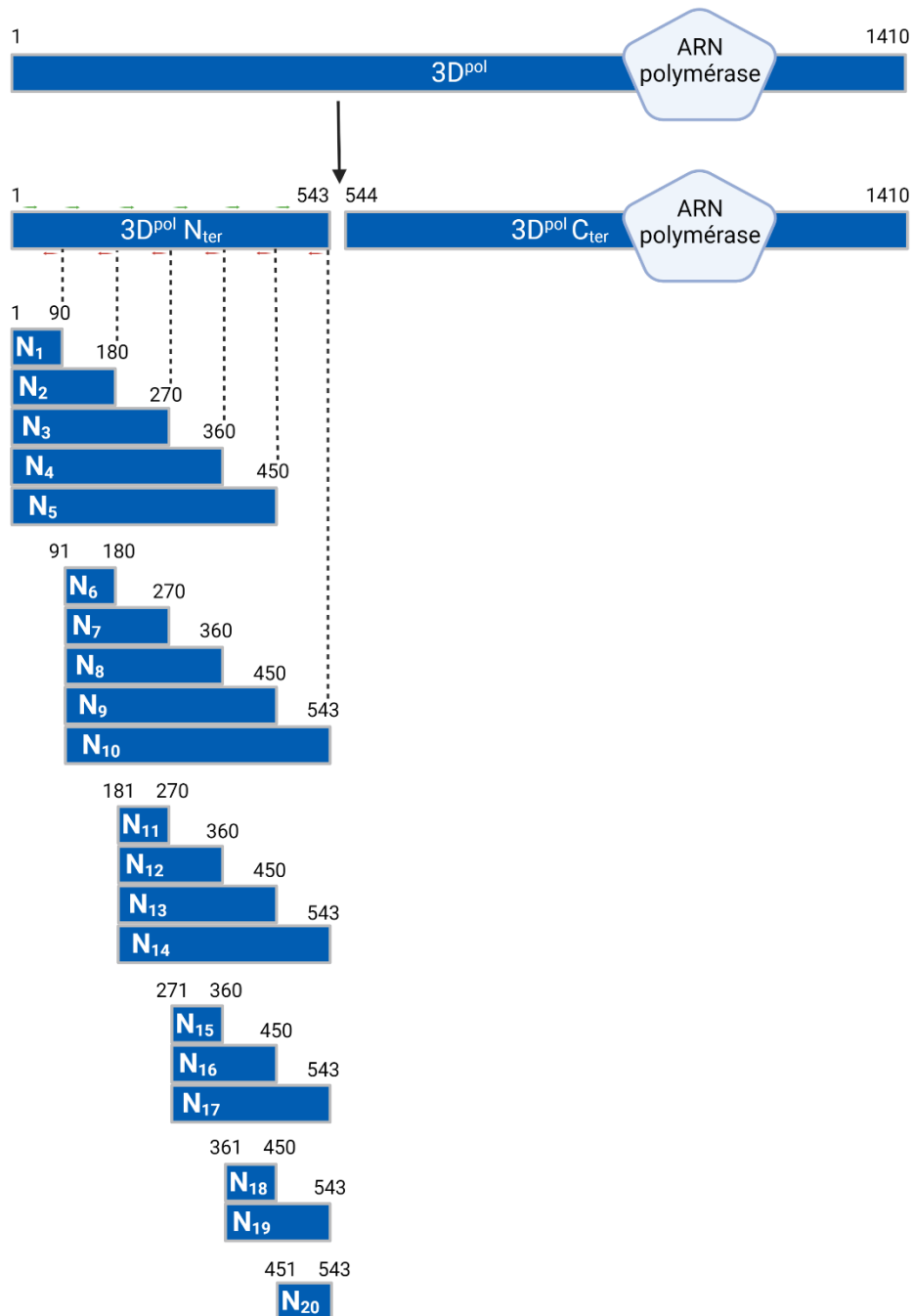


Figure 20 : **Stratégie de découpe de la 3D^{pol} pour l'étude des domaines minimums d'interactions par approche «fragmentome».**

Les différentes constructions tronquées de la 3D^{pol} ont été obtenues par amplification PCR à partir du vecteur entrée 3D^{pol} déjà construit précédemment.



Tableau 4 : Couples d'amorces utilisés pour l'obtention des formes tronquées de 3D^{pol} dans le cadre de l'étude des domaines minimums d'interactions par approche « fragmentome ».

Construction	Position nt initial	Position nt terminal	Amorce Sens	Amorce antisens
3Dpol	1	1410	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTGGTCACCGCACACGGCGTTCACCC
3Dpol N-ter	1	543	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGACAATGCGAGTCTTGCCGG
3Dpol C-ter	544	1410	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGACGTCTGCCGTTGAACAC	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTGGTCACCGCACACGGCGTTCACCC
N1	1	90	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGAACACACACCGTGTGCCACGGTG
N2	1	180	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGTGTTGGAGAAGATGACTTCATC
N3	1	270	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGACCCAGCAGCTATGCAGACGC
N4	1	360	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGGGAGACACAGCGCGGTGTCTG
N5	1	450	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGGATTGATAGTTGACACCAGAG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGCATGAGCTTCAAGGCAGCTTC
N6	90	180	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAACCCCGAATTTGGGCTGCCG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGTGTTGGAGAAGATGACTTCATC
N7	90	270	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAACCCCGAATTTGGGCTGCCG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGACCCAGCAGCTATGCAGACGC
N8	90	360	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAACCCCGAATTTGGGCTGCCG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGGGAGACACAGCGCGGTGTCTG
N9	90	450	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAACCCCGAATTTGGGCTGCCG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGCATGAGCTTCAAGGCAGCTTC
N10	90	543	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAACCCCGAATTTGGGCTGCCG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGACAATGCGAGTCTTGCCGG
N11	180	270	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAAGGAAACACAAGATGTCTG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGG
N12	180	360	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAAGGAAACACAAGATGTCTG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGGGAGACACAGCGCGGTGTCTG
N13	180	450	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAAGGAAACACAAGATGTCTG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGCATGAGCTTCAAGGCAGCTTC
N14	180	543	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCAAGGAAACACAAGATGTCTG	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGACAATGCGAGTCTTGCCGG
N15	270	360	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCACGGCAATACCCCACTGAGC	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGGGAGACACAGCGCGGTGTCTG
N16	270	450	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCACGGCAATACCCCACTGAGC	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGCATGAGCTTCAAGGCAGCTTC
N17	270	543	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCACGGCAATACCCCACTGAGC	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGACAATGCGAGTCTTGCCGG
N18	360	450	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCTGGCTCTCCAGGGGAAACGCC	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGCATGAGCTTCAAGGCAGCTTC
N19	360	543	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCTGGCTCTCCAGGGGAAACGCC	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGACAATGCGAGTCTTGCCGG
N20	450	543	GGGGCAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCGAGAAAGAGTACAAGTTTAC	GGGGCAACTTTGTACAAGAAAGTTGGGACAATGCGAGTCTTGCCGG

Les interactions entre les formes tronquées de la 3D^{pol} et les interacteurs cellulaires précédemment identifiés lors des cribles Nanoluciférase et confirmés par GST pull-down, seront ensuite testées par approche double-hybride en levures Y2HGOLD Yeast Strain (Clontech) (465,466). Cette méthode repose sur l'utilisation conjointe d'un vecteur pPC97 permettant l'expression de la protéine virale d'intérêt et porteur d'un gène d'expression de la leucine, ainsi que du domaine de liaison à l'ADN du promoteur de GAL4 (GAL4DB), et d'un vecteur pPC86 permettant l'expression de la protéine cellulaire d'intérêt et porteur d'un gène d'expression du tryptophane, ainsi que du domaine d'activation de GAL4 (GAL4AD). Une fois les levures transformées (selon la méthode détaillée dans Fablet *et al.*), elles peuvent être conjuguées grâce à leur type sexuel différent. S'il existe une interaction entre les deux protéines testées, les domaines de liaison et d'activation de GAL4 peuvent induire l'activation d'un gène rapporteur histidine, permettant la sélection des levures en question sur un milieu ne contenant pas cet acide aminé essentiel à leur croissance (Figure 21) (465).



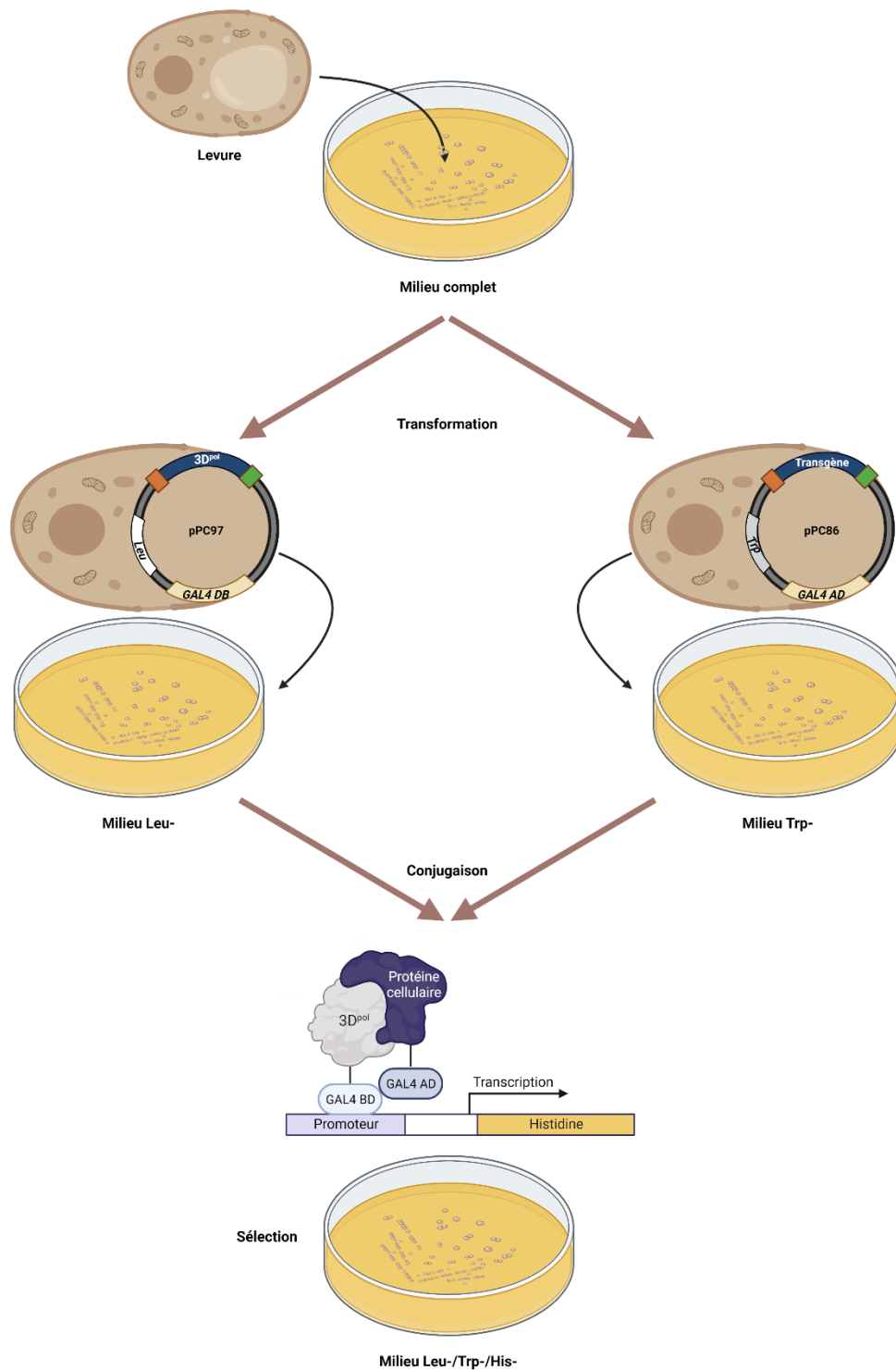
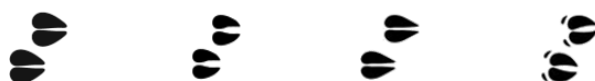


Figure 21 : Principe de détection d'interactions protéiques par approche double-hybride en levures. Créé avec Biorender.com.



Afin de s'affranchir des étapes nécessaires au clonage des différentes constructions de la 3D^{pol} dans des vecteurs d'expression adaptés aux levures, il a été décidé de procéder selon la technique de *gap repair* (467,468). Cette méthode consiste à transformer les levures, en utilisant non pas un plasmide d'expression portant la séquence d'intérêt, mais un plasmide d'expression pPC97 linéarisé ainsi que le produit de PCR correspondant à la séquence d'intérêt flanquée de séquences de recombinaison (Figure 22). La recombinaison homologe entre le plasmide d'expression et le transgène se déroule ainsi directement dans le système levure après transformation.



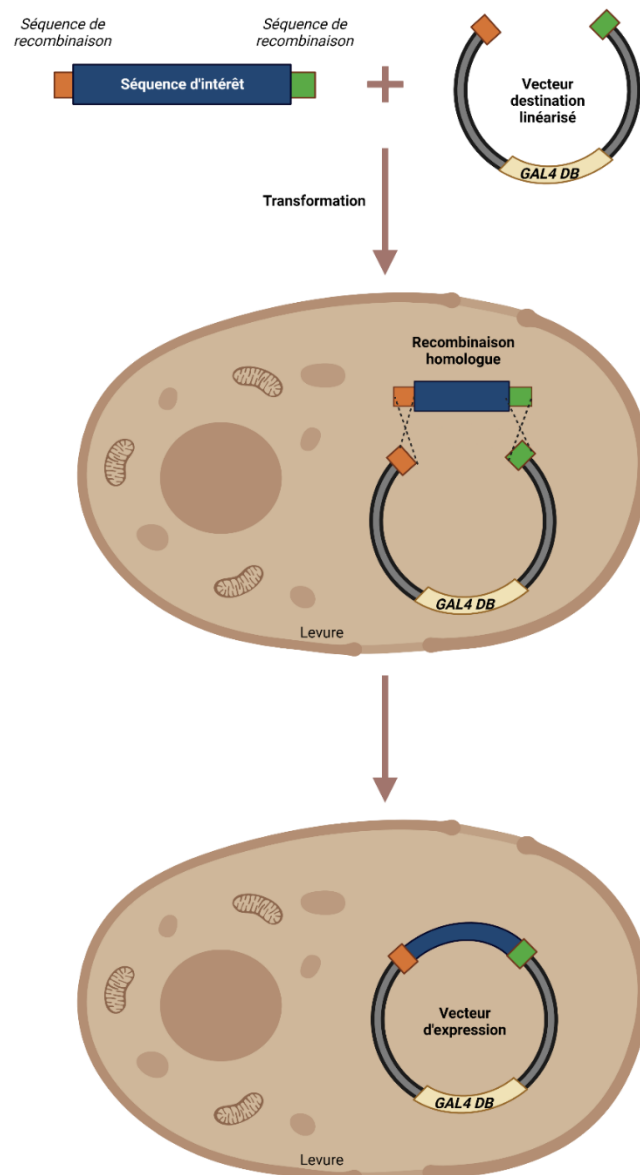


Figure 22 : **Principe de la méthode de gap repair en levures.**

Cette méthode sera utilisée pour la transformation des levures à partir de produits de PCR dans la cadre de la détection d'interactions protéiques par approche double-hybride en levures. Créé avec Biorender.com.

Les vecteurs d'entrée correspondant aux protéines cellulaires décrites comme interagissant avec la 3D^{pol} par Sarry *et al.* ayant déjà été construits dans le cadre des cribles Nanoluciférase, une méthodologie différente a été suivie. Ainsi, de manière similaire à ce qui a été réalisé pour la construction des banques de vecteurs d'expression Nanoluciférase, les séquences d'intérêt ont été insérées dans des vecteurs d'expression pPC86 à partir des vecteurs entrée *via* une *LR reaction* du système de clonage Gateway® (*cf.* Construction des banques de vecteurs).



En parallèle, notre maîtrise de la technique de *gap repair* sera éprouvée sur des interactions déjà identifiées par le passé au laboratoire en système levure, lors de cribles double-hybride sans a priori impliquant la 3D^{pol} du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 et une banque d'ADNc bovine. Lors de ces essais, dix-neuf interacteurs potentiels avaient été identifiés. Les protéines *Centromere protein C*, *Ankyrin repeat domain-containing protein 26*, *SUMO-conjugating enzyme UBC9*, *CCDC144C-like coiled-coil domain-containing protein* et *Exosome complex component RRP45*, ayant notamment été identifiées plus d'une dizaine de fois.

Discussion et perspectives de la partie I

Conformément à l'objectif qui était fixé, cette première partie a permis la mise en évidence de nouvelles interactions protéine-protéine entre le FMDV et la voie interféron de type I et l'étude de leur spécificité d'hôte. En revanche, il n'est pour l'heure pas possible d'établir un lien évident entre les interactions protéiques mises en lumière et la persistance différentielle du virus.

La construction de banques de vecteurs d'expression correspondant aux protéines du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2, ainsi qu'aux seize protéines d'intérêt provenant de quatre espèces sensibles au virus, a rendu possible la réalisation de cribles Nanoluciférase. Ces cribles ont permis de tester plus de deux cents interactions différentes, parmi lesquelles, des interactions déjà décrites dans la littérature. Nous avons d'ailleurs constaté qu'une part importante de ces interactions n'était pas détectée lors de nos cribles. A l'image des questionnements soulevés dans notre revue Sarry *et al.* concernant l'importance du modèle utilisé lors de la description des interactions protéine-protéine, il semble que les interactions ayant fait l'objet d'une publication basée sur l'utilisation de protéines humaines n'ont pas souvent été retrouvées à travers



nos cribles impliquant des protéines issues d'espèces sensibles au FMDV (42) (*cf.* Immunité innée). De plus, nous avons pu constater, au cours de nos cribles que les interactions identifiées, bien que souvent conservées, ne l'étaient pas toujours d'une espèce à l'autre. L'étude des interactions impliquant la 3D^{pol} en est d'ailleurs un bon exemple puisque nous avons pu montrer, après confirmation GST pull-down, que les interactions entre la 3D^{pol} et IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 et NEMO étaient conservées entre les quatre espèces d'étude, tandis que l'interaction entre la 3D^{pol} et MAVS semble spécifique à la forme porcine de la protéine (456).

Outre le choix du modèle d'étude, la méthode d'investigation mise en place est également un facteur important pouvant expliquer que nous n'ayons pas pu retrouver l'ensemble des interactions décrites dans la littérature. En effet, des caractéristiques spécifiques sont inhérentes à chaque méthode. A titre d'exemple, un changement de l'étiquette associée à une protéine de fusion peut potentiellement impliquer une modification de la stabilité et de la conformation de la protéine étudiée, ou induire un encombrement stérique empêchant l'établissement de l'interaction recherchée (469,470). Ainsi, il est tout à fait envisageable que lors de nos essais de double hybride en levures nous ne parvenions pas à retrouver l'intégralité des interactions identifiées par approche Nanoluciférase entre la 3D^{pol} et la réponse IFN de type I. Aucune de ces interactions n'avait d'ailleurs été mise en évidence lors des cribles sans a priori réalisés à partir de la banque d'ADNc bovine. Ceci peut toutefois s'expliquer par le fait que les banques d'ADNc ont été obtenues à partir de cellules saines, non infectées, dont la réponse antivirale n'était pas activée, induisant une potentielle sous-représentativité des ADNc correspondant aux protéines impliquées dans la réponse immunitaire.

Dans le cadre de l'approche « fragmentome » la donne sera différente puisque les protéines cellulaires impliquées dans la voie interféron de type I et identifiées comme pouvant interagir avec la 3D^{pol} seront exprimées dans les levures. Cette approche



pourrait nous permettre, d'une part, de conforter les interactions déjà observées par approche Nanoluciférase et GST pull-down, et d'autre part de déterminer les domaines protéiques nécessaires à ces interactions. La mise en évidence des domaines d'interaction apporterait une meilleure compréhension de ces interactions protéine-protéine et éventuellement de leur rôle biologique ainsi que de leur importance dans la physiopathologie de l'infection par le FMDV.

Bien que nous ayons systématiquement cherché à réaliser nos travaux à partir de modèles pertinents, nous nous sommes aperçus que ce n'était pas toujours chose aisée lorsque nous changions de méthode d'investigation. En effet, lors de la réalisation des essais rapporteurs luciférase, nous avons été confrontés à la difficulté de trouver un modèle compatible avec cette méthode, *i.e.* des cellules non déficientes au niveau de leur réponse IFN et capables de supporter des co-transfections. Ainsi, nous avons utilisé dans un premier temps, des cellules épithéliales rénales humaines (HEK293T, pour *Human Embryonic Kidney*), particulièrement adaptées à la réalisation d'essais rapporteurs, mais peu adaptées à l'étude du FMDV. Ces cellules nous ont ainsi permis de mettre en évidence pour la première fois, un effet inhibiteur de la 3D^{pol} du FMDV sur la phase d'induction de la réponse IFN de type I. Nous nous sommes ensuite attachés à évaluer cet effet dans des cellules plus pertinentes pour l'étude du FMDV. Diverses populations cellulaires provenant d'espèces sensibles au virus ont ainsi été testées, sans succès en ce qui concerne les ZZ-R127, les IBRS-2 et les DSP Bovines, au contraire des BUcEC et des PK15, qui, malgré une efficacité de transfection bien inférieure à celle des HEK293T, ont permis de confirmer la tendance observée (456).

L'association des cribles Nanoluciférase et des chromatographies d'affinité par GST pull-down nous a permis de confirmer le potentiel d'interaction entre la 3D^{pol} et les



protéines IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5, NEMO et MAVS. Cependant, il ne s'agit là que de méthodes biochimiques impliquant la surexpression simultanée d'une grande quantité de la protéine virale et de la protéine cellulaire dans un compartiment restreint. Il est à présent primordial de vérifier si ces interactions existent réellement. Dans cette optique, nous avons tout d'abord entrepris des expériences de co-localisation par microscopie confocale, reposant sur l'expression de protéines virales fusionnées à une protéine eGFP et de protéines cellulaires fusionnées à une protéine mCherry en cellules HeLa. Après une longue période de mise au point de la méthode, nous nous sommes malheureusement rendu compte que la quasi-totalité des protéines étudiées étaient surexprimées à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules transfectées, rendant de fait impossible de tirer des enseignements significatifs d'un point de vue biologique à partir des phénomènes de co-localisation observés. Il a alors été décidé de réaliser des essais de Split-Venus, un test de complémentation basé sur l'utilisation d'une protéine fluorescente scindée en deux sous-unités et permettant la visualisation de l'interaction protéique par microscopie confocale. Il n'a cependant pas été possible d'obtenir les constructions vectorielles associées à l'une des sous-unités de la Split-Venus, empêchant la mise au point de cette méthode (471).

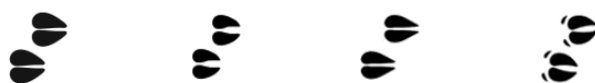
Le meilleur moyen de vérifier si les interactions protéine-protéine mises en évidence dans cette première partie existent réellement, reste sans doute de déterminer ce qu'il se passe en contexte infectieux dans des cellules pertinentes pour l'étude du FMDV. Pour cela, il est nécessaire de disposer de modèles d'étude adaptés au virus et provenant des quatre espèces d'intérêt.



II. Développement de modèles cellulaires d'intérêt pour l'étude de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse

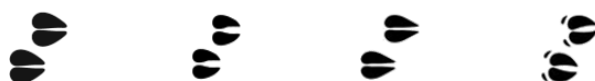
Introduction de la partie II

Bien que la fièvre aphteuse soit une maladie virale ancienne, puisque décrite en 1514, de nombreuses zones d'ombre demeurent autour de cette pathologie majeure du bétail et de la physiopathologie du FMDV (2). En effet, certaines étapes du cycle infectieux sont encore incomplètement décrites, les phénomènes de trans-encapsidation ne sont pas totalement maîtrisés, et les mécanismes responsables de la persistance du FMDV restent largement méconnus malgré plusieurs décennies de travaux de recherche. Un des freins notables à l'avancée des recherches concernant l'infection par le FMDV est la difficulté à trouver des modèles d'étude particulièrement adaptés (*cf.* Modèles d'étude *in vitro*). Ainsi, la réalisation d'infections expérimentales *in vivo* chez les Artiodactyles est associée à d'importantes contraintes logistiques et financières liées à l'hébergement de gros animaux dans des structures hautement confinées, ainsi qu'à des problématiques éthiques non négligeables. Le recours à d'autres modèles animaux permet de s'affranchir de certaines des contraintes énoncées mais n'est que peu informatif en ce qui concerne la réponse immunitaire de l'hôte puisque le cobaye, modèle le plus pertinent du point de vue de la physiopathologie, développe une réponse immunitaire très éloignée de celle des espèces naturellement sensibles au virus. En ce qui concerne les modèles d'étude *in vitro*, la plupart des solutions utilisées aujourd'hui sont des cellules de lignées, provenant d'espèces pertinentes (IBRS-2, PK15, SK6, MDBK, MDOK, LFBK $\alpha\beta 6$, ZZ-R127), ou non (BHK21) (284,428–430). Hormis les ZZ-R127, issues d'épithélium de langue de chèvre, les autres types cellulaires proviennent de tissus physiologiquement peu adaptés à l'étude du FMDV, principalement d'épithéliums rénaux. Il existe ainsi un réel besoin de développer de nouveaux modèles



in vitro plus proches des tissus naturellement ciblés *in vivo*. Ainsi, dans le cadre du projet européen Transcriptovac, des cellules primaires issues de DSP bovins, cultivées en multicouches à l'interface air-liquide ont permis de mimer un épithélium pluristratifié (289). Ce modèle a notamment été utilisé pour caractériser les réponses transcriptionnelles de l'hôte lors d'une infection aiguë et persistante par le FMDV, et pourrait dans le futur participer à l'amélioration des connaissances sur les mécanismes de persistance du virus (288).

Le grand potentiel de ce modèle bovin nous a conduit à vouloir développer des modèles similaires à partir d'autres espèces d'intérêt pour l'étude de l'infection par le FMDV. L'objectif de cette seconde partie a ainsi été de mettre en place au laboratoire des modèles de cellules primaires porcines et ovines, et de suivre leur infection par le FMDV. En ce qui concerne le modèle porcin, animal chez qui la persistance du FMDV n'est pas décrite, il a été décidé d'isoler des cellules épithéliales à partir des sites de réplication primaire du FMDV chez le porc, à savoir les amygdales oropharyngées et le DSP (223). Alors que les cellules originaires des amygdales oropharyngées n'ont pas pu être maintenues en culture, il a été possible de cultiver les cellules provenant du DSP. Ces dernières ont ensuite été caractérisées afin de s'assurer de leur caractère épithélial, propagées en monocouches ainsi qu'en multicouches à l'interface air-liquide. Après vérification de leur sensibilité au FMDV, ces cellules ont été infectées en monocouches ainsi qu'en multicouches et l'infection a été suivie durant plusieurs semaines. En ce qui concerne le modèle ovin, espèce sujette à l'infection persistante par le FMDV, des travaux similaires, initiés dans le cadre du projet EpithelOv, financé par l'École nationale vétérinaire d'Alfort, ont été poursuivis. Des cellules épithéliales ont ainsi été isolées à partir d'amygdales palatines et de DSP, sites de réplication primaire et de persistance du FMDV chez l'ovine (196). A l'image de ce qui a été fait pour



les modèles bovin et porcin, les cellules ovines ont été caractérisées, propagées en monocouches puis en multicouches à l'interface air-liquide. L'infection des cellules à court et long terme par le FMDV a également été étudiée.

Les travaux relatifs au développement du modèle cellulaire porcin ont fait l'objet d'un article soumis dans la revue *Frontiers in Microbiology*, tandis que l'article concernant le développement du modèle cellulaire ovin est en cours de relecture par les co-auteurs avant soumission.

1) Développement d'un modèle de cellules primaires porcines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse

Afin de développer un modèle cellulaire permettant l'étude du FMDV chez le porc *in vitro*, des structures d'intérêt ont été prélevées, à savoir les amygdales oropharyngées et le DSP, sites de répllication primaire du virus (227). Les cellules épithéliales ont pu être isolées à partir de ces prélèvements. Par la suite, il a été possible de cultiver au laboratoire les cellules provenant du DSP mais pas celles provenant des amygdales. L'étude de marqueurs cellulaires tels que l'occludine et la cytokératine a permis de vérifier le caractère épithélial de ces cellules. Bien que les cellules DSP porcines semblent moins sensibles que les DSP bovines, l'infection de ces cellules à différentes multiplicités d'infections (MOI, pour *Multiplicity Of Infection*) a mis en évidence leur sensibilité à l'infection par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. Le suivi de l'infection des DSP porcines cultivées en monocouches a conduit à la détection de virus infectieux jusqu'à quatorze jours post-infection, d'antigènes viraux jusqu'à seize jours post-infection et d'ARN viraux jusqu'à soixante jours post-infection pour la MOI la plus importante (MOI 1). Les cellules DSP porcines ont également été cultivées en multicouches à l'interface air-liquide afin de mimer un épithélium pluristratifié. L'infection de ce modèle en multicouches a mis en évidence une diminution de la



sensibilité des cellules à l'infection en comparaison de l'infection des cellules en monocouches. En effet, des virus infectieux n'ont pu être détectés que jusqu'à sept jours, neuf jours pour les antigènes viraux et vingt-trois jours pour les ARN viraux après infection à la MOI 1.

Que les cellules DSP porcines aient été infectées en monocouches ou en multicouches à l'interface air-liquide, il apparaît qu'aucun virus infectieux n'a pu être détecté après vingt-huit jours post-infection, limite à laquelle la persistance du FMDV est définie. Les résultats obtenus dans cette étude semblent ainsi totalement cohérents avec ce qui a été observé *in vivo* chez le porc puisqu'aucun signe de persistance du FMDV n'a pu être identifié, renforçant de fait la légitimité du modèle développé (226).

Article : Sarry M, Bernelin-Cottet C, Michaud C, Relmy A, Romey A, Salomez A L, Renson P, Contrant M, Berthaud M, Huet H, Jouvion G, Hägglund S, Valarcher J F, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research**



Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis

Morgan Sarry^{1,2*}, Cindy Bernelin-Cottet¹, Caroline Michaud¹, Anthony Relmy¹, Aurore Romey¹, Anne-Laure Salomez¹, Patricia Renson³, Maud Contrant³, Maxime Berthaud³, Hélène Huet¹, Gregory Jouvion^{4,5}, Sara Häggglund⁶, Jean-François Valarcher⁶, Labib B. Kassimi¹, Sandra Blaise-Boisseau¹

¹UMR VIROLOGIE, INRAe, EnvA, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, France,

²AgroParisTech Institut des Sciences et Industries du Vivant et de L'environnement, France,

³Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), France, ⁴Université Paris-Est Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, ANSES, Dynamyc research team, France, ⁵Unité d'Histologie et d'Anatomie pathologique, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, France, ⁶Host Pathogen Interaction Group, Section of Ruminant Medicine, Department of Clinical Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

Submitted to Journal:
Frontiers in Microbiology

Specialty Section:
Virology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
1215347

Received on:
01 May 2023

Revised on:
07 Aug 2023

Journal website link:
www.frontiersin.org



Conflict of interest statement

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

Author contribution statement

Conceptualization: SBB, LBK, JFV, MS; Methodology: JFV, SH, SBB, MS; Investigation: MS, SBB, CBB, CM, ARo, ALS, PR, MC, MB, HH, GJ; Original draft preparation: MS; Supervision: SBB, LBK; Reviewing: SBB, LBK, JFV, SH, CBB, CM, ARo

Keywords

Foot-and-mouth disease virus (FMDV), FMDV persistence, Cellular model, primary cells, Swine

Abstract

Word count: 253

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease of cloven-hoofed animals that has a significant socio-economic impact. One concern associated with this disease is the ability of its etiological agent, the FMD virus (FMDV), to persist in its hosts through underlying mechanisms that remain to be elucidated. While persistence has been described in cattle and small ruminants, it is unlikely to occur in pigs. One of the factors limiting the progress in understanding FMDV persistence and in particular differential persistence is the lack of suitable in-vitro models. While a primary bovine cell model derived from the dorsal soft palate, the primary site of replication and persistence of FMDV in cattle, has been developed, it seemed relevant to develop a similar porcine model. Cells from two sites of FMDV replication in pigs, namely the dorsal soft palate and the oropharyngeal tonsils, were isolated and cultured. The epithelial character of the cells from the dorsal soft palate was then assessed by immunofluorescence. The FMDV-sensitivity of these cells was assessed after monolayer infection with FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. These cells were also grown in multilayers at the air-liquid interface to mimic a stratified epithelium susceptible to FMDV infection. Consistent with what has been shown in vivo in pigs, our study showed no evidence of persistence of FMDV in either the monolayer or multilayer model, with no infectious virus detected 28 days after infection. The development of such a model opens up new possibilities for the study and diagnosis of FMDV in porcine cells.

Contribution to the field

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease threatening livestock worldwide. One concern associated with FMD is the ability of the FMD virus (FMDV) to persist in its hosts through mechanisms that remain unknown. While persistence has been described in ruminants, it is unlikely to occur in pigs. One of the factors limiting the progress in understanding FMDV persistence is the lack of suitable in-vitro models. Cells currently available for diagnostic and research purposes are indeed essentially cell lines derived from tissues far from those of interest in vivo. Epithelial tissues in regard of lymphoid structures of the soft palate, pharynx, nasopharynx and tonsils constituting primary sites of replication for FMDV in bovine, ovine or porcine hosts are however of critical relevance to study FMDV. While a primary bovine cell model derived from the dorsal soft palate (DSP) has been developed, it seemed us relevant to develop a similar porcine model. In this study cells from porcine DSP and oropharyngeal tonsils were isolated and cultured. The epithelial character of the DSP cells was assessed as well as their FMDV-sensitivity. These cells could be immortalized to develop a porcine cell line useful for research and diagnosis of FMD.

Funding information

This original study work was funded by ANSES animal health laboratory's own funds.



Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: Ethical approval was not required for the study involving animals in accordance with the local legislation and institutional requirements because Tissue sampling was carried out on pigs that had already been euthanised as part of another project validated by the ethical committee of the Maisons-Alfort veterinary school. .

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in the manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable images or data are presented in this study.

In review



Data availability statement

Generated Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

In review



Development of a primary cell model derived from porcine dorsal soft palate for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis

1 Morgan Sarry^{1,2*}, Cindy Bernelin-Cottet¹, Caroline Michaud¹, Anthony Relmy¹, Aurore
2 Romey¹, Anne-Laure Salomez¹, Patricia Renson³, Maud Contrant³, Maxime Berthaud³, Hélène
3 Huet¹, Grégory Jouvion^{4,5}, Sara H agglund⁶, Jean-François Valarcher⁶, Labib Bakkali Kassimi¹
4 and Sandra Blaise-Boisseau^{1*}

5 ¹ UMR VIROLOGIE, INRAe, EnvA, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est,
6 94700 Maisons-Alfort, France.

7 ² AgroParisTech – 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

8 ³ ANSES Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, 22440 Ploufragan, France

9 ⁴ Université Paris-Est Créteil, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, ANSES, Dynamyc research team,
10 94000 Créteil, France

11 ⁵ Unité d'Histologie et d'Anatomie pathologique, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 94700,
12 Maisons-Alfort, France

13 ⁶ Host Pathogen Interaction Group, Section of Ruminant Medicine, Department of Clinical Science,
14 Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden

15 * Correspondence:

16 Morgan Sarry and Sandra Blaise-Boisseau

17 Morgan.sarry@anses.fr and Sandra.blaise-boisseau@anses.fr

18 **Keywords:** Foot-and-mouth disease virus (FMDV), FMDV persistence, cellular model, primary
19 cells, swine

20 Abstract

21 Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease of cloven-hoofed animals that has
22 a significant socio-economic impact. One concern associated with this disease is the ability of its
23 etiological agent, the FMD virus (FMDV), to persist in its hosts through underlying mechanisms that
24 remain to be elucidated. While persistence has been described in cattle and small ruminants, it is
25 unlikely to occur in pigs. One of the factors limiting the progress in understanding FMDV persistence
26 and in particular differential persistence is the lack of suitable in-vitro models. While a primary bovine
27 cell model derived from the dorsal soft palate, the primary site of replication and persistence of FMDV
28 in cattle, has been developed, it seemed relevant to develop a similar porcine model. Cells from two
29 sites of FMDV replication in pigs, namely the dorsal soft palate and the oropharyngeal tonsils, were
30 isolated and cultured. The epithelial character of the cells from the dorsal soft palate was then assessed
31 by immunofluorescence. The FMDV-sensitivity of these cells was assessed after monolayer infection
32 with FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2. These cells were also grown in multilayers at the air-liquid
33 interface to mimic a stratified epithelium susceptible to FMDV infection. Consistent with what has
34 been shown *in vivo* in pigs, our study showed no evidence of persistence of FMDV in either the
35 monolayer or multilayer model, with no infectious virus detected 28 days after infection. The
36 development of such a model opens up new possibilities for the study and diagnosis of FMDV in
37 porcine cells.

38 1 Introduction



39 Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious transboundary disease affecting wild and
40 domestic cloven-hoofed animals. It is one of the most important animal diseases regarding its socio-
41 economic impact in case of an outbreak (Knight-Jones and Rushton 2013). The etiological agent
42 of FMD, known as Foot-and-mouth disease virus (FMDV), is a single-stranded positive RNA virus,
43 which belongs to the genus *Aphthovirus* within the *Picornaviridae* family (Jamal and Belsham
44 2013). FMDV has a high mutation rate resulting in the existence of seven different serotypes,
45 namely A, O, C, Asia-1, Southern African Territories (SAT) 1, SAT2 and SAT3, and many lineages
46 and sublineages (N. J Knowles and Samuel 2003). The FMDV genome contains an 8.5 kb open
47 reading frame (ORF), flanked by untranscribed regions (5'UTR and 3'UTR). It encodes a single
48 polyprotein precursor composed of four structural proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4) and eleven
49 non-structural proteins (L_{ab}^{pro}, L_b^{pro}, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C and 3D^{pol}) (Belsham,
50 Kristensen, and Jackson 2020).

51 The clinical signs induced by FMDV are characterised by fever and the development of vesicles or
52 aphthae on multiple mucosa and epithelia (tongue, legs, muzzle, teats, mammary gland, prepuce,
53 vulva and other parts of the skin), a state of lethargy and loss of appetite (Kitching 2002). The
54 clinical signs are quite easily noted in domestic cattle, which are considered to be revelatory, but
55 less marked in small ruminants, which act as disseminators, and in African buffalo, in which the
56 infection is mild or subclinical. Swine, considered as amplifiers, show severe clinical signs often
57 characterised by lameness, a withdrawn posture and reluctance to stand or walk as a direct
58 consequence of podal lesions. While mortality in adult animals is generally low, it can be high in
59 young animals due to acute myocarditis in particular in piglets, lamb and calves (Carolina Stenfeldt
60 and Arzt 2020). The severity of clinical signs in susceptible species may vary according to the
61 specific virulence of FMDV strains. Indeed, some mutations affecting the FMDV 3A protein in
62 particular, can affect the host range. For instance, the O/TAW/97 strain caused severe lesions in
63 swine, while no cases were observed in ruminants (Beard and Mason 2000; Nick J. Knowles et al.
64 2001).

65 After clinical recovery, FMDV persists in up to 50% of ruminants. These become carriers without
66 clinical signs, regardless of their specific FMD immune status (J. Arzt, Baxt, et al. 2011; World
67 Organization for Animal Health (OIE) 2021). Such healthy carriers represent a potential threat of
68 transmission of FMDV to susceptible animals, a source of new recombinants and remain thus an
69 obstacle to FMDV control (Carolina Stenfeldt and Arzt 2020; Jonathan Arzt et al. 2018; Fish et al.
70 2022; Childs et al. 2022). FMDV persistence was originally defined as infectious virus detected
71 beyond 28 days post infection. This arbitrary threshold is challenged by the fact that viral clearance
72 has been shown to occur earlier than previously assumed, between 10 to 21 days beyond infection
73 depending on the animal vaccination status (Carolina Stenfeldt and Arzt 2020; Carolina Stenfeldt
74 and Belsham 2012; Carolina Stenfeldt, Eschbaumer, et al. 2016). More than 50 years after it was
75 first described, the mechanisms of establishment, maintenance and resolution of FMDV persistence
76 are still not fully understood (“Van Bekkum, J. G., Frenkel, H. S., Frederiks, H. H. J., & Frenkel,
77 S. Observations on the Carrier State of Cattle Exposed to Foot-and-Mouth Disease Virus. Tijdschr.
78 Diergeneeskd, 84, 1159-1164.” 1959). Among the existing gaps of knowledge, the differential
79 persistence of FMDV is also not explained. For example, there are currently no data to understand
80 why FMDV persistence has been reported in cattle and small ruminants, but not in pigs (Burrows
81 1968; C. Stenfeldt et al. 2016). Over the last decades, the primary sites of infection as well as the
82 sites of FMDV persistence in different susceptible species have been located. Domestic cattle and
83 buffalo persistent sites mainly consist in their dorsal soft palate and dorsal nasopharynx (J. Arzt,
84 Juleff, et al. 2011). Dorsal soft palate, as well as palatine tonsils are those of sheep and goat (J.
85 Arzt, Baxt, et al. 2011). In swine, which are more susceptible to infection via exposure of the upper



86 gastrointestinal tract than to infection through inhalation of virus, specialised epithelium within
87 porcine oropharyngeal tonsils has been described as the primary site of FMDV replication, while
88 epithelium of the soft palate tonsils hosts significant replication of the virus during the clinical
89 infection phase (Sellers and Gloster 2008; Carolina Stenfeldt, Diaz-San Segundo, et al. 2016;
90 Carolina Stenfeldt et al. 2014). While persistent infectious viruses, as well as FMDV proteins and
91 RNA, are detected in the persistence sites of carriers ruminants, only long-lasting FMDV proteins
92 and RNA are frequently detected after infection in the swine FMDV replication sites (J. Arzt, Baxt,
93 et al. 2011; C. Stenfeldt et al. 2016; J. Arzt, Juleff, et al. 2011).

94 One limiting factor in the progress of knowledge about FMDV persistence is the lack of suitable
95 models. Indeed, studies performed in animals require infrastructures that only a few laboratories
96 worldwide have, are costly and raise ethical issues. Since the development of *in vitro* techniques
97 allowing the growth of the virus, various epithelial cell lines have served as study models, such as
98 Baby Hamster Kidney 21 (BHK-21), Instituto Biologico-Rim Suino-2 (IBRS-2), Porcine Kidney
99 (PK-15), Swine Kidney (SK-6), Foetal porcine kidney (LFBK- $\alpha\gamma\beta 6$), Foetal goat tongue (ZZ-
100 R127) and Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells (Gray et al. 2020; Kopliku et al. 2015; de
101 la Torre et al. 1985; Castro and P 1970; Kasza, Shaddock, and Christofinis 1972, 6). Except for the
102 ZZ-R127 cells, none of these lines were derived from FMDV-sensitive tissue, which raises the
103 question of a possible bias in the results obtained. The use of relevant primary cells may overcome
104 such bias. Primary bovine thyroid (BTY) cells are, for example, among the reference cells for the
105 study of FMDV. However, primary BTY cells cannot be passaged stably or frozen with remaining
106 sensitivity. This problem was overcome with the development of a BTY-derived cell line (Mao et
107 al. 2018). Primary cells, like cell lines, share a drawback, which is the need to be regularly passed
108 to survive. To avoid such cell passages, a multilayer cellular model derived from primary bovine
109 dorsal soft palate (DSP), cultured at the air-liquid interface (ALI) has been developed (Hägglund
110 et al. 2020). We have shown that this *in vitro* DSP-ALI model enabled the establishment of a
111 persistent FMDV infection and has led to improved knowledge concerning transcriptional
112 responses following FMDV infection (Pfaff et al. 2019).

113 Given the opportunities offered by such a model and the absence of a suitable porcine cell model,
114 we isolated primary cells from porcine oropharyngeal tonsils and dorsal soft palate in order to
115 develop a multilayer culture model at the air-liquid interface. We tested if these cells were
116 expressing epithelial markers, checked their ability to produce type I interferons and activate
117 interferon stimulating genes and assessed their sensitivity to a panel of FMDV strains of different
118 serotypes and to other viruses that induce similar lesions as FMDV. We then studied the infection
119 by FMDV of these cells as monolayers and multilayers

120 **2 Materials and Methods**

121 **Virus**

122 The FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 (GenBank: OV121130.1) used in this study is a twice-plaque-
123 purified viral clone derived from the O/FRA/1/2001 strain that was further propagated on BHK-21
124 cells (Kopliku et al. 2015). Viral batches were titrated on BHK-21 monolayers by plaque assay as
125 described in Kopliku *et al.* 2015 (Kopliku et al. 2015). Viral titer is equal to 1.4×10^6 Plaque Forming
126 Unit (PFU) per mL.

127 Viruses used for assessment of porcine DSP susceptibility to FMDV and look alike disease viruses
128 were previously grown in IBRS-2 cell monolayers, and lysates were clarified by centrifugation and



129 stored at -80°C. A panel of eight FMDV strains representative of field viruses recently detected, namely
130 Asia1/PAK/2011, SAT1/NIG/2015, SAT3/ZIM/1981, O/OMN/2020, O/FRA/2001, O/MUR/2016,
131 O/ALG/2018 and A/TUN/2017, and a panel of two strains of Vesicular Stomatitis Virus (VSV)
132 IND/1942 and NJ/1964, Seneca Valley Virus (SVV) CA/2001 and MN/1988, as well as Swine
133 Vesicular Disease Virus (SVDV) FRA/1973 and ITL/2008, were tested.

134 **Viral titration**

135 FMDV titration by TCID₅₀ assays were performed as described by Hägglund *et al.* 2020 (Hägglund
136 *et al.* 2020). VSV, SVV and SVDV titration by TCID₅₀ assays were performed similarly to FMDV
137 titrations but using porcine DSP cells.

138 **Isolation of cells from the swine dorsal soft palate**

139 Epithelial tissue from the DSP was collected immediately after slaughter of three American Yorkshire
140 swine (id: 100-309, 100-310 and 100-313), aged to 4 to 6 months-old. They had undergone anti-basal
141 glomerulus lamp treatment, which was considered to have no impact on the oropharyngeal structures
142 of interest. During transport to the FMDV laboratory, located on the same site, tissues were stored in
143 sterile containers with transport medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM,
144 Lonza, Belgium), supplemented per liter with 2.5 mg amphotericin B (Sigma-Aldrich, A-9528) and 20
145 mg gentamicin (Sigma-Aldrich, G-1397). Dissociation of the surface epithelium was performed to
146 remove as much connective and muscle tissue as possible. Epithelial tissue was dissected and digested
147 at 4°C overnight in incubation medium composed of DMEM supplemented per liter with 2.5 mg
148 amphotericin B, 1 mg deoxyribonuclease (Sigma-Aldrich, DN-25), 1 g dithiothreitol (Sigma-Aldrich,
149 D-0632), 20 mg gentamicin, 20 mL 1 M HEPES (VWR, BioWhittaker BE17-737F), 10 mL 200 mM
150 L-glutamine (VWR, BioWhittaker BE17-605F), 100 mg penicillin-streptomycin (PS, Invitrogen) and
151 additionally supplemented per liter with 1 g protease XIV (Sigma-Aldrich, P5147).

152 Epithelial cells were thereafter manually scraped off the underlying tissue, filtered through a 40 µm
153 cell strainer (Corning) and incubated in cell culture flasks for 4 hr at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere
154 with culture medium to deplete the fibroblasts. This medium consisted of DMEM containing 10%
155 gamma-irradiated, heat inactivated, foetal calf sera (FCS, Hyclone™, GE Healthcare) and
156 supplemented per liter with 31.25 KU Nystatin (Sigma-Aldrich, N6261), in addition to HEPES, L-
157 glutamine and PS as above. The epithelial cells were centrifuged at 200 x g for 10 min at room
158 temperature and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in flasks containing culture medium.

159 **Tissues histological staining**

160 After necropsy, tissue samples from the oropharyngeal tonsils and dorsal soft palate were removed and
161 immediately fixed in neutral-buffered formalin for 48h. Samples were then embedded in paraffin; 4
162 µm-thick sections were cut and stained in haematoxylin-eosin-saffron (HES).

163 **Air-liquid interface multilayers**

164 12 mm diameter coated inserts with 1.0 µm pores (cellQART® 12-Well Insert 1.0 µm PET clear,
165 SABEU) have been rehydrated by soaking the inserts in a 12-well plate containing 1 mL of DMEM
166 High glucose W/L-GLU W/O PY (Eurobio, L0102)-based complete culture medium (10% FCS, 2%
167 HEPES, 1% L-glutamine, 1% PS and 0.2% gentamicin) and by adding 1 mL of this medium directly
168 on the inserts. The inserts were left in contact with the medium for two hours at 37°C in a 5% CO₂
169 atmosphere. Dorsal soft palate cells previously propagated in cell culture flasks were then seeded on



170 the rehydrated inserts at a density of 7.5×10^5 cells per insert in 1 mL of DMEM High glucose-based
171 complete culture medium supplemented with 0.02 $\mu\text{g/mL}$ recombinant human hepatocyte growth
172 factor (HFG, Sigma-Aldrich, H9661). As the cells formed a complete monolayer, the culture medium
173 was removed from the upper compartment after four days of culture. The culture medium contained in
174 the lower compartment was changed every two or three days during five weeks.

175 **Cell characterization**

176 The cellular expression of epithelial markers such as cytokeratin, vimentin and occludin, as well as that
177 of integrin $\alpha\text{v}\beta_6$, the specific receptor for FMDV, was analysed after cell passages in culture flasks, as
178 well as in the cell multilayers cultured on inserts at ALI. For monolayer characterization, cells were
179 cultured in a 8-well μ -Slide (high ibiTreat 1.5 polymer coverslip, Ibidi). Once the cells have adhered
180 to the support, they were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) for 30
181 min at room temperature and permeabilized in 0.1% Triton X-100. Cell nuclei were stained using DAPI
182 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Proteins of interest were detected by
183 immunofluorescence microscopy using a DMi8 microscope (Leica Microsystems). A cocktail
184 composed of two mouse monoclonal antibodies (clones A1/A3, DAKO, M3515), which recognise
185 cytokeratins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16 and 19 was used to stain cytokeratin. Vimentin
186 staining was performed using a mouse monoclonal antibody (Clone LN-6, Sigma-Aldrich, V2258).
187 Occludin staining was performed using a rabbit polyclonal antibody (Affinity, DF7504) and a mouse
188 monoclonal antibody directed against integrin $\alpha\text{v}\beta_6$ (clone 10D5, Abcam, ab77906 (Burman et al.
189 2006)) was used to stain integrin $\alpha\text{v}\beta_6$. Immunofluorescence (IF) was performed using two secondary
190 antibodies: anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen), for integrin, vimentin and cytokeratin revelation and
191 anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen) for occludin revelation.

192 **Multilayers characterization**

193 The cell morphology was studied by light after fixation in 10% buffered formalin. Selected multilayers
194 and the underlying PTFE membranes were embedded in 1.3% agarose then left in 70% ethanol
195 overnight. They were then embedded in paraffin, routinely processed, sliced at $4\mu\text{m}$, stained with
196 haematoxylin-eosin-saffron (HES) and examined by light microscopy.

197 **Detection of common swine viruses**

198 In order to detect DNA and RNA from virus frequently circulating in French swine populations, such
199 as (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) and Porcine Circovirus 2 and 3 (PCV2
200 and PCV3), molecular detection tests were performed using RNA and DNA from the culture
201 supernatant and from DSP cell pellets. RNA and DNA extraction was performed using the NucleoSpin
202 irus kit (Macherey-Nagel). Pellets were resuspended in 700 μL of RAV1 lysis buffer, then ground with
203 stainless steel beads for 30 seconds at 25 Hz before centrifugation. Six-hundred microliters of shred
204 supernatant was then incubated with proteinase K for 1 min at room temperature, vortexed and
205 incubated at 70°C for 5 min. A further extraction was carried out according to the supplier's
206 recommendations. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus detection was attempted by
207 using quantitative PCR using RT-PCR VetMAX PRRSV EU&NA 2.0 kit (ThermoFisher) and CFX96
208 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad), according to the supplier's recommendations.
209 Porcine circovirus 2 detection was attempted by using quantitative PCR searching for CAP gene. The
210 PCR reaction was performed in a 25 μL volume, with 1X UMM2X, 100nM of each primer (forward:
211 5'-GGCGGTGGACATGATGAG-3' and reverse: 5'-GGGAGCAGGGCCAGAATT-3'), 200nM of the
212 TaqMan FAM-MGB/NFQ probe (5'-ACCTTAACCTTTCTTATTCTG-3'), and 5 μL of sample DNA.



213 PCR conditions : 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds
214 denaturation at 95°C and 1 minute hybridization and elongation at 60°C. Porcine circovirus 3 detection
215 was attempted by using quantitative PCR searching for REP gene (Franzo et al. 2018). The PCR
216 reaction was performed in a 25µL volume, with 1X UMM2X, 300nM of each primer (forward: 5'-
217 CGGCGGGAAATCTGACTGAA -3' and reverse: 5'- TACCCAACCCCATCACCCC -3'), 200nM of
218 the TaqMan FAM-MGB/NFQ probe, and 5µL of sample DNA. PCR conditions as above.

219 **FMDV inoculation of cell monolayers**

220 DSP cells were propagated in culture flasks for five passages before being seeded in 48-well plates at
221 a density of 1.0×10^5 cells per well in DMEM High Glucose complete medium. Once the cells formed
222 a complete monolayer, two wells were trypsinized in order to count the cells and adjust the multiplicity
223 of infection (MOI). Viral inoculum of FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 was diluted at MOI 1, MOI
224 0.1 and MOI 0.01 in a serum-free DMEM High Glucose complete medium. One hundred microliters
225 of viral inoculum or 100 µl of conditioned-medium (MOCK) was added to the corresponding wells.
226 One hour later, 250 µl of DMEM High Glucose complete medium was added to each well. Visual
227 estimation of the cytopathic effect (CPE) from 0% (no destruction) to 100% (no more adherent cells)
228 was performed daily during the first week post-infection to evaluate the viral impact on the cells. Each
229 two or three days, the supernatants were collected and stored for further investigations as described in
230 Figure 1 (A), and fresh DMEM High Glucose complete medium was added. When the cells became
231 confluent, they were trypsinized and seeded into a larger well.

232 **FMDV inoculation of multilayered cells**

233 DSP cells were cultured on inserts for five weeks and were thereafter inoculated with FMDV
234 O/FRA/1/2001 Clone 2.2 at MOI 1 or incubated with conditioned-medium. Visual estimation of the
235 cytopathic effect (CPE) was performed daily during the first week post-infection. Two days post-
236 infection (dpi) the viral inoculum or the conditioned-medium contained in the upper compartment was
237 harvested and the upper part of the insert was let dry. Each two or three days, fresh DMEM High
238 Glucose complete medium was added to wash the inserts and immediately collected for further
239 investigations as described in Figure 1 (B) and the culture medium contained in the lower compartment
240 was renewed. Inserts were regularly harvested and fixed, embedded and then cross-sectioned for
241 further staining.

242 **Type-I IFN response investigation**

243 Porcine DSP and bovine DSP were cultured in 6-well plates at a density of 1.5×10^6 cells per well in
244 DMEM High Glucose complete medium. After 24 hours, half of the wells were infected by FMDV
245 O/FRA/1/2001 Clone 2.2 (MOI 1 for porcine DSP and MOI 0.01 for bovine DSP) and the other half
246 were incubated with conditioned medium as described above. After 6, 12 and 24 hours post-infection,
247 cells were collected in order to extract RNA. Extracted RNA were used to perform five simplex rtRT-
248 PCR targeting bovine and porcine IFN α , IFN β , MX-1, PKR and β -actin housekeeping gene, using
249 AgPath-ID One-Step RT-PCR kit (Applied Biosystems) and following suppliers recommendations.
250 Primers used were adapted from O'Donnell 2014 (V. O'Donnell et al. 2014).

251 **Detection of infectious FMDV by viral isolation**

252 Porcine kidney epithelial cells (IBRS-2, CCLV-RIE 103, FLI) were cultured in Earle's essential
253 minimum medium with L-glutamine, supplemented with 7% FCS, 1.5% lactalbumin hydrolysate
254 (SigmaAldrich), 1% PS and 25 mM HEPES. 96-well plates were seeded with 5×10^4 IBRS-2 cells per



255 well and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h. The monolayers were then washed twice
256 with serum-free culture medium and were inoculated with 50 µl of upper supernatant. One hour later,
257 250 µl of culture medium was added. The cells were then incubated at 37° C in a 5% CO₂ atmosphere
258 for 48 h. CPE was visually monitored at 24 h and 48 h post-infection (hpi).

259 **Detection of FMDV 3D^{pol} antigen by immunofluorescence**

260 Foot-and-mouth disease 3D^{pol} antigen detection was performed 48h post virus inoculation on IBRS-2
261 cells, by IF. The 96-well plates were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences)
262 during 25 minutes, then permeabilized with Triton X-100 for 30 minutes. 3D^{pol} staining was performed
263 using mouse monoclonal antibody 3F12 anti-FMDV 3D^{pol} at 1:500 (kindly provided by Dr Emiliana
264 Brocchi and Dr Santina Grazioli of IZSLER, Brescia, Italy) and goat anti-mouse AlexaFluor 488 IgG
265 H+L (Life Technologies) used at 1:1000. Cell nuclei were stained using DAPI (Life Technologies)
266 according to the manufacturer's instructions. Positivity for FMDV antigen was assessed by IF
267 observation using a DMi8 microscope (Leica Microsystems). The observations were classified
268 according to an arbitrary index ranging from 0 to 3 based on a visual estimation of the proportion of
269 cells in which 3D^{pol} antigen is detected. 0 means no detection, 1 indicates the presence of a few 3D^{pol}
270 antigen positive cells, 2 represents wells in which more than half of the cells are positive and 3 indicates
271 that almost all cells are 3D^{pol} antigen positive.

272 **Detection of FMDV RNA by real-time RT-PCR**

273 Viral RNA were extracted from 100 µL of cell culture supernatants using the ID Gene Mag Universal
274 kit (Innovative Diagnostic) and a KingFisher Flex automat, according to the supplier's
275 recommendations in an elution volume of 60 µL. Molecular FMDV detection was performed by real-
276 time (rt) RT-PCR targeting 3D^{pol} gene, as well as GAPDH housekeeping gene (Bernelin-Cottet *et al.*,
277 in prep.) using AgPath-ID One-Step RT-PCR kit in a final volume of 25 µL. For each PCR, 12.5 µL
278 of buffer 2X, 1 µL of RT-PCR enzyme mix 25X according to suppliers recommendations and each
279 primers and TaqMan probes at 0.2 µM were mixed with 5 µL of sample RNA. PCR amplifications
280 were performed with a QuantStudio™5 Real-Time PCR Instrument (Life Technologies) with 10 min
281 at 45°C, 10 min at 95°C followed by 45 cycles composed of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. Results
282 were analysed with the *QuantStudio Design & Analysis software* v1.5.1 (Thermo Fisher Scientific).

283 **3 Results**

284 **Porcine DSP cells are *in-vitro* cultivatable epithelial cells**

285 Histological analysis of oropharyngeal tonsils and DSP revealed epithelial structures associated with
286 lymphoid tissue and exocrine glands, respectively (Figure 2).

287 This analysis confirmed that the samples were taken from the correct area with an intact epithelium for
288 cell isolation. Primary cells from the oropharyngeal tonsils of three swine (100-309, 100-310 and 100-
289 313) were isolated but only a few adhered to the culture plates. These cells did not survive the first
290 trypsinization and could not be further propagated. For the primary DSP cells, the dorsal soft palates
291 from animals 100-309 and 100-310 were not treated because the dorsal soft palates were slightly
292 damaged during collection. Thus, only the dorsal soft palate from swine 100-313 was used to isolate
293 primary cells. After initial sub-optimal passages in complete DMEM (slow growth and difficulty in
294 detaching cells), culture in complete DMEM High Glucose Medium significantly improved culture
295 conditions and enabled cell characterisation, as well as infection assays in monolayers and multilayers.
296 Thus, only the DSP from swine 100-313 were used for further experimentation.



297 In order to ensure that the primary cultured cells did not carry other viruses, we performed PCR tests,
298 using RNA from the culture supernatant and from DSP cell pellets, for detection of viruses that are
299 frequently circulating in French swine populations and that may persist in the long term. No viral RNA
300 nor DNA from PRRS, PCV2 or PCV3 was detected.

301 After starting the culture, the DSP cells were observed under a brightfield microscope to analyse their
302 morphology (Figure 3 (A)). We observed cells with a polygonal or cobblestone morphology with
303 somewhat irregular contours, similar to epithelial cells (Yang et al. 2020).

304 As we did not have enough cells in culture to fix them for labelling at the beginning of the experiment,
305 we had to wait several passages before characterising them by IF. At this point, cells grown in
306 monolayers labelled with an anti-cytokeratin antibody showed a weak signal, drowned in massive
307 autofluorescence compared to the positive control on goat tongue epithelial cells (ZZ-R127). However,
308 no autofluorescence was detected on porcine DSP cells in absence of primary antibody (data not
309 shown). Furthermore, the staining performed on bovine endothelial cells derived from umbilical cord
310 (BUcEC), considered as a negative control for cytokeratin detection, was not associated with any signal
311 as shown in Figure 3 (B).

312 Labelling to detect occludin, a protein involved in tight junction formation, revealed the expression of
313 occludin in DSP cells, while the secondary antibody alone did not generate fluorescence at similar
314 conditions of fluorescent microscopy (data not shown). Almost no signal was detected on endothelial
315 BUcEC considered as negative control (Figure 3 (C)).

316 When performed simultaneously, labelling with an anti-vimentin antibody indicates that the cells
317 express more vimentin than cytokeratin in porcine DSP cells (Figure 3 (D)). Secondary antibody alone
318 did not generate fluorescence at similar conditions of fluorescent microscopy (data not shown).
319 Vimentin was also detected in a more diffuse way in the ZZ-R127 epithelial cell line.

320 Prior to infection of DSP cells, we wanted to verify that these cells possessed the specific FMDV
321 receptor required for infection initiation, namely integrin $\alpha_v\beta_6$. DSP cells were labelled with an
322 antibody raised against this protein. Secondary antibody alone did not generate fluorescence at similar
323 conditions of fluorescent microscopy (data not shown). This labelling enabled us to observe a signal
324 corresponding to a significant expression of the $\alpha_v\beta_6$ integrin in our cells, as shown in Figure 3 (E).

325 **Porcine DSP are susceptible to Foot-and-Mouth and other vesicular disease viruses**

326 Porcine DSP susceptibility to FMDV infection was assessed using eight strains representative of the
327 diversity of reference and field viruses recently detected, namely Asia1/PAK/2011, SAT1/NIG/2015,
328 SAT3/ZIM/1981, O/OMN/2020, O/FRA/2001, O/MUR/2016, O/ALG/2018 and A/TUN/2017.
329 Infection performance of porcine DSP was compared to ZZ-R127 and IBRS-2 standard diagnostic cell
330 lines, as well as bovine DSP cells (Figure 4 (A)). In contrast to bovine DSP, porcine DSP, like ZZ-
331 R127 and IBRS-2, were shown to be susceptible to all FMDV strains tested, resulting in a systematic
332 CPE at 48 hpi. Titration of corresponding cell culture supernatants showed similar infectious titers
333 between porcine DSP and standard diagnostic cell lines in the case of infection with Asia1/PAK/2011,
334 O/FRA/2001, O/MUR/2016 and A/TUN/2017 strains. However, titers obtained after infection of
335 porcine DSP with SAT1/NIG/2015, SAT3/ZIM/1981, O/OMN/2020 and O/ALG/2018 were
336 significantly lower than those that resulted from ZZ-R127 and IBRS-2 infection.

337 In addition, porcine DSP were tested for susceptibility to viruses involved in the FMD differential
338 diagnosis and compared with the same cells (Figure 5 (B)). Porcine DSP were shown to be susceptible



339 to Vesicular Stomatitis Virus (VSV) IND/1942 and NJ/1964 strains, Seneca Valley Virus (SVV)
340 CA/2001 and MN/1988 strains, as well as Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) FRA/1973 and
341 ITL/2008 strains. These infection assays revealed a much more pronounced CPE in porcine DSP than
342 in the other cell lines currently used for SVV infection.

343 **Porcine DSP are able to produce type-I IFN in response to FMDV infection**

344 Porcine DSP ability to produce type-I IFN was assessed by rtRT-PCR by comparing RNA expression
345 levels of IFN α , IFN β , MX-1 and PKR in supernatants from cells infected at MOI 1 or incubated with
346 conditioned medium (Figure 5) at 6 h, 12 h or 24 hpi. Likewise, the IFN response induced by porcine
347 DSP was compared to that induced by bovine DSP in response to FMDV infection at MOI 0.01. The
348 internal control β -actin was detected at Ct values between 12 and 20. As porcine DSP exhibited greater
349 CPE than bovine DSP, the highest Ct β -actin values were detected in porcine cell culture supernatants.
350 Consistent with what was observed for bovine cells, IFN β -associated Ct values decreased significantly
351 when comparing infected porcine DSP supernatants (Ct values between 23 and 29), compared to
352 MOCK samples (Ct values between 32 and 33). The highest induction was observed at 6 hpi for porcine
353 DSP and 12 hpi for bovine DSP, consistent with the higher MOI used during infection. For the IFN α ,
354 MX-1 and PKR targets, although no significant changes could be detected between MOCK and
355 infected conditions, Ct values between 33 and 40, 20 and 25, 21 and 26, respectively, were detected,
356 reflecting cells competent for the type-I IFN pathway.

357 **No infectious FMDV detected beyond 14 days post-infection**

358 According to light microscopy observation, FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 infection of DSP
359 monolayers resulted in a variable cell lysis depending on both the MOI used during infection (Figure
360 6 (A)). Indeed, CPE was detectable between one and four dpi for the three MOI tested, i.e. 1, 0.1
361 (Figure 6 (B)). While estimated CPE was close to 100% at MOI 1, it did not exceed 80% at MOI 0.1
362 and 40% at MOI 0.01. No CPE was detected for the MOCK samples. After 7 dpi, whatever the MOI
363 used, the infected cells that were still alive managed to grow again and to reform pieces of cell
364 monolayers of varying size. This was also true for MOI 1, for which we estimated a CPE close to
365 100%, indicating that there were still a few cells that survived the infection. The reconstruction of the
366 cell monolayers was very gradual and was confronted with new events of cell degradation, especially
367 during the first ten days after infection (data not shown). Recovery of a complete monolayer required
368 four days for DSP infected at MOI 0.01, seven days for cells infected at MOI 0.1, and 24 days for cells
369 infected at MOI 1.

370 Cell culture supernatants collected during the whole experiment were tested for the presence of
371 infectious viruses by inoculation on FMDV-sensitive IBRS-2 cells. FMDV-induced CPE on IBRS-2
372 was estimated by microscopy observation and is summarised in Figure 6 (C). Under our experimental
373 conditions, no CPE was detected for the MOCK samples. Again, results depending on both the MOI
374 used for the infection and the infected cell population. Thus, CPE, which revealed infectious FMDV
375 particles were present, was detected in supernatants collected up to 14 dpi for DSP infected at MOI 1
376 and up to 9 dpi and 7 dpi respectively for the cells infected at MOI 0.1 and 0.01.

377 Porcine cells IBRS-2 96-wells plates used for viral isolation were then fixed and stained to detect
378 FMDV antigens, in particular 3D^{pol} antigens by IF (Figure 6 (D)). No specific fluorescence was found
379 to be associated with MOCK conditions. Again, results depend on both the MOI used for the infection.
380 Indeed, 3D^{pol} antigens were detected in IBRS-2 incubated with DSP samples collected up to 14 dpi for
381 MOI 1, 11 dpi for MOI 0.1 and 9 dpi for MOI 0.01.



382 Throughout the experiment, cell culture supernatants were analysed for the presence of viral RNA by
383 rtRT-PCR targeting the 3D^{pol} protein coding region of FMDV. The internal control GAPDH was
384 detected at Ct values between 29 and 37. FMDV RNA was not detected in the cell culture supernatant
385 prior to infection, but was detected after DSP infection at MOI 1, 0.1 and 0.01 (Figure 6 (E)). FMDV
386 3D^{pol} RNA was detected by rtRT-PCR in supernatants collected up to 14 dpi for cells infected at MOI
387 0.01 (Ct values between 22 and 40) and 0.1 (Ct values between 19 and 37) and up to 60 dpi for the
388 MOI 1 (Ct values between 16 and 42).

389 **Primary porcine DSP cells grew in multiple layers at the air-liquid interface**

390 In order to study the cooperation that may exist between the layers forming an epithelium, DSP
391 multilayers cultured at the ALI were grown and then infected. Infection was monitored as on
392 monolayers. As revealed by HES staining of the inserts, after five weeks in culture at the ALI, the DSP
393 were organised into a layer dotted with a multitude of cell clusters composed of few layers of cells
394 (Figure 7).

395 **No infectious FMDV detected beyond seven dpi on porcine DSP multilayers**

396 According to light microscopy observation, the FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 infection of DSP
397 multilayers resulted in a slight CPE that was difficult to estimate. Indeed, addition of medium to the
398 inserts at the time of infection resulted in significant desquamation of the multilayers in the first two
399 days post infection, which made the visualisation of the FMDV-mediated CPE less apparent. However,
400 cell clusters and the monolayer appeared to be more severely affected in the infected inserts than in the
401 MOCK, indicating a weak FMDV-induced cell lysis as early as 24 hpi (Figure 8 (A)). Differences
402 between the infected and MOCK inserts remained observable until 10 dpi, without further cell lysis.
403 The cultures seemed to have quickly recovered before 14 dpi.

404 Cell culture supernatants collected during the whole experience were tested for the presence of
405 infectious viruses on IBRS-2 cells. After 48 hpi, no CPE was detected on IBRS-2. Therefore, it has
406 been decided to perform a second passage of all supernatants on IBRS-2. No CPE was detected for the
407 MOCK samples. As shown in Figure 8 (B), CPE was detected for upper supernatants collected up to 7
408 dpi after being passaged once on IBRS-2. IBRS-2 96-wells plate used for the second viral isolation
409 was then fixed and stained to detect 3D^{pol} antigens (Figure 8 (C)). No specific fluorescence was found
410 to be associated with MOCK conditions. Viral antigen positive cells have been observed when
411 investigating supernatants harvested up to 9 dpi.

412 Insert upper supernatants were analysed for the presence of viral RNA by rtRT-PCR targeting the 3D^{pol}
413 protein coding region of FMDV. The internal control GAPDH was detected at Ct values between 25
414 and 35. FMDV RNA was not detected in the insert upper supernatant prior to infection. 3D^{pol} RNA
415 was detected by rtRT-PCR in supernatants collected up to 23 dpi as shown in Figure 8 (D). The
416 measured Ct values ranged from 15 for samples collected at 2 dpi to over 35 for those collected at 23
417 dpi. No signal corresponding to 3D^{pol} RNA could be detected in the samples collected beyond 23 dpi.

418 **4 Discussion**

419 **Facing a lack of relevant in vitro models for FMDV infection**

420 While BTY cells have been considered as the most susceptible cells to FMDV infection for a long
421 time, the constraints associated with their culture have resulted in the use of cell lines such as BHK-
422 21, IBRS-2 and ZZ-R127 (Brehm et al. 2009). Except for the latter, derived from goat tongue, none of



423 the commonly used cell lines are derived from tissues relevant to FMDV study. Since none of the
424 porcine cell lines used for FMDV research and diagnosis derive from relevant locations, this study
425 describes the development of a porcine DSP cell model particularly suited to this virus.

426 Primary epithelial cells from porcine oropharyngeal tonsils and DSP were isolated and then cultured.
427 While cells from the DSP, described as one of the primary sites of FMDV replication, were successfully
428 cultured, we were unable to culture cells from the oropharyngeal tonsils, a structure considered to be
429 the most important site of primary and sustained FMDV replication (Carolina Stenfeldt et al. 2014).
430 Indeed, cells from the oropharyngeal tonsils of three pigs had difficulty adhering to the culture flask
431 and did not survive trypsinization. As the collection and culture protocol was followed in exactly the
432 same way for both cell populations, we concluded that these cells required an additional factor to allow
433 the adhesion and/or detachment of the few cells that adhered to their support. Unfortunately, this factor
434 could not be identified in the framework of this study. The difference observed in the behaviour of
435 DSP cells and oropharyngeal tonsil cells could also be due to the amount of epithelial cells available
436 in the starting samples. Only few studies concerning pig oropharyngeal tonsil cells culture have been
437 reported in the literature, and most of them do not deal with epithelial cells but with myeloid or
438 lymphoid cells (E. Razzuoli et al. 2012; Elisabetta Razzuoli et al. 2014; Soldevila et al. 2018). To the
439 best of our knowledge, only one paper refers to the establishment of a pig tonsil epithelial cell line (Xi
440 et al. 2020). However, this article does not mention the use of a particular factor in addition to a
441 classical culture medium DMEM/F12 with FCS, and did not helped us to maintain these cells in culture.

442 **Porcine DSP are epithelial cells able to produce type-I IFN**

443 Regarding the DSP-derived cells, we were able to identify the presence of epithelial tissue in the
444 explants, culture these cells, maintain them and perform freeze-thaw resistance assays.
445 Characterisation of DSP cells enabled us to confirm their epithelial nature. Indeed, although they
446 weakly express cytokeratin, an important epithelial marker, in comparison with epithelial cells from
447 the ZZ-R127 lineage, we observed cells with a characteristic epithelial cells polygonal morphology
448 (Kuburich et al. 2022; Wang, Jamal, and Janes 2012). Furthermore, we showed that these cells
449 constitutively express occludin, a protein involved in tight junction formation in epithelia (Matter and
450 Balda 1999). The low expression of cytokeratin in our cells is consistent with the high detection of
451 vimentin, a cytoskeletal intermediate filament protein characteristic of fibroblastic cells but which can
452 also be found in epithelial cells, and potentially involved in FMDV survival (Gladue et al. 2013).
453 Generally, vimentin production has been reported to be associated with the epithelial-mesenchymal
454 transition (EMT), a highly dynamic and reversible biological process by which an epithelial cell
455 undergoes biochemical changes that allow it to adopt a mesenchymal cell phenotype (Yang et al. 2020;
456 Guarino 2007; Kalluri and Weinberg 2009). As this transition is known to affect primary epithelial
457 cells over passages, it is not surprising that vimentin is detected to a greater extent than cytokeratin as
458 these markings were performed after seven passages (Pieper et al. 1992).

459 We have also demonstrated the ability of porcine DSP to trigger an innate immune response during
460 infection. As part of this study, we focused on the type-I IFN response, the first line of defence against
461 pathogens, known to be significantly activated during FMDV infection (Sarry et al. 2022; Ma et al.
462 2018). We identified a substantial increase in the RNA associated with IFN β expression level in
463 response to FMDV infection. Although the absolute expression levels are slightly lower than those
464 measured in bovine DSP, the activating effect following FMDV infection appears to be more
465 pronounced in porcine DSP. Despite no significant increase in the expression levels of RNA
466 corresponding to IFN α , as well as MX-1 and PKR ISG, within 24 hpi, high basal expression levels



467 similar to those found in bovine DSP were measured, suggesting that the cells were competent in their
468 type I IFN pathway.

469 **Porcine DSP are susceptible to Foot-and-Mouth and other vesicular disease viruses**

470 Anti-integrin $\alpha_v\beta_6$ antibody cell staining revealed expression of this protein, considered to be the
471 preferential receptor for FMDV (Monaghan et al. 2005). We therefore expected that DSP would be
472 susceptible to this virus. Infection assays performed in monolayers confirmed this assumption.

473 Indeed, we demonstrated the susceptibility of porcine DSP to a panel of eight FMDV strains
474 representative of the diversity of reference and field strains detected in recent years, namely
475 Asia1/PAK/2011, SAT1/NIG/2015, SAT3/ZIM/1981, O/OMN/2020, O/FRA/2001, O/MUR/2016,
476 O/ALG/2018 and A/TUN/2017. Although the viral titers obtained 48 hpi in the porcine DSP were
477 slightly lower overall than those obtained after infection of the standard diagnostic cell lines ZZ-R127
478 and IBRS-2, significant CPE appeared following infection of the porcine DSP, making it easy to detect
479 the infection.

480 Likewise, infection of porcine DSP with VSV IND/1942 and NJ/1964 strains, SVV CA/2001 and
481 MN/1988 strains, as well as SVDV FRA/1973 and ITL/2008 strains highlighted the susceptibility of
482 these cells to the viruses involved in the FMDV differential diagnosis. In addition, the observed CPE
483 in porcine DSP were significant, resulting in round and floating cells throughout most of the well,
484 including when infected with SVV, a virus for which the strains currently used for diagnosis enable
485 partial CPE to be observed, where only a few cells are lysed, leaving part of the monolayer intact,
486 according to our experience.

487 Regarding our preliminary assays for long-term infection we found that these porcine cells were less
488 sensitive to FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 than the bovine DSP cultured by Hägglund *et al.* 2020
489 (Hägglund et al. 2020). Indeed, whereas the bovine DSP infected at MOI 0.01 showed an almost
490 complete CPE at 24 hpi, the porcine DSP infected at the same MOI showed less than 20% CPE. To
491 reach an almost complete CPE at 24 hpi the porcine DSP had to be infected at MOI 1. Obtaining and
492 infecting epithelial cells from oropharyngeal tonsils would have been useful to determine whether
493 porcine epithelial cells from tissues of interest are all less susceptible than bovine cells or whether those
494 from tonsils, considered as the main site of primary replication, are more susceptible to FMDV
495 (Carolina Stenfeldt et al. 2014). Given the results obtained when assessing the IFN response in porcine
496 and bovine DSP, it would not be possible to explain the lower sensitivity of porcine cells by a stronger
497 type-I IFN response. However, it is not excluded that other immune response pathways are activated
498 to a greater extent.

499 Regardless of the MOI used, we were able to detect infectious FMDV in the culture supernatants by
500 viral isolation on susceptible IBRS-2 cells. Infectious viruses were detected up to 14 dpi in the
501 supernatants of DSP infected at MOI 1. Infectious viruses were associated with viral antigens, notably
502 3D^{pol}, which we were able to detect up to 16 dpi in the supernatants of DSP infected at MOI 1, as well
503 as viral RNA. Although rtRT-PCR detection of viral RNA was no longer possible beyond 14 dpi for
504 cells infected at MOI 0.01 and 0.1, we were able to identify RNA corresponding to the FMDV 3D^{pol}
505 up to 60 dpi in supernatants from MOI 1 infection. RNA Ct values detected several weeks after
506 termination of infectious virus detection are over 35 Ct and increase over time. Such low RNA levels
507 could potentially be related to the generation of a limited quantity of defective viral particles or to the
508 antiviral cellular response-mediated FMDV inhibition (Pfaff et al. 2019; Carolina Stenfeldt et al. 2017;
509 Jonathan Arzt et al. 2017).



510 **Infection of porcine DSP multilayers does not indicate existence of FMDV persistence**

511 Porcine DSP cells were cultured at the air-liquid interface in order to reproduce a stratified epithelium,
512 mimicking a natural epithelium, inspired by the work carried out on bovine DSP by Häggglund *et al.*
513 2020 (Häggglund *et al.* 2020). Histological characterisation of our multilayer cultures confirms the
514 establishment of a stratified epithelium. However, it appears that, similar to the bovine model, our
515 model does not allow the reconstitution of an epithelium as deep as those observed *in vivo* (Schley,
516 Ward, and Zhang 2011).

517 After infection with FMDV at MOI 1, DSP cells grown in multilayers showed a very limited CPE
518 during the first few days post-infection, similar to what was observed with the bovine model infected
519 at MOI 0.01. The desquamation of the cells upon contact with the inoculum did not however facilitate
520 the observation of CPE as a small proportion of the cells also detached from the multilayers for the
521 MOCK conditions. The limited CPE resulted in a rapid reconstitution of the cell layers after less than
522 14 dpi. As discussed by Häggglund *et al.* 2020, this limited CPE is in line with the absence of lesion and
523 low viral replication that can be observed *in vivo* in DSP (Carolina Stenfeldt and Belsham 2012;
524 Carolina Stenfeldt, Diaz-San Segundo, *et al.* 2016; Carolina Stenfeldt *et al.* 2014; Häggglund *et al.* 2020;
525 Zhang and Alexandersen 2004; Murphy *et al.* 2010). Furthermore, Häggglund *et al.* 2020, highlighted
526 that the difference in susceptibility found between DSP cells grown in monolayers and those grown in
527 multilayers could be correlated to the presence of integrin $\alpha_V\beta_6$ in monolayers but not in multilayers
528 within which FMDV could enter via other receptors such as other integrins $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_8$ or heparan
529 sulfate (Vivian O'Donnell, Larocco, and Baxt 2008; Baranowski *et al.* 2000; V. O'Donnell *et al.* 2014;
530 Jackson *et al.* 1996).

531 The limited CPE observed during multilayers infection may also be a consequence of the genome
532 distribution of FMDV, which is concentrated in the basal layer, whereas the viral antigens are
533 concentrated in the superficial layer of the soft palate epithelium, thus limiting the CPE visible on the
534 surface (Carolina Stenfeldt, Eschbaumer, *et al.* 2016). Analysis of upper culture supernatants collected
535 during infection of the multilayer model enabled us to demonstrate the presence of infectious FMDV
536 up to 7 dpi. However, the detection of infectious viruses was only possible after a second passage of
537 the supernatants on IBRS-2 sensitive cells, indicating that the viral load present in the harvested culture
538 supernatants was too low to induce a visible CPE on these cells within 48 h. Again, the distribution of
539 infectious viruses in the deep layers of the epithelium could be one of the possible causes for the low
540 viral load detected in the supernatants collected from the upper surface. Staining of the IBRS-2 96-
541 well plate used for the detection of infectious viruses allowed us to confirm that the observed CPE was
542 indeed related to FMDV, as we were able to detect 3D^{pol} viral antigens in cells incubated in the presence
543 of culture supernatants collected up to 9 dpi. Furthermore, we showed by rtRT-PCR that the collected
544 supernatants contained 3D^{pol} RNA up to 23 dpi. All these results tend to show that the infection of
545 porcine DSP cultured in multilayers only led to a weakly productive infection, of short duration and
546 probably rapidly countered by the antiviral cellular response, corroborating the *in vivo* observations
547 showing a decrease in the quantity of FMDV detected over time and a viremia phase lasting only a few
548 days in pigs (J. Arzt, Baxt, *et al.* 2011; Carolina Stenfeldt, Diaz-San Segundo, *et al.* 2016; Carolina
549 Stenfeldt *et al.* 2014).

550 The main parameters controlled during the infection of the porcine cell model developed in this study
551 have been presented in Table 1 and compared with those published by Häggglund *et al.* 2020 regarding
552 the bovine model.

553 **5 Conclusion and perspectives**



554 In this study, we demonstrated that FMDV-infections of porcine DSP cells grown as monolayers and
555 multilayers at the air-liquid interface are consistent with those *in vivo*. Accordingly, since no infectious
556 virus was detected beyond 14 dpi, there was no evidence of FMDV persistence. Compared to the
557 currently used porcine cell models, this new model of cells cultured at the air-liquid interface,
558 unaffected by cell passages, allows to reproduce natural conditions by mimicking a stratified
559 epithelium sensitive to FMDV infection. It can thus be used alongside the bovine model developed by
560 Hägglund *et al.* 2020 to further investigate the differential persistence of FMDV, with particular
561 reference to the conservation of epithelial innate immune responses from one species to another during
562 infection. By allowing hypotheses to be tested in biological models that are more suitable than
563 monolayer cultured cells, the use of these multilayer models will reduce the number of experiments
564 involving animals. The porcine primary DSP cells cultured in this study could also be immortalised to
565 produce the first tissue-derived cell line of interest for the study of FMDV. Such a cell line could be
566 used for both FMDV research and diagnosis. Given their great susceptibility to SVV, VSV and SVDV
567 infection, these cells could be considered as a useful tool for swine viral vesicular diseases differential
568 diagnosis.

569 **References**

- 570 Arzt, J., B. Baxt, M. J. Grubman, T. Jackson, N. Juleff, J. Rhyan, E. Rieder, R. Waters, and L. L.
571 Rodriguez. 2011. "The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine,
572 Small Ruminants, and Wildlife; Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus-Host
573 Interactions." *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (4): 305–26.
574 <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01236.x>.
- 575 Arzt, J., N. Juleff, Z. Zhang, and L. L. Rodriguez. 2011. "The Pathogenesis of Foot-and-Mouth
576 Disease I: Viral Pathways in Cattle." *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (4): 291–
577 304. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01204.x>.
- 578 Arzt, Jonathan, Graham J. Belsham, Louise Lohse, Anette Bøtner, and Carolina Stenfeldt. 2018.
579 "Transmission of Foot-and-Mouth Disease from Persistently Infected Carrier Cattle to Naive
580 Cattle via Transfer of Oropharyngeal Fluid." *MSphere* 3 (5): e00365-18.
581 <https://doi.org/10.1128/mSphere.00365-18>.
- 582 Arzt, Jonathan, Juan M. Pacheco, Carolina Stenfeldt, and Luis L. Rodriguez. 2017. "Pathogenesis of
583 Virulent and Attenuated Foot-and-Mouth Disease Virus in Cattle." *Virology Journal* 14 (1):
584 89. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0758-9>.
- 585 Baranowski, Eric, Carmen M. Ruiz-Jarabo, Noemi Sevilla, David Andreu, Ewald Beck, and Esteban
586 Domingo. 2000. "Cell Recognition by Foot-and-Mouth Disease Virus That Lacks the RGD
587 Integrin-Binding Motif: Flexibility in Aphthovirus Receptor Usage." *Journal of Virology* 74
588 (4): 1641–47.
- 589 Beard, Clayton W., and Peter W. Mason. 2000. "Genetic Determinants of Altered Virulence of
590 Taiwanese Foot-and-Mouth Disease Virus." *Journal of Virology* 74 (2): 987–91.
- 591 Belsham, Graham J., Thea Kristensen, and Terry Jackson. 2020. "Foot-and-Mouth Disease Virus:
592 Prospects for Using Knowledge of Virus Biology to Improve Control of This Continuing
593 Global Threat." *Virus Research* 281: 197909. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197909>.
- 594 Brehm, K. E., N. P. Ferris, M. Lenk, R. Riebe, and B. Haas. 2009. "Highly Sensitive Fetal Goat
595 Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus." *Journal of*
596 *Clinical Microbiology* 47 (10): 3156–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.00510-09>.



- 597 Burman, Alison, Stuart Clark, Nicola G. A. Abrescia, Elizabeth E. Fry, David I. Stuart, and Terry
598 Jackson. 2006. "Specificity of the VP1 GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus for Av
599 Integrins." *Journal of Virology* 80 (19): 9798–9810. <https://doi.org/10.1128/JVI.00577-06>.
- 600 Burrows, R. 1968. "The Persistence of Foot-and Mouth Disease Virus in Sheep." *The Journal of*
601 *Hygiene* 66 (4): 633–40.
- 602 Castro, De, and M. P. 1970. "Clonal Variation in the Swine Kidney Cell Line, IB-RS-2, in Relation
603 to Morphology Karyotype and Susceptibility to the Foot-and-Mouth Disease Virus(FMDV)."
604 *Arqs. Inst. Biol., S. Paulo.* 37: 103–27.
- 605 Childs, Kay, Ben Jackson, Yongjie Harvey, and Julian Seago. 2022. "Trans-Encapsidation of Foot-
606 and-Mouth Disease Virus Genomes Facilitates Escape from Neutralizing Antibodies."
607 *Viruses* 14 (6): 1161. <https://doi.org/10.3390/v14061161>.
- 608 Fish, Ian, Carolina Stenfeldt, Edward Spinard, Gisselle N. Medina, Paul A. Azzinaro, Miranda R.
609 Bertram, Lauren Holinka, et al. 2022. "Foot-and-Mouth Disease Virus Interserotypic
610 Recombination in Superinfected Carrier Cattle." *Pathogens* 11 (6): 644.
611 <https://doi.org/10.3390/pathogens11060644>.
- 612 Franzo, Giovanni, Matteo Legnardi, Cinzia Centelleghé, Claudia M. Tucciarone, Mattia Cecchinato,
613 Martí Cortey, Joaquim Segalés, and Michele Drigo. 2018. "Development and Validation of
614 Direct PCR and Quantitative PCR Assays for the Rapid, Sensitive, and Economical Detection
615 of Porcine Circovirus 3." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official*
616 *Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 30 (4):
617 538–44. <https://doi.org/10.1177/1040638718770495>.
- 618 Gladue, D. P., V. O'Donnell, R. Baker-Branstetter, L. G. Holinka, J. M. Pacheco, I. Fernández Sainz,
619 Z. Lu, X. Ambroggio, L. Rodriguez, and M. V. Borca. 2013. "Foot-and-Mouth Disease Virus
620 Modulates Cellular Vimentin for Virus Survival." *Journal of Virology* 87 (12): 6794–6803.
621 <https://doi.org/10.1128/JVI.00448-13>.
- 622 Gray, Ashley, Britta Wood, Elisabeth Henry, Mehreen Azhar, Donald King, and Valerie Mioulet.
623 2020. "Evaluation of Cell Lines for the Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus and Other
624 Viruses Causing Vesicular Disease." *Frontiers in Veterinary Science* 7 (July).
625 <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00426>.
- 626 Guarino, Marcello. 2007. "Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumour Invasion." *The*
627 *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (12): 2153–60.
628 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.011>.
- 629 Hägglund, Sara, Eve Laloy, Katarina Näslund, Florian Pfaff, Michael Eschbaumer, Aurore Romey,
630 Anthony Relmy, et al. 2020. "Model of Persistent Foot-and-mouth Disease Virus Infection in
631 Multilayered Cells Derived from Bovine Dorsal Soft Palate." *Transboundary and Emerging*
632 *Diseases* 67 (1): 133–48. <https://doi.org/10.1111/tbed.13332>.
- 633 Jackson, T, F M Ellard, R A Ghazaleh, S M Brookes, W E Blakemore, A H Corteyn, D I Stuart, J W
634 Newman, and A M King. 1996. "Efficient Infection of Cells in Culture by Type O Foot-and-
635 Mouth Disease Virus Requires Binding to Cell Surface Heparan Sulfate." *Journal of Virology*
636 70 (8): 5282–87. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5282-5287.1996>.
- 637 Jamal, Syed M, and Graham J Belsham. 2013. "Foot-and-Mouth Disease: Past, Present and Future."
638 *Veterinary Research* 44 (1): 116. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-116>.



- 639 Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition."
640 *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- 641 Kasza, L., J. A. Shaddock, and G. J. Christofinis. 1972. "Establishment, Viral Susceptibility and
642 Biological Characteristics of a Swine Kidney Cell Line SK-6." *Research in Veterinary
643 Science* 13 (1): 46–51.
- 644 Kitching, R.P. 2002. "Clinical Variation in Foot and Mouth Disease: Cattle: -EN- -FR- -ES-." *Revue
645 Scientifique et Technique de l'OIE* 21 (3): 499–504. <https://doi.org/10.20506/rst.21.3.1343>.
- 646 Knight-Jones, T.J.D., and J. Rushton. 2013. "The Economic Impacts of Foot and Mouth Disease –
647 What Are They, How Big Are They and Where Do They Occur?" *Preventive Veterinary
648 Medicine* 112 (3–4): 161–73. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.07.013>.
- 649 Knowles, N. J., and A. R. Samuel. 2003. "Molecular Epidemiology of Foot-and-Mouth Disease
650 Virus." *Virus Research*, Foot-and-Mouth Disease, 91 (1): 65–80.
651 [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00260-5).
- 652 Knowles, Nick J., Paul R. Davies, Tina Henry, Vivian O'Donnell, Juan M. Pacheco, and Peter W.
653 Mason. 2001. "Emergence in Asia of Foot-and-Mouth Disease Viruses with Altered Host
654 Range: Characterization of Alterations in the 3A Protein." *Journal of Virology* 75 (3): 1551–
655 56. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1551-1556.2001>.
- 656 Kopliku, Lela, Anthony Relmy, Aurore Romey, Kamila Gorna, Stephan Zientara, Labib Bakkali-
657 Kassimi, and Sandra Blaise-Boisseau. 2015. "Establishment of Persistent Foot-and-Mouth
658 Disease Virus (FMDV) Infection in MDBK Cells | SpringerLink." *Arch Virol*.
659 <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2526-8>.
- 660 Kuburich, Nick A., Petra den Hollander, Jordan T. Pietz, and Sendurai A. Mani. 2022. "Vimentin and
661 Cytokeratin: Good Alone, Bad Together." *Seminars in Cancer Biology* 86 (November): 816–
662 26. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.006>.
- 663 Ma, Xiao-xia, Li-na Ma, Qiu-yan Chang, Peng Ma, Lin-Jie Li, Yue-ying Wang, Zhong-ren Ma, and
664 Xin Cao. 2018. "Type I Interferon Induced and Antagonized by Foot-and-Mouth Disease
665 Virus." *Frontiers in Microbiology* 9 (August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01862>.
- 666 Mao, Ruoqing, Dehui Sun, Fan Yang, Hong Tian, Zixiang Zhu, Haixue Zheng, and Xiangtao Liu.
667 2018. "Establishment and Evaluation of a Stable Bovine Thyroid Cell Line for Investigating
668 Foot-and-Mouth Disease Virus." *Frontiers in Microbiology* 9: 2149.
669 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02149>.
- 670 Matter, K., and M. S. Balda. 1999. "Occludin and the Functions of Tight Junctions." *International
671 Review of Cytology* 186: 117–46. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61052-9](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61052-9).
- 672 Monaghan, Paul, Sarah Gold, Jennifer Simpson, Zhidong Zhang, Paul H. Weinreb, Shelia M.
673 Violette, Soren Alexandersen, and Terry Jackson. 2005. "The Alpha(v)Beta6 Integrin
674 Receptor for Foot-and-Mouth Disease Virus Is Expressed Constitutively on the Epithelial
675 Cells Targeted in Cattle." *The Journal of General Virology* 86 (Pt 10): 2769–80.
676 <https://doi.org/10.1099/vir.0.81172-0>.
- 677 Murphy, C., J. B. Bashiruddin, M. Quan, Z. Zhang, and S. Alexandersen. 2010. "Foot-and-Mouth
678 Disease Viral Loads in Pigs in the Early, Acute Stage of Disease." *The Veterinary Record* 166
679 (1): 10–14. <https://doi.org/10.1136/vr.b5583>.
- 680 O'Donnell, V., J. M. Pacheco, Michael Larocco, D. P. Gladue, S. J. Pauszek, G. Smoliga, P. W.
681 Krug, B. Baxt, M. V. Borca, and L. Rodriguez. 2014. "Virus-Host Interactions in Persistently



- 682 FMDV-Infected Cells Derived from Bovine Pharynx." *Virology* 468–470 (November): 185–
683 96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.004>.
- 684 O'Donnell, Vivian, Michael Larocco, and Barry Baxt. 2008. "Heparan Sulfate-Binding Foot-and-
685 Mouth Disease Virus Enters Cells via Caveola-Mediated Endocytosis." *Journal of Virology*
686 82 (18): 9075–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.00732-08>.
- 687 Pfaff, Florian, Sara Häggglund, Martina Zoli, Sandra Blaise-Boisseau, Eve Laloy, Susanne Koethe,
688 Daniela Zühlke, et al. 2019. "Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response
689 in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth
690 Disease Virus." *Viruses* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/v11010053>.
- 691 Pieper, F. R., F. A. Van de Klundert, J. M. Raats, J. B. Henderik, G. Schaart, F. C. Ramaekers, and
692 H. Bloemendal. 1992. "Regulation of Vimentin Expression in Cultured Epithelial Cells." *European Journal of Biochemistry* 210 (2): 509–19. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17449.x>.
- 695 Razzuoli, E., E. Faggionato, S. Dotti, R. Villa, T. Lombardo, L. Boizza, M. Ferrari, and M. Amadori.
696 2012. "Isolation and Culture of Pig Tonsil Lymphocytes." *Veterinary Immunology and
697 Immunopathology* 148 (3): 320–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.04.022>.
- 698 Razzuoli, Elisabetta, Riccardo Villa, Angelo Ferrari, and Massimo Amadori. 2014. "A Pig Tonsil
699 Cell Culture Model for Evaluating Oral, Low-Dose IFN- α Treatments." *Veterinary
700 Immunology and Immunopathology* 160 (3): 244–54.
701 <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.05.011>.
- 702 Sarry, Morgan, Damien Vitour, Stephan Zientara, Labib Bakkali Kassimi, and Sandra Blaise-
703 Boisseau. 2022. "Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response
704 and the Importance of the Model." *Viruses* 14 (10): 2129. <https://doi.org/10.3390/v14102129>.
- 705 Schley, David, John Ward, and Zhidong Zhang. 2011. "Modelling Foot-and-Mouth Disease Virus
706 Dynamics in Oral Epithelium to Help Identify the Determinants of Lysis." *Bulletin of
707 Mathematical Biology* 73 (7): 1503–28. <https://doi.org/10.1007/s11538-010-9576-6>.
- 708 Sellers, Robert, and John Gloster. 2008. "Foot-and-Mouth Disease: A Review of Intranasal Infection
709 of Cattle, Sheep and Pigs." *The Veterinary Journal* 177 (2): 159–68.
710 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.03.009>.
- 711 Soldevila, Ferran, Jane C. Edwards, Simon P. Graham, Lisa M. Stevens, Bentley Crudgington, Helen
712 R. Croke, Dirk Werling, and Falko Steinbach. 2018. "Characterization of the Myeloid Cell
713 Populations' Resident in the Porcine Palatine Tonsil." *Frontiers in Immunology* 9 (August):
714 1800. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01800>.
- 715 Stenfeldt, C., J. M. Pacheco, G. R. Smoliga, E. Bishop, S. J. Pauszek, E. J. Hartwig, L. L. Rodriguez,
716 and J. Arzt. 2016. "Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in
717 Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State." *Transboundary and Emerging Diseases* 63 (2): 152–64. <https://doi.org/10.1111/tbed.12235>.
- 719 Stenfeldt, Carolina, and Jonathan Arzt. 2020. "The Carrier Conundrum; A Review of Recent
720 Advances and Persistent Gaps Regarding the Carrier State of Foot-and-Mouth Disease
721 Virus." *Pathogens* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030167>.
- 722 Stenfeldt, Carolina, and Graham J. Belsham. 2012. "Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus
723 RNA in Pharyngeal Epithelium Biopsy Samples Obtained from Infected Cattle: Investigation



- 724 of Possible Sites of Virus Replication and Persistence.” *Veterinary Microbiology* 154 (3):
725 230–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.007>.
- 726 Stenfeldt, Carolina, Fayna Diaz-San Segundo, Teresa de los Santos, Luis L. Rodriguez, and Jonathan
727 Arzt. 2016. “The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs.” *Frontiers in Veterinary*
728 *Science* 3 (May). <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00041>.
- 729 Stenfeldt, Carolina, Michael Eschbaumer, Steven I. Rekant, Juan M. Pacheco, George R. Smoliga,
730 Ethan J. Hartwig, Luis L. Rodriguez, and Jonathan Arzt. 2016. “The Foot-and-Mouth Disease
731 Carrier State Divergence in Cattle.” *Journal of Virology* 90 (14): 6344–64.
732 <https://doi.org/10.1128/JVI.00388-16>.
- 733 Stenfeldt, Carolina, Michael Eschbaumer, George R. Smoliga, Luis L. Rodriguez, James Zhu, and
734 Jonathan Arzt. 2017. “Clearance of a Persistent Picornavirus Infection Is Associated with
735 Enhanced Pro-Apoptotic and Cellular Immune Responses.” *Scientific Reports* 7 (1): 17800.
736 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18112-4>.
- 737 Stenfeldt, Carolina, Juan M. Pacheco, Luis L. Rodriguez, and Jonathan Arzt. 2014. “Early Events in
738 the Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs; Identification of Oropharyngeal Tonsils
739 as Sites of Primary and Sustained Viral Replication.” *PLoS ONE* 9 (9).
740 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106859>.
- 741 Torre, J. C. de la, M. Dávila, F. Sobrino, J. Ortín, and E. Domingo. 1985. “Establishment of Cell
742 Lines Persistently Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus.” *Virology* 145 (1): 24–35.
743 [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90198-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90198-9).
- 744 Van Bekkum, J. G., Frenkel, H. S., Frederiks, H. H. J., & Frenkel, S. Observations on the Carrier
745 State of Cattle Exposed to Foot-and-Mouth Disease Virus. *Tijdschr. Diergeneeskd*, 84, 1159-
746 1164. 1959.
- 747 Wang, Chun-Chao, Leen Jamal, and Kevin A. Janes. 2012. “Normal Morphogenesis of Epithelial
748 Tissues and Progression of Epithelial Tumors.” *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems*
749 *Biology and Medicine* 4 (1): 51–78. <https://doi.org/10.1002/wsbm.159>.
- 750 World Organization for Animal Health (OIE). 2021. “Chapter 3.1.8: Foot and Mouth Disease
751 (Infection with Foot and Mouth Disease Virus). Available Online:
752 https://www.oie.int/fileadmin/Home/Eng/Health_standards/Tahm/3.01.08_FMD.Pdf
753 (Accessed on 11 April 2022).” In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial*
754 *Animals*. Available online:
755 https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.
- 756 Xi, Shumin, Ke Liu, Changguang Xiao, Muddassar Hameed, Anni Ou, Donghua Shao, Beibei Li, et
757 al. 2020. “Establishment and Characterization of the Pig Tonsil Epithelial (PT) Cell Line as a
758 New Model for Persist Infection of Japanese Encephalitis Virus.” *Veterinary Microbiology*
759 242 (March): 108587. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108587>.
- 760 Yang, Jing, Parker Antin, Geert Berx, Cédric Blanpain, Thomas Brabletz, Marianne Bronner, Kyra
761 Campbell, et al. 2020. “Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–Mesenchymal
762 Transition.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (6): 341–52.
763 <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>.
- 764 Zhang, Zhidong, and Soren Alexandersen. 2004. “Quantitative Analysis of Foot-and-Mouth Disease
765 Virus RNA Loads in Bovine Tissues: Implications for the Site of Viral Persistence.” *The*
766 *Journal of General Virology* 85 (Pt 9): 2567–75. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80011-0>.



767

768 **Figure legend**

769 **Figure 1: Experimental timeline for monitoring FMDV infection of porcine DSP**

770 **(A) Experimental timeline for monitoring FMDV infection of porcine DSP cultured in**
771 **monolayers.** Porcine DSP cells were propagated in monolayers and were infected with FMDV O Cl2.2
772 at MOI 0.01, 0.1 or 1, or a placebo conditioned medium. Culture supernatants were collected each two
773 or three days during 112 dpi as illustrated above.

774 **(B) Experimental timeline for monitoring FMDV infection of porcine DSP cultured in**
775 **multilayers at air-liquid interface.** Porcine DSP cells were propagated in multilayers on porous
776 membrane inserts at the air-liquid interphase and were infected with FMDV O Cl2.2 at MOI 1, or a
777 placebo conditioned medium. Insert upper supernatants were collected each two or three days during
778 39 dpi as illustrated above. Analysis were performed on collected supernatants: virus isolation
779 (squares), RT-qPCR (circles) immunofluorescence (triangles). Immunochemistry analysis were
780 performed on fixed inserts (hexagon) and CPE observation were also performed (stars), at indicated
781 days post-infection.

782 **Figure 2: Oropharyngeal tonsils and dorsal soft palate.** DSP and oropharyngeal tonsils were
783 collected from four to six months-old American Yorkshire swine. Histological analysis, HES staining.

784 **Figure 3: Porcine DSP cells characterization**

785 **(A) Porcine DSP morphological observation.** DSP cells were cultured in monolayers and were
786 observed under brightfield microscopy (x100).

787 **(B) Cytokeratin staining.** DSP were cultured in monolayers on High ibiTreat Ibbi chamber slides.
788 Cell nuclei were stained with Hoechst (blue) and cells were visualized by fluorescence microscopy
789 using a DMI8 microscope. Staining with specific mouse cytokeratin antibody and a goat anti-mouse
790 Alexa 488 (green). DSP staining were compared to ZZ-R127 epithelial cell line known to strongly
791 express cytokeratin and BUC-1 endothelial cell line known to not express cytokeratin.

792 **(C) Occludin staining.** DSP were stained with specific rabbit occludin antibody and a goat anti-rabbit
793 Alexa 488 (green). DSP staining were compared to BUC-1 endothelial cell line known to not express
794 occludin.

795 **(D) Vimentin staining.** DSP stained with specific mouse vimentin antibody and a goat anti-mouse
796 Alexa 488 (green). DSP staining were compared to ZZ-R127 epithelial cell line known to strongly
797 express cytokeratin.

798 **(E) α v β 6 integrin staining.** DSP were stained with specific mouse cytokeratin antibody and a goat
799 anti-mouse Alexa 488 (green).

800 **Figure 4: Assessment of porcine DSP susceptibility to a panel of viruses involved in the**
801 **differential diagnosis of FMDV.**

802 **(A) Porcine DSP susceptibility to FMDV strains**

803 Porcine DSP, bovine DSP, ZZ-R127 and IBRS-2 were cultured in 48-well plates and infected with
804 FMDV Asia1/PAK/2011, SAT1/NIG/2015, SAT3/ZIM/1981, O/OMN/2020, O/FRA/2001,
805 O/MUR/2016, O/ALG/2018 or A/TUN/2017 strain. Forty-eight hours post-infection, CPE was visually
806 determined and supernatants were collected in order to perform viral titration in BHK-21 cells. Virus
807 titer are expressed as TCID₅₀ / ml.

808 **(B) Porcine DSP susceptibility VSV, SVV and SVDV strains**

809 Porcine DSP, bovine DSP, ZZ-R127 and IBRS-2 were cultured in 48-well plates and infected with



810 VSV/IND/1942, VSV/NJ/1964, SVV/CA/2001, SVV MN/1988, SVDV/FRA/1973 or
811 SVDV/ITL/2008 strain. Forty-eight hours post-infection, CPE was visually determined and
812 supernatants were collected in order to perform viral titration in porcine DSP cells. Virus titer are
813 expressed as TCID₅₀ / ml.

814

815 **Figure 5: Assessment of porcine DSP ability to produce type-I IFN.**
816 Porcine DSP and bovine DSP were cultured in 6-well plates and incubated with FMDV O C12.2 or
817 conditioned medium. At 6, 12 and 24 hpi, cellular RNA were extracted in order to perform rtRT-PCR
818 targeting type-I IFN response components.

819 (A) IFN β ; (B) IFN α ; (C) MX-1; (D) PKR

820

821 **Figure 6: Monitoring of FMDV infection of porcine DSP cultured in monolayers.**

822 Porcine DSP were cultured in monolayers and were infected with FMDV O C12.2 at MOI 0.01, 0.1 or
823 1, or a placebo conditioned medium.

824 (A) CPE observation at 48 hpi.

825 (B) CPE evolution during the first seven dpi. CPE was visually estimated using brightfield
826 microscopy.

827 (C) Infectious FMDV detection by viral isolation. Viral isolation on IBRS-2 sensitive cells were
828 performed using collected supernatants to detect infectious FMDV. CPE on IBRS-2 after an 48 hours
829 incubation with supernatants were visually estimated. The results presented here concern culture
830 supernatants collected during the first 23 days post-infection.

831 (D) FMDV 3D^{pol} antigen detection by immunofluorescence. IBRS-2 96-well plates used for viral
832 isolation were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with Triton X-100 before being
833 stained with with specific mouse 3D^{pol} antibody and a goat anti-mouse Alexa 488 (green). Cell nuclei
834 were stained with Hoechst (blue) and cells were visualized by fluorescence microscopy using a DMi8
835 microscope. Results were arbitrarily classified according to an index ranging from 0 to 3. 0 indicates
836 no fluorescence, 1 a small amount of fluorescent cells, 2 a majority of fluorescent cells and 3 indicates
837 that almost all cells are fluorescent. Evolution of fluorescence levels estimated after 48h of incubation
838 of IBRS-2 with culture supernatants harvested up to 23 days post-infection. Results presented here are
839 the average of two samples.

840 (E) FMDV 3D^{pol} RNA detection by rtRT-PCR. Duplex rtRT-PCR targeting 3D^{pol} FMDV RNA as
841 well as GAPDH housekeeping gene was performed. The results presented here concern results from
842 culture supernatants collected during the first 60 days post-infection.

843

844 **Figure 7: DSP cells multilayers characterisation.** Porcine DSP were cultured in multilayers at the
845 air-liquid interface during six weeks. Some inserts were sacrificed to evaluate the multilayers depth.
846 To this purpose, inserts were fixed in formalin and ethanol and then stained with HES. Stained inserts
847 were observed by microscopy to estimate the number of cell layers.

848 **Figure 8: Monitoring of FMDV infection of porcine DSP cultured in multilayers at the air-liquid
849 interface.**

850 DSP were cultured in multilayers at the air-liquid interface during 6 weeks before being infected with
851 FMDV O C12.2 at MOI 1, or a placebo conditioned medium. CPE were visually estimated almost daily
852 during the first two weeks post-infection.

853 (A) CPE evolution on DSP multilayers. Microscopic CPE observation was pictured just before
854 infection, at 24 hpi, 48 hpi, 7 dpi and 14 dpi for infected and MOCK condition.

855 (B) Infectious FMDV detection by viral isolation. Viral isolation on IBRS-2 sensitive cells were
856 performed using collected supernatants to detect infectious FMDV. CPE on IBRS-2 after a 48 hours



857 incubation with supernatants passed once in IBRS-2 were visually estimated. The results presented
 858 here concern culture supernatants collected during the first 11 days post-infection.

859 **(C) FMDV 3D^{pol} antigen detection by immunofluorescence.** IBRS-2 96-well plates used for viral
 860 isolation were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with Triton X-100 before being
 861 stained with specific mouse 3D^{pol} antibody and a goat anti-mouse Alexa 488). Cell nuclei were stained
 862 with Hoechst and cells were visualized by fluorescence microscopy using a DMi8 microscope. Results
 863 were arbitrarily classified according to an index ranging from 0 to 3. 0 indicates no fluorescence, 1 a
 864 small amount of fluorescent cells, 2 a majority of fluorescent cells and 3 indicates that almost all cells
 865 are fluorescent. Here is presented the evolution of fluorescence levels estimated after 48h of incubation
 866 of IBRS-2 with culture supernatants harvested up to 11 days post-infection. Results presented here are
 867 the average of two samples.

868 **(D) FMDV 3D^{pol} RNA detection by rtRT-PCR.** Duplex rtRT-PCR targeting 3D^{pol} FMDV RNA as
 869 well as GAPDH housekeeping gene was performed. The results presented here concern results from
 870 culture supernatants collected during the first 28 days post-infection.

871 **Tables**

872 **Table 1: Comparative analysis of FMDV O C12.2 infection monitoring of porcine DSP cells**
 873 **cultured in monolayers, and multilayers at the air-liquid interface as well as bovine DSP cells**
 874 **cultured in multilayers at the air-liquid interface.**

875 *The results for pig cells are entirely based on this study, while the results for bovine cells are based
 876 on the work of Hägglund *et al.* (2020).

	Susceptibility to FMDV infection	Time to complete destruction of the cell layers	Time to complete cell layers recovery	3D ^{pol} RNA detection (up to)	Infectious virus detection (up to)	3D ^{pol} antigen detection (up to)
Porcine DSP Monolayers	++++	1 dpi	25 dpi	60 dpi	14 dpi	16 dpi
Porcine DSP Multilayers	+	X	14 dpi	23 dpi	7 dpi	9 dpi
* Bovine DSP Multilayers	++	X	28 dpi	>28 dpi	>28 dpi	>28 dpi

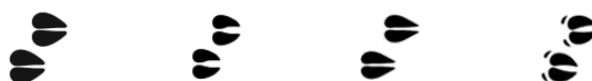
877

878 **Conflict of Interest**

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

881 **Author Contributions**

882 Conceptualization: SBB, LBK, JFV, MS; Methodology: JFV, SH, SBB, MS; Investigation: MS, SBB,
 883 CBC, CM, ARe, ARo, ALS, PR, MC, MB,HH, GJ; Original draft preparation: MS; Supervision: SBB,
 884 LBK; Reviewing: SBB, LBK, JFV, SH, CBB, CM, ARo



885 **Funding**

886 This original study work was funded by ANSES animal health laboratory's own funds.

887 **Acknowledgments**

888 Thanks to Benoit Lecuelle and the Maisons-Alfort Veterinary School Biomedical Research Center for
889 providing post-anesthesia swine. Thanks to Maxime Delsart for the tissue sampling demonstration.
890 Thanks to Olivier Bourry and Beatrice Grasland for sharing their expertise regarding porcine viruses.
891 Thanks to Santina Grazioli and Emiliana Brocchi for providing 3F12 antibody. Thanks to our trainees
892 Clara Pigozzo and Estelle Koulmann for actively contributing to this work.

In review



Figure 1.TIFF

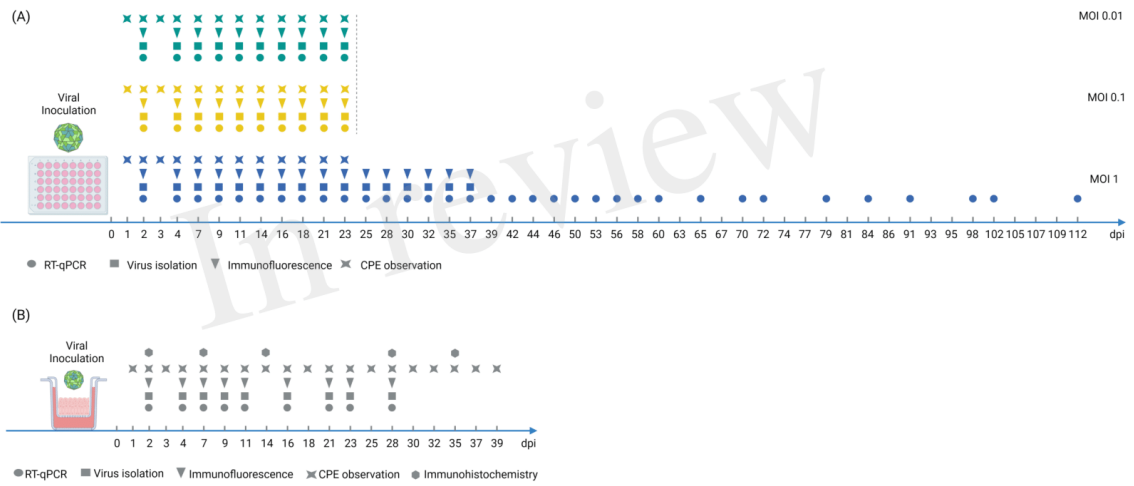


Figure 2.TIFF

In review

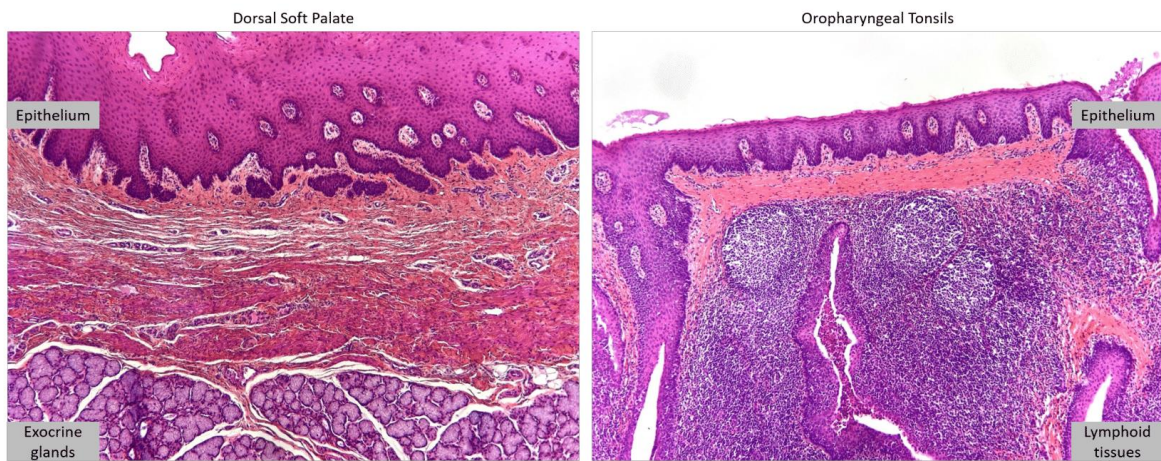
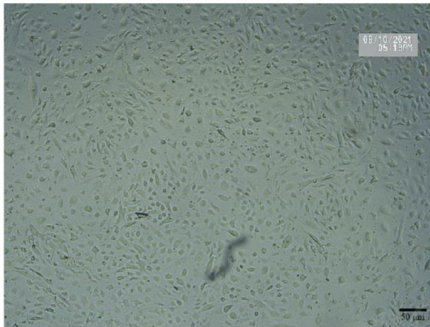
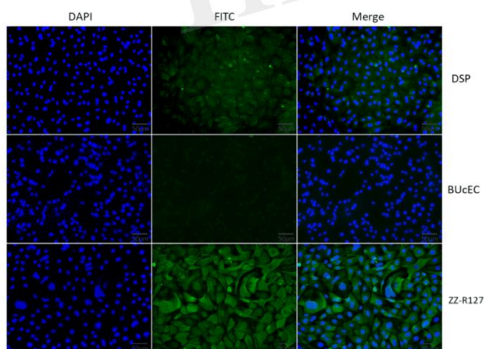


Figure 3.TIFF

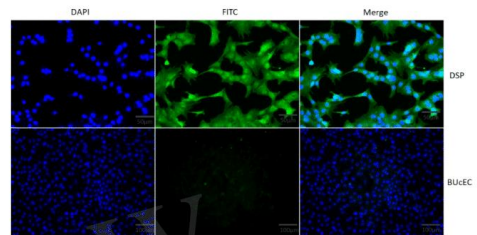
(A) Morphology



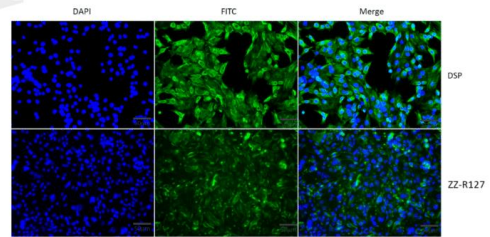
(B) Cytokeratin



(C) Occludin



(D) Vimentin



(E) $\alpha_v\beta_6$ integrin

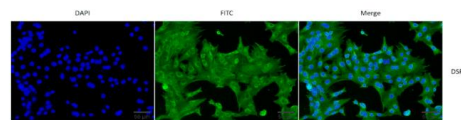


Figure 4.TIFF

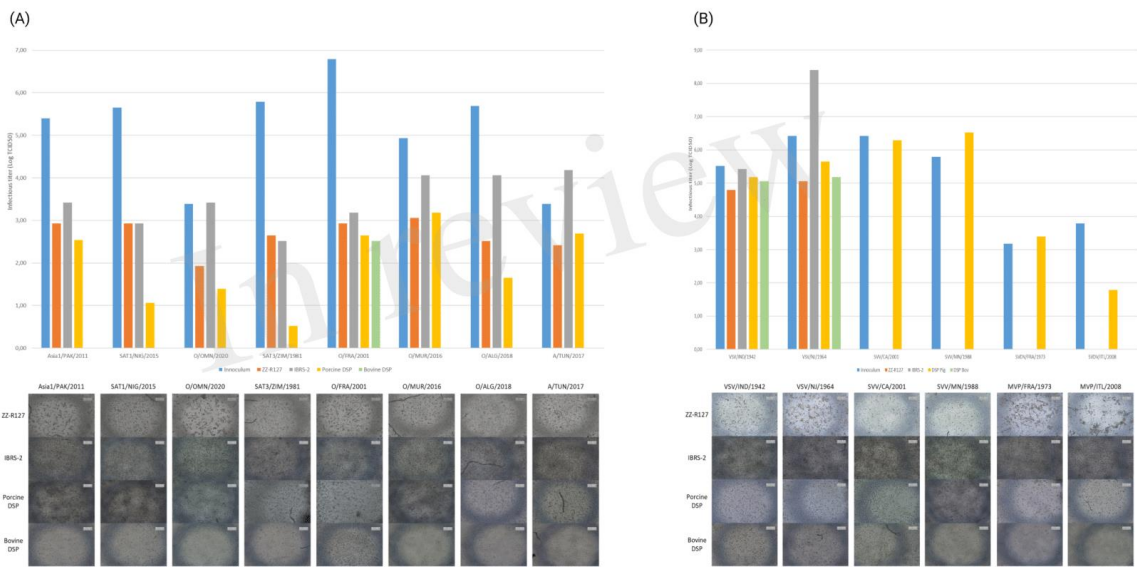


Figure 5.TIFF

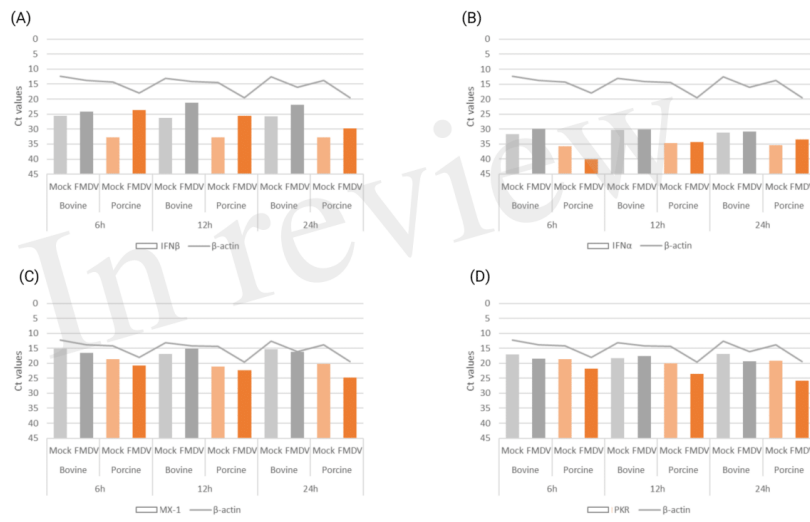


Figure 6.TIFF

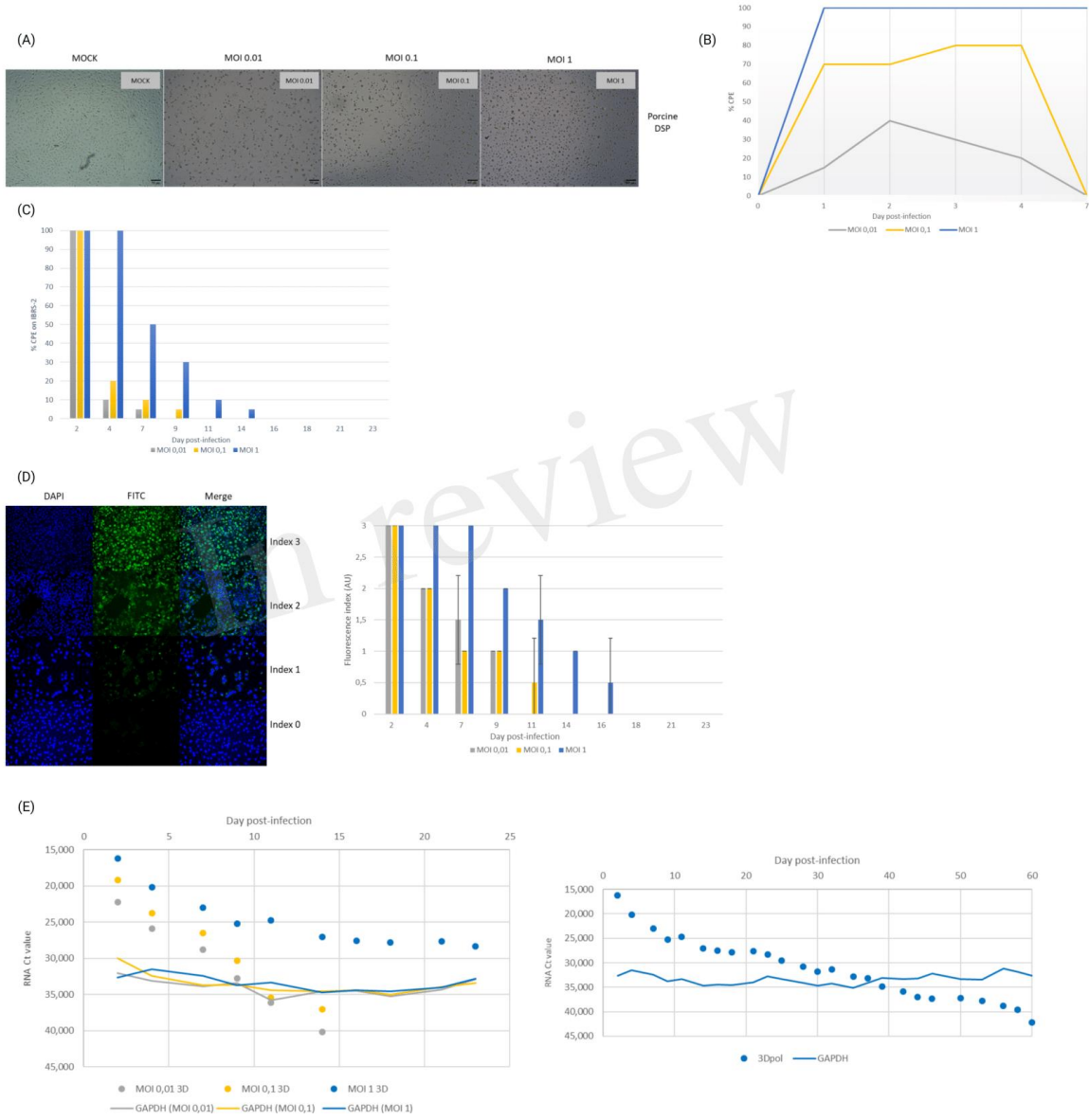


Figure 7.TIFF

In review

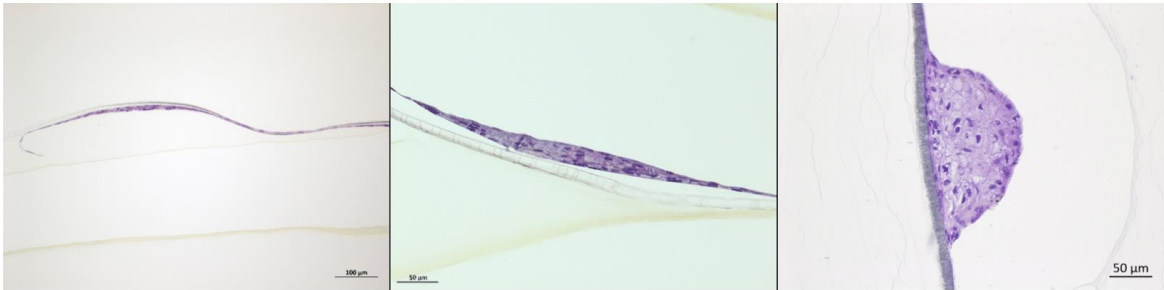
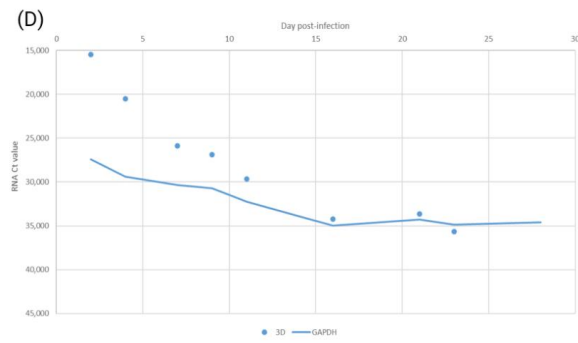
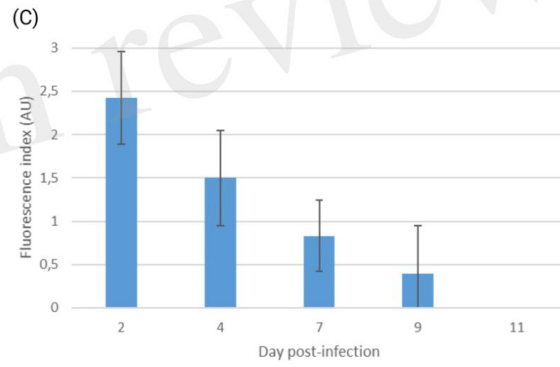
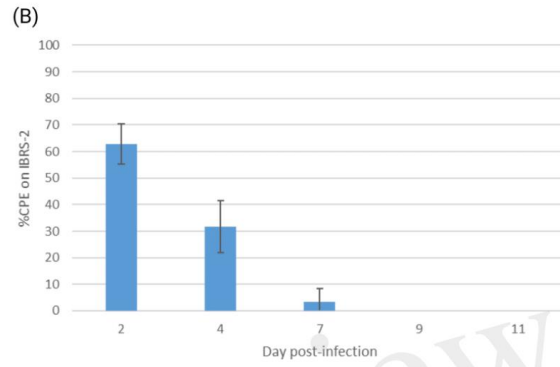
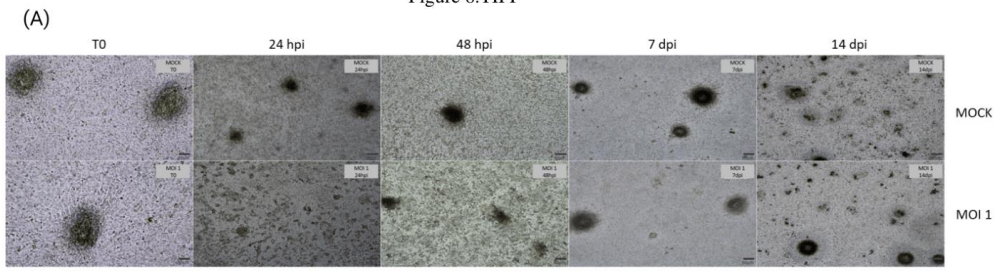


Figure 8.TIFF



2) Développement d'un modèle de cellules primaires ovines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse

Afin de développer un modèle cellulaire permettant l'étude du FMDV chez l'ovin *in vitro*, des structures d'intérêt, correspondant aux sites de réplication primaire et aux sites de persistance du FMDV chez cette espèce, ont été prélevées, à savoir les amygdales palatines et le DSP (196). Les cellules épithéliales ont pu être isolées à partir de ces prélèvements, puis cultivées au laboratoire. L'analyse de marqueurs cellulaires tels que la cytokératine a permis de vérifier le caractère épithélial de ces cellules.

L'infection par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 des cellules DSP et PT cultivées en monocouches a permis de mettre en évidence leur sensibilité à différentes MOI. Le suivi de l'infection des cellules DSP ovines a révélé la présence de virus infectieux et d'antigènes viraux jusqu'à dix-sept jours post-infection et d'ARN viraux jusqu'à la fin de l'expérience, c'est-à-dire vingt-trois jours post-infection. En ce qui concerne les cellules PT ovines, le suivi de l'infection a permis de mettre en évidence du virus infectieux jusqu'à dix jours post-infection, d'antigènes viraux jusqu'à treize jours post-infection et d'ARN viraux jusqu'à vingt-trois jours post-infection pour les deux MOI les plus importantes (10^{-2} et 10^{-4}). A l'issue de ces essais d'infection en monocouches, les cellules DSP, plus sensibles, ont été cultivées en multicouches à l'interface air-liquide sur membrane de collagène afin de mimer un épithélium pluristratifié. L'infection de ce modèle en multicouches a mis en évidence une légère diminution de la sensibilité des cellules à l'infection en comparaison à l'infection des cellules en monocouches, illustrée par un effet cytopathique plus tardif. Le suivi de l'infection de ce modèle a mis en lumière la présence de virus infectieux, d'antigènes viraux et d'ARN viraux dans les surnageants de culture récoltés jusqu'à la fin de l'expérience, c'est-à-dire jusqu'à trente-cinq jours après l'infection. Alors que la détection de virus infectieux plus de vingt-huit jours post-infection pourrait indiquer que nous avons réussi à développer



un modèle permettant l'établissement d'une infection persistante par le FMDV, il est difficile d'affirmer de tels propos dans la mesure où l'infection conduit à la destruction quasi-totale du tapis cellulaire, sans signe de reconstruction de celui-ci, reflétant une absence d'équilibre entre le virus et les cellules hôtes.

Article : Sarry M, Laloy E, Relmy A, Romey A, Bernelin-Cottet C, Salomez A L, Huet H, Hägglund S, Valarcher J F, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Development of a primary cell model derived from ovine dorsal soft palate and palatine tonsils for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis.** En cours de relecture avant soumission.



Development of a primary cell model derived from ovine dorsal soft palate and palatine tonsils for foot-and-mouth disease virus research and diagnosis

Morgan Sarry^{1,2}, Eve Laloy⁴, Relmy Anthony, Romey Aurore, Cindy Bernelin-Cottet, Anne-laure Salomez, Hélène Huet¹, Sara H  gglund³, Jean-François Valarcher³, Labib Bakkali Kassimi¹ and Sandra Blaise-Boisseau¹

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE,   cole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France.

² AgroParistech – 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

³ Host Pathogen Interaction Group, Section of Ruminant Medicine, Department of Clinical Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden

Keywords: Foot-and-mouth disease virus (FMDV), FMDV persistence, cellular model, primary cells, sheep, palatine tonsils, dorsal soft palate

Abstract

Foot and mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease that affects animals with cloven hooves. This disease is one of the most important in animal health since it has a significant socio-economic impact, especially in case of an outbreak. One important challenge associated with this disease is the ability of the FMD virus (FMDV), its etiological agent, to persist in its hosts through still unresolved underlying mechanisms. Although persistence in cattle and small ruminants has been described, it is unlikely to happen in pigs. The absence of relevant *in vitro* models is one of the factors preventing advancement in our understanding of FMDV persistence, and particularly differential persistence. While a primary bovine cell model has been established using cells from the dorsal soft palate, which is where FMDV is primarily replicated and persists in cattle, it appeared interesting to develop a model based on FMDV replication and persistence site in sheep. Thus, epithelial cells derived from the palatine tonsils and the dorsal soft palate were isolated and cultured. The epithelial nature of these cultured cells was confirmed using immunofluorescence approach. Following monolayer infection with FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2, the FMDV-sensitivity of these cells was evaluated. At the air-liquid interface, these cells were also expanded in multilayers to mimic a stratified epithelium sensitive to FMDV infection. Our investigation revealed the presence of infectious virus, as well as viral antigens and viral RNA, up to 17 days after infection when infection occurred in cell monolayers, and up to 35 dpi when infection occurred in cell multilayers model. Although infection of ovine DSP grown in multilayers at the air-liquid interface indicates the presence of infectious virus beyond 28 days post-infection, it is not possible to state that we have developed a persistent infection model in these ovine cells since almost all the cells were destroyed during infection and failed to re-grow. Despite this, the creation of such a model creates new opportunities for the research and analysis of FMDV in sheep cells.



1 Introduction

Wild and domestic *artiodactyls*, *i.e.* animals with cloven hooves are susceptible to the highly contagious foot-and-mouth disease (FMD). Regarding its potential socio-economic effects in the event of an outbreak, it is among the most significant animal diseases (Knight-Jones and Rushton 2013). Foot-and-mouth disease virus (FMDV), the FMD etiological agent, is a single-stranded positive RNA virus that belongs to the Aphthovirus genus within Picornaviridae family (Jamal and Belsham 2013). Since FMDV has a high rate of mutation, there are numerous lineages and sublineages as well as the seven serotypes A, O, C, Asia-1, Southern African Territories (SAT) 1, SAT2, and SAT3 (N. J Knowles and Samuel 2003). Untranscribed regions (5'UTR and 3'UTR) surround the 8.5 kb open reading frame (ORF) found in the FMDV genome. It encodes a single polyprotein precursor which lead to four structural proteins (VP1, VP2, VP3, and VP4) and eleven non-structural proteins (Lab_{pro}, Lb_{pro}, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3C, and 3D^{pol}) (Belsham, Kristensen, and Jackson 2020).

The clinical signs of FMDV include fever, the development of vesicles or apthae on numerous mucosa and epithelia (tongue, legs, muzzle, teats, mammary gland, prepuce, vulva, and other parts of the skin), a state of lethargy, and loss of appetite (Kitching 2002). Domestic cattle, which are thought to be revelatory, exhibit the clinical signs quite readily, whereas the infection is less severe in small ruminants such as goat and sheep which act as disseminators and mild or subclinical in African buffalo (J. Arzt, Baxt, et al. 2011). Swine, who are viewed as FMDV amplifiers, exhibit severe clinical signs that are frequently characterized by lameness, a withdrawn posture, and a reluctance to stand or walk as a direct result of podal lesions. Although mortality in adult animals is typically low, it can be higher in young animals, particularly in piglets, lambs, and calf, due to acute myocarditis (Carolina Stenfeldt and Arzt 2020). Depending on the particular virulence of FMDV strains, the severity of clinical signs in susceptible species may differ. In fact, some mutations, specifically those affecting the FMDV 3A protein, can alter the host range. The O/TAW/97 strain, for example, caused severe lesions in swine but not in ruminants (Beard and Mason 2000; Nick J. Knowles et al. 2001).

Up to 50% of ruminants remain infected after clinical recovery. Regardless of their particular FMD immune status, they become asymptomatic carriers (J. Arzt, Baxt, et al. 2011; World Organization for Animal Health (OIE) 2021). Such healthy carriers constitute an obstacle to FMDV control because they represent a potential source of new recombinants and a threat to transmit FMDV to susceptible animals (Carolina Stenfeldt and Arzt 2020; Jonathan Arzt et al. 2018; Fish et al. 2022; Childs et al. 2022). FMDV persistence was initially defined as the detection of infectious virus after 28 days post-infection. Given that viral clearance has been shown to occur between 10 and 21 days, sooner than previously thought, depending on the animal's vaccination status, this arbitrary threshold is currently questioned (Carolina Stenfeldt and Arzt 2020; Carolina Stenfeldt and Belsham 2012; Carolina Stenfeldt et al., n.d.). Mechanisms underlying FMDV persistence are still not fully understood more than 50 years after it was first described ("Van Bekkum: Observations on the Carrier State of... - Google Scholar" n.d.). The differential persistence of FMDV constitutes one of the gaps of knowledge that remains unsolved. For instance, there are currently no data to explain why FMDV persistence has been reported in cattle and small ruminants but not in pigs (Burrows 1968; C. Stenfeldt et al. 2016). The primary sites of infection as well as the locations where FMDV persists in various susceptible species have been identified over the past few decades. Specifically, the dorsal soft palate and dorsal nasopharynx are the main persistent sites in domestic cattle and buffalo (J. Arzt, Juleff, et al. 2011).

FMDV pathogenesis in small ruminants such as sheep and goats even if less extensively documented appears relatively similar to that observed in domestic cattle. Aerosol inhalation infection is thus considered as the main mode of transmission in small ruminants, although oral infections also appear



to be effective (Alexandersen et al. 2002). Dorsal soft palate and epithelial crypts of palatine and pharyngeal tonsils are the main primary replication sites in sheep and goat (J. Arzt, Baxt, et al. 2011). These anatomical sites are also persistence sites for FMDV in small ruminants since long-lasting infectious viruses, as well as FMDV proteins and RNA can be detected there.

The lack of suitable study models is one barrier to furthering our understanding of FMDV persistence. Animal studies are expensive, involve ethical concerns, and call for infrastructure that only a small number of laboratories have worldwide. Since the development of *in vitro* methods enabling the growth of the virus, various epithelial cell lines have served as study models, such as Baby Hamster Kidney 21 (BHK-21), Instituto Biologico-Rim Suino-2 (IBRS-2), Porcine Kidney (PK-15), Swine Kidney (SK-6), Foetal porcine kidney (LFBK- α V β 6), Foetal goat tongue (ZZ-R127), Madin-Darby Ovine Kidney (MDOK) and Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells (Gray et al. 2020; Koplaku et al. 2015; de la Torre et al. 1985; Castro and P 1970; Kasza, Shaddock, and Christofinis 1972, 6). Since none of these lines, with the exception of ZZ-R127 cells, were established from FMDV-sensitive tissue, it is possible that the results may have been biased.

In order to improve *in vitro* FMDV study, a multilayer cellular model derived from primary bovine dorsal soft palate (DSP), cultured at the air-liquid interface (ALI) has been developed by Hägglund *et al.* (Hägglund et al. 2020). It has been demonstrated that this *in vitro* DSP-ALI model allowed for the development of a persistent FMDV infection and contributed to a better understanding of the transcriptional responses to FMDV infection (Pfaff et al. 2019).

Given the opportunities provided by such a model and the lack of a suitable ovine cell model, we isolated primary cells from ovine palatine tonsils (PT) and dorsal soft palate in order to create a multilayered culture model at the air-liquid interface. To study the acute and long-term FMDV infection in relevant ovine cells, we first characterized these cells and then infected them as monolayers then multilayers.

2 Materials and Methods

Virus

The FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 (GenBank: OV121130.1) used in this study is a twice-plaque-purified viral clone derived from the O/FRA/1/2001 strain that was further propagated on BHK-21 cells (Koplaku et al. 2015). Viral batches were titrated on BHK-21 monolayers by plaque assay as described in Koplaku *et al.* 2015 (Koplaku et al. 2015). Viral titer is equal to 1.4×10^6 Plaque Forming Unit (PFU) per mL.

Isolation of epithelial cells from the ovine palatine tonsils and dorsal soft palate (Figure 1)

Epithelial tissue from the PT and DSP was collected immediately after slaughter of sheep. During transport to the FMDV laboratory facility, tissues were stored in sterile containers with transport medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Belgium), supplemented per liter with 2.5 mg amphotericin B (Sigma-Aldrich, A-9528) and 20 mg gentamicin (Sigma-Aldrich, G-1397). Dissociation of the surface epithelium was performed to remove as much connective and muscle tissue as possible. Epithelial tissue was dissected and digested at 4°C overnight in incubation medium detailed in Hägglund *et al.* (Hägglund et al. 2020).

Epithelial cells were manually scraped off the underlying tissue, filtered through a 40 μ m cell strainer (Corning) and incubated in cell culture flasks for 4 hr at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere with culture



medium to deplete the fibroblasts. This medium consisted of DMEM containing 10% gamma-irradiated, heat inactivated, foetal calf sera (FCS, Hyclone™, GE Healthcare) and supplemented per liter with 31.25 KU Nystatin (Sigma-Aldrich, N6261), in addition to HEPES, L-glutamine and PS as above. The adherent cells were assumed to mainly consist of fibroblasts, while the suspended cells were epithelial cells. The fibroblastic cells were maintained and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in culture medium, whereas the epithelial cells were centrifuged at 200 x g for 10 min at room temperature and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in flasks containing culture medium.

Air-liquid interface multilayers

Likewise what was done with bovine DSP cells, 12 mm diameter Corning® Transwell®-COL collagen-coated PTFE membrane inserts with 3.0 µm pores (Sigma-Aldrich, CLS3494) have been rehydrated by soaking the inserts in a 12-well plate containing 1 mL of DMEM complete culture medium (10% FCS, 2% HEPES, 1% L-glutamine, 1% PS and 0.2% gentamicin) and by adding 1 mL of this medium directly on the inserts (Hägglund et al. 2020). The inserts were left in contact with the medium for two hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Ovine dorsal soft palate cells and palatine tonsils cells were thawed and immediately seeded on the rehydrated inserts at a density of 1 x 10⁶ cells per insert in 1 mL of DMEM complete culture medium supplemented with 0.02 µg/mL recombinant human hepatocyte growth factor (HFG, Sigma-Aldrich, H9661). After four weeks, when the cells formed a complete monolayer, the culture medium was removed from the upper compartment. The culture medium contained in the lower compartment was changed every two or three days during five weeks.

Cell characterization

The cellular expression of epithelial markers such as cytokeratin and vimentin, as well as that of integrin $\alpha_v\beta_6$, the specific receptor for FMDV, was analysed after five cell passages in culture flasks. For monolayer characterization, cells were cultured in an 8-well µ-Slide (high ibiTreat 1.5 polymer coverslip, Ibbidi). Once the cells have adhered to the support, they were permeabilized with Triton X-100 for 30 minutes after being fixed for 25 minutes with four percent paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences). DAPI (Life Technologies) was used to stain cell nuclei in accordance with the manufacturer's recommendations. Proteins of interest were detected by immunofluorescence microscopy using a DMi8 microscope (Leica Microsystems). A cocktail composed of two mouse monoclonal antibodies (clones A1/A3, DAKO, M3515), which recognise cytokeratin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16 and 19 was used to stain cytokeratin. Vimentin staining was performed using a mouse monoclonal antibody (Clone LN-6, Sigma-Aldrich, V2258). Integrin $\alpha_v\beta_6$ staining was performed using a mouse monoclonal antibody directed against integrin $\alpha_v\beta_6$ (clone 10D5, Abcam, ab77906 (Burman et al. 2006)). Immunofluorescence (IF) detection was performed using an anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen) secondary antibody.

Multilayers characterization

The cell morphology was studied by light microscopy after fixation in 10% buffered formalin. Selected multilayers and the underlying PTFE membranes were embedded in 1.3% agarose then left in 70% ethanol overnight. They were then embedded in paraffin, routinely processed, sliced at 4µm, stained with haematoxylin-eosin-saffron (HES) and examined by light microscopy. Immunohistochemistry was performed using an automated Discovery XT (Ventana Medical Systems, Roche Diagnostics) in order to detect cytokeratin expression in cell multilayers. Mouse monoclonal against cytokeratin AE1-AE3 was used at 1:500 dilution.

FMDV inoculation of cell monolayers



Ovine DSP and PT cells were propagated in culture flasks for four passages before being seeded in 48-well plates at a density of 1.0×10^5 cells per well in DMEM complete medium. Once the cells formed a complete monolayer, two wells were trypsinized in order to count the cells and adjust the multiplicity of infection (MOI). Viral inoculum of FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 was diluted at MOI 10^{-2} , MOI 10^{-4} and MOI 10^{-6} in a serum-free DMEM complete medium. One hundred microliters of viral inoculum or 100 μ l of conditioned-medium (MOCK) was added to the corresponding wells. One hour later, 250 μ l of DMEM complete medium was added to each well. Visual estimation of the cytopathic effect (CPE) from 0% (no destruction) to 100% (almost no adherent cells) was performed daily during the first week post-infection to evaluate the viral impact on the cells viability. Each two or three days, the supernatants were collected and stored for further investigations as described in Figure 2, and fresh DMEM complete medium was added. When the cells became confluent, they were trypsinized and expanded in a larger well.

FMDV inoculation of multilayered cells

Ovine DSP cells were cultured on inserts for five weeks and were thereafter inoculated with FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 at MOI 10^{-4} or incubated with conditioned-medium. Visual estimation of the cytopathic effect (CPE) was performed daily during the first week post-infection. Two days post-infection (dpi) the viral inoculum or the conditioned-medium contained in the upper compartment was evaporated and the upper part of the insert was let dry. Each two or three days, fresh DMEM complete medium was added to wash the inserts and immediately collected for further investigations as described in Figure 3. The culture medium contained in the lower compartment was also collected and renewed. Inserts were regularly harvested and fixed, embedded and then cross-sectioned for further staining as indicated in Figure 3.

Detection of infectious FMDV by viral isolation

Porcine kidney epithelial cells (IBRS-2, CCLV-RIE 103, FLI) were cultured in Earle's essential minimum medium with L-glutamine, supplemented with 7% FCS, 1.5% lactalbumin hydrolysate (Sigma Aldrich), 1% PS and 25 mM HEPES as described in Hägglund *et al.* (Hägglund *et al.* 2020). 96-well plates were seeded with 5×10^4 IBRS-2 cells per well and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h. The monolayers were then washed twice with serum-free culture medium and were inoculated with 50 μ l of upper supernatant. A 250 μ l of culture medium addition was made one hour later. The cells were then incubated for 48 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. CPE was visually estimated at 24 h and 48 h post-infection (hpi).

Detection of FMDV 3D^{pol} antigen by immunofluorescence

Forty-eight hours after the culture supernatant was inoculated on IBRS-2 cells, 3D^{pol} antigen detection was performed by IF. The 96-well plates were permeabilized with Triton X-100 for 30 minutes after being fixed for 25 minutes with four percent paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences). Primary mouse monoclonal antibody 3F12 anti-FMDV 3D^{pol} was used at a concentration of 1:500 (kindly provided by Drs. Emiliana Brocchi and Santina Grazioli of IZSLER, Brescia, Italy) along with a secondary Goat anti-mouse AlexaFluor 488 IgG H+L (Life Technologies) at a ratio of 1:1000. DAPI (Life Technologies) was used to stain cell nuclei in accordance with the manufacturer's recommendations. Using a DMI8 microscope (Leica Microsystems), IF observation was used to determine FMDV antigen positivity. Based on a visual assessment of the percentage of cells in which 3D^{pol} antigen is detected, the observations were categorized using an arbitrary index that ranged from 0 to 3. 0 means no detection, 1 indicates the presence of a few 3D^{pol} antigen positive cells, 2 represents wells in which more than half of the cells are positive and 3 indicates that almost all cells are 3D^{pol} antigen positive.



Detection of FMDV RNA by real-time RT-PCR

A one-step duplex real-time RT-PCR (rtRT-PCR) assay for pan-FMDV was used as previously described by Gorna *et al.* (2016) (Gorna et al. 2016). The assay targeted the 3D^{pol} coding region of FMDV and the cellular β -actin gene as an internal control. A positive FMDV RNA control was included in each run, as well as a negative control containing no RNA template.

3 Results

Ovine DSP and PT cells are *in vitro* cultivatable epithelial cells

Primary cells derived from ovine DSP and PT were isolated on culture plates. Both cell populations were propagated in parallel. The DSP cells were quite easier to detach during the trypsinization step than the PT cells and seem to develop slightly faster.

After the culture had begun, the morphology of the PT and DSP cells was examined under a brightfield microscope (Figure 4). We observed cells that resembled epithelial cells in shape, with polygonal or cobblestone morphologies and rather irregular contours (Yang et al. 2020).

We had to wait through five passages before characterizing the cells by IF since we lacked sufficient numbers of cells in culture to fix them for labelling at the start of the experiment. At this time, cells grown in monolayers and stained with an anti-cytokeratin antibody showed a positive signal that is lower than the one associated with the positive control based on goat tongue epithelial cells (ZZ-R127). Thus, while almost all the ZZ-R127 cells were shown to express cytokeratin, only a 30% of DSP cells and a 40% of PT cells seem to be expressing this epithelial protein marker. No autofluorescence was detected on ovine DSP cells in absence of primary antibody (data not shown). Furthermore, staining performed using bovine endothelial cells derived from umbilical cord (BUcEC), considered as a negative control for cytokeratin detection, was not associated with any signal as shown in Figure 5 (A).

Anti-vimentin immunostaining of ovine DSP after five passages indicates that the cells are likely to express more vimentin than cytokeratin (Figure 5 (B)). Under comparable fluorescent microscopy conditions, the secondary antibody did not produce any fluorescence on its own (data not shown). Additionally, a more diffuse distribution of vimentin was found in the epithelial cell line ZZ-R127. Such analysis was not performed on PT cells.

We wanted to make sure that DSP cells express integrin $\alpha_v\beta_6$, the particular FMDV receptor needed to start an infection, before we infected them. A protein-specific antibody was used to mark DSP cells. With the help of this labelling, we were able to detect a signal that indicated that the integrin $\alpha_v\beta_6$ was expressed significantly in our cells, as seen in Figure 5 (C). Under comparable fluorescent microscopy conditions, the secondary antibody did not produce any fluorescence on its own (data not shown). Such analysis was not performed on PT cells.

Ovine DSP and PT monolayers are susceptible to FMDV infection

According to light microscopy observation, FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 infection of ovine DSP and PT monolayers resulted in a variable cell lysis depending on both the MOI used during infection and the infected cell population (Figure 6). Cells from DSP appeared to be more sensitive to early infection as CPE on these cells was almost complete after only three days post-infection at MOI 10^{-2} , while it took six days for PT cells. Cytopathic effect also appeared faster in DSP infected at MOI 10^{-4} (65% CPE after three days) than in PT (50% CPE after three days). However, at this MOI CPE observed on DSP has



reached a stagnation phase at 6 dpi, while CPE observed on PT was still increasing after 6 dpi. Furthermore, while MOI 10^{-6} appeared to be sufficient to effectively infect the DSP, this was not the case for the PT that showed only an extremely limited CPE that disappeared within the first six days post-infection. Despite some phases of cell growth recovery (data not shown), no complete reconstitution of the monolayer was observed after its destruction both for DSP infected at MOI 10^{-2} , 10^{-4} and 10^{-6} and for PT infected at MOI 10^{-2} and 10^{-4} . Throughout the experiment, no CPE was detected for either the DSP or PT MOCK samples.

No infectious FMDV detected beyond 17 days post-infection

Cell culture supernatants collected during the whole experiment were tested for the presence of infectious viruses by inoculation on FMDV-sensitive IBRS-2 cells. FMDV-induced CPE on IBRS-2 was estimated by microscopy observation and the results are summarised in Figure 7. The MOCK samples did not exhibit any CPE when tested under our experimental settings. The results again depend on both the population of infected cells and the MOI employed for the infection. Indeed, CPE which indicated the presence of infectious FMDV particles, was detected in supernatants collected from 6 dpi to 17 dpi for DSP infected at the three different MOI, with an associated-CPE percentage correlated to the inoculum concentration. Regarding PT supernatant analysis, CPE was observed on IBRS-2 cells from day six to day ten when PT were infected at MOI 10^{-2} , and only from day eight to day ten for MOI 10^{-4} . No infectious virus was detected in MOI 10^{-4} infected PT supernatants collected between 6 dpi and 23 dpi.

Porcine cells IBRS-2 96-wells plates used for viral isolation were then fixed and stained in order to detect FMDV 3D^{pol} antigens by IF (Figure 8). There was no discernible fluorescence associated with MOCK samples. Once more, results are widely influenced by the MOI employed for the infection as well as the population of infected cells. 3D^{pol} antigens were detected in IBRS-2 incubated with DSP supernatants collected up to 17 dpi for MOI 10^{-2} , 10^{-4} and 10^{-6} . Similarly to what has been observed for the detection of infectious viruses, it appears that the proportion of 3D^{pol} antigen positive cells is correlated to the concentration of the inoculum used. Regarding IBRS-2 incubated with supernatants obtained from FMDV infection of PT cells, 3D^{pol} antigens were detected only for MOI 10^{-2} and 10^{-4} , up to 13 dpi. Globally, the proportion of 3D^{pol} antigen positive cells is higher after incubation with supernatants from DSP infection than after incubation with supernatants from PT infection.

Throughout the experiment, cell culture supernatants from DSP and PT infection were analysed for the presence of viral RNA by rtRT-PCR targeting the 3D^{pol} protein coding region of FMDV. The housekeeping-gene control β -actine was detected at Ct values between 29 and 37 for DSP and from 29 to 39 for PT. FMDV 3D^{pol} was not detected in the cell culture supernatant prior to infection, as well as in MOCK samples, but was detected at six days after infection at MOI 10^{-2} , 10^{-4} and 10^{-6} for both cell populations (Figure 9). Foot-and-mouth disease virus 3D^{pol} RNA was detected by rtRT-PCR in DSP supernatants collected from 6 dpi to 23 dpi for the DSP cells infected regardless of the MOI. 3D^{pol} RNA Ct values ranged between 23 and 30 Ct in supernatants of DSP infected at MOI 10^{-2} , between 24 and 28 Ct in supernatants of DSP infected at MOI 10^{-4} and from 22 to 29 Ct for MOI 10^{-6} . Regarding PT supernatants, 3D^{pol} RNA was detected from day six to day twenty-three when infected at MOI 10^{-2} and 10^{-4} , with Ct values ranging from 23 to 29 Ct. In contrast, when infected at MOI 10^{-6} , 3D^{pol} RNA detection was only possible in supernatant from day six post-infection. No RNA was detected in the other samples.

Primary ovine DSP cells grew in multiple layers at the air-liquid interface

In order to study the cooperation that may exist between the layers forming an epithelium, DSP and PT were grown in multilayers cultured at the ALI in order to mimic a natural epithelium. The DSP cells



managed to develop correctly on the collagen-coated membrane, but it was not the case for the PT cells. After five weeks in culture at the ALI, the DSP were organized into a monolayer or bilayers dotted with numerous cell clusters made of a few layers of cells, as shown by HES staining of the inserts (Figure 10 (A)). Cytokeratin immunohistochemistry detection performed on inserts indicates that cells grown on the inserts still express this epithelial marker (Figure 10 (B)). Therefore, only the DSP cells multilayers were then infected. Infection was monitored as it was previously done with monolayers infection.

Infectious FMDV detected beyond twenty-eight dpi on ovine DSP multilayers

According to light microscopy observations, the FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 infection of DSP multilayers at MOI 10^{-4} resulted in a gradual CPE. Thus, relatively few differences could be observed between infected and MOCK samples during the first days after infection, and then the layers of infected inserts were progressively degraded until they were almost completely destroyed after 29 dpi. No evidence of cell recovery have been observed until the end of the infection monitoring (Figure 11 – photos ECP).

Throughout the entire process, cell culture supernatants were collected and examined for the presence of infectious viruses on IBRS-2 cells. After 48 hpi, no CPE was found on IBRS-2 incubated with the MOCK supernatants. As shown in Figure 12, CPE was observed on IBRS-2 cultured in presence of upper supernatants collected from day one to day thirty-five post-infection. Average CPE percentage was estimated about 10% when IBRS-2 were incubated during 48 hours with supernatants from day 2 post-infection and 45% for the ones from 10 dpi. A CPE close to 100% was visualised when IBRS-2 cells were cultured in presence of supernatants harvested from 15 dpi to 31 dpi. A 70% CPE was associated after viral isolation on supernatants collected at 35 dpi.

After the viral isolation, the IBRS-2 96-well plate was fixed and stained in order to search for 3D^{pol} antigens. There was no discernible fluorescence related to MOCK samples.

IBRS-2 incubated with supernatants harvested during the first two days after infection showed a small proportion of 3D^{pol} antigen positive cells (between 10% and 50%), classified as index 1 or 2 (Figure 13). Around half of the IBRS-2 cells incubated with supernatants obtained at 6 dpi were positive for the 3D^{pol} antigen (index 2). The supernatants collected from 15 dpi to 35 dpi were incubated for 48 hours, and the wells under observation showed a massive majority of marked cells (index 1). When examining supernatants from MOCK samples, no 3D^{pol}-positive cells could be found.

Insert upper supernatants were also examined for the presence of viral RNA using rtRT-PCR targeting the 3D^{pol} protein coding region of FMDV. The housekeeping gene control β -actin was found at Ct values ranging from 29 to 33 Ct. No FMDV RNA was detected in the insert upper supernatant harvested prior to infection or from MOCK samples. 3D^{pol} RNA was detected by rtRT-PCR in infected inserts supernatants collected throughout the experiment, i.e. up to 35 dpi, as shown in Figure 14. The measured Ct values ranged from 21 to 25 Ct, with no real decrease in the amount of 3D^{pol} RNA detected over time.

4 Discussion

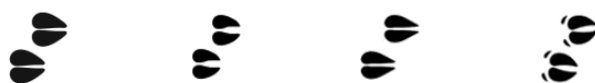
The existing gaps of knowledge regarding FMDV infection, notably with regard to viral persistence, are notably related to the lack of suitable cell models for the study of this virus. While primary Bovine Thyroid cells (BTY) have long been considered as the best available tool, the associated difficulties of



supply and culture have promoted the use of cell lines such as BHK-21, IBRS-2, MDOK or ZZ-R127 (Brehm *et al.* 2009). While ZZ-R127 is derived from goat tongue epithelium, the other cell lines used are mostly derived from kidney epithelium, tissues of limited relevance with respect to the pathophysiology of FMDV. Since a bovine model particularly suited to FMDV studies was developed by Hägglund *et al.* (2020) using primary cells from the dorsal soft palate, we considered it relevant to develop a similar model from the anatomically relevant sites in sheep, namely the palatine tonsils and dorsal soft palate.

Primary epithelial cells from ovine palatine tonsils and dorsal soft palate were therefore isolated and cultured. Cells from both sites of primary FMDV replication in this species were successfully cultured. These cells were then maintained in culture and tested in freeze-thaw resistance assays. The epithelial character of the cultured DSP and PT cells was confirmed through morphological observations and the immunofluorescence detection of selected epithelial markers. Thus, we have shown that DSP and PT look-like epithelial cells, and that they express cytokeratin, a constitutive protein of intermediate filaments (Kuburich *et al.* 2022; Wang, Jamal, and Janes 2012). The mild expression of cytokeratin in DSP cells is consistent with their vimentin expression, characteristic protein of fibroblastic cells but which can also be found in epithelial cells, and potentially related to FMDV survival (Gladue *et al.* 2013). Vimentin synthesis has typically been linked to the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a dynamic and reversible biological process by which an epithelial cell undergoes biochemical changes that enables epithelial cells to modify their biochemistry and take on the characteristics of mesenchymal cells (Yang *et al.* 2020; Guarino 2007; Kalluri and Weinberg 2009). It is not surprising that vimentin was found more largely than cytokeratin because these markings were carried out after numerous passages because it is known that this transition affects primary epithelial cells over passages (Pieper *et al.* 1992).

Anti-integrin $\alpha\beta6$ staining of ovine DSP cells showed that these cells significantly express the preferential receptor for FMDV, indicating their probable susceptibility to infection by this virus (Monaghan *et al.* 2005). The sensitivity of DSP and PT cells to infection was confirmed when assessed in monolayers. Thus, we were able to successfully infect these two cell populations, which appear to be almost as susceptible as the bovine DSP cultured by Hägglund *et al.* (2020) (Hägglund *et al.* 2020). Hence, whereas the bovine DSP infected at MOI 10^{-2} showed an almost complete CPE at 24 hpi, the CPE observed at 24 hpi is close to 90% for the ovine DSP and is considered complete after only 3 dpi. However, this experiment also showed that PT were slightly less susceptible to early FMDV infection than DSP as it took more than 3 dpi to observe a CPE above 90%. Furthermore, it appeared that infection of PT at the lowest MOI (MOI 10^{-6}) was very quickly interrupted and only induced an extremely limited CPE. Regardless of the MOI used to infect PT and DSP, we were able to detect infectious FMDV in the culture supernatants by viral isolation on susceptible IBRS-2 cells. Infectious viruses were detected up to 17 dpi and 10 dpi respectively in the supernatants of DSP and PT cells infected at MOI 10^{-2} and 10^{-4} , while infection at MOI 10^{-6} led to the detection of infectious virus up to 17 dpi for DSP but not for PT infected cells. Infectious viruses detection was associated with FMDV 3D^{pol} antigens, which we were also able to detect up to 17 dpi and 10 dpi respectively in the supernatants of DSP and PT infected at MOI 10^{-2} and 10^{-4} . Consistent with what was observed in terms of infectious virus, infection at MOI 10^{-6} led to the detection of viral antigens in the supernatants harvested up to 17 dpi for DSP but not in the supernatants of PT cells. Regarding viral RNA detection, we were able to demonstrate the presence of 3D^{pol} RNA up to 35 dpi in the culture supernatants from the DSP cells, with very small differences in Ct values between the three MOI tested. A similar observation was made with regard to the detection of 3D^{pol} RNA in the culture supernatants of PT cells infected at MOI 10^{-2} and 10^{-4} . In contrast, infection of these cells at 10^{-6} MOI revealed viral RNA only up to 5 dpi. Infection of DSP cells at MOI 10^{-2} , 10^{-4} and 10^{-6} and PT cells at MOI 10^{-2} and 10^{-4} with FMDV



thus resulted in the detection of infectious virus as well as viral antigens and viral RNA in the culture supernatants harvested above 28 dpi, the limit at which the persistence of FMDV is now defined. However, as the persistence of FMDV is a phenomenon involving a certain balance between the presence of the virus and the survival of its host, it is difficult to affirm that we developed an ovine cellular model allowing the study of persistent infection since the cell cultures were destroyed by the virus during the infection and no sign of reconstitution was observed.

According to the findings from monolayer cultures, DSP cells are slightly more susceptible to FMDV infection than PT cells, so we chose to focus our investigation exclusively on DSP cells. In order to establish a stratified epithelium that resembled a natural epithelium, these cells were cultivated at the air-liquid interphase. This method was motivated by the work done on bovine DSP by Häggglund *et al.* (2020) (Häggglund *et al.* 2020). Our multilayer cultures histological characterization supports the development of a stratified epithelium. It seems that our model, like the bovine model, does not permit the development of an epithelium as deep as those seen *in vivo* since we mainly observed a monolayer or bilayer topped by regular cell clusters (Schley, Ward, and Zhang 2011). Cytokeratin characterization by immunohistochemistry performed on DSP multilayers confirmed their epithelial nature. After infection with FMDV at MOI 10^{-4} , multilayers of DSP cells exhibited a progressive CPE, which was less severe than that observed in monolayers, but still resulted in almost complete destruction of the cells at 29 dpi. The difference in sensitivity between the monolayer and multilayer model was explained by Häggglund *et al.* (2020) as being potentially correlated to the presence of integrin $\alpha V\beta 6$ in monolayers but not in multilayers within which FMDV could enter via other receptors such as other integrins $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 8$ or heparan sulphate ((Vivian O'Donnell, Larocco, and Baxt 2008; Baranowski *et al.* 2000; V. O'Donnell *et al.* 2014; Jackson *et al.* 1996). The CPE visualised during this infection is still stronger than that observed in the bovine model infected at MOI 10^{-2} with a rather limited CPE (Häggglund *et al.* 2020). While the monitoring of the bovine model infection allowed us to observe a complete reconstitution of the cell layer over time, this was not the case for the ovine model. Indeed, despite some phases of reconstruction of pieces of the cell layer, it was continuously degraded by the virus. Analysis of upper culture supernatants collected during DSP multilayer infection revealed the presence of infectious viruses by viral isolation up to 35 dpi. Similarly, 3D^{pol} antigens could be detected in culture supernatants collected at up to 35 dpi. Finally, 3D^{pol} RNA were also detected in the supernatants harvested at up to 35 dpi by rtRT-PCR. It thus appears that the presence of infectious virus is more durable in the multilayer model than during the infection of monolayers. Taking into account the moderated CPE in the multilayers, it seems that the cooperation between the different cell layers could delay the infection of the lower layers and promote the establishment of a long-term infection (Pfaff *et al.* 2019). However, it is again difficult here to state that the model developed in this study allows the establishment of a persistent infection by FMDV since, as we observed during the infection of primary ovine cells in monolayers, the cell layer is almost completely destroyed, indicating an absence of equilibrium between the virus and its host.

Despite this, in this study we developed two primary cell models, from the palatine tonsils and dorsal soft palate of sheep, which are susceptible to acute and long-term infection with FMDV (Burrows 1968; J. Arzt, Baxt, *et al.* 2011). The establishment of an air-liquid interphase cultured multilayer model from ovine DSP allows to reproduce natural conditions by mimicking a stratified epithelium sensitive to FMDV infection. As a result, it can be used in combination with the bovine model established by Häggglund *et al.* (2020) and a porcine model based on DSP cells (article under publication) to further explore the FMDV differential persistence, with special emphasis on how epithelial innate immune responses are conserved from one species to another during infection. The use of these multilayered models will help reduce the number of studies involving animals by enabling hypotheses to be evaluated in biological models that are more appropriate than monolayers of non-specific lineage cells.



Given the very limited number of currently available in vitro models to study FMDV infection in sheep, it might be interesting to immortalise these cells in order to produce the first ovine tissue-derived cell line of interest for the study of FMDV. Such a cell line has the potential to be used for either FMDV research or diagnosis.

References

- Alexandersen, S., Z. Zhang, S. M. Reid, G. H. Hutchings, and A. I. Donaldson. 2002. "Quantities of Infectious Virus and Viral RNA Recovered from Sheep and Cattle Experimentally Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus O UK 2001." *The Journal of General Virology* 83 (Pt 8): 1915–23. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-8-1915>.
- Arzt, J., B. Baxt, M. J. Grubman, T. Jackson, N. Juleff, J. Rhyan, E. Rieder, R. Waters, and L. L. Rodriguez. 2011. "The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine, Small Ruminants, and Wildlife; Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus–Host Interactions." *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (4): 305–26. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01236.x>.
- Arzt, J., N. Juleff, Z. Zhang, and L. L. Rodriguez. 2011. "The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease I: Viral Pathways in Cattle." *Transboundary and Emerging Diseases* 58 (4): 291–304. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01204.x>.
- Arzt, Jonathan, Graham J. Belsham, Louise Lohse, Anette Bøtner, and Carolina Stenfeldt. 2018. "Transmission of Foot-and-Mouth Disease from Persistently Infected Carrier Cattle to Naive Cattle via Transfer of Oropharyngeal Fluid." *MSphere* 3 (5): e00365-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00365-18>.
- Baranowski, Eric, Carmen M. Ruiz-Jarabo, Noemi Sevilla, David Andreu, Ewald Beck, and Esteban Domingo. 2000. "Cell Recognition by Foot-and-Mouth Disease Virus That Lacks the RGD Integrin-Binding Motif: Flexibility in Aphthovirus Receptor Usage." *Journal of Virology* 74 (4): 1641–47.
- Beard, Clayton W., and Peter W. Mason. 2000. "Genetic Determinants of Altered Virulence of Taiwanese Foot-and-Mouth Disease Virus." *Journal of Virology* 74 (2): 987–91.
- Belsham, Graham J., Thea Kristensen, and Terry Jackson. 2020. "Foot-and-Mouth Disease Virus: Prospects for Using Knowledge of Virus Biology to Improve Control of This Continuing Global Threat." *Virus Research* 281: 197909. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197909>.
- Brehm, K. E., N. P. Ferris, M. Lenk, R. Riebe, and B. Haas. 2009. "Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus." *Journal of Clinical Microbiology* 47 (10): 3156–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.00510-09>.
- Burman, Alison, Stuart Clark, Nicola G. A. Abrescia, Elizabeth E. Fry, David I. Stuart, and Terry Jackson. 2006. "Specificity of the VP1 GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus for Av Integrins." *Journal of Virology* 80 (19): 9798–9810. <https://doi.org/10.1128/JVI.00577-06>.
- Burrows, R. 1968. "The Persistence of Foot-and Mouth Disease Virus in Sheep." *The Journal of Hygiene* 66 (4): 633–40.
- Castro, De, and M. P. 1970. "Clonal Variation in the Swine Kidney Cell Line, IB-RS-2, in Relation to Morphology Karyotype and Susceptibility to the Foot-and-Mouth Disease Virus(FMDV)." *Arqs. Inst. Biol., S. Paulo.* 37: 103–27.
- Childs, Kay, Ben Jackson, Yongjie Harvey, and Julian Seago. 2022. "Trans-Encapsidation of Foot-and-Mouth Disease Virus Genomes Facilitates Escape from Neutralizing Antibodies." *Viruses* 14 (6): 1161. <https://doi.org/10.3390/v14061161>.
- Fish, Ian, Carolina Stenfeldt, Edward Spinard, Gisselle N. Medina, Paul A. Azzinaro, Miranda R. Bertram, Lauren Holinka, et al. 2022. "Foot-and-Mouth Disease Virus Interserotypic Recombination in Superinfected Carrier Cattle." *Pathogens* 11 (6): 644. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060644>.
- Gladue, D. P., V. O'Donnell, R. Baker-Branstetter, L. G. Holinka, J. M. Pacheco, I. Fernández Sainz, Z. Lu, X. Ambroggio, L. Rodriguez, and M. V. Borca. 2013. "Foot-and-Mouth Disease Virus



- Modulates Cellular Vimentin for Virus Survival." *Journal of Virology* 87 (12): 6794–6803. <https://doi.org/10.1128/JVI.00448-13>.
- Gorna, K., A. Relmy, A. Romey, S. Zientara, S. Blaise-Boisseau, and L. Bakkali-Kassimi. 2016. "Establishment and Validation of Two Duplex One-Step Real-Time RT-PCR Assays for Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease." *Journal of Virological Methods* 235 (September): 168–75. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.03.020>.
- Gray, Ashley, Britta Wood, Elisabeth Henry, Mehreen Azhar, Donald King, and Valerie Mioulet. 2020. "Evaluation of Cell Lines for the Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus and Other Viruses Causing Vesicular Disease." *Frontiers in Veterinary Science* 7 (July). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00426>.
- Guarino, Marcello. 2007. "Epithelial–Mesenchymal Transition and Tumour Invasion." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (12): 2153–60. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.011>.
- Hägglund, Sara, Eve Laloy, Katarina Näslund, Florian Pfaff, Michael Eschbaumer, Aurore Romey, Anthony Relmy, et al. 2020. "Model of Persistent Foot-and-mouth Disease Virus Infection in Multilayered Cells Derived from Bovine Dorsal Soft Palate." *Transboundary and Emerging Diseases* 67 (1): 133–48. <https://doi.org/10.1111/tbed.13332>.
- Jackson, T, F M Ellard, R A Ghazaleh, S M Brookes, W E Blakemore, A H Corteyn, D I Stuart, J W Newman, and A M King. 1996. "Efficient Infection of Cells in Culture by Type O Foot-and-Mouth Disease Virus Requires Binding to Cell Surface Heparan Sulfate." *Journal of Virology* 70 (8): 5282–87. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5282-5287.1996>.
- Jamal, Syed M, and Graham J Belsham. 2013. "Foot-and-Mouth Disease: Past, Present and Future." *Veterinary Research* 44 (1): 116. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-116>.
- Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–28. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
- Kasza, L., J. A. Shaddock, and G. J. Christofinis. 1972. "Establishment, Viral Susceptibility and Biological Characteristics of a Swine Kidney Cell Line SK-6." *Research in Veterinary Science* 13 (1): 46–51.
- Kitching, R.P. 2002. "Clinical Variation in Foot and Mouth Disease: Cattle: -EN- -FR- -ES-." *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 21 (3): 499–504. <https://doi.org/10.20506/rst.21.3.1343>.
- Knight-Jones, T.J.D., and J. Rushton. 2013. "The Economic Impacts of Foot and Mouth Disease – What Are They, How Big Are They and Where Do They Occur?" *Preventive Veterinary Medicine* 112 (3–4): 161–73. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.07.013>.
- Knowles, N. J, and A. R Samuel. 2003. "Molecular Epidemiology of Foot-and-Mouth Disease Virus." *Virus Research*, Foot-and-Mouth Disease, 91 (1): 65–80. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00260-5).
- Knowles, Nick J., Paul R. Davies, Tina Henry, Vivian O'Donnell, Juan M. Pacheco, and Peter W. Mason. 2001. "Emergence in Asia of Foot-and-Mouth Disease Viruses with Altered Host Range: Characterization of Alterations in the 3A Protein." *Journal of Virology* 75 (3): 1551–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1551-1556.2001>.
- Kopliku, Lela, Anthony Relmy, Aurore Romey, Kamila Gorna, Stephan Zientara, Labib Bakkali-Kassimi, and Sandra Blaise-Boisseau. 2015. "Establishment of Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Infection in MDBK Cells | SpringerLink." *Arch Virol*. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2526-8>.
- Kuburich, Nick A., Petra den Hollander, Jordan T. Pietz, and Sendurai A. Mani. 2022. "Vimentin and Cytokeratin: Good Alone, Bad Together." *Seminars in Cancer Biology* 86 (November): 816–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2021.12.006>.
- Monaghan, Paul, Sarah Gold, Jennifer Simpson, Zhidong Zhang, Paul H. Weinreb, Shelia M. Violette, Soren Alexandersen, and Terry Jackson. 2005. "The Alpha(v)Beta6 Integrin Receptor for Foot-and-Mouth Disease Virus Is Expressed Constitutively on the Epithelial Cells Targeted in Cattle." *The Journal of General Virology* 86 (Pt 10): 2769–80. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81172-0>.



- O'Donnell, V., J. M. Pacheco, Michael Larocco, D. P. Gladue, S. J. Pauszek, G. Smoliga, P. W. Krug, B. Baxt, M. V. Borca, and L. Rodriguez. 2014. "Virus-Host Interactions in Persistently FMDV-Infected Cells Derived from Bovine Pharynx." *Virology* 468–470 (November): 185–96. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.004>.
- O'Donnell, Vivian, Michael Larocco, and Barry Baxt. 2008. "Heparan Sulfate-Binding Foot-and-Mouth Disease Virus Enters Cells via Caveola-Mediated Endocytosis." *Journal of Virology* 82 (18): 9075–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.00732-08>.
- Pfaff, Florian, Sara Häggglund, Martina Zoli, Sandra Blaise-Boisseau, Eve Laloy, Susanne Koethe, Daniela Zühlke, et al. 2019. "Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus." *Viruses* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/v11010053>.
- Pieper, F. R., F. A. Van de Klundert, J. M. Raats, J. B. Henderik, G. Schaart, F. C. Ramaekers, and H. Bloemendal. 1992. "Regulation of Vimentin Expression in Cultured Epithelial Cells." *European Journal of Biochemistry* 210 (2): 509–19. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17449.x>.
- Schley, David, John Ward, and Zhidong Zhang. 2011. "Modelling Foot-and-Mouth Disease Virus Dynamics in Oral Epithelium to Help Identify the Determinants of Lysis." *Bulletin of Mathematical Biology* 73 (7): 1503–28. <https://doi.org/10.1007/s11538-010-9576-6>.
- Stenfeldt, C., J. M. Pacheco, G. R. Smoliga, E. Bishop, S. J. Pauszek, E. J. Hartwig, L. L. Rodriguez, and J. Arzt. 2016. "Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State." *Transboundary and Emerging Diseases* 63 (2): 152–64. <https://doi.org/10.1111/tbed.12235>.
- Stenfeldt, Carolina, and Jonathan Arzt. 2020. "The Carrier Conundrum; A Review of Recent Advances and Persistent Gaps Regarding the Carrier State of Foot-and-Mouth Disease Virus." *Pathogens* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/pathogens9030167>.
- Stenfeldt, Carolina, and Graham J. Belsham. 2012. "Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus RNA in Pharyngeal Epithelium Biopsy Samples Obtained from Infected Cattle: Investigation of Possible Sites of Virus Replication and Persistence." *Veterinary Microbiology* 154 (3): 230–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.007>.
- Stenfeldt, Carolina, Michael Eschbaumer, Steven I. Rekant, Juan M. Pacheco, George R. Smoliga, Ethan J. Hartwig, Luis L. Rodriguez, and Jonathan Arzt. n.d. "The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle." *Journal of Virology* 90 (14): 6344–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.00388-16>.
- Torre, J. C. de la, M. Dávila, F. Sobrino, J. Ortín, and E. Domingo. 1985. "Establishment of Cell Lines Persistently Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus." *Virology* 145 (1): 24–35. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90198-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90198-9).
- "Van Bakkum: Observations on the Carrier State of... - Google Scholar." n.d. Accessed January 19, 2022. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Observations+on+the+carrier+state+of+cattle+exposed+to+foot-and-mouth+disease+virus&author=van+Bakkum+J.+G.&author=Frenkel+H.+S.&author=Frederiks+H.+H.+J.&author=Frenkel+S.&publication+year=1959&journal=Tijdschr.+Diergeneesk.&volume=84.
- Wang, Chun-Chao, Leen Jamal, and Kevin A. Janes. 2012. "Normal Morphogenesis of Epithelial Tissues and Progression of Epithelial Tumors." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 4 (1): 51–78. <https://doi.org/10.1002/wsbm.159>.
- World Organization for Animal Health (OIE). 2021. "Chapter 3.1.8: Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus). Available Online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/Eng/Health_standards/Tahm/3.01.08_FMD.Pdf (Accessed on 11 April 2022)." In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Available online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf.



Yang, Jing, Parker Antin, Geert Berx, Cédric Blanpain, Thomas Brabletz, Marianne Bronner, Kyra Campbell, et al. 2020. "Guidelines and Definitions for Research on Epithelial–Mesenchymal Transition." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (6): 341–52. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>.

Figure legend

Figure 1: Development of a model of primary ovine epithelial cells cultured in multilayers at the air-liquid interface workflow. DSP and PT were collected from sheep. After separating epithelial tissues, the resultant epithelial cells were propagated in monolayers before being cultivated in multilayers at the air-liquid interface on the membrane of collagen-coated inserts. Created with Biorender.com

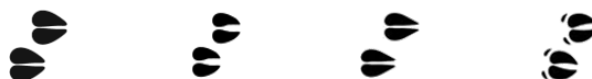
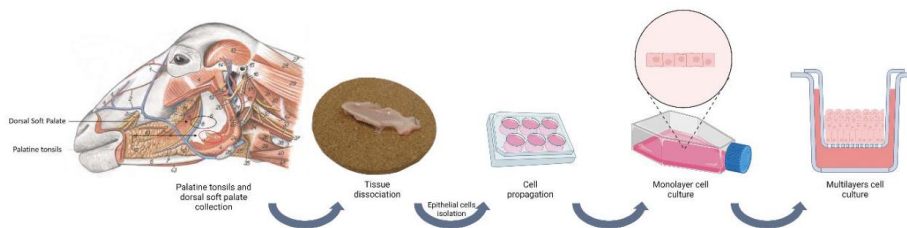


Figure 2: Experimental timeline for monitoring FMDV infection of ovine DSP and PT cultured in monolayers. Ovine DSP and PT cells were propagated in monolayers and were infected with FMDV O C12.2 at MOI 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} or a placebo conditioned medium. Culture supernatants were collected each two or three days during 23 dpi as illustrated above. Analysis were performed on collected supernatants: virus isolation (squares), RT-qPCR (circles) immunofluorescence (triangles). CPE observation were also performed (stars), at indicated days post-infection. Created with Biorender.com

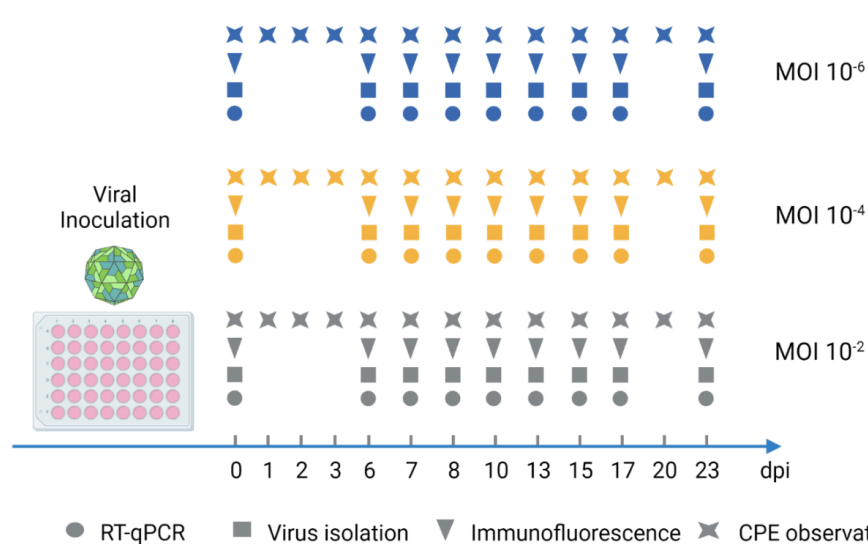


Figure 3: Experimental timeline for monitoring FMDV infection of ovine DSP cultured in multilayers at air-liquid interface. Ovine DSP cells were propagated in multilayers on collagen-coated inserts at the air-liquid interphase and were infected with FMDV O C12.2 at MOI 1, or a placebo conditioned medium. Insert upper supernatants and lower supernatants were collected each two or three days during 35 dpi as illustrated above. Analysis were performed on collected upper supernatants: virus isolation (squares), RT-qPCR (circles) immunofluorescence (triangles). Immunochemistry analysis were performed on fixed inserts (hexagon) and CPE observation were also performed (stars), at indicated days post-infection. Created with Biorender.com

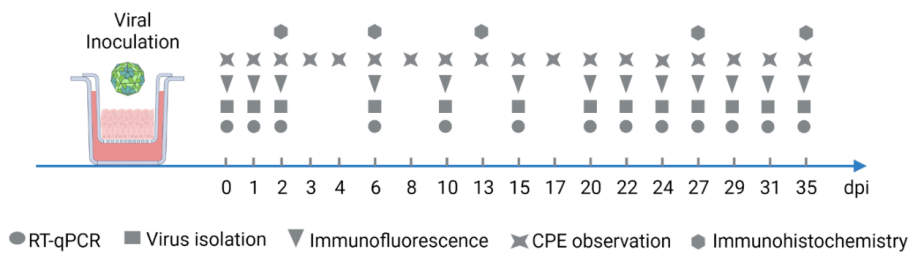


Figure 4: Ovine DSP and PT cells morphological observation. DSP and PT cells were cultured in monolayers and were observed under brightfield microscopy (x100).

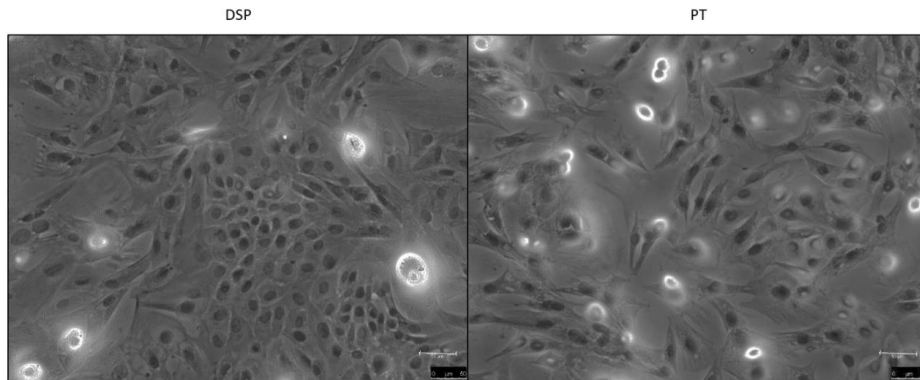
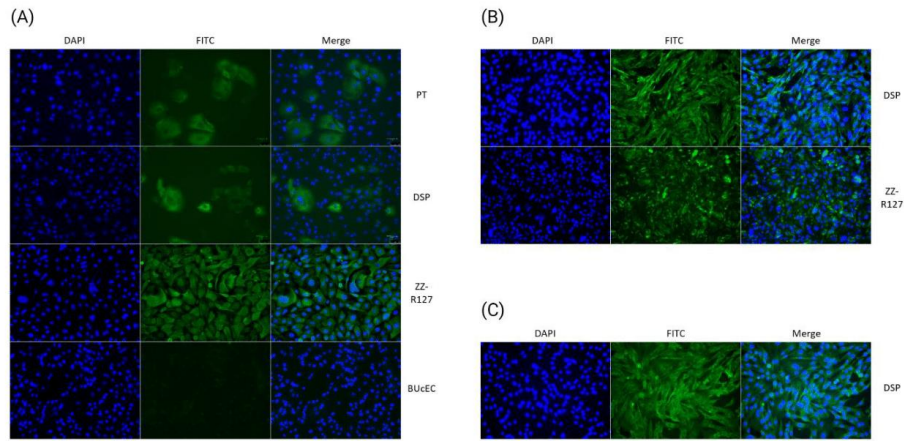


Figure 5: Ovine DSP and PT cells characterisation. DSP and PT were cultured in monolayers on High ibiTreat Ibidi chamber slides and stained with specific antibodies and a secondary Alexa 488 (green). Cell nuclei were stained with DAPI (blue) and cells were visualized by fluorescence microscopy using a DMi8 microscope.





(A) Cytokeratin staining. DSP and PT were cultured in monolayers on High ibiTreat Ibidi chamber slides and stained with specific mouse cytokeratin antibody and a goat anti-mouse Alexa 488 (green). DSP and PT staining were compared to ZZ epithelial cell line known to strongly express cytokeratin and BUcEC endothelial cell line known to not express cytokeratin.

(B) Vimentin staining. DSP were cultured in monolayers on High ibiTreat Ibidi chamber slides and stained with specific mouse vimentin antibody and a goat anti-mouse Alexa 488 (green). DSP staining was compared to ZZ epithelial cell line known to strongly express cytokeratin.

(C) $\alpha 5 \beta 6$ integrin staining. DSP were cultured in monolayers on High ibiTreat Ibidi chamber slides and stained with specific mouse cytokeratin antibody and a goat anti-mouse Alexa 488 (green).



Figure 6: DSP and PT cells CPE observation after FMDV infection. DSP and PT were cultured in monolayers and were infected with FMDV O C12.2 at MOI 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} or a placebo conditioned medium. CPE were visually estimated almost daily during the first two weeks post-infection. **(A)** Evolution of CPE observed at 48 hpi on DSP and PT infected with FMDV O C12.2 at MOI 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} or MOCK. **(B)** Estimated CPE observed during the first seven dpi on DSP E and DSP F infected with FMDV O C12.2 at MOI 10^{-2} , 10^{-4} or 10^{-6} .

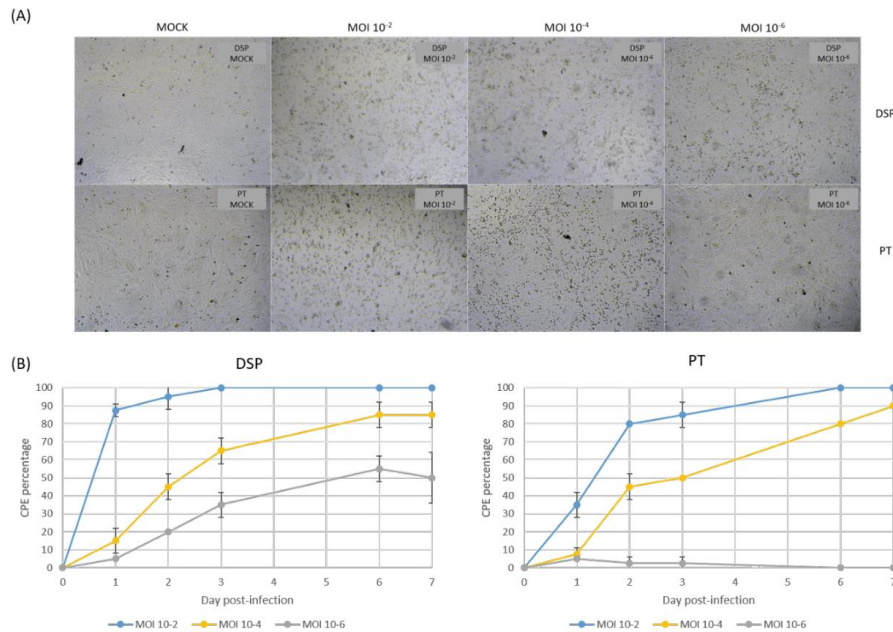


Figure 7: Infectious FMDV detection by viral isolation. DSP and PT were cultured in monolayers and were infected with FMDV O C12.2 at MOI at MOI 10^{-2} (in blue), 10^{-4} (in yellow) or 10^{-6} (in grey) or a placebo conditioned medium. Supernatants were collected each two or three days during 23 dpi. Viral isolation on IBRS-2 sensitive cells were performed using collected supernatants to detect infectious FMDV. CPE on IBRS-2 after an 48 hours incubation with supernatants were visually estimated. The results presented here concerns culture supernatants collected during the first 23 days post-infection.

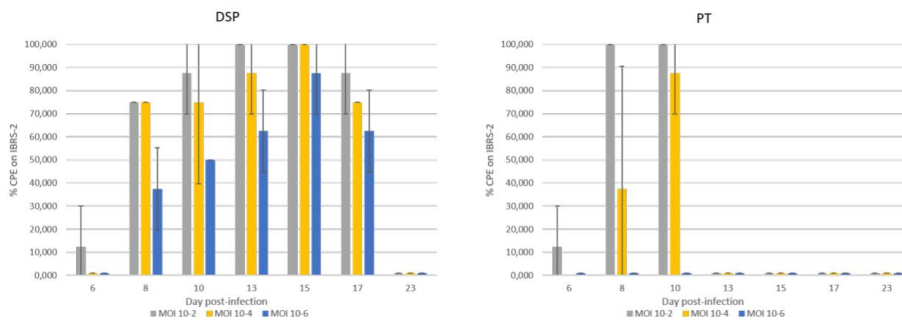


Figure 8: FMDV 3D^{pol} antigen detection by immunofluorescence. DSP and PT were cultured in monolayers and were infected with FMDV O C12.2 at MOI 10⁻² (in blue), 10⁻⁴ (in yellow) or 10⁻⁶ (in grey), or a placebo conditioned medium. Supernatants were collected each two or three days during 23 dpi. IBRS-2 96-well plates used for viral isolation were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with Triton X-100 before being stained with specific mouse 3D^{pol} antibody and a goat anti-mouse Alexa 488 (green). Cell nuclei were stained with DAPI (blue) and cells were visualized by fluorescence microscopy using a DMi8 microscope. Results were arbitrarily classified according to an index ranging from 0 to 3. 0 indicates no fluorescence, 1 a small amount of fluorescent cells, 2 a majority of fluorescent cells and 3 indicates that almost all cells are fluorescent.

(A) Illustration of the index used. (B) Evolution of fluorescence levels estimated after 48h of incubation of IBRS-2 with culture supernatants harvested up to 23 days post-infection. Results presented here are the average of two samples.

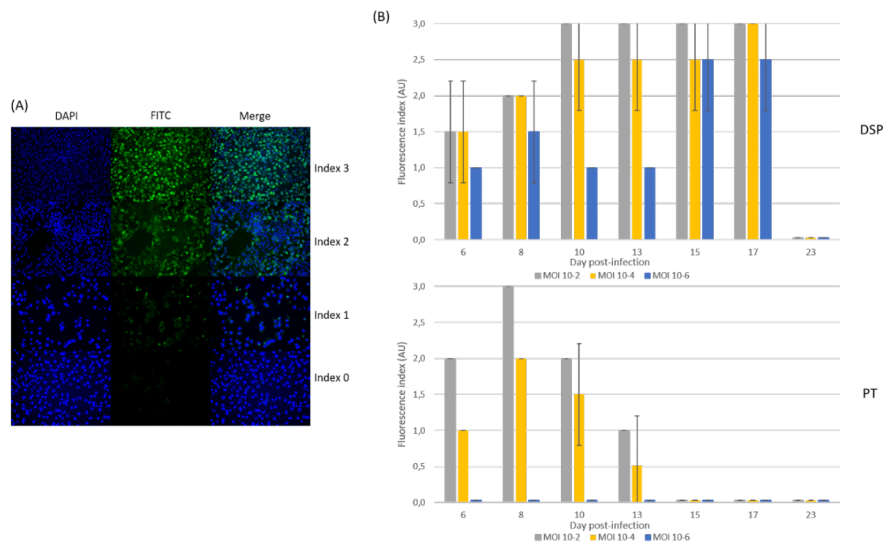


Figure 9: FMDV 3D^{pol} RNA detection by rtRT-PCR. DSP and PT were cultured in monolayers and were infected with FMDV O C12.2 at MOI at MOI 10⁻² (in blue), 10⁻⁴ (in yellow) or 10⁻⁶ (in grey), or a placebo conditioned medium. Supernatants were collected each two or three days during 23 dpi. Duplex rtRT-PCR targeting 3D^{pol} FMDV RNA as well as β -actin housekeeping gene was performed.

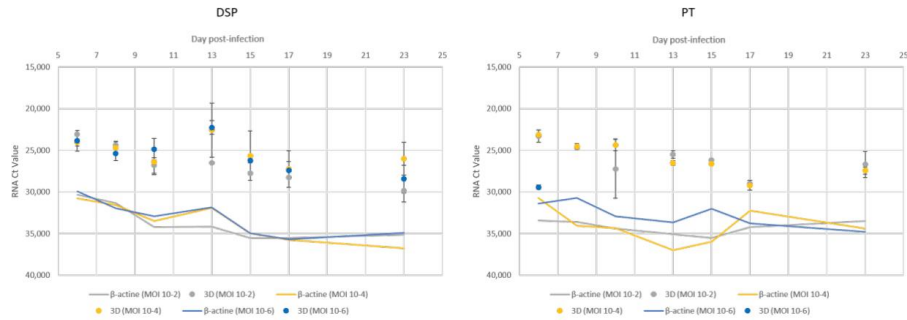


Figure 10: DSP cells multilayers characterisation. DSP were cultured in multilayers at the air-liquid interface during six weeks. Some inserts were sacrificed to evaluate the multilayers depth. To this purpose, inserts were fixed in formalin and ethanol and then stained with HES. Stained inserts were observed by microscopy to estimate the number of cell layers. IHC characterisation of cytokeratin expression in DSP cells cultured in multilayers at the air-liquid interphase.

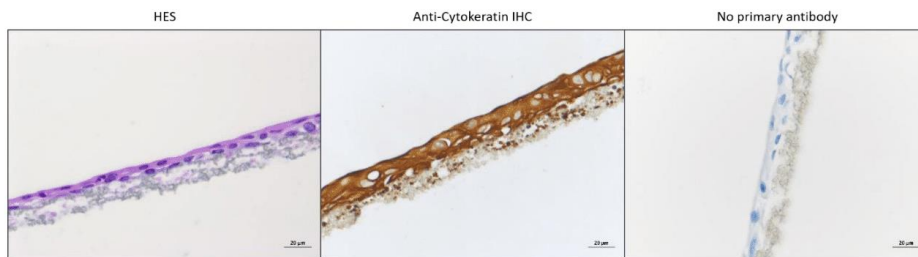


Figure 11: CPE evolution on DSP multilayers. DSP were cultured in multilayers at the air-liquid interface during five weeks before being infected with FMDV O C12.2 at MOI 10⁻⁴, or a placebo conditioned medium. CPE were visually estimated almost daily during 35 dpi. Microscopic CPE observation was captured just before infection, at 24 hpi, 6 dpi, 17 dpi and 29 dpi for infected and MOCK condition.

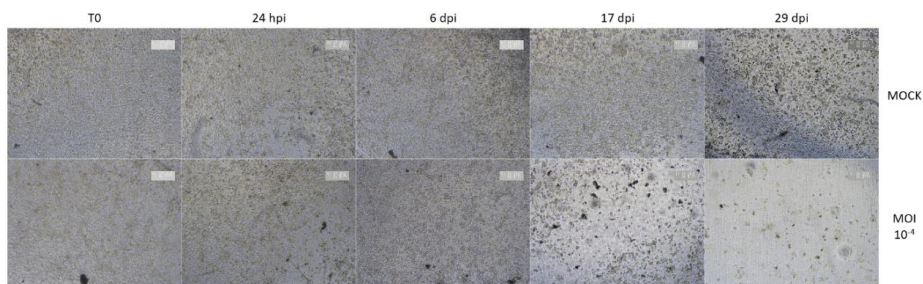


Figure 12: Infectious FMDV detection in infected DSP multilayers supernatants by viral isolation. DSP were cultured in multilayers at the air-liquid interface during five weeks before being infected with FMDV O C12.2 at MOI 10^{-4} , or a placebo conditioned medium. Supernatants were collected each two or three days during 35 dpi. Viral isolation on IBRS-2 sensitive cells were performed using collected supernatants to detect infectious FMDV. CPE on IBRS-2 after a 48 hours incubation with supernatants passaged once in IBRS-2 were visually estimated.

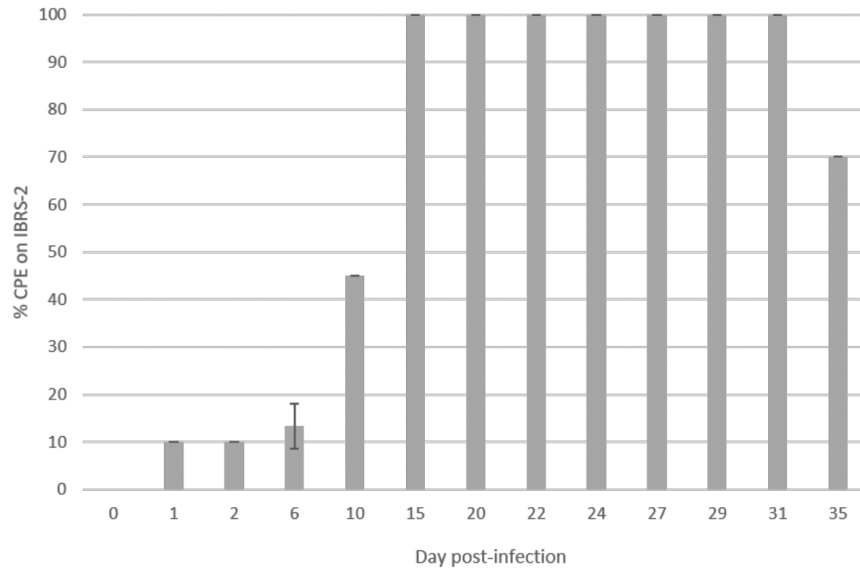


Figure 13: FMDV 3D^{pol} antigen detection in infected DSP multilayers supernatants by immunofluorescence. DSP were cultured in multilayers at the air-liquid interface during five weeks before being infected with FMDV O C12.2 at MOI 10⁻⁴, or a placebo conditioned medium. Supernatants were collected each two or three days during 35 dpi. IBRS-2 96-well plates used for viral isolation were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with Triton X-100 before being stained with specific mouse 3D^{pol} antibody and a goat anti-mouse Alexa 488). Cell nuclei were stained with DAPI and cells were visualized by fluorescence microscopy using a DMi8 microscope. Results were arbitrarily classified according to an index ranging from 0 to 3. 0 indicates no fluorescence, 1 a small amount of fluorescent cells, 2 a majority of fluorescent cells and 3 indicates that almost all cells are fluorescent (see figure 9 for index details). Here is presented the evolution of fluorescence levels estimated after 48h of incubation of IBRS-2 with culture supernatants harvested up to 11 days post-infection. Results presented here are the average of two samples.

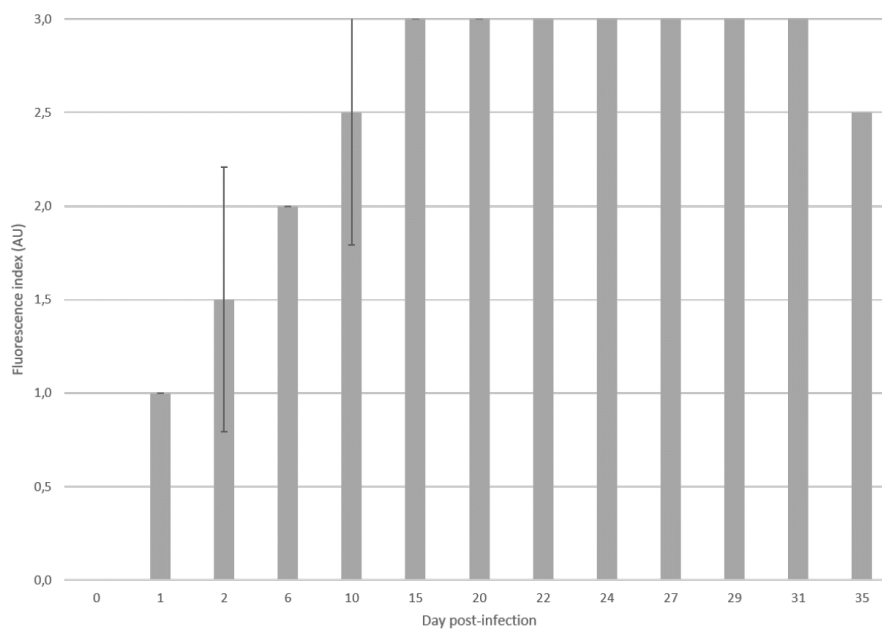
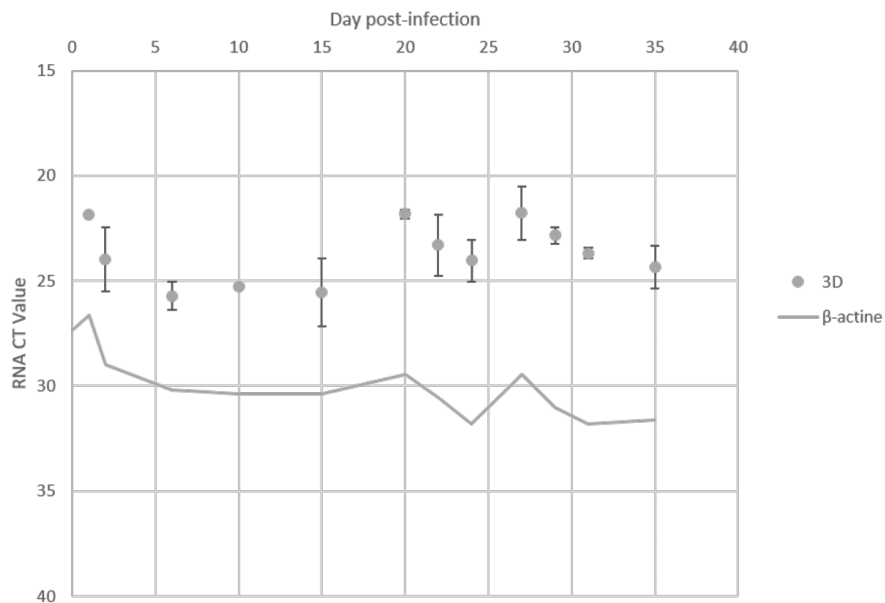


Figure 14: FMDV 3D^{pol} RNA detection in infected DSP multilayers supernatants by rtRT-PCR. DSP were cultured in multilayers at the air-liquid interface during five weeks before being infected with FMDV O C12.2 at MOI 10⁻⁴, or a placebo conditioned medium. Supernatants were collected each two or three days during 35 dpi. rtRT-PCR targeting 3D^{pol} FMDV RNA as well as β -actin housekeeping gene was performed. The results presented here concerns 3D^{pol} and β -actin results from culture supernatants collected during the experiment.



Conflict of Interest

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

Funding

This original study work was funded by ANSES animal health laboratory's own funds as well as the by Alfort Veterinary School (EpithelOv project grant 2019).

Acknowledgments

Thanks to Santina Grazioli and Emilian Brocchi for providing 3F12 antibody.



Discussion et perspectives de la partie II

Conformément aux objectifs fixés concernant cette seconde partie, des modèles *in vitro* adaptés à l'étude du FMDV et inspirés du modèle bovin déjà établi ont pu être développés à partir de cellules primaires porcines et ovines provenant de tissus *ad hoc* : un modèle cellulaire ovin impliquant des cellules épithéliales issues des sites de réplication primaire et de persistance du FMDV, à savoir le palais mou dorsal et les amygdales palatines (196). De même, un modèle porcin, basé sur des cellules épithéliales du palais mou dorsal, un des sites de réplication primaire du virus chez le porc a ainsi pu être obtenu (196,223). En revanche, cela n'a pas été le cas pour les cellules issues des amygdales oropharyngées qui n'ont pas pu être maintenues en culture. Comme évoqué dans la discussion de l'article concernant le développement du modèle cellulaire porcin, au regard du très peu de données actuellement disponibles dans la littérature et du caractère lacunaire de certains matériels et méthodes publiés, il n'a pas été possible pour nous de déterminer le facteur manquant à l'adhésion et au développement de ces cellules. La taille des amygdales étant bien supérieure à celle du palais mou dorsal chez le porc, il semblerait que le nombre de cellules récoltées ne soit pas la cause de cet échec. Il est toutefois possible que la proportion de cellules épithéliales dans les tissus prélevés soit plus faible qu'au niveau du palais mou dorsal et pourrait contribuer à expliquer les difficultés rencontrées lors de la mise en culture de ces cellules. De manière intéressante, de telles différences de comportement des cellules lors de la mise en culture n'avaient pas été relevées lors de l'établissement des modèles cellulaires ovins puisque les cellules issues du palais mou dorsal et des amygdales palatines se sont comportées de façon similaire. Les amygdales oropharyngées, en particulier les cryptes présentes dans ces amygdales, étant considérées comme le site de réplication primaire le plus important chez le porc, il paraît ainsi important de réaliser de nouveaux prélèvements, à partir d'un nombre plus



important de porcs afin de pouvoir tester une plus grande diversité de milieux de culture. L'utilisation de matériel dédié au suivi de culture cellulaire tels qu'un analyseur automatisé permettant de mesurer la concentration en substrats, métabolites et électrolytes dans le milieu, ou un automate d'analyse en temps réel du comportement cellulaire, pourrait grandement participer à l'évaluation des milieux de culture et à la détermination des facteurs nécessaires au bon développement de ces cellules (472,473). Cependant, ce type d'appareils plutôt adaptés à des applications industrielles sont extrêmement onéreux.

De telles analyses pourraient également se révéler extrêmement utiles pour les cellules porcines et ovines mises en culture dont la vitesse de développement assez réduite constitue un frein à leur utilisation pour le diagnostic d'urgence de la fièvre aphteuse. Les modèles cellulaires développés avec succès dans le cadre de cette seconde partie ont permis l'étude de l'infection par le FMDV en systèmes monocouches et multicouches. L'infection du modèle porcine a notamment conduit à une absence de détection de virus infectieux après plus de dix-sept jours post-infection, soit onze jours avant la limite à partir de laquelle la persistance du FMDV est définie. Cette absence de signe de persistance du virus est totalement cohérente avec ce qui a été décrit *in vivo* par Stenfeldt *et al.* (226). Alors que des ARN viraux ont pu être détectés pendant plus de soixante jours *in vivo*, nous avons également détecté des ARN viraux à long terme suite à l'infection en monocouches mais pas lors de l'infection du système en multicouches. En ce qui concerne les modèles ovins, nous avons pu révéler la présence de virus infectieux jusqu'à la fin du suivi pour les cellules DSP infectées en monocouches et en multicouches, signe d'une potentielle persistance virale, cohérente avec ce qui est décrit *in vivo* chez cette espèce (196). Toutefois, au contraire de ce qui a été observé lors de l'infection du modèle bovin développé par Hägglund *et al.* les cellules ovines ne sont pas parvenues à reformer un tapis cellulaire au cours du temps,



rendant plus discutable la légitimité de ce modèle pour l'étude de l'infection persistante par le FMDV (289). La reproduction de cette expérience à partir du prélèvement de cellules provenant de nouveaux moutons pourrait permettre de vérifier s'il s'agit d'un phénomène lié au modèle ovin ou simplement associé aux cellules utilisées. L'infection des cellules PT en monocouches n'a de son côté pas permis de mettre en évidence de virus infectieux au-delà de dix jours post-infection. Les différences observées entre le modèle DSP bovin et le modèle DSP ovin pourraient partiellement être expliquées par la difficulté d'obtention de réelles multicouches de cellules ovines. En effet, bien que les structures formées par les cellules bovines sont moins profondes que les épithéliums naturels, elles restent légèrement plus importantes que celles formées par les cellules ovines qui consistent principalement en une mono- ou bicouche agrémentée d'amas irréguliers de cellules (474).

La réalisation de nouveaux essais de culture de cellules en multicouches à l'interface air-liquide sera conditionnée à l'utilisation d'une nouvelle référence d'inserts. Ainsi, la référence *Corning® Transwell®-COL collagen-coated PTFE membrane inserts with 3.0 µm pores (Sigma-Aldrich, CLS3494)* utilisée pour le développement des modèles bovins et ovins n'est actuellement plus commercialisée. Alors qu'une nouvelle référence *12 mm diameter coated inserts, 1.0 µm pores (cellQART® 12-Well Insert 1.0 µm PET clear, SABEU)* a été utilisée pour la mise en culture des multicouches de cellules porcines, il s'est avéré que ces inserts, ne donnaient pas pleine satisfaction puisque la réalisation de coupes nécessaires aux analyses d'immunohistochimie est extrêmement complexe. Ceci peut notamment être expliqué par l'absence de collagène sur la membrane de ces inserts, composés uniquement de Polytéraphalate d'éthylène. Une nouvelle référence (*12-mm diameter, 0.45-µm pore size; Costar*), notamment utilisée pour mimer une barrière épithéliale à partir de cellules humaines Caco-2, est actuellement testée avec les cellules DSP bovines et porcines (475). Malgré l'opacité de



ces inserts rendant impossible l'observation des cellules par microscopie inversée, il s'agit ici de s'assurer que les inserts permettent le développement des monocouches de cellules, que les pores ne soient pas trop larges pour ne pas laisser passer les cellules au fond du puits, mais pas trop étroits pour permettre de nourrir les cellules par le dessous, que la membrane supporte de se trouver à l'interface air-liquide et permette le développement des multicouches de cellules, que les inserts soient utilisables lors de l'infection par le FMDV et qu'ils puissent être fixés, inclus en paraffine, puis sectionnés au microtome afin de réaliser les lames à analyser en immunohistochimie.

Nous disposons maintenant de modèles *in vitro* permettant l'étude du FMDV chez le bovin et l'ovin, espèces susceptibles d'être infectées de manière persistante, et chez le porc, espèce considérée comme non sujette à l'infection persistante par ce virus (195,196,226). Parmi les espèces étudiées dans le cadre de ces travaux de thèse, seul le caprin, animal également susceptible d'être infecté de manière persistante par le FMDV, n'a pas fait l'objet d'un modèle d'étude *in vitro*. Le développement d'un modèle cellulaire similaire à ce qui a été réalisé pour les autres espèces d'intérêt pourrait permettre de compléter les modèles déjà à disposition et de réaliser des infections comparées des différentes populations cellulaires. L'établissement d'un modèle caprin ne constitue toutefois pas une priorité puisque les petits ruminants que sont les ovins et les caprins sont considérés comme peu différents au regard de l'infection par le FMDV. Ainsi, la physiopathologie du virus chez ces deux espèces est hautement similaire, et les principaux sites de réplication primaire et de persistance sont conservés (196,219). De plus, nous disposons déjà au laboratoire d'une lignée cellulaire issue d'épithélium de langue de chèvre sensibles au FMDV, permettant l'étude de l'infection chez cette espèce (419).



Pour l'heure, il semble ainsi plus important de poursuivre les travaux menés sur les modèles déjà mis en place. L'immortalisation des cellules primaires mises en culture, en vue de développer des lignées cellulaires apparaît notamment comme une étape importante. Il existe une multitude de méthodes permettant l'immortalisation de lignées cellulaires, telles que la transfection des cellules avec un gène d'immortalisation, suppresseur de tumeur ou affectant l'activité télomérase, l'infection des cellules par un virus oncogène, ou encore l'utilisation d'agents mutagènes permettant le blocage du cycle cellulaire (476–480). L'utilisation de ces techniques montre cependant certaines limites telles des modifications importantes du phénotype cellulaire par rapport à celui des cellules primaires, ou encore des contraintes d'application à certains types cellulaires particuliers (481). Afin de pallier les problèmes les plus couramment rencontrés lors du processus d'immortalisation de cellules primaires, la société Inscreenex a mis au point une méthode basée sur l'utilisation d'une librairie de trente-trois gènes d'immortalisation délivrés dans les cellules par des vecteurs lentivirus et permettant de sélectionner le cocktail de gènes le mieux adapté au type cellulaire en question, tout en préservant le phénotype initial (482). Cette méthode a notamment été appliquée avec succès à de nombreuses populations cellulaires d'intérêt en recherche vétérinaire provenant de neuf espèces animales. L'immortalisation des cellules primaires développées au laboratoire nécessitant un investissement non négligeable, il semble important de poursuivre les investigations relatives à la caractérisation des cellules, en ce qui concerne leur nature épithéliale. A l'image de ce qui a été fait pour les DSP bovines, l'observation des jonctions serrées des cellules porcines et ovines par microscopie électronique pourrait grandement contribuer à attester de leur caractère épithélial. La recherche d'autres marqueurs telles que la cadhérine E peut également être envisagée.



L'expression de la cytokératine qui tend à diminuer au cours des passages au contraire de l'expression en vimentine, sont des signes d'une potentielle transition épithélio-mésenchymateuse (443,483). Afin de conserver le mieux possible le phénotype initial des cellules il pourrait ainsi se révéler pertinent de limiter l'apparition de ce phénomène réversible en traitant les cellules afin de réguler les facteurs de transcription impliqués dans ce processus (441).

En attendant d'avoir l'opportunité d'immortaliser les populations cellulaires mises en culture, il serait très intéressant de réaliser de nouvelles expériences d'infection en multicouches à l'interface air-liquide afin de caractériser les réponses transcriptionnelles des cellules porcines et ovines à l'infection par le FMDV et de comparer les résultats à ceux déjà obtenus pour les cellules DSP bovines (288). Les différences ou similitudes concernant les gènes stimulés ou inhibés suite à l'infection pourraient participer à une meilleure compréhension de la persistance différentielle du virus. De manière plus générale, l'étude comparée des modèles bovin, ovin, et porcin représente un potentiel levier d'amélioration des connaissances sur le comportement du virus, la réponse de l'hôte, ainsi que les interactions virus-hôte établies lors de l'infection aiguë et persistante par le FMDV.

Les modèles cellulaires sensibles au FMDV développés dans cette partie des travaux de thèse constituent ainsi des outils pertinents et prometteurs pour l'étude en contexte infectieux des interactions protéine-protéine mises en évidence dans la première partie.



III. Validation fonctionnelle des interactions protéine-protéine en contexte infectieux dans des cellules d'intérêt

Introduction de la partie III

Alors que plusieurs centaines d'interactions entre les protéines du FMDV et les protéines impliquées dans la réponse cellulaire à l'infection, notamment au niveau de la voie IFN, des mécanismes de l'autophagie et de l'apoptose, ont été décrites dans la littérature, il est possible de se questionner quant à leur importance biologique, voire leur existence réelle lors d'une infection (42,62,86). En effet, comme discuté dans la première partie de ce manuscrit, une majorité de ces interactions a été mise en évidence dans des modèles d'étude peu pertinents au regard de la physiopathologie du FMDV, quasi-exclusivement en conditions non infectieuses et impliquant une surexpression des protéines étudiées (42) (*cf.* Immunité innée). Dans le cas des interactions entre la 3D^{pol} et les protéines de la voie IFN de type I mises en lumière par approche Nanoluciférase et GST pull-down, leur existence potentielle a été confortée par la démonstration, à travers des essais rapporteurs luciférase, de l'effet inhibiteur de cette protéine virale sur la phase d'induction de la réponse IFN de type I. Bien que le possible rôle de la 3D^{pol} dans la subversion de la réponse cellulaire antivirale ait été renforcé par ces essais rapporteurs, il n'en reste pas moins qu'aucune certitude n'a été rapportée quant à l'existence en contexte infectieux des interactions protéiques identifiées précédemment. Afin de lever le doute entourant la réalité de ces interactions, il convient de les rechercher lors de l'infection de cellules sensibles au FMDV. Le recours à des études *in vivo* pour détecter des interactions protéiques n'étant absolument pas envisageable pour des raisons éthiques et financières, ces investigations doivent être menées dans des modèles *in vitro* pertinents au regard de la physiopathologie du FMDV tels que les modèles de cellules primaires bovines, ovines



et porcines, ainsi que la lignée cellulaire caprine ZZ-R127 dont nous disposons au laboratoire. Ces investigations nécessitent également de disposer d'outils d'analyse adaptés aux différentes espèces ciblées, en particulier des anticorps dirigés contre les protéines de la voie IFN de type I identifiées comme interagissant avec la 3D^{pol}. Si nous disposons d'anticorps spécifiques de certaines protéines du FMDV dont la 3D^{pol} ce n'est pas le cas pour les interacteurs protéiques cellulaires bovines, ovines, caprines et porcines.

L'objectif de cette partie a donc été, dans un premier temps, d'identifier et/ou de produire des réactifs d'immunodétection permettant de reconnaître les protéines cellulaires d'intérêt provenant des quatre espèces d'étude. Cette partie a fait l'objet d'un stage de 1^{ère} année de BTS. Dans un second temps, l'objectif a été de se servir de ces anticorps afin de mettre en place une méthode d'immunoprécipitation permettant la validation fonctionnelle des interactions protéine-protéine en contexte infectieux. Cette partie a fait l'objet d'un stage de 2^{ème} année de BTS.

Matériels et Méthodes

Virus

Le clone 2.2 du virus de la fièvre aphteuse O/FRA/1/2001 (GenBank : OV121130.1) utilisé dans cette étude est un clone viral dérivé de la souche O/FRA/1/2001, purifié deux fois sur plages de lyse, puis propagé en cellules BHK-21 (285). Les productions virales ont été titrées sur des monocouches de BHK-21 comme décrit dans Koplaku *et al.* 2015 (285). Le titre viral mesuré est égal à $1,4 \cdot 10^6$ PFU par ml.

Cellules

Des cellules rénales embryonnaires humaines (HEK-293T) ont été cultivées à 37°C et sous 5% de CO₂ dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) +



GlutaMAX™ (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF, Eurobio Scientific), 1% de pénicilline–streptomycine (Gibco) et 1% de sodium pyruvate (Gibco).

Des cellules épithéliales de langue de chèvre ZZ-R127, ainsi que des cellules primaires DSP bovines et ovines ont été entretenues à 37°C et sous 5% de CO₂ en milieu DMEM High glucose W/L-GLU W/O PY (Eurobio) complété avec 10% de SVF, 2% d'HEPES (BioWhittaker), 1% de L-glutamine (BioWhittaker), 1% de pénicilline–streptomycine et 0,2% de gentamicine (Sigma-Aldrich).

Des cellules rénales bovines (BSR) ont été cultivées à 37°C et sous 5% de CO₂ dans du milieu DMEM + GlutaMAX™ supplémenté de 10% de SVF, 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco) et 1% de sodium pyruvate.

Obtention de vecteurs d'expression par clonage Gateway®.

Les vecteurs d'expression pCi-Neo-3xFlag correspondant aux protéines cellulaires impliquées dans la voie IFN de type I (IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MAVS, MDA5, NEMO, RIG-I, STAT2 et TRAF3) ont été produits par clonage Gateway® à partir des séquences codantes bovines, ovines, caprines et porcines, comme détaillé dans la partie I (*cf.* Construction des banques de vecteurs)

De la même façon, la séquence codant la protéine MAVS bovine a été transférée dans un vecteur d'expression pVote2, adapté à l'expression de protéines en système vaccinal (484).

Expression de protéines d'intérêt en cellules de mammifères

Des cellules HEK293T ou ZZ-R127 ont étéensemencées vingt-quatre heures avant la transfection respectivement à raison de 400 000 et 600 000 cellules par puits dans des plaques six puits à fond plat. Après 24 h, les cellules ont été transfectées par ajout de 0,5, 1 ou 2 μ g du plasmide d'expression correspondant à la protéine d'intérêt ; 1, 2, 3, 4 ou 6 μ l de lipofectant JetPRIME® (Polyplus), dilué dans 300 μ l de tampon



JetPRIME® par puits. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été lysées afin de préparer des lysats protéiques à analyser par Western-Blot.

Préparation de lysats protéiques

Des cellules HEK293T, ZZ, DSP bovines et DSP ovines ont étéensemencées en plaques six puits, respectivement à 400 000 HEK293T par puits ou 600 000 cellules pour les autres types cellulaires. Après 48 h, le milieu de culture a été retiré et le tapis cellulaire a été rincé deux fois au PBS 1X (Gibco).

Le tapis cellulaire a ensuite été lysé par ajout de 310 µl de tampon NP40 Cell lysis buffer (Thermo Scientific), puis incubation de 30 minutes sur glace. Toutes les 10 minutes, la plaque a été placée sous agitation pendant une minute à 250 rpm pour faciliter le décollement des cellules. Après 30 minutes d'incubation, le fond du puits a été délicatement gratté à l'aide d'un *cell scraper* (Dutscher). Le contenu des puits a été collecté dans des microtubes Eppendorf, avant d'être centrifugé pendant 10 minutes à 12000 x g à 4°C. Les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes puis dilués au demi dans du bleu de dépôt 2X (NuPage Blue, Life Technologies) et conservés à -80°C.

Activation de la réponse antivirale par traitement au poly-IC

Des cellules ZZ-R127, DSP bovines et DSP ovines ont étéensemencées en plaques six puits à raison de 600 000 cellules par puits, puis cultivées dans les conditions présentées précédemment. Après 24 h, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais additionné d'acide polyinosinique-polycitydylique (poly-IC, Sigma-Aldrich), à raison de 0,5 ou 1 µl/puits.

Cinétique d'infection par le FMDV

Des cellules ZZ-R127 et DSP bovines ont étéensemencées à raison de 800 000 cellules par puits en plaques six puits. Après 24 h, ces cellules ont été infectées par le FMDV



O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 ou 0,01 ou du milieu conditionné de cellules BHK-21 (MOCK) dilué de la même façon que le virus, en milieu DMEM High glucose. L'infection des ZZ-R127 à la MOI 0,1 a été suivie pendant 6h30 post-infection. Entre 2 h et 6h30, un lysat protéique et une extraction d'ARN ont été réalisés toutes les trente minutes afin de réaliser une étude cinétique de l'infection. De manière similaire, l'infection des DSP bovines à la MOI 0,1 a été suivie toutes les 30 minutes entre 3 h et 7 h post-infection. Un point de cinétique plus tardif, à 9 h post-infection a également été réalisé. L'infection des DSP bovines à la MOI 0,01 a fait l'objet d'un lysat protéique et d'une extraction d'ARN toutes les trois heures entre 3 h et 12 h post-infection.

Les lysats protéiques ont ensuite été utilisés pour la recherche de protéine virale 3D^{pol} et de protéines cellulaires impliquées dans la réponse IFN de type I. Les ARN extraits ont servi à la réalisation de rtRT-PCR permettant d'évaluer l'activation de la réponse IFN de type I dans les cellules infectées.

Extraction d'ARN

Les extractions d'ARN ont été réalisées à l'aide du kit RNeasy Mini kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur.

Suivi de l'activation de la réponse interféron de type I par rtRT-PCR

L'activation de la réponse antivirale dans les cellules ZZ-R127 a été évaluée par rtRT-PCR dirigée contre les gènes MX-1 et OAS. L'activation de la réponse antivirale dans les cellules DSP bovines a été évaluée par rtRT-PCR dirigée contre les gènes MX-1, PKR, OAS et IFN- β en utilisant les amorces décrites par O'Donnell *et al.* (286). Un gène de ménage β -actine a été suivi afin de pouvoir normaliser l'expression relative pour les différentes cibles. Dans le cas des cinétiques d'infection, la région 3D^{pol} a également été ciblée afin de s'assurer de la présence d'ARN viral.

Toutes les rtRT-PCR ont été réalisées en simplex, en utilisant le kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Applied Biosystems) dans un volume final de 25 μ L. Pour chaque PCR,



12,5 μL de tampon 2X, 1 μL de mélange d'enzymes RT-PCR 25X selon les recommandations des fournisseurs et chaque amorce et sonde TaqMan à 0,2 μM ont été mélangés à 5 μL d'échantillon d'ARN. Les amplifications PCR ont été réalisées avec un instrument QuantStudio™5 Real-Time PCR (Life Technologies) avec le programme suivant : 10 min à 45°C, 10 min à 95°C suivi de 45 cycles composés de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. Les résultats ont été analysés avec le logiciel *QuantStudio Design & Analysis v1.5.1* (Thermo Fisher Scientific).

Immunodétection par Western-Blot

Les lysats ainsi obtenus ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'une immunodétection par Western- Blot. Pour ce faire, 30 μL de ces échantillons et 4 μL de ladder Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, Hercules) ont été déposés sur un gel de polyacrylamide Bolt Gradient 4-12% Bis-Tris Plus (Life Technologies). La séparation des protéines a été effectuée pendant 10 min à 120 V puis 40 min à 180 V dans du tampon Bolt Running Buffer (Life Technologies) dilué au 1/20 dans de l'eau distillée. Une fois la migration terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Life Technologies) par transfert liquide pendant 1 h à 30 V dans du tampon Bolt Transfer Buffer (Life Technologies) dilué au 1/20 dans de l'eau distillée avec 20% d'éthanol (Euromedex) et 0,1% d'antioxydant (Life). Les membranes de nitrocellulose ont ensuite été saturées par incubation pendant 30 min dans une solution de lait à 5% (Regilait) dilué dans du PBS-Tween.

Les membranes ont été incubées sur la nuit en présence d'anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt :

- anticorps monoclonal anti-Flag produit chez la souris et conjugué à la peroxydase de raifort (HRP, pour *Horseradish Peroxidase*) (Sigma-Aldrich), utilisé au 1/10 000,
- anticorps monoclonal 3F12 anti-3D^{pol} produit chez la souris (fourni par les Dr Emiliana Brocchi et Dr Santina Grazioli, Izsler Istituto, Italie), utilisé au 1/500,



- anticorps polyclonal anti-IKK α produit chez le lapin (A2062, ABclonal), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-IKK ϵ produit chez le lapin (A0244, ABclonal), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-IRF3 produit chez le lapin (DF6895, Affinity Bioscience), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-IRF7 produit chez le lapin (A0159, ABclonal), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-MAVS produit chez le lapin (A5764, Affinity Bioscience), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-NEMO produit chez le lapin (A0917, ABclonal), utilisé au 1/2500,
- anticorps polyclonal anti-MDA5 produit chez le lapin (DF6926, Affinity Bioscience), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-RIG-I produit chez le lapin (DF6107, Affinity Bioscience), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-STAT2 produit chez le lapin (A14995, ABclonal), utilisé au 1/1000,
- anticorps polyclonal anti-TRAF3 produit chez le lapin (AF5380, Affinity Bioscience), utilisé au 1/1000.

Après incubation, les membranes ont été lavées 3 fois pendant 5 minutes dans un tampon PBS-Tween. Elles ont ensuite été incubées pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé HRP (Sigma-Aldrich) utilisé au 1/5000. Les membranes ont été lavées à nouveau 3 fois pendant 5 min dans du tampon PBS-Tween. La révélation a été réalisée à l'aide du kit Clarity Western ECL (Bio-Rad) à raison de 3 ml de solution par membrane. Les membranes



ont été lues à l'aide d'un appareil ChemiDoc (Bio-Rad). L'acquisition par chimioluminescence a permis de révéler les bandes associées aux anticorps, tandis que l'acquisition colorimétrique a été utilisée pour révéler le marqueur de taille.

Obtention d'un virus MVA recombinant

Le *Modified vaccinia virus Ankara* (MVA) codant pour l'ARN polymérase du bactériophage T7 (MVA-T7green) (exprimant l'ARN polymérase T7 inductible à l'IPTG) dérive du MVA-EM24 par l'insertion du gène codant pour l'eGFP, sous le contrôle d'un promoteur synthétique précoce/tardif, d'une cassette *gyrB*-PKR dans le locus de l'hémagglutinine de MVA, ainsi que d'un gène codant pour la protéine mCherry sous le contrôle du même promoteur (485,486).

Les cellules BSR ont été infectées par le MVA-T7green à la MOI 3. Une heure plus tard, elles ont été transfectées avec le plasmide pVote2-MAVS à l'aide du lipofectant JetPRIME® selon les instructions du fabricant, puis incubées sur la nuit.

Les cellules ont été lysées et les lysats ont été testés par Western blot en utilisant un anticorps anti-Flag permettant la détection de la protéine d'intérêt.

Afin de produire le virus recombinant MVA-T7green-MAVS, les cellules BSR ont été infectées par le MVA-T7green à une MOI de 0,05, transfectées avec le pVote2-MAVS et incubées à 37°C pendant 2 à 3 jours. Les recombinants MVA-T7green-MAVS ont ensuite été obtenus par sélection basée sur le gène *gpt*, suivie de deux séries successives de contre-sélection à la coumermicine (486,487).

Titrage viral et clonage par dilution limite

Des dilutions de dix en dix du recombinant sélectionné ont été utilisées pour infecter des cellules BSR, à raison de 100 µl par puits en plaque quatre-vingt-seize puits. Après trois jours d'incubation, l'infection virale a été observée par lecture de la fluorescence verte associée aux virus recombinants. Le titre viral a été exprimé en dose infectieuse lysant 50% du tapis cellulaire (TCID₅₀, pour 50% *tissue culture infective dose*) d'après



la table de Bornarel et Stellmann, puis converti en PFU/ml (488). A partir de ce titrage, une cupule à la dernière dilution présentant une fluorescence a été récolté afin d'obtenir un virus cloné par dilution limite.

Expression et purification de la protéine d'intérêt

Des cellules BSR ont étéensemencées à raison de 1.10^7 cellules en T75 puis infectées par le virus recombinant MVA-T7green-MAVS sélectionné à une MOI de 3. Après 1 h, 15 ml de milieu de culture, complété par 10mM d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), ont été ajoutés. Après 24 h, le milieu de culture a été retiré. Le tapis cellulaire a été lavé deux fois au PBS, puis 1 ml de PBS contenant des anti-protéases (Cocktail d'inhibiteurs de protéase sans EDTA, Roche) a été ajouté. Les cellules BSR infectées ont été décollées en utilisant un *cell scraper*, puis récoltées dans un microtube Eppendorf de 2 ml avant d'être congelées à -20°C jusqu'à la réalisation du protocole de purification de la protéine d'intérêt.

Après décongélation, le lysat cellulaire a été agité au vortex et centrifugé à $10\ 000 \times g$ pendant 10 minutes à 4°C . Le surnageant a été récupéré et ajouté à 20 μL de billes englobées de gel d'affinité anti-Flag M2-Agarose provenant d'un kit d'immunoprécipitation Flag (Sigma) en suivant les recommandations du fabricant. La protéine recombinante capturée par la résine a ensuite été éluée, en présence de peptides Flag 3X à une concentration de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, soit trois fois supérieure à celle recommandée par le fournisseur. Une fraction de l'éluion a été analysée par SDS-PAGE afin de confirmer la présence de la protéine recombinante par Western-Blot basé sur l'utilisation d'un anticorps anti-Flag et, pour estimer sa pureté, par une coloration au Bleu de Coomassie.

Détermination des conditions optimales de couplage anticorps 3F12-Dynabeads™ Protein G



Afin d'optimiser l'étape de couplage covalent des anticorps 3F12 sur les Dynabeads™ Protein G (Invitrogen) utilisées dans le cadre des expériences d'immunoprécipitation en contexte infectieux, une gamme de dilution de l'anticorps allant de 1/10 à 1/200 a été testée. Les Dynabeads™ Protein G ont ainsi été préparées selon les recommandations du fournisseur, puis incubées sur un agitateur rotatif 30 min ou 1 h en présence d'anticorps 3F12 anti-3Dpol. Après avoir été lavées, les billes ont été incubées pendant 1 h avec un anticorps polyclonal secondaire anti-IgG de souris (H+L) couplé à l'HRP (Thermo Scientific) dilué au 1/5000. La révélation a été réalisée par ajout de substrat chromogène TétraméthylBenzidine (TMB, Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur. Après ajout de solution stop (Applied Biosystems) préalablement stabilisée à température ambiante, la densité optique associée à chacune des conditions testées a été mesurée à 450 nm en utilisant un spectrophotomètre Glomax (Promega).

Immunoprécipitation à l'aide du kit Dynabeads™ Protein G

Des cellules ZZ-R127 et DSP bovines ont étéensemencées en plaques six puits, et infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 comme détaillé précédemment. Entre 3 h et 5 h post-infection, des lysats protéiques ont été préparés comme détaillé précédemment. Les Dynabeads™ Protein G ont ainsi été préparées selon les recommandations du fournisseur, puis incubées sur un agitateur rotatif pendant 30 min en présence d'anticorps 3F12 anti-3D^{pol} dilué au 1/10. Après avoir été lavées selon les recommandations du fournisseur, les billes liées aux anticorps ont été incubées en présence de 250 µl de lysat protéique. L'immunoprécipitation de l'antigène a été réalisée à vitesse lente sur agitateur rotatif pendant 30 min. Après une nouvelle série de lavages, le complexe billes-anticorps-antigène a été élué dans 20 µl en suivant les recommandations du fournisseur. Les échantillons ont ensuite été dilués au 1/2 en bleu de dépôt NuPage contenant du dithiothréitol (DTT) et ont été dénaturés



thermiquement pendant 10 min à 95°C avant d'être stockés à -20°C, jusqu'à leur analyse par Western-Blot.

Résultats

1) Evaluation d'anticorps commerciaux

Alors que dans le cadre des expériences de chromatographie d'affinité par GST pull-down l'identification des protéines d'intérêt était rendue possible par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines fusion Flag ou GST, ce n'est pas le cas lorsqu'il s'agit d'identifier les protéines endogènes. Ainsi, afin d'identifier *in cellulo* les protéines d'intérêt, il est indispensable de disposer d'outils permettant de reconnaître directement ces protéines. Bien qu'une multitude de références d'anticorps soit actuellement commercialisée, il s'avère que dans l'immense majorité des cas, ces réactifs ciblent les espèces les plus couramment étudiées. Ainsi, la plupart des anticorps que nous avons pu trouver dans le commerce étaient dirigés contre les formes humaines ou murines. En collaboration avec la société Diagnostics, spécialisée dans la commercialisation de réactifs de recherche et diagnostic *in vitro*, nous avons pu sélectionner des références d'anticorps, anti-protéine humaine ou murine, prédits par analyses bio-informatiques comme pouvant détecter les formes bovines, ovines, caprines et porcines des protéines d'intérêt. Parmi toutes les références identifiées, dix anticorps dirigés contre les protéines IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MAVS, MDA5, NEMO, RIG-I, STAT2 et TRAF3 ont ainsi été commandés. Huit d'entre eux, correspondant aux protéines les plus intéressantes au regard des résultats des cribles Nanoluciférase, ont été testés (Tableau 5).



Tableau 5 : Réactivité prédite des anticorps sélectionnés contre les quatre espèces d'étude.

Cible	Réactivité prédite	Cible	Réactivité prédite
IKK α	Bovine: 92%	MDA5	Bovine: 95%
	Ovine: 88%		Ovine: 95%
	Caprine : 88%		Caprine : 95%
	Porcine: 90%		Porcine: 95%
IKK ϵ	Bovine: 83%	NEMO	Bovine: 83%
	Ovine: 84%		Ovine: 83%
	Caprine : 84%		Caprine : 83%
	Porcine: 83%		Porcine: 92%
IRF3	Bovine: 98%	RIG-I	Bovine: 92%
	Ovine: 98%		Ovine: 98%
	Caprine : 98%		Caprine : 98%
	Porcine: 98%		Porcine: 92%
IRF7	Bovine: 69%	STAT2	Bovine: 78%
	Ovine: 70%		Ovine: 84%
	Caprine : 70%		Caprine : 84%
	Porcine: 71%		Porcine: 85%
MAVS	Bovine: 63%	TRAF3	Bovine: 94%
	Ovine: 63%		Ovine: 94%
	Caprine : 63%		Caprine : 94%
	Porcine: 63%		Porcine: 94%

Dans un premier temps, ces anticorps ont été testés en Western-Blot sur des lysats de DSP bovines non infectées et non traitées. Les bandes observées après révélation des membranes de nitrocellulose ont été comparées aux tailles théoriques attendues pour chaque protéine d'intérêt. Alors que des bandes correspondant aux tailles attendues de certaines protéines telles que IKK α , IKK ϵ , IRF7 et NEMO ont pu être détectées. Il n'a en revanche pas été possible de statuer quant à l'efficacité des anticorps dirigés contre les protéines pour lesquelles des bandes n'ont pas été observées à la taille attendue du fait de la non disponibilité d'un contrôle positif.

Les difficultés de détection de certaines des protéines d'intérêt étant possiblement liées au fait que les lysats utilisés en Western-Blot proviennent de cellules saines, dans lesquelles la voie IFN de type I n'est pas activée. Il a ainsi été décidé de renouveler



l'évaluation des anticorps sur des lysats de DSP bovines et ovines ayant subi ou non un traitement au poly-IC censé activer la réponse IFN en simulant l'infection virale. De manière générale, seule de très légères différences ont pu être détectées entre les échantillons traités ou non au poly-IC. Ces essais n'ont ainsi pas permis de conclure davantage par rapport aux tests réalisés précédemment à partir de cellules DSP bovines non traitées.

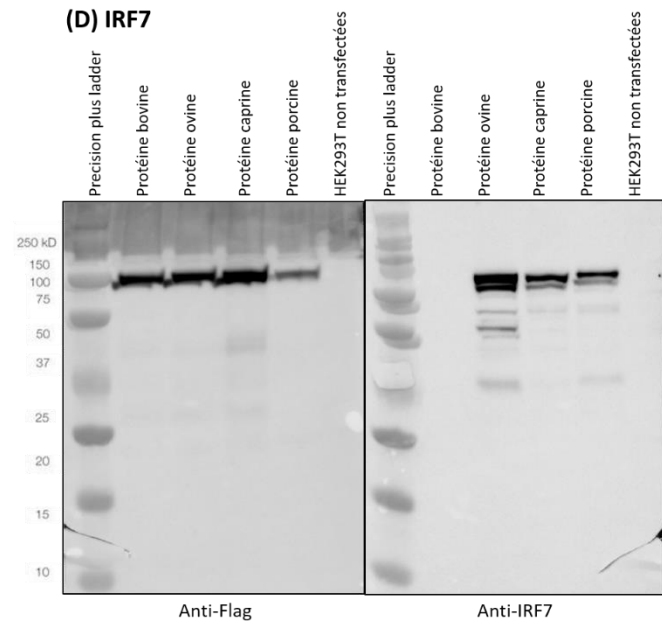
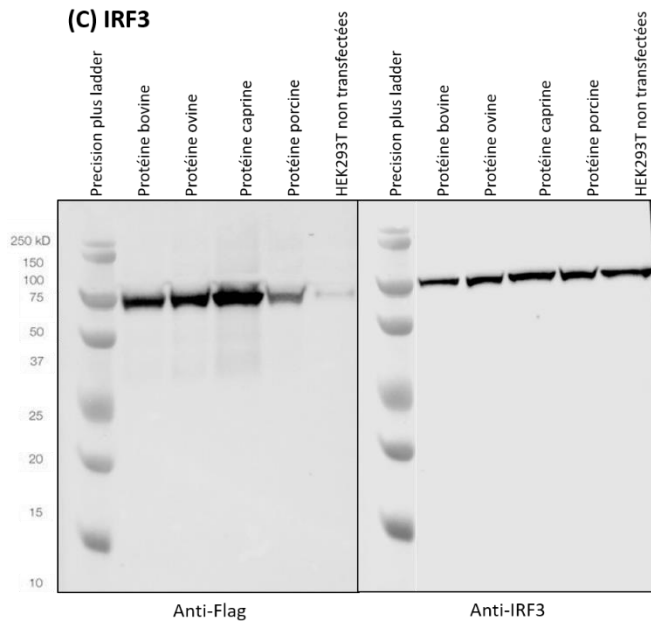
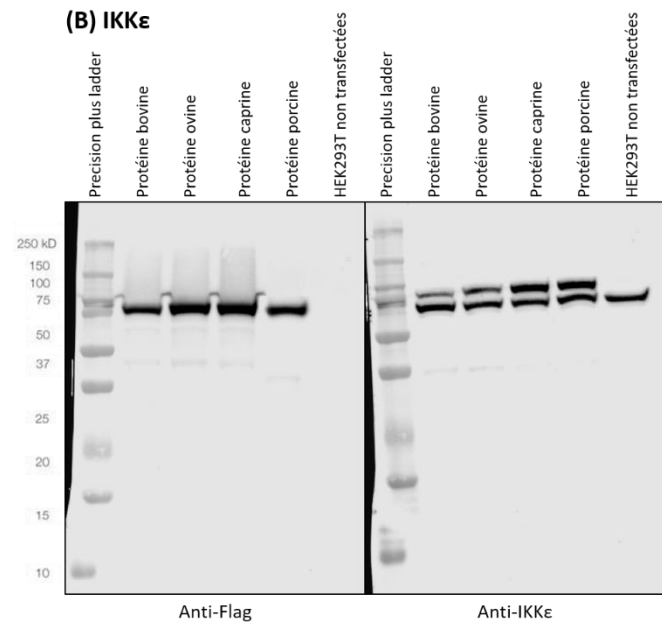
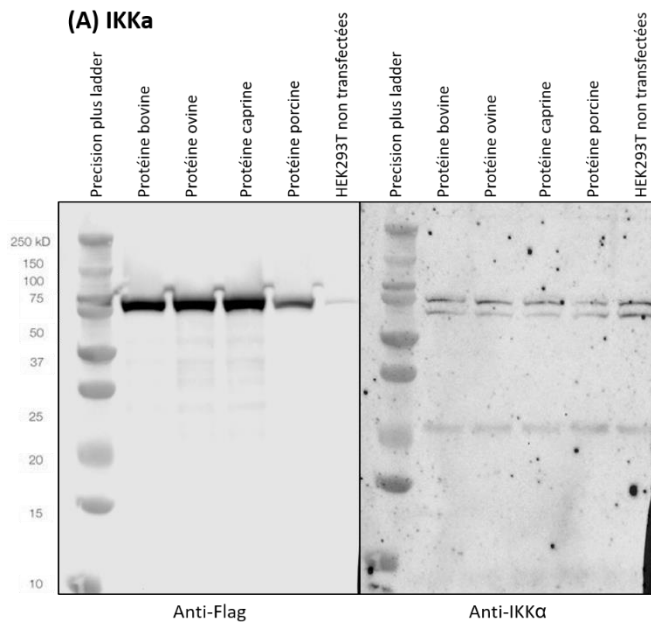
Aucune différence notable n'ayant pu être observée entre les lysats protéiques provenant de cellules DSP bovines et ovines traitées au poly-IC et celles non traitées, il a été décidé de surexprimer les protéines d'intérêt en cellules HEK293T afin d'évaluer les anticorps sélectionnés en étant certain que la protéine à détecter soit présente (Figure 23). Les protéines produites étant des protéines-fusion 3X-Flag, l'utilisation d'un anticorps anti-Flag a permis de confirmer la présence des protéines recherchées. L'analyse des lysats de HEK293T surexprimant les formes bovine, ovine, caprine et porcine d'IKK α , à l'aide d'un anticorps anti-Flag, a conduit à la visualisation de bandes correspondant à la protéine d'intérêt (Figure 23 (A)). Aucune bande comparable n'a pu être détectée à partir des lysats de cellules ne surexprimant pas la protéine. Lorsque ces mêmes lysats ont été incubés en présence d'un anticorps anti-IKK α , de fines bandes ont pu être observées à la taille attendue, sans différence notable entre les conditions transfectées ou non transfectées, signe d'une détection de la protéine endogène uniquement. Un constat similaire a pu être fait en ce qui concerne l'évaluation de l'anticorps anti-IRF3, permettant la détection de la protéine endogène mais pas des formes bovine, ovine, caprine et porcine surexprimées (Figure 23 (C)). Le test de l'anticorps anti-IKK ϵ a permis de mettre en évidence la présence de la protéine endogène, détectée de manière similaire dans les lysats de cellules surexprimant ou non la protéine d'intérêt (Figure 23 (B)). Les différentes formes surexprimées d'IKK ϵ , de tailles légèrement supérieures ont également pu être détectées, à la fois en utilisant



l'anticorps anti-Flag et l'anticorps anti- IKK ϵ . En ce qui concerne la protéine IRF7, des bandes associées aux quatre formes surexprimées ont pu être détectées en utilisant un anticorps anti-Flag (Figure 23 (D)). En revanche, l'utilisation de l'anticorps anti-IRF7 n'a conduit qu'à la détection des formes ovines, caprines et porcines de la protéine, aucune bande n'étant observée à partir du lysat de cellules surexprimant la version bovine de cette protéine. L'évaluation de l'anticorps dirigé contre la protéine MAVS n'a conduit à l'observation d'aucun signal, y compris à partir des lysats de cellules transfectées (Figure 23 (E)). L'incubation de ces mêmes lysats avec un anticorps anti-Flag n'a cependant permis de ne démontrer qu'une faible expression des protéines d'intérêt. En ce qui concerne la cible MDA5, aucune bande n'a pu être observée après incubation avec l'anticorps à évaluer, alors que la surexpression des protéines provenant des quatre espèces d'intérêt a pu être confirmée après incubation avec l'anticorps anti-Flag (Figure 23 (F)). L'analyse des lysats de HEK293T surexprimant les formes bovine, ovine, caprine et porcine de NEMO, à l'aide d'un anticorps anti-Flag, a permis la visualisation de bandes correspondant à la protéine d'intérêt (Figure 23 (G)). Des bandes pouvant être associées aux différentes formes surexprimées de NEMO ont également pu être observées grâce à l'utilisation de l'anticorps anti-NEMO. Une seconde bande, de taille légèrement inférieure à également été observée dans cette expérience. Le test de l'anticorps dirigé contre TRAF3 a permis de mettre en évidence la présence de la protéine d'intérêt sous ses quatre formes, confirmant les observations réalisées à l'aide de l'anticorps anti-Flag (Figure 23 (H)).

Ainsi, parmi les huit références d'anticorps ayant pu être testées dans le cadre de ces travaux de thèse, seules ceux dirigés contre les protéines IKK ϵ , NEMO et TRAF3 ont permis de détecter les formes bovine, ovine, caprine et porcine des protéines surexprimées.





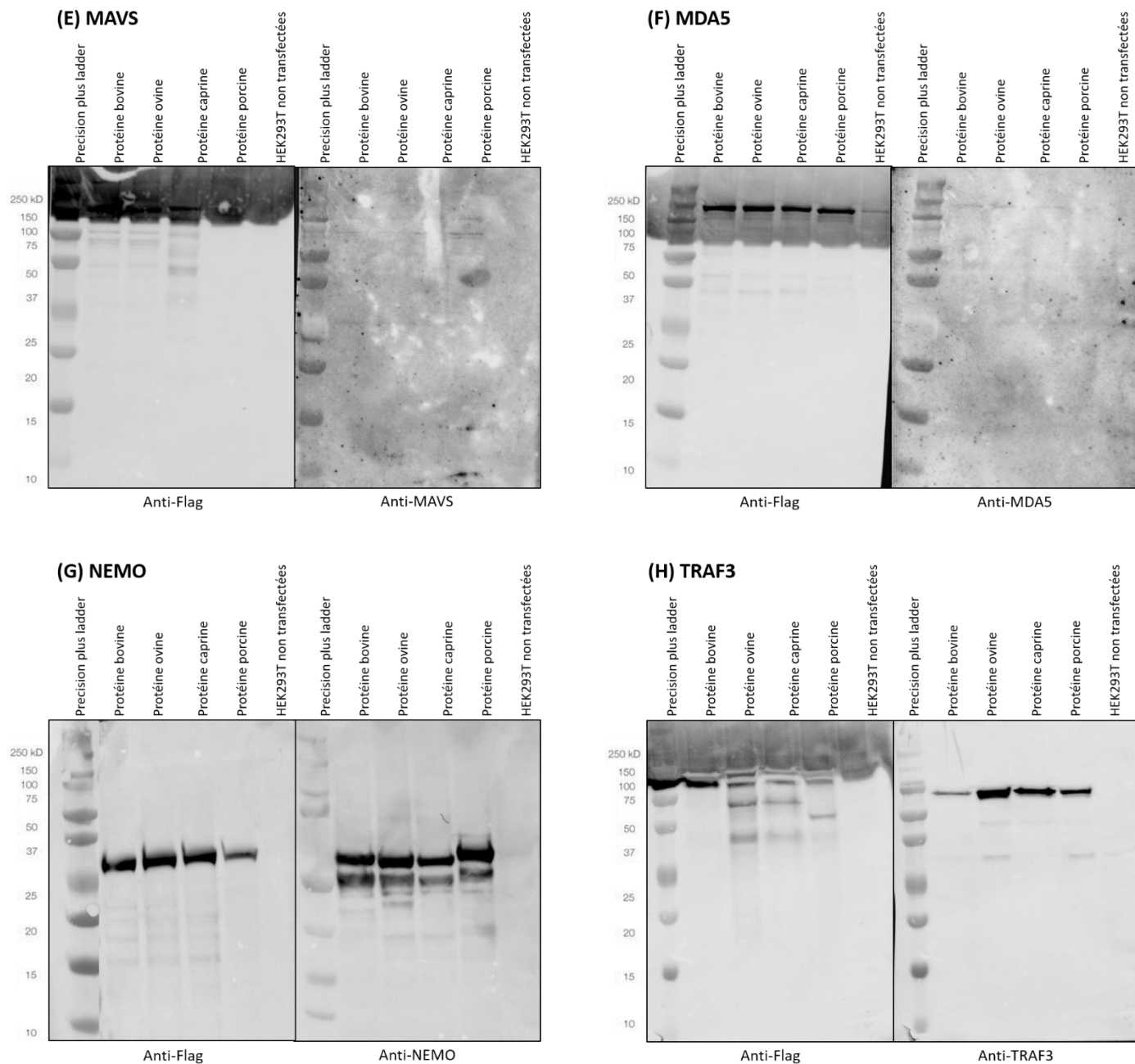


Figure 23 : Evaluation des anticorps sélectionnés par analyse Western-Blot après surexpression des protéines d'intérêt.

La réactivité des anticorps dirigés contre les protéines *IKK α* , *IKK ϵ* , *IRF3*, *IRF7*, *MAVS*, *MDA5*, *NEMO*, *RIG-I*, *STAT2* et *TRAF3* a été évaluée à partir de lysats protéiques provenant de cellules HEK293 surexprimant ou non les formes bovines, ovines, caprines et porcines des protéines d'intérêt. Les membranes de Western-Blot ont été révélées à l'aide d'un anticorps anti-Flag d'une part, et d'autre part à l'aide de l'anticorps à tester. (A) Evaluation de l'anticorps anti- *IKK α* . (B) Evaluation de l'anticorps anti- *IKK ϵ* . (C) Evaluation de l'anticorps anti-*IRF3*. (D) Evaluation de l'anticorps anti-*IRF7*. (E) Evaluation de l'anticorps anti-*MAVS*. (F) Evaluation de l'anticorps anti-*MDA5*. (G) Evaluation de l'anticorps anti-*NEMO*. (H) Evaluation de l'anticorps anti-*TRAF3*.



2) Production d'un anticorps dirigé contre la protéine MAVS

Parmi les interactions protéine-protéine mises en évidence par approche Nanoluciférase et confirmées par chromatographie d'affinité, seule l'interaction entre la 3D^{pol} du FMDV et la protéine MAVS semble être hôte spécifique (456). En effet, alors que les autres interactions décrites dans la première partie de ces travaux de thèse apparaissent comme étant conservées au sein des espèces étudiées, celle-ci a pu être identifiée uniquement en utilisant la forme porcine de la protéine cellulaire (*cf.* Mise en évidence d'interactions protéine-protéine entre le virus de la fièvre aphteuse et la voie interféron de type I et détermination de leur spécificité d'hôte). La démonstration de l'interaction entre la 3D^{pol} et la forme porcine de MAVS, mais pas avec les formes provenant des espèces bovine, ovine et caprine, susceptibles à l'infection persistante par le FMDV, font de cette interaction un objet d'étude particulièrement intéressant. L'étude de cette interaction hôte spécifique est d'autant plus pertinente au regard de l'hypothèse posée dans le cadre de ces travaux de thèse, portant sur un lien éventuel entre les interactions protéiques mises en place entre le virus et son hôte, et la persistance virale. La recherche d'un anticorps anti-MAVS possédant une réactivité pour les formes bovine, ovine, caprine et porcine de la protéine s'étant révélée infructueuse, il a été décidé de produire, au laboratoire, un anticorps polyclonal dirigé contre MAVS afin de disposer d'un outil permettant l'étude de l'interaction 3D^{pol}-MAVS en contexte infectieux. Dans cette optique, il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante de protéine purifiée pour immuniser un lapin. S'il est possible de produire la protéine d'intérêt en système bactérien ou en levure, ces solutions ne permettent pas à la protéine de subir les modifications co- et post-traductionnelles se produisant en cellules de mammifères (489–492). Afin d'obtenir une protéine la plus proche possible des protéines biologiques, il a été décidé de la produire en cellules de mammifères *via* le système vaccine (484). Cette méthode, déjà



mise en place dans notre laboratoire, a également été choisie pour produire de la protéine 2B du FMDV afin de permettre l'obtention d'un anticorps monoclonal dans le cadre du projet européen Spidvac, ainsi que d'autres protéines virales. La charge de travail associée à la production d'une nouvelle protéine en système vaccine étant particulièrement importante, ce projet a été géré de manière transversale avec les personnes impliquées dans la production de protéines du FMDV.

Dans le cadre de cette partie des travaux de thèse, il a été choisi d'utiliser la forme bovine de la protéine MAVS pour la production de l'anticorps. Ce choix a notamment été motivé par le fait que cette protéine bovine est la forme possédant la plus faible variabilité génétique par rapport aux petits ruminants d'une part, et au porc d'autre part. De plus, au moment du choix de la protéine à utiliser, seul le modèle de cellules primaires bovin était pleinement mis en place au laboratoire et permettait d'envisager la réalisation de travaux de validation d'interactions protéiques en contexte infectieux. Un vecteur pVote2-MAVS, permettant l'expression de la protéine MAVS bovine, et adapté au système vaccine a ainsi été construit par clonage Gateway®. Ce vecteur a ensuite été utilisé afin de produire un virus MVA recombinant capable d'induire l'expression de la protéine MAVS. Pour cela, des cellules BSR ont été infectées par le MVA puis transfectées avec le vecteur pVote2-MAVS afin d'obtenir un virus recombinant MVA-T7green. Le taux de recombinaison du virus a été estimé par lecture de la fluorescence après 24 h et 48 h d'incubation (Figure 24). En effet, le MVA possède une fluorescence rouge et verte, tandis que si l'évènement de recombinaison a lieu, le virus perd la séquence mCherry et ne fluoresce alors plus que dans le vert. Après 24 h d'incubation, une part non négligeable des virus fluorescents observés avaient perdu leur capacité de fluorescer dans le rouge, signe d'une recombinaison efficace. Après 48 h, la proportion de virus apparaissant en vert mais pas en rouge semble



relativement semblable à celle observée à 24 h, cependant, le nombre total de virus présents est plus important dans ces conditions.

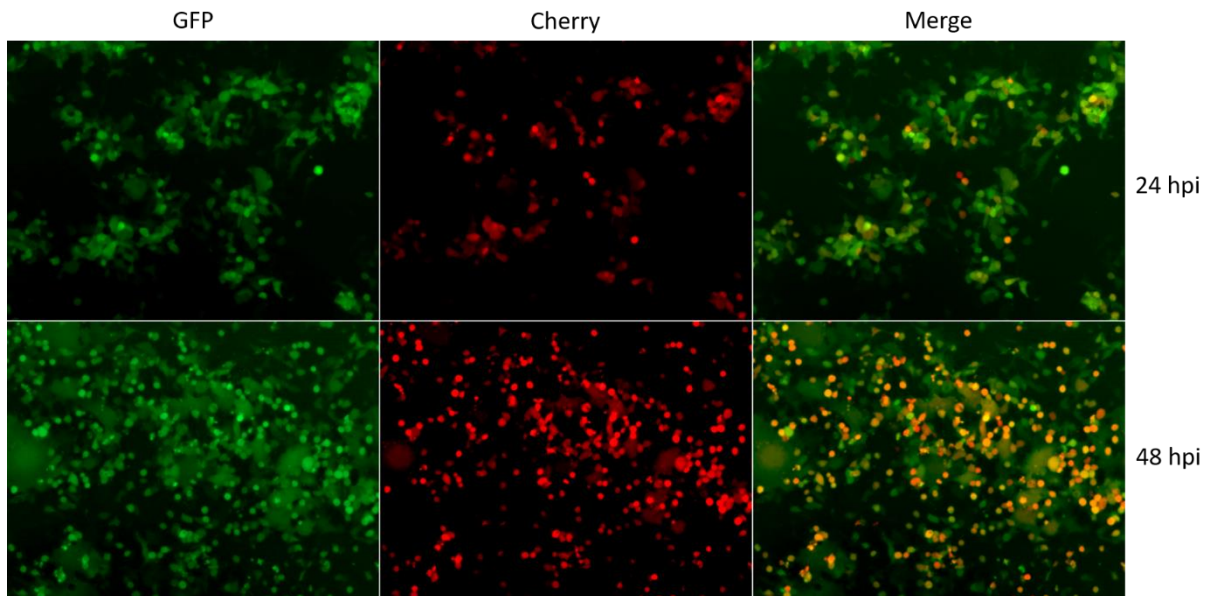


Figure 24 : Obtention de virus recombinant MVA-T7green-MAVS.

Les virus recombinants ont été obtenus après infection de cellules BSR transfectées à l'aide d'un vecteur pVote2-MAVS. Les virus non recombinés sont capables de fluorescer dans le rouge et dans le vert. Les virus recombinés perdent leur aptitude à fluorescer dans le rouge et sont censés ne plus fluorescer que dans le vert. Observation au microscope à épifluorescence x100, Exposition FITC : 1s, Exposition DsRed : 1s.

Les virus recombinants ont ensuite été sélectionnés deux fois, en infectant de nouvelles cellules BSR en présence de xanthine et d'hypoxanthine, puis une troisième fois en infectant des cellules BSR en présence de coumermicine (Figure 25). Après 24 h d'infection en milieu de sélection, la quasi-totalité des virus qui étaient encore capables d'émettre une fluorescence rouge ont été éliminés, alors qu'il en reste encore une part non négligeable pour la condition 48 h.



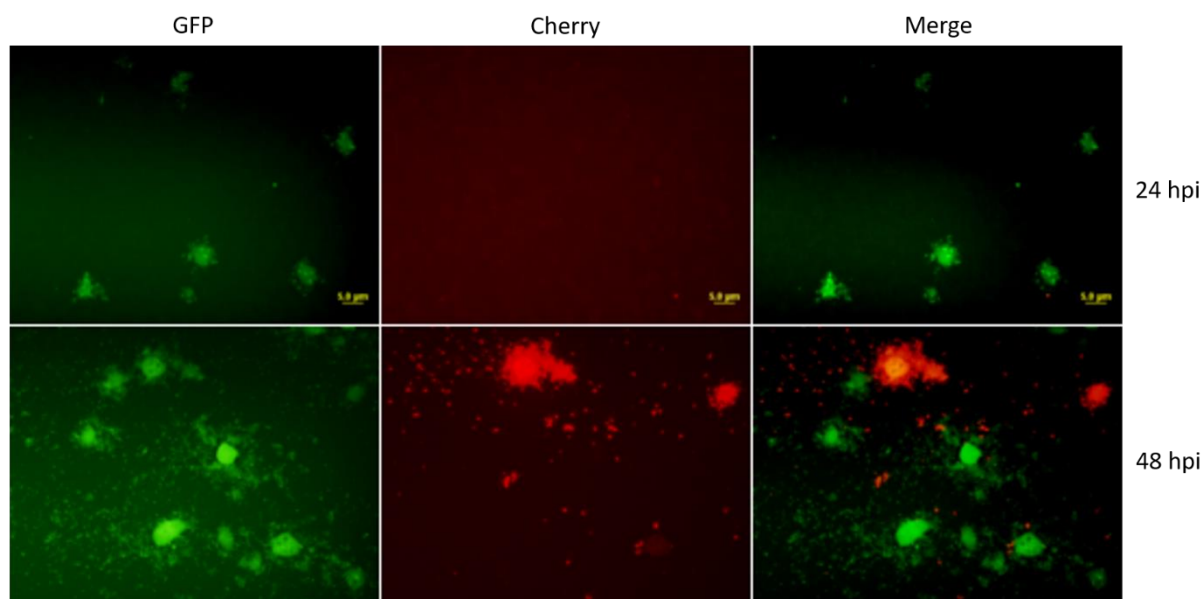


Figure 25 : **Sélection des virus recombinant MVA-T7green-MAVS.**

Les virus recombinants ont été sélectionnés par infection de cellules BSR pendant 24 h ou 48 h en présence d'antibiotiques. Les virus non recombinés sont capables de fluorescer dans le rouge et dans le vert. Les virus recombinés perdent leur aptitude à fluorescer dans le rouge et sont censés ne plus fluorescer que dans le vert. Observation au microscope à épifluorescence $\times 100$, Exposition FITC : 1s, Exposition DsRed : 1s.

A la suite de cette étape de sélection, la capacité des virus recombinants à produire la protéine d'intérêt a été testée. Pour cela, des cellules BSR ont été infectées à partir d'une dilution au 1/5 de la suspension virale sélectionnée. Vingt-quatre heures post-infection, les surnageants de culture ont été récoltés. Des lysats protéiques ont été réalisés à partir de la solution de PBS utilisée pour la récolte des cellules, ainsi que des culots cellulaires. Les trois types d'échantillons, à savoir les surnageants de culture, les suspensions cellulaires en PBS et les culots cellulaires ont été analysés par Western-Blot (Figure 26). Les membranes de Western-Blot ont été incubées en présence d'anticorps anti-Flag permettant de détecter la protéine fusion MAVS-Flag codée par le pVote2-MAVS. Des bandes correspondant à la protéine MAVS ont pu être observées dans la suspension de cellules détachées en PBS à l'aide d'un *cell scraper*, ainsi que dans le lysat protéique issu du culot cellulaire. En revanche, aucun signal n'a pu être détecté à partir du surnageant de culture.



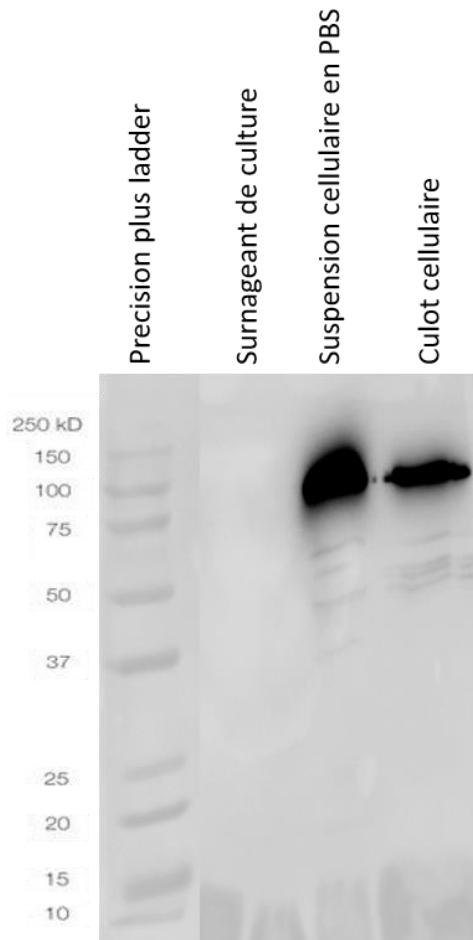
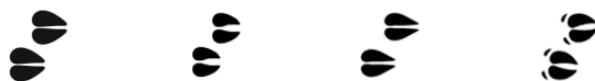


Figure 26 : Détection de la protéine MAVS par analyse Western-Blot.

Différents échantillons (surnageant de culture, surnageant PBS et culot cellulaire) ont été analysés afin de rechercher la protéine d'intérêt. La membrane de Western-Blot a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-Flag

Après vérification de la capacité des virus recombinants à exprimer correctement la protéine d'intérêt, la suspension virale a été titrée. Alors que l'infection de BSR à partir de suspensions virales diluées jusqu'au 10^{-5} a mené à l'observation de virus fluorescents dans l'intégralité des puits testés, seuls sept puits sur huit ont présenté des signaux fluorescents après infection par la suspension virale à la dilution 10^{-6} . Uniquement deux puits ont permis la visualisation de fluorescence suite à l'infection à la dilution 10^{-7} , tandis que les dilutions suivantes n'ont pas conduit à l'observation de virus fluorescent. Le titre viral a été calculé au regard de ces résultats et de la table de



Bornarel et Stellmann (488). Cette solution a ainsi été titrée à $4,0 \cdot 10^{7,54}$ TCID₅₀/ml, soit $1,3 \cdot 10^8$ PFU/ml.

La détermination du titre viral de la solution de MVA recombinant a permis l'infection de cellules BSR a une MOI de 3, adaptée à l'expression de protéine, en vue de produire et purifier la protéine d'intérêt. Les cellules infectées afin de produire la protéine MAVS ont ensuite été récoltées puis lysées. La lyse cellulaire a été réalisées soit par ajout de tampon de lyse, soit par centrifugation rapide des cellules récoltées dans du PBS. Ces échantillons protéiques totaux ont été mis en présence de billes associées à des immunoglobulines purifiées anti-Flag, permettant la purification des protéines MAVS porteuses d'une étiquette Flag (Figure 27). L'efficacité d'expression et de purification de la protéine MAVS a été évaluée par analyse SDS-Page. Une coloration au bleu de Coomassie a permis de révéler les protéines totales présentes dans chacun des échantillons, tandis qu'un Western-Blot anti-Flag a permis de détecter la protéine d'intérêt. La coloration au bleu de Coomassie a conduit à l'observation de très nombreuses bandes dans les échantillons protéiques totaux, avant et après purification sur billes, signe d'une lyse correcte des cellules aussi bien par action du tampon de lyse, que par centrifugation rapide. Au regard des bandes légèrement plus intenses, il semblerait toutefois que davantage de protéines aient été détectées à partir des échantillons obtenus en présence de tampon de lyse. En ce qui concerne les échantillons obtenus à l'issue de l'élution, seule une très faible quantité de protéine a pu être détectée à partir des échantillons provenant de la lyse des cellules par ajout de tampon de lyse. Aucune bande n'a pu être observée à partir des échantillons provenant de la lyse des cellules par centrifugation. Afin de vérifier que l'utilisation du peptide 3X Flag à une concentration élevée avait effectivement induit le décrochage des protéines captées par les billes, ces dernières ont également été analysées. Alors qu'une très faible



quantité de protéine a pu être détectée sur les billes incubées en présence des lysats protéiques obtenus par centrifugation des cellules, une quantité plus importante a été observée pour les billes incubées en présences des lysats protéiques obtenus par lyse chimique. Une bande assez intense pouvant correspondre à la protéine MAVS a notamment été révélée. L'incubation de la membrane de Western-Blot à l'aide d'un anticorps anti-Flag a conduit à la détection d'une bande de faible intensité, associée à la protéine d'intérêt, dans le lysat total provenant de l'ajout de tampon de lyse sur les cellules. Alors qu'une bande d'intensité encore plus limitée a été observée après purification sur billes et élution, il semblerait que la quasi-totalité de la protéine d'intérêt soit restée accrochée aux billes, indiquant de fait l'inefficacité de l'utilisation du peptide 3X Flag. Aucun signal n'a pu être révélé à partir des échantillons issus de la centrifugation des cellules infectées.

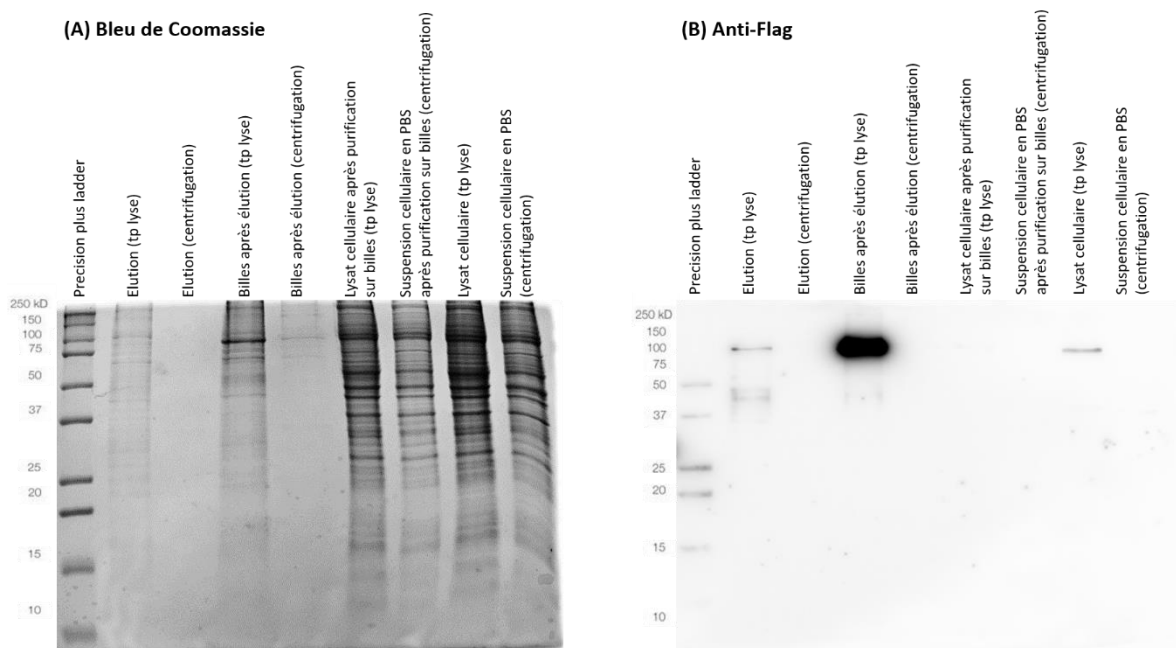


Figure 27 : Evaluation de l'efficacité de production et de purification de la protéine MAVS.
 Les protéines présentes dans le lysat total ainsi que dans des échantillons récoltés avant et après la purification de la protéine MAVS ont été séparés par SDS-Page. (A) Les protéines totales ont été visualisées par coloration au Bleu de Coomassie. (B) La protéine MAVS a été analysée par Western-Blot à l'aide d'un anticorps anti-Flag.



3) Mise au point d'une méthode d'immunoprécipitation visant à valider les interactions protéiques en contexte infectieux

En attendant de pouvoir disposer d'un anticorps dirigé contre la protéine MAVS, il a été décidé d'investiguer, en contexte infectieux, les interactions mises en évidence par approche Nanoluciférase et pour lesquelles nous disposons d'un anticorps permettant de détecter les formes bovine, ovine, caprine et porcine de la protéine. Une méthode de détection des interactions protéine-protéine lors de l'infection de cellules d'intérêt par le FMDV a ainsi été mise au point afin de vérifier l'existence des interactions 3D^{pol}-IKK ϵ et 3D^{pol}-NEMO. Il a dans un premier temps été envisagé de développer une méthode permettant d'étudier les interactions protéiques en contexte infectieux et surexpression des protéines cellulaires d'intérêt, ou simplement en présence de 3D^{pol} surexprimée, or les cellules adaptées à l'étude de l'infection par le FMDV dont nous disposons, à savoir les ZZ-R127, DSP bovines, DSP ovines, PT ovines et DSP porcines n'avaient jamais fait l'objet d'une transfection d'ADN. Un protocole de transfection d'ARN a cependant déjà été mis au point par le passé en cellules ZZ-R127. Des essais de transfection ont ainsi été menés en cellules ZZ-R127 et en cellules DSP bovines. En ce qui concerne les cellules primaires bovines, différentes conditions de transfection ont été testées, à savoir plusieurs concentrations plasmidiques, combinées à différentes quantités de lipofectant JetPRIME[®] et deux temps d'incubation post-transfection, à savoir 24 h et 48 h (données non présentées). A l'issue de cette expérience il est apparu que la quasi-totalité des cellules transfectées avaient été détruites. Des essais similaires ont alors été entrepris en remplaçant le JetPRIME[®] par la référence JetOPTIMUS[®] (Polyplus), spécialement développée pour les cellules présentant une mortalité importante suite à la transfection. L'utilisation de ce second



lipofectant n'a toutefois pas permis d'améliorer les conditions de transfection des DSP bovines, puisqu'une nouvelle fois, la plupart des cellules n'ont pas survécu.

En ce qui concerne les essais de transfection en cellules ZZ-R127, les premiers essais ont été menés en transfectant une protéine de fusion 3D^{pol}-eGFP en faisant varier la quantité de plasmide et le ratio plasmide/transfectant utilisé (données non présentées). Alors qu'aucune des conditions testées n'a permis d'observer une efficacité de transfection satisfaisante, il est apparu que contrairement aux DSP bovines, ces cellules ne présentent pas de mortalité significative suite à la transfection. La détermination de conditions de transfection des cellules ZZ-R127 ayant pour intérêt d'exprimer la protéine 3D^{pol} ou les protéines impliquées dans la voie IFN de type I, afin de réaliser des immunoprécipitations et de les détecter par Western-Blot, il a été décidé de tester de nouvelles conditions de transfection et d'analyser directement les lysats protéiques associés par Western-Blot. Des cellules ZZ-R127 ont ainsi été transfectées en utilisant différentes densités de mise en culture, quantités de plasmide d'expression 3D-Flag et volumes de transfectant JetPRIME®. L'analyse des lysats protéiques a été réalisée par Western-Blot en utilisant l'anticorps 3F12 anti-3D^{pol}. Une bande correspondant à la taille attendue de la 3D^{pol}, *i.e.* environ 52 kD a pu être observée pour l'ensemble des conditions testées. Parmi les conditions associées aux expressions de 3D^{pol} les plus efficaces, la condition correspondant à une mise en culture à la densité de 600 000 cellules ZZ-R127 par puits, transfectées à raison de 1 µg de plasmide d'expression en présence de 1 µl de JetPRIME®, a été considérée comme étant la plus efficace. En effet, cette condition offre une efficacité d'expression de 3D^{pol} satisfaisante tout en ne nécessitant qu'une quantité limitée de vecteur d'expression et d'agent transfectant.



Afin de pouvoir mettre au point une méthode de détection des interactions entre la 3D^{pol} du FMDV et les protéines cellulaires impliquées dans la voie IFN de type I en contexte d'infection, il est nécessaire de s'assurer que ces protéines sont exprimées dans le même intervalle de temps. Pour cela, l'infection de cellules ZZ-R127 par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2, a été suivie lors de la phase précoce de l'infection. L'ECP a été visuellement estimé toutes demi-heures entre 2 h et 6h30 post-infection (Figure 28). Alors que durant les quatre premières heures post-infection, aucun ECP n'a pu être observé, près de la moitié du tapis cellulaire était détruit après 4h30 post-infection. Lors du dernier point de cinétique, *i.e.* 6h30 après l'infection, l'ECP concernait la quasi-totalité du tapis cellulaire. Aucun signe évocateur d'ECP n'a pu être observé pour les conditions MOCK tout au long de l'expérience.

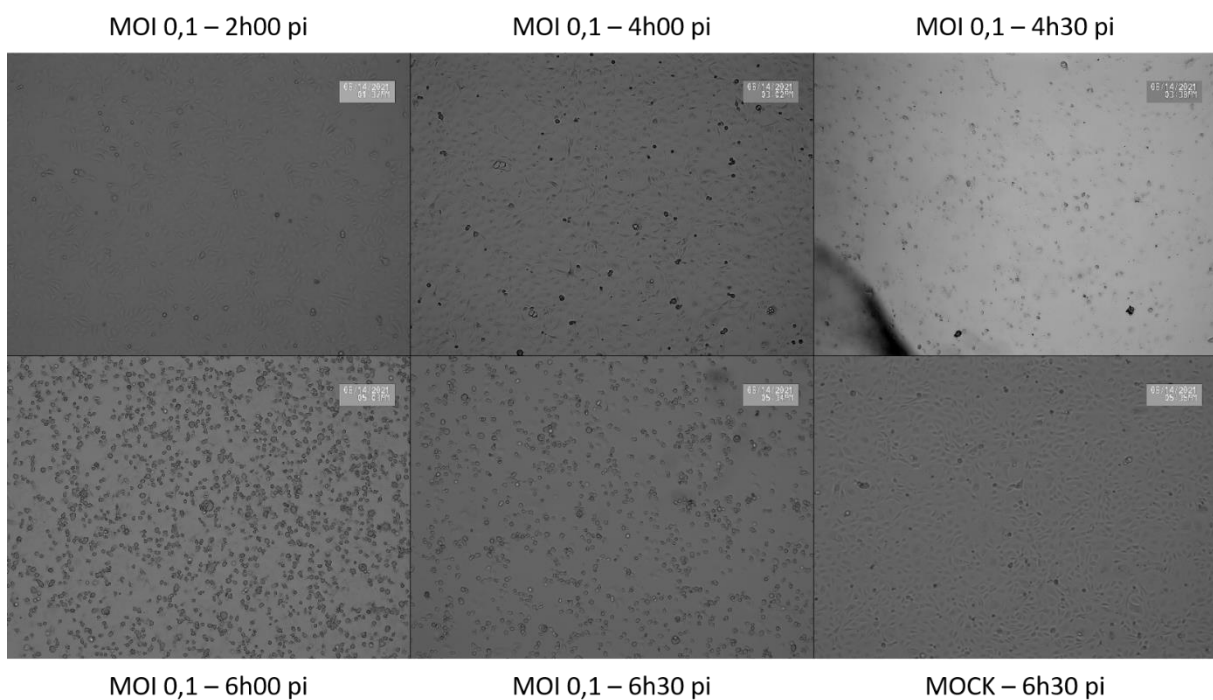


Figure 28 : Evolution de l'ECP au cours de l'infection de cellules ZZ-R127 par le FMDV.
Des cellules ZZ-R127 ont été infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 ou du milieu conditionné. L'ECP a été visuellement estimé toutes les trente minutes durant sept heures post infection.



Deux tapis cellulaires de ZZ-R127 infectées ont également été récoltés, toutes les trente minutes, afin d'effectuer d'une part des extractions d'ARN et des lysats protéiques d'autre part. Les ARN ainsi extraits ont servi à la réalisation de rtRT-PCR permettant d'étudier l'activation de la voie IFN de type I en ciblant les gènes OAS et MX-1 (Figure 29). Les ARN codant la 3D^{pol} du FMDV ont aussi fait l'objet d'une amplification par rtRT-PCR afin de déterminer une éventuelle corrélation entre les niveaux d'ARN viraux et cellulaires mesurés. Le contrôle interne β -actine, détecté à des valeurs de Ct comprises entre 14 et 17, a permis la normalisation des niveaux d'expression relative à partir des valeurs de Ct associées aux cibles OAS, MX-1 et 3D^{pol}. Aucune différence significative n'a pu être observée concernant les niveaux d'expression de MX-1 (valeurs de Ct comprises entre 25 et 27) et OAS (valeurs de Ct comprises entre 26 et 28) mesurés au cours de la cinétique. Ainsi, au regard des valeurs absolues de Ct, déterminées par rtRT-PCR, aucune variation de plus de 2 Ct n'a pu être détectée entre les conditions infectées et la condition MOCK. A titre de comparaison, des analyses portant sur l'activation de la voie IFN de type I dans les cellules ZZ-R127 en présence de poly-IC ont permis d'obtenir des différences de 3 Ct pour MX1 et 4 Ct pour OAS entre les conditions traitées et non traitées (données non présentées). Ces résultats ont ainsi renforcé l'absence d'activation visible de la voie IFN de type I dans les cellules ZZ-R127 au cours de cette cinétique en contexte infectieux. Cette absence d'activation visible de la voie IFN de type I n'a toutefois pas pu être associée à un souci lié à l'infection par le FMDV puisque les valeurs de Ct associées aux ARN 3D^{pol} ont diminué au cours de la cinétique, passant de près de Ct de 20, 2 h après l'infection à 10 à 6 h post-infection.



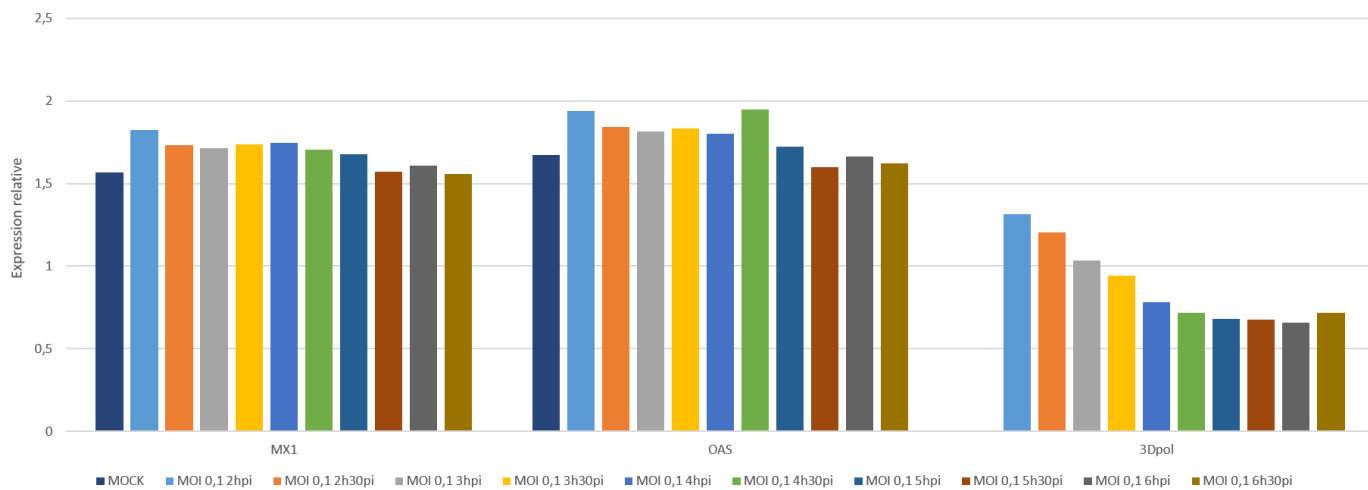
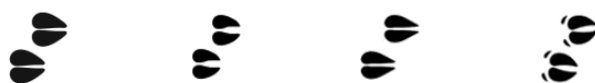


Figure 29 : Activation de la voie IFN de type I après infection de cellules ZZ-R127 par le FMDV. Le niveau d'expression associé aux ISG OAS, PKR et MX-1 dans des cellules ZZ-R127 infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 ou du milieu conditionné, a été évalué par rtRT-PCR. Les données présentées correspondent au niveau d'expression relative prenant en compte les valeurs de Ct du gène de ménage β -actine associées à chacun des échantillons.

Les lysats cellulaires obtenus ont été analysés par Western-Blot afin de réaliser une cinétique d'apparition de la 3D^{pol} et des protéines cellulaires IKK ϵ et NEMO au cours de l'infection des cellules ZZ-R127 (Figure 30). Avant de procéder à l'immunodétection des protéines d'intérêt, les lysats protéiques ont fait l'objet d'un marquage anti- β -actine afin de s'assurer de la qualité des échantillons et d'identifier d'éventuelles variations de la quantité de protéines totales d'un prélèvement à l'autre (Figure 30 (A)). L'incubation des lysats protéiques avec un anticorps anti- β -actine, a permis de visualiser une bande correspondant à la β -actine, aussi bien pour le contrôle positif constitué d'un lysat de cellules HEK293T connu pour être positif en β -actine, que pour la condition MOCK et les lysats de cellules infectées, à l'exception du prélèvement réalisé à 2h30 post-infection. Seule une très fine bande a pu être visualisée pour cette condition, indiquant un probable problème technique survenu lors de la récolte ou de la lyse des cellules infectées. Ce point de cinétique ne sera donc pas pris en compte dans la suite de l'analyse. Malgré l'important ECP observé sur les cellules ZZ-R127 après plus de 4 h post-infection, aucune variation notable de l'intensité du signal associé à la



β -actine n'a été remarquée. En ce qui concerne la protéine 3D^{pol}, l'immunomarquage impliquant l'anticorps 3F12 a permis de mettre en évidence la présence de la protéine virale dans le contrôle positif (protéine 3D^{pol} surexprimées en HEK293T) ainsi que dans les échantillons récoltés à partir de 3h30 post-infection (Figure 30 (B)). Aucun signal correspondant à la 3D^{pol} n'a pu être détecté dans les lysats issus de la condition MOCK ou des prélèvements réalisés durant les trois premières heures ayant suivi l'inoculation. Après incubation des membranes de Western-Blot avec un anticorps anti-NEMO, une bande correspondant à la taille attendue de la protéine, soit environ 46 kD, a pu être détectée dans l'intégralité des échantillons analysés (le point de cinétique 2h30 post-infection étant exclu) (Figure 30 (C)). Une légère diminution de l'intensité des bandes a pu être notée à partir de 4h30 post-infection. En ce qui concerne la protéine IKK ϵ , il a également été possible de détecter la protéine d'intérêt dans l'intégralité des échantillons testés (Figure 30 (D)). Des bandes d'intensité importante et n'ayant que très peu migré ont pu être détectées dans les lysats provenant de la condition MOCK et des temps les plus précoces de la cinétique.

Au regard des résultats présentés dans la Figure 30, il a ainsi été possible de détecter la présence simultanée de la 3D^{pol} ainsi que des protéines cellulaires d'intérêt entre 3h30 et 6 h post-infection dans les cellules ZZ-R127.



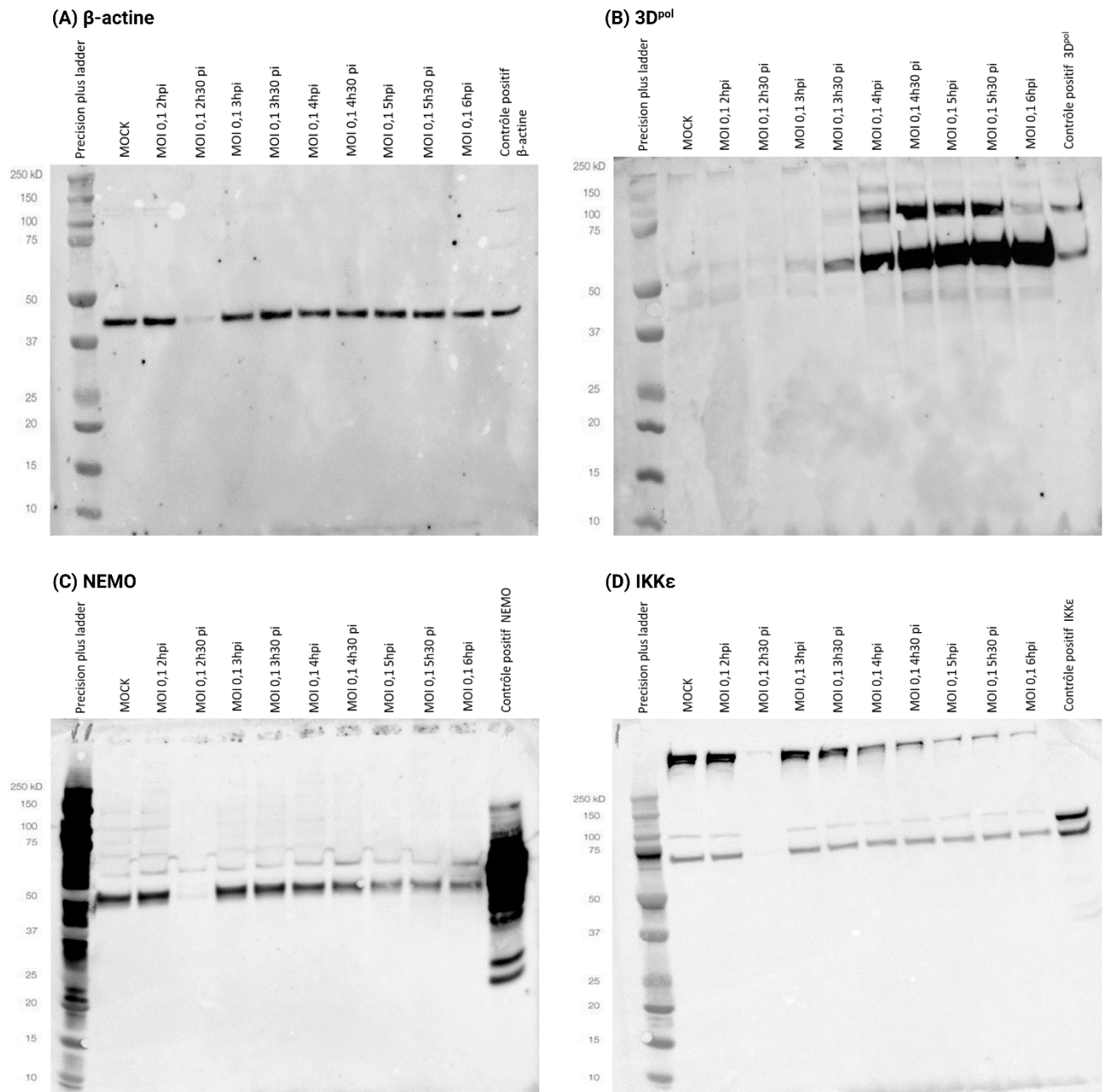


Figure 30 : Cinétique de détection des protéines d'intérêt lors de l'infection de cellules ZZ-R127. Des cellules ZZ-R127 ont été infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 ou du milieu conditionné. De 2h30 à 6h30 post-infection, des lysats protéiques ont été réalisés toutes les trente minutes. Ces lysats ont été analysés par Western-Blot afin de détecter les protéines β -actine, 3D^{pol}, NEMO et IKK ϵ . (A) Révélation à l'aide d'un anticorps anti- β -actine. (B) Révélation à l'aide d'un anticorps anti-3D^{pol}. (C) Révélation à l'aide d'un anticorps anti-NEMO. (D) Révélation à l'aide d'un anticorps anti-IKK ϵ .

De manière similaire, des cellules DSP bovines ont été infectées à la MOI 0,1 et à la MOI 0,01, l'ECP induit par le FMDV a été suivi, tout comme l'activation de la voie IFN de type I, la cinétique d'expression de la 3D^{pol} et celle des protéines IKK ϵ et NEMO. En ce qui concerne l'infection à la MOI 0,1, un point de cinétique a été réalisé toutes les



deux heures de 3 h à 7 h post-infection, puis un dernier 9 h après l'inoculation. Le suivi de l'infection des DSP bovines à la MOI 0,01 a consisté en la collecte de deux puits à trois heures d'intervalle jusqu'à 12 h post-infection.

Aucun ECP n'a pu être observé dans les puits MOCK et durant les trois premières heures ayant suivi l'infection des DSP bovines à la MOI 0,1 (Figure 31). Après 4 h post-infection, un ECP d'environ 10% a été visualisé. Cet ECP a légèrement évolué jusqu'à atteindre 20% du tapis cellulaire après 7 h post-infection mais ne s'est pas davantage étendu. En ce qui concerne l'infection des DSP bovines à la MOI 0,01, seul un ECP très limité (estimé à environ 5%) a pu être observé à partir de 9 h post-infection (données non présentées).

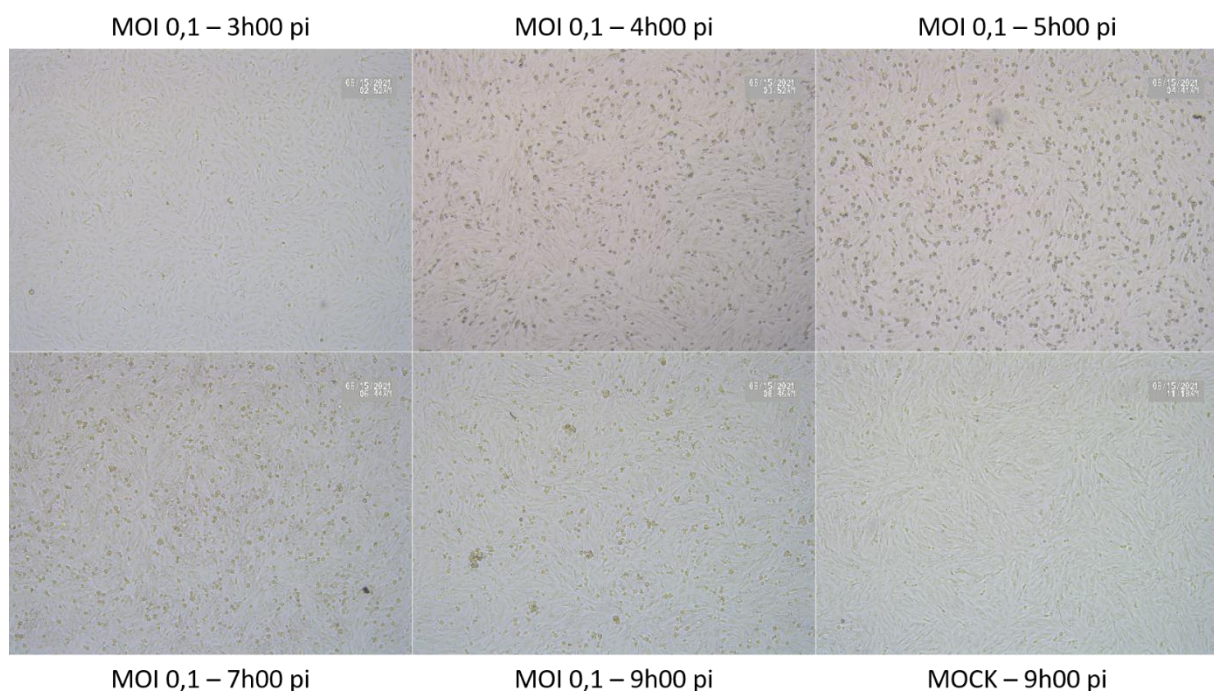


Figure 31 : Evolution de l'ECP au cours de l'infection de cellules DSP bovines par le FMDV. Des cellules DSP bovines ont été infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 ou du milieu conditionné. L'ECP a été visuellement estimé toutes les trente minutes durant neuf heures post infection.

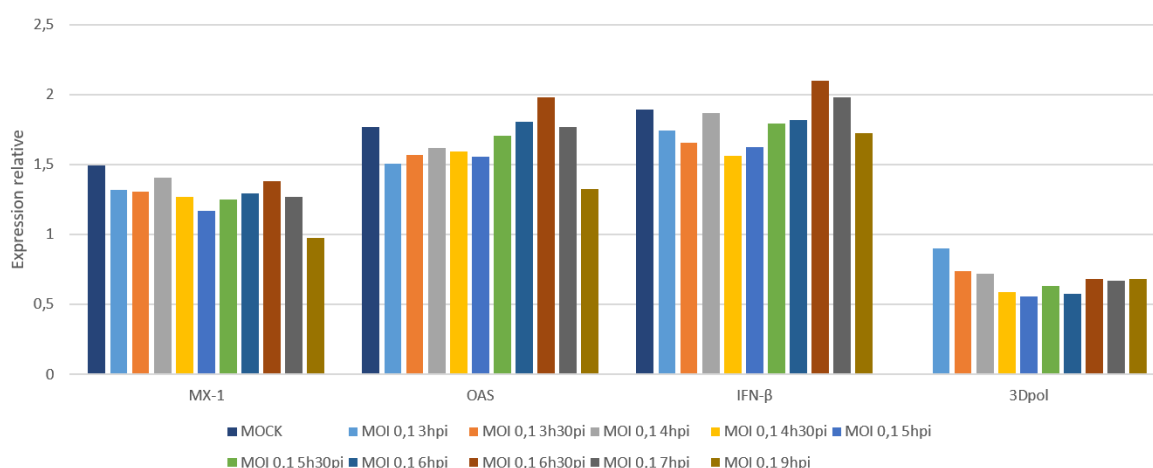
A l'image de ce qui avait été fait suite à l'infection des cellules ZZ-R127, les ARN extraits au cours de la cinétique d'infection en DSP bovines ont permis la réalisation de rtRT-PCR permettant d'étudier l'activation de la voie IFN de type I. Cette fois-ci, les gènes



OAS, MX-1 et IFN- β ont été ciblés, tout comme la 3D^{pol} du FMDV et la β -actine (Figure 32). Le contrôle interne β -actine a été détecté à des valeurs de Ct comprises entre 16 et 19 et a permis la normalisation des niveaux d'expression relative associé aux valeurs de Ct associées aux cibles OAS, MX-1, IFN- β et 3D^{pol}. Alors que les valeurs de Ct correspondant aux cibles OAS et MX-1 ont semblé constantes et similaires au MOCK dans les échantillons provenant des six premières heures post-infection (entre 22 et 24 Ct), une sensible diminution des valeurs de Ct a pu être observée entre 7 h et 9 h après l'infection à la MOI 0,1 (Figure 32 (A)) et entre 6 h et 9 h après l'infection à la MOI 0,01 (Figure 32 (B)). Ainsi, des diminutions de 5 à 6 Ct ont pu être observées entre les échantillons collectés à 9 h post-infection, respectivement issus de l'infection à la MOI 0,1 et de l'infection à la MOI 0,01 et les MOCK respectifs. A titre de comparaison, ces variations de Ct correspondent à ce qui a pu être observé par le passé lors d'essais d'activation de la voie IFN de type I dans les DSP bovines après traitement au poly-IC (données non montrées). En revanche, aucune évolution notable de la quantité d'IFN- β n'a pu être détectée au cours de la cinétique si ce n'est un écart mesuré de 3 Ct entre la condition MOCK et le point de cinétique réalisé 4h30 post-infection à la MOI 0,1. En ce qui concerne la 3D^{pol}, aucun signal n'a été détecté dans les échantillons MOCK. Dans le cadre de l'infection à la MOI 0,1, les valeurs de Ct associées à cette cible ont diminué entre 3 h et 6 h post-infection, passant de 16 à 9 Ct, puis ont ré-augmenté jusqu'à 9 h post-infection (13 Ct) (Figure 32 (A)). De la même façon, l'analyse des échantillons issus de l'infection à la MOI 0,01 a montré une diminution des valeurs de Ct associées aux ARN viraux entre 3 h et 6 h post-infection, de 19 à 11 Ct, suivie d'une légère augmentation entre 6 h et 9 h post-infection (14 Ct). Aucune variation de Ct n'a été constaté entre 9 h et 12 h après l'infection (Figure 32 (B)).



(A) MOI 0,1



(B) MOI 0,01

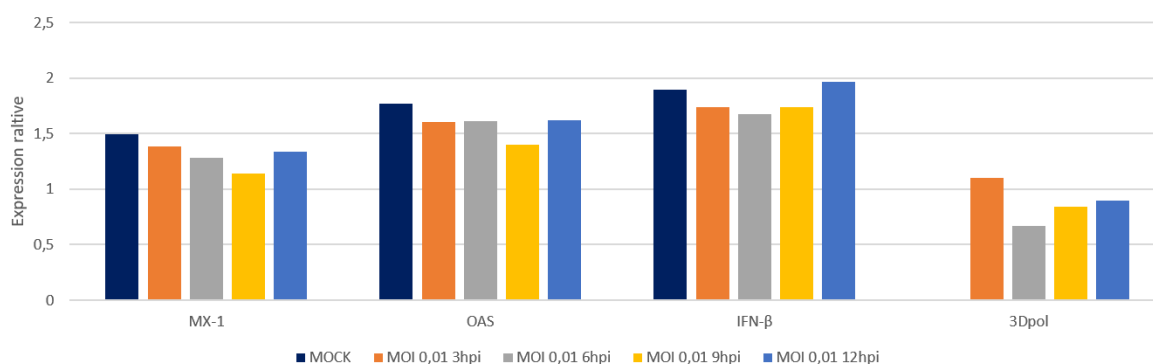


Figure 32 : **Activation de la voie IFN de type I après infection de cellules DSP bovines par le FMDV.** Le niveau d'expression associé à l'IFN- β , ainsi qu'aux ISG OAS, PKR et MX-1 dans des cellules DSP bovines infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 ou 0,01, ou du milieu conditionné, a été évalué par *rtRT-PCR*. Les données présentées correspondent au niveau d'expression relative prenant en compte les valeurs de Ct du gène de ménage β -actine associées à chacun des échantillons. (A) Résultats correspondant aux cellules infectées à la MOI 0,1. (B) Résultats correspondant aux cellules infectées à la MOI 0,01.

Les lysats cellulaires obtenus dans le cadre de ces suivis d'infection en DSP bovines ont été analysés par Western-Blot afin de réaliser une cinétique d'apparition de la 3D^{pol} et des protéines cellulaires IKK ϵ et NEMO (Figure 33 (A)). L'incubation des lysats protéiques, avec un anticorps anti- β -actine, a permis de visualiser une bande correspondant à la β -actine, aussi bien pour le contrôle positif constitué d'un lysat de cellules HEK293T connu pour être positif en β -actine, que pour les conditions MOCK et les lysats de cellules infectées à la MOI 0,1 et 0,01, à l'exception du prélèvement réalisé à 12 h post-infection à la MOI la plus faible certainement concerné par un

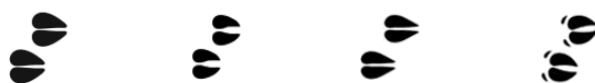


problème technique. Ce point de cinétique ne sera donc pas pris en compte dans la suite de l'analyse.

En ce qui concerne la protéine 3D^{pol}, l'immunomarquage impliquant l'anticorps 3F12 a permis de mettre en évidence la présence de la protéine virale dans le contrôle positif ainsi que dans les échantillons issus de l'infection des DSP bovines à la MOI 0,1, récoltés à partir de 3h30 post-infection (Figure 33 (B)). Une augmentation de l'intensité des bandes associées à la 3D^{pol} (52 kD) a pu être observée entre 3h30 et 7 h post-infection, puis une diminution entre 7 h et 9 h. Aucun signal correspondant à la 3D^{pol} n'a pu être détecté dans les lysats issus de la condition MOCK ou du prélèvement effectué à 3 h post-infection. Au sujet de l'infection des DSP bovines à la MOI 0,01, la présence de 3D^{pol} a pu être révélée dans les échantillons récoltés à 3 h, 6 h et 9 h post-infection, avec une bande nettement plus intense pour le prélèvement réalisé 9 h après l'inoculation.

Similairement à ce qui avait été montré à partir des lysats de cellules ZZ-R127 infectées, la recherche de la protéine NEMO a permis de mettre en évidence la présence d'une bande à la taille attendue de 46 kD pour l'intégralité des échantillons analysés, aussi bien pour le suivi d'infection à la MOI 0,1, que celui à la MOI 0,01 (Figure 33 (C)). Cette fois-ci, en revanche, aucune variation notable de l'intensité de ces bandes n'a pu être mise en évidence au cours de la cinétique.

De même, après incubation des membranes de Western-Blot avec un anticorps anti-IKK ϵ , une bande correspondant à la taille attendue de la protéine, soit environ 80 kD, a pu être observée pour l'ensemble des échantillons testés (Figure 33 (D)). Alors que ces bandes ont semblé moins intenses en ce qui concerne les échantillons issus de l'infection à la MOI 0,01, la plus faible intensité associée au contrôle positif sur cette membrane par rapport au même contrôle positif présenté sur l'autre membrane indique qu'il s'agit là probablement d'un phénomène lié à la révélation. Une nouvelle



fois, des bandes d'intensité importante et n'ayant que très peu migré ont pu être détectées dans les lysats issus des cellules infectées et MOCK. Afin de tenter de percer à jour ce phénomène, il a été décidé de réaliser une nouvelle migration des échantillons concernés sur un gel de polyacrylamide très peu concentré (données non présentées). Ces bandes de forte intensité ont ainsi pu être légèrement discriminées par leur taille mais il n'a pas été possible de prouver qu'il s'agissait effectivement de multimères de la protéine d'intérêt. L'intensité de ces bandes étant variables au cours de la cinétique, il n'est toutefois que peu probable qu'il s'agisse d'un signal aspécifique.

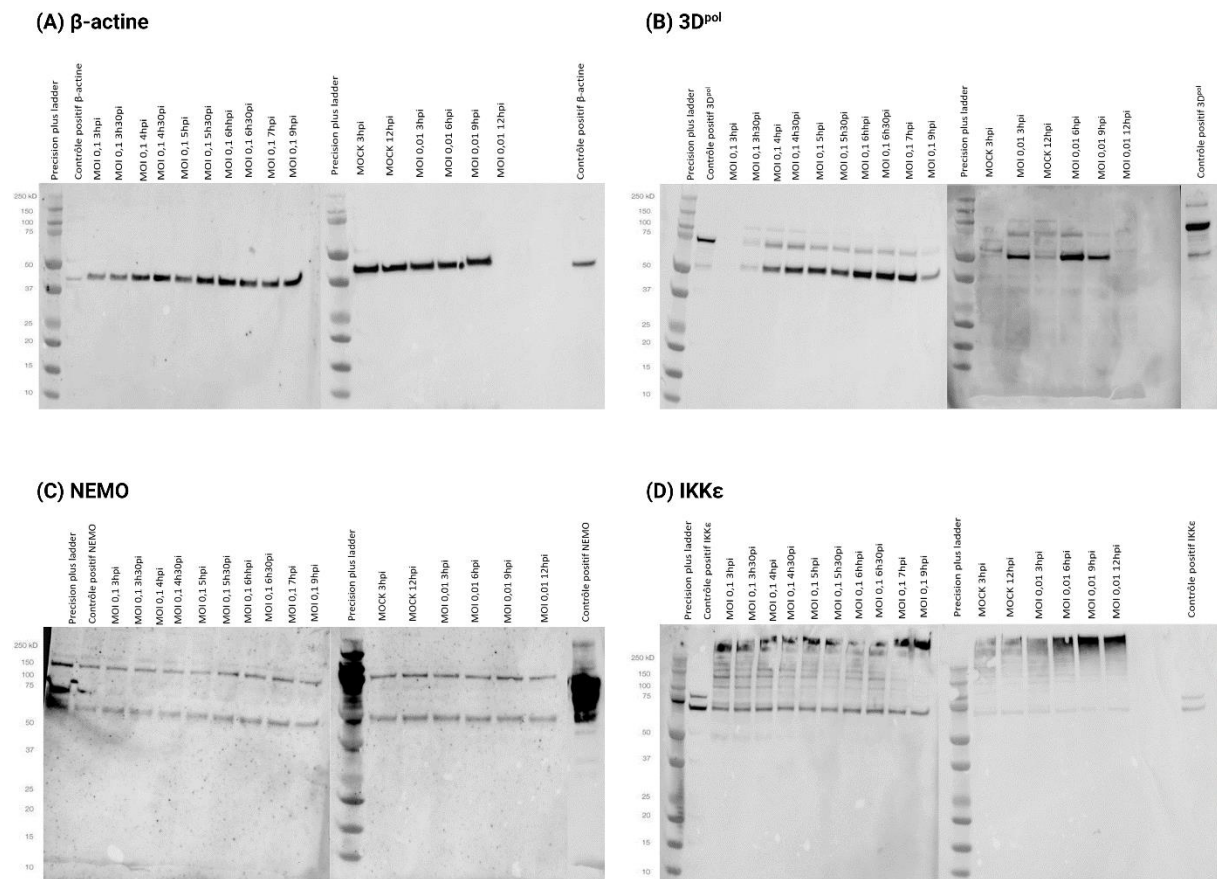


Figure 33 : Cinétique de détection des protéines d'intérêt lors de l'infection de cellules DSP bovines. Des cellules DSP bovines ont été infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1 ou 0,01, ou du milieu conditionné. De 3 h à 9 h post-infection, des lysats protéiques ont été réalisés toutes les trente minutes. Ces lysats ont été analysés par Western-Blot afin de détecter les protéines β -actine, $3D^{pol}$, NEMO et IKK ϵ . (A) Révélation à l'aide d'un anticorps anti- β -actine. (B) Révélation à l'aide d'un anticorps anti- $3D^{pol}$. (C) Révélation à l'aide d'un anticorps anti-NEMO. (D) Révélation à l'aide d'un anticorps anti- $IKK\epsilon$.



En prenant en compte l'ensemble des analyses menées à partir des lysats de DSP bovines infectées, il semble possible de détecter la présence simultanée de la 3D^{pol} ainsi que des protéines cellulaires d'intérêt entre 3 h et 9 h post-infection dans les cellules DSP bovines, avec une détection optimale de la 3D^{pol} entre 3 h et 7 h post-infection à la MOI 0,1 et à environ 6 h post-infection pour la MOI 0,01.

Après avoir identifié l'intervalle de temps durant lequel les protéines 3D^{pol}, NEMO et IKK ϵ étaient co-exprimées au cours de l'infection des cellules ZZ-R127 et DSP bovines par le FMDV, il a été décidé d'effectuer de premiers essais d'immunoprécipitation visant à détecter les interactions 3D^{pol} - NEMO et 3D^{pol} - IKK ϵ en cellules ZZ-R127. La mise au point des conditions de transfection d'ADN dans ces cellules n'ayant pas été achevée à temps, la solution intermédiaire envisagée, à savoir surexprimer un des deux interactants, n'a pas pu être testée. Ainsi, ces essais ont été réalisés en contexte d'infection et sans surexpression des protéines d'intérêt. Afin de maximiser les chances de capture de l'interaction protéique et de minimiser le bruit de fond associé à la technique d'immunoprécipitation, il a été choisi d'utiliser des billes superparamagnétiques couplées de manière covalentes à la protéine G (DynabeadsTM Protein G). Ces protéines possèdent une affinité importante pour les IgG de classe 1, famille d'immunoglobulines dont fait partie l'anticorps 3F12 dirigé contre la 3D^{pol}. Les conditions de couplage des anticorps sur ces billes étant hautement dépendantes de l'anticorps utilisé, une gamme de dilution de l'anticorps a été testée afin d'identifier la concentration d'anticorps 3F12 optimale à utiliser (Figure 34). Deux durées d'incubation ont également été testées pour estimer le temps nécessaire au couplage en fonction de la concentration d'anticorps. Lors de la lecture de l'absorbance associée aux différents échantillons, il a été observé d'importantes variations en fonction de la dilution d'anticorps et du temps d'incubation. La condition semblant la plus



intéressante, incubation des Dynabeads™ Protein G pendant trente minutes, en présence d'anticorps 3F12 dilué au 1/10, a permis d'obtenir une valeur d'absorbance plus de deux fois plus importante que celles associées aux autres conditions. Seule la condition impliquant une incubation des billes pendant une heure, en présence d'anticorps 3F12 dilué au 1/50 a conduit à la mesure d'une absorbance moins de deux fois inférieure à la condition optimale.

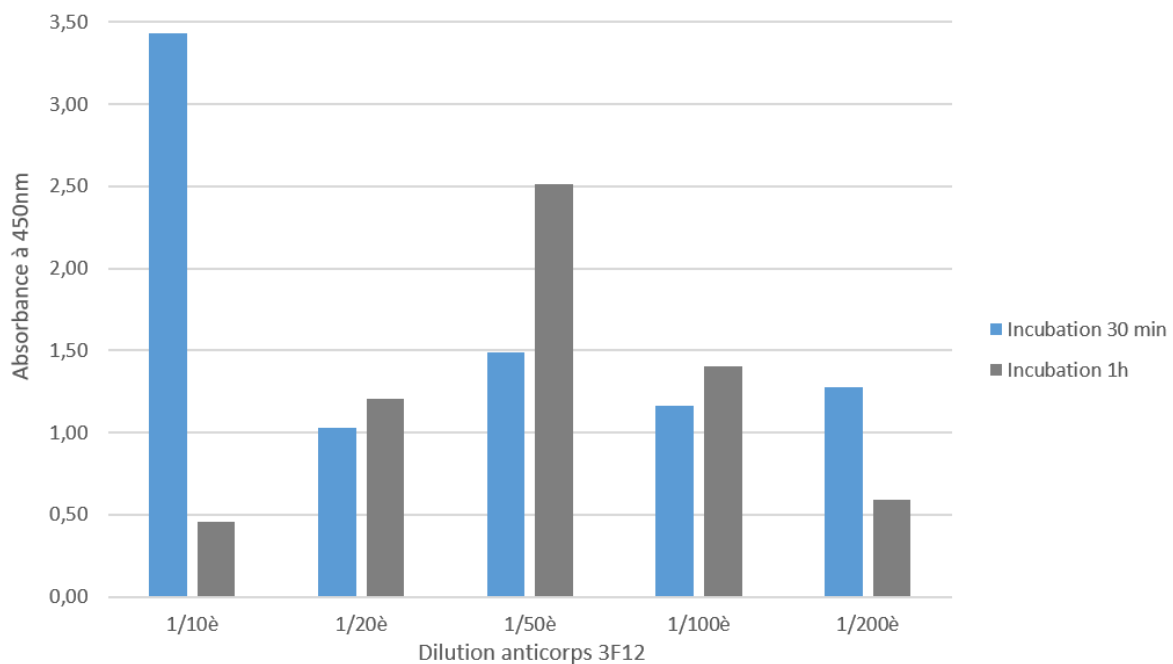


Figure 34 : Optimisation des conditions de couplage Dynabeads™ Protein G-anticorps 3F12.
Des Dynabeads™ Protein G ont été incubées en présence d'une gamme de dilution d'anticorps 3F12 pendant 30 min ou 1 h. Les complexes billes-anticorps ont ensuite été incubés en présence d'un anticorps secondaire couplé à l'HRP. L'efficacité du couplage a été déterminée par lecture de l'absorbance à 450nm.

Les conditions de couplage déterminées précédemment ont été suivies afin de réaliser un essai d'immunoprécipitation de la 3D^{pol} visant à co-précipiter les protéines cellulaires interagissant avec la polymérase virale. Des cellules ZZ-R127 ont ainsi été infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1, avant d'être récoltées quatre heures plus tard, puis lysées afin d'obtenir des lysats protéiques. Une partie de ces lysats a fait l'objet d'une immunoprécipitation, tandis que l'autre partie a été conservée sous forme de lysat protéique total. Les lysats totaux ainsi que les



échantillons obtenus après immunoprécipitation ont été analysés par Western-Blot ciblant la 3D^{pol}, ainsi que les interactants cellulaires recherchés, à savoir NEMO et IKK ϵ (Figure 35). La coloration des membranes de Western-Blot au rouge Ponceau a permis de mettre en évidence la présence de nombreuses bandes correspondant aux lysats protéiques totaux, alors que seules deux bandes d'environ 25 et 50 kD ont pu être observées à partir des lysats obtenus après immunoprécipitation avec l'anticorps 3F12 (Figure 35 (A)). La recherche de la 3D^{pol} par immunodétection a conduit à la détection d'une bande correspondant à la taille de la protéine virale, à savoir 52 kD, à partir du lysat total de cellules ZZ-R127 infectées (Figure 35 (B)). Aucune bande similaire n'a été identifiée à partir du lysat total provenant de la condition MOCK. En ce qui concerne les échantillons ayant été immunoprécipités avec l'anticorps 3F12, une bande importante pouvant correspondre à la 3D^{pol} a pu être visualisée pour les cellules infectées. En revanche, aucune bande équivalente n'a été révélée suite à l'immunoprécipitation des conditions MOCK. Après incubation des membranes avec un anticorps anti-NEMO, des bandes correspondant à la taille attendue de 46 kD, ont pu être visualisées de manière similaire dans les lysats totaux réalisés à partir des cellules infectées et MOCK (Figure 35 (C)). Une bande semblable a également pu être détectée après immunoprécipitation des échantillons infectés, contrairement aux échantillons MOCK. En ce qui concerne la recherche de la protéine IKK ϵ , il a été possible d'observer des bandes à la taille attendue de 80 kD dans les lysats totaux infectés ou non. En revanche, aucun signal correspondant n'a pu être mis en évidence après immunoprécipitation de la protéine 3D^{pol} (Figure 35 (D)).



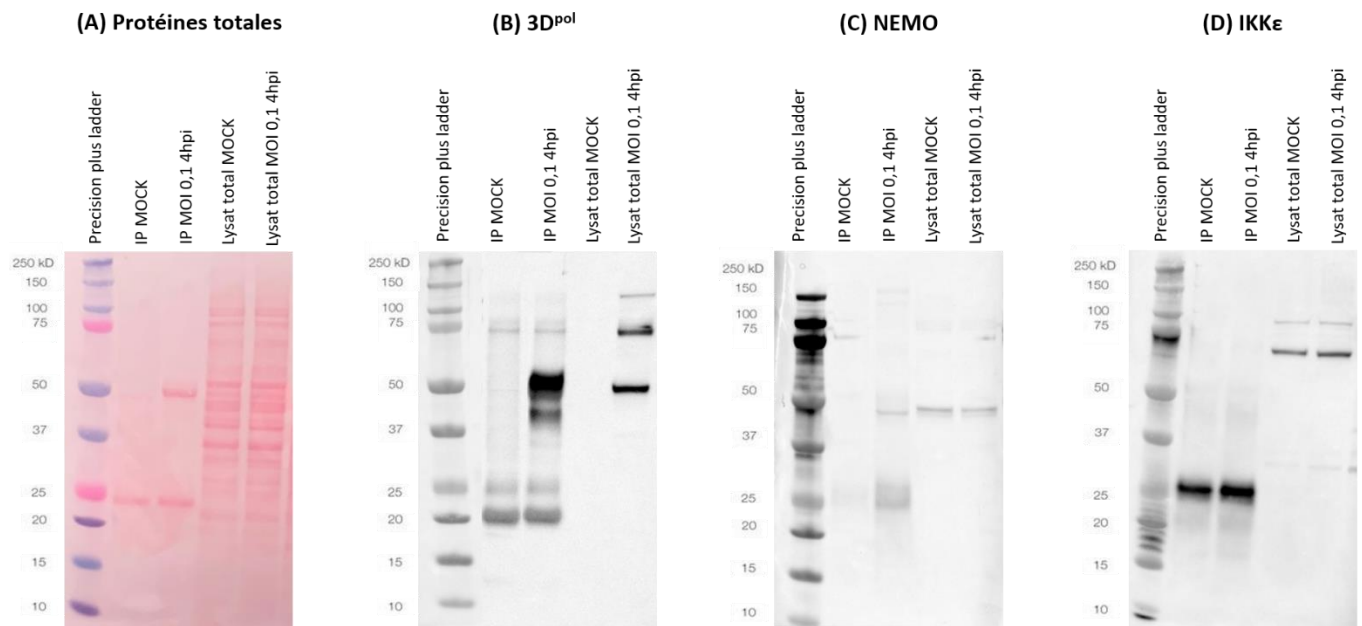


Figure 35 : Recherche d'interactions protéine-protéine en contexte infectieux en cellules ZZ-R127. Des cellules ZZ-R127 ont été infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2 à la MOI 0,1, ou du milieu conditionné. Des lysats protéiques ont été réalisés quatre heures après infection. Une fraction de ces lysats a été conservée (lysat total), tandis que l'autre fraction a fait l'objet d'une immunoprécipitation (IP) sur Dynabeads™ Protein G couplées à l'anticorps 3F12 anti-3D^{pol}. Les lysats totaux ainsi que les IP ont été analysés par Western-Blot afin de détecter les protéines 3D^{pol}, NEMO et IKKε. (A) Marquage des protéines totales au Rouge Ponceau. (B) Révélation à l'aide d'un anticorps anti-3D^{pol}. (C) Révélation à l'aide d'un anticorps anti-NEMO. (D) Révélation à l'aide d'un anticorps anti-IKKε.

Discussion et perspectives de la partie III

Dans la lignée des objectifs qui avaient été fixés, cette troisième partie de la thèse PersIFA a permis de sélectionner puis d'évaluer une dizaine de réactifs d'immunodétection adaptés aux quatre espèces d'étude. Alors que les anticorps développés pour l'étude de protéines bovines, ovines, caprines et porcines représentent une part infinitésimale du marché, il a été extrêmement ardu d'identifier des références potentiellement intéressantes au regard de nos objectifs. Les prédictions de réactivité par analyses bio-informatiques nous ont permis de faire une première sélection d'anticorps à tester. Malgré le caractère purement informatif de ces prédictions, il était nécessaire d'avoir un premier indicateur puisqu'il était absolument impossible, pour des raisons de temps et de coûts, de tester l'intégralité des références commerciales disponibles. Parmi les dix références testées, les anticorps dirigés contre MAVS et



MDA5 n'ont pas permis de détecter les protéines d'intérêt, ni sous leurs formes surexprimées, ni sous leurs formes endogènes. Les anticorps anti-IKK α et anti-IRF3 ont conduit à la détection des protéines endogènes, mais pas à celle des formes surexprimées. La référence ciblant IRF7 a permis la reconnaissance des formes ovine, caprine et porcine, mais pas de la forme bovine de la protéine. Les anticorps dirigés contre IKK ϵ , NEMO et TRAF3 ayant détecté les protéines surexprimées provenant des quatre espèces d'étude, ont, eux, été validés. Aucune interaction n'ayant été confirmée entre TRAF3 et 3D^{pol}, seuls les anticorps anti-IKK ϵ et anti-NEMO ont été utilisés dans le cadre des essais de validation des interactions protéiques en contexte infectieux.

Alors que MAVS, protéine décrite dans la première partie de ces travaux de thèse comme impliquée dans une interaction spécifique de l'hôte porcin avec la 3D^{pol} du FMDV, faisait figure de cible prioritaire, aucun anticorps adapté n'a pu être identifié (456). Parmi les références disponibles dans le commerce, aucune de celles étudiées ne possédait une réactivité prédite supérieure à 63 % par rapport aux espèces étudiées, représentant ainsi de faibles chances de succès. Au regard du caractère particulier de l'interaction 3D^{pol}-MAVS, la production d'un anticorps polyclonal anti-MAVS a été initiée au laboratoire. Pour ce faire, il a été décidé de produire la forme bovine de la protéine MAVS dont la séquence est la plus conservée entre les quatre espèces d'étude. Afin d'obtenir la protéine d'intérêt sous une forme la plus proche possible de sa forme naturelle et en quantité suffisante pour immuniser des lapins, il a été choisi de réaliser la production en cellules de mammifères *via* le système vaccine (485). Une suspension de virus recombinant exprimant la protéine MAVS a pu être produite et titrée. Cette protéine a été retrouvée dans les culots cellulaires ainsi que dans les suspensions cellulaires en PBS ayant servi à décoller les cellules mais pas dans les surnageants de culture. Ces observations sont totalement cohérentes avec la localisation subcellulaire



de la protéine MAVS qui n'est pas connue pour être sécrétée mais plutôt pour être présente au niveau des membranes mitochondriales externes (493). La mise au point du système d'expression par le virus de la vaccine étant à adapter à chaque protéine, les essais d'optimisation de la production et de la purification de MAVS sont encore en cours. En effet, au regard des derniers résultats obtenus, deux problèmes majeurs subsistent. Il apparaît ainsi que la quantité de protéine obtenue à partir des virus recombinants sélectionnés est extrêmement limitée, en comparaison à d'autres protéines produites à partir de la même méthode au laboratoire. Cette faible efficacité de production rend, de fait, inenvisageable l'immunisation d'un lapin dans ces conditions. Dans le cadre de la production d'une autre protéine du FMDV, il a été récemment observé une importante diminution de l'efficacité de production de la protéine d'intérêt à la suite de l'étape de clonage des virus recombinants. En conséquence, des analyses sont prévues concernant les autres protéines pour lesquelles des problèmes d'expression ont été observés. Il pourrait alors être envisagé de se passer de l'étape de clonage et d'utiliser les virus recombinants immédiatement après leur sélection. La faible quantité de protéine produite pourrait être à l'origine des difficultés rencontrées concernant le décrochage de la protéine MAVS des billes anti-Flag puisqu'il semblerait qu'une quantité résiduelle reste accrochée sur les billes malgré l'ajout du peptide 3X Flag.

En attendant de disposer d'un anticorps anti-MAVS fonctionnel, une méthode de validation des interactions protéiques, précédemment mises en évidence par approche Nanoluciférase et chromatographie d'affinité, a été développée en contexte d'infection de cellules sensibles par le FMDV. Alors que la réalisation d'essais visant à détecter l'interaction entre la protéine virale surexprimée et la protéine cellulaire endogène, et inversement, était dans un premier temps envisagée, les difficultés rencontrées lors de



la transfection des cellules ZZ-R127 et DSP bovines ne nous a pas permis de réaliser cette étape. En effet, il est apparu que les DSP bovines ne survivaient pas à la transfection impliquant un agent lipofectant, y compris lors de l'utilisation de JetOPTIMUS®, pourtant adapté aux cellules primaires difficiles à transférer (494). Afin de disposer de cellules pertinentes pour l'étude du FMDV qui soient transfectables, de nouveaux essais doivent être réalisés afin de tester d'autres types d'agents transfectant tels que le phosphate de calcium, régulièrement utilisé dans le cadre de manipulations portant sur des cellules primaires (495). En ce qui concerne les cellules ZZ-R127, alors que nous avons pu déterminer des conditions de lipofection permettant une efficacité de transfection satisfaisante, ce n'était pas encore le cas lorsque nous souhaitions mettre en place les essais de validation des interactions protéiques en cellules sensibles au FMDV. Il a donc été décidé de procéder à la validation des interactions protéine-protéine directement à partir des protéines endogènes en contexte d'infection en cellules ZZ-R127 et DSP bovines, à l'aide des anticorps anti-IKK ϵ et anti-NEMO précédemment sélectionnés.

Avant de pouvoir passer à la mise au point du protocole d'immunoprécipitation des protéines d'intérêt, il était nécessaire de s'assurer qu'elles pouvaient être détectées de manière simultanée. Des cellules ZZ-R127 et DSP bovines ont été infectées par le FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2, puis la phase précoce de l'infection a été suivie afin de monitorer l'activation de la réponse IFN de type I et de réaliser une cinétique d'apparition et de détection des protéines impliquées dans les interactions étudiées, à savoir IKK ϵ , NEMO et la 3D^{pol}.

L'analyse de l'expression des ISG MX-1 et OAS par rtRT-PCR a permis de confirmer l'activation de la réponse IFN de type I dans les DPS bovines suite à l'infection aux MOI 0,1 et 0,01. En revanche, aucune activation notable n'a pu être associée à l'infection des



cellules ZZ-R127 à la MOI 0,1. L'analyse de l'activation de cette voie de réponse antivirale après traitement au poly-IC n'a toutefois pas non plus permis de mettre en évidence une forte augmentation de l'expression de ces ISG. Il se pourrait ainsi que la réponse IFN de type I soit plus modérée dans ces cellules, ou plus longue à se mettre en place que dans les DSP bovines. Le cycle de réplication du FMDV étant extrêmement court, il est envisageable que l'infection n'ait pas laissé suffisamment de temps aux ZZ-R127 pour déployer leur réponse antivirale (199). Il pourrait ainsi s'avérer pertinent de renouveler cette expérience en infectant ces cellules à une MOI plus faible, permettant l'induction d'un ECP plus limité et rendant de fait possible la réalisation d'une cinétique plus longue. La détection de la 3D^{pol} pourrait toutefois être rendue potentiellement plus difficile si l'inoculum de départ est moins concentré.

En ce qui concerne la cinétique d'apparition des protéines d'intérêt, IKK ϵ , NEMO et la 3D^{pol}, il a été montré qu'elles pouvaient être détectées de manière simultanée, aussi bien lors de l'infection des ZZ-R127 à la MOI 0,1 que lors de celle des DSP bovines aux MOI 0,1 et 0,01. Au regard des résultats obtenus concernant la détection des protéines NEMO et IKK ϵ en cellules ZZ-R127, aucun signe d'activation de leur synthèse n'a été révélé au cours de cette cinétique d'infection. A l'inverse, une tendance de diminution de la quantité de la protéine NEMO détectée a pu être observée. Ce phénomène pourrait notamment être associé au clivage de cette protéine cellulaire médié par la protéase 3C du FMDV (496). Malgré l'absence d'activation de l'expression des protéines impliquées dans la voie IFN de type I au cours de la cinétique réalisée, la présence simultanée de la 3D^{pol} et des protéines cellulaires d'intérêt a pu être détectée entre 3h30 et 6 h post-infection. Un constat similaire a pu être dressé à partir des résultats des cinétiques impliquant les DSP bovines. En effet, dans ces cellules, les protéines d'intérêt ont été toutes les trois détectées entre 3h30 et 9 h post-infection à la MOI 0,1, avec une détection optimale entre 4 h 30 et 7 h post-infection. La période



de détection optimale associée à l'infection de ces cellules à la MOI 0,01 a, elle, été définie autours de 6 h post-infection. Il semblerait judicieux de rechercher les interactions protéiques à valider dans les échantillons prélevés entre 4 h et 6 h après l'infection. Afin de pouvoir, à terme, procéder à la validation des interactions protéiques dans les différents hôtes étudiés à travers ces travaux de thèse, il semblerait intéressant de réaliser des travaux analogues à partir des cellules primaires ovines et porcines développées dans la deuxième partie de cette thèse (*cf.* Développement de modèles cellulaires d'intérêt pour l'étude de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse).

Pour le moment, l'objectif de validation des interactions protéiques repose sur l'utilisation des cellules ZZ-R127 et DSP bovines, qui sont plus faciles à cultiver que les cellules DSP et PT ovines ainsi que les DSP porcines. La réalisation des cinétiques d'apparition des protéines d'intérêt lors de l'infection des ZZ-R127 et DSP bovines a permis d'identifier un intervalle de temps durant lequel il serait envisageable d'effectuer une immunoprécipitation. Des tests de couplage billes-anticorps anti-3D^{pol} ont conduit à l'identification des conditions optimales pour la préparation des billes servant à l'immunoprécipitation. Pour l'heure, un seul essai a pu être effectué à partir des conditions préalablement définies. Au contraire de ceux réalisés avant la mise au point du protocole, celui-ci a permis de détecter la 3D^{pol} après immunoprécipitation des échantillons infectés. De plus, une faible quantité de la protéine NEMO a également pu être détectée, signe d'une co-précipitation de cette protéine cellulaire avec la 3D^{pol}, révélant une potentielle interaction entre ces deux protéines dans les cellules ZZ-R127 infectées. En revanche, aucun signe de co-précipitation de l'autre interacteur testé, à savoir IKKε n'a pu être observé. Au regard des résultats obtenus, il semblerait que les protéines virales et cellulaires d'intérêt aient tendance à rester fixées



sur les billes couplées à l'anticorps 3F12. Il paraît ainsi opportun de poursuivre les essais d'optimisation de ce protocole en déterminant de meilleures conditions d'élution. Un grand nombre d'autres paramètres pourraient encore être modifiés afin d'optimiser cette méthode, tels que la quantité de lysat protéique utilisé pour l'immunoprécipitation, le temps d'incubation du lysat sur les billes couplées à l'anticorps, la vitesse de rotation, ou encore les conditions de dénaturation. De fait, il n'est actuellement pas possible de conclure quant à l'existence ou non des interactions 3D^{pol}-IKKε et 3D^{pol}-NEMO en contexte infectieux en cellules ZZ-R127.

Les conditions d'immunoprécipitation optimales étant dépendantes de chaque anticorps utilisé, en particulier en ce qui concerne l'étape de couplage, il est difficilement envisageable de mettre en place un contrôle positif impliquant une autre interaction protéique. Parmi les méthodes alternatives permettant d'étudier fonctionnellement des interactions protéiques, les approches de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) sont peu envisageables puisqu'elles ne permettent pas l'étude des interactions entre les protéines endogènes, nécessitent une surexpression des deux interacteurs sous forme de protéines-fusion et reposent généralement sur une lecture par microscopie confocale dont nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, dans le laboratoire confiné fièvre aphteuse (497). En revanche, des essais de ligature de proximité (PLA, pour *Proximity Ligation Assay*) permettant de détecter *in situ* des interactions entre les protéines endogènes, pourrait être envisagé. Le recours à une telle méthode serait d'autant plus intéressant qu'il existe des kits de détection adaptés à la réalisation de PLA sur des coupes histologiques fixées et incluses en paraffine. Il serait alors imaginable de pouvoir étudier les interactions protéiques à partir de coupes histologiques réalisées lors d'essais d'infection de cellules primaires d'intérêt cultivées en multicouche à l'interface air-liquide. Cela permettrait ainsi de comparer les interactions observées lors d'une infection aiguë et lors d'une infection persistante par



le FMDV des cellules d'intérêt telles que les DSP bovines, et d'identifier de potentiels liens entre interactions protéiques et persistance virale. Toutefois, cette méthode nécessite de disposer d'anticorps permettant la détection spécifique des deux protéines d'intérêt. Bien que des anticorps polyclonaux aient été validés pour les cibles IKK ϵ et NEMO, ces derniers ne sont peut-être pas assez spécifiques pour la mise au point d'une méthode aussi sensible que la PLA, et risqueraient d'induire de faux négatifs.



Discussion générale & perspectives

Bien que décrite il y a plus de cinq cents ans, la fièvre aphteuse figure encore aujourd'hui parmi les maladies les plus importantes en santé vétérinaire, comme en atteste sa présence dans l'article 5 de la nouvelle Loi de Santé Animale parue en 2021. Ceci s'explique notamment par son impact socio-économique considérable en cas d'épizootie (23,29). Alors que certaines régions du globe sont actuellement indemnes avec ou sans vaccination, l'objectif d'éradication mondiale de cette maladie à l'horizon 2030, annoncé par l'OMSA a été reconsidéré en raison des nombreux obstacles rencontrés. En effet, la fièvre aphteuse affecte essentiellement les pays en développement qui ne disposent pas toujours des ressources nécessaires à la surveillance épidémiologique ainsi qu'à la mise en place des méthodes de prévention et de lutte contre cette maladie. Certaines contraintes sont, elles, directement liées à l'agent étiologique de la fièvre aphteuse. C'est notamment le cas de l'absence de protection croisée entre les sérotypes et de la persistance du virus dans l'organisme des ruminants pendant plusieurs mois, voire années, après la résolution des signes cliniques (199,209). Malgré des décennies de recherche, les mécanismes responsables de l'infection persistante par le FMDV sont encore largement méconnus. Parmi les hypothèses envisagées figure la création d'un équilibre entre la multiplication du virus et la réponse antivirale de l'hôte. Cette hypothèse est soutenue par la démonstration d'une coévolution entre le virus et son hôte, par la mise en évidence de phénomènes de modulation de l'immunité cellulaire médiée par le virus, ainsi que par les conclusions du projet européen Transcriptovac, indiquant que l'infection persistante de cellules primaires bovines DSP, cultivées en multicouches, s'accompagne d'une réponse IFN de type I durable mais diminuée et inefficace pour éliminer le virus (284–288).



Ces travaux de thèse ont eu pour objectif d'identifier des interactions entre les protéines du FMDV et les protéines impliquées dans la réponse IFN de type I, pouvant contribuer à l'établissement et/ou au maintien de l'infection persistante. La persistance du FMDV étant décrite chez les bovins, ovins et caprins mais pas chez les porcins, une attention particulière a été portée à la détermination de la spécificité d'hôte de ces interactions, aspect rarement pris en considération dans la littérature (42).

Dans un premier temps, les interactions entre les protéines du FMDV et seize protéines impliquées dans la réponse IFN de type I provenant de quatre espèces d'intérêt (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus* et *Sus scrofa*) ont été identifiées par approche *NanoLuc-2-Hybrid*. Les interactions concernant la 3D^{pol}, protéine dont le rôle dans la subversion de la réponse immunitaire n'est que très peu documenté, ont ensuite été éprouvées par chromatographie d'affinité. Nous avons ainsi montré que les interactions entre la 3D^{pol} et IKK α , IKK ϵ , IRF3, IRF7, MDA5 et NEMO étaient conservées entre les quatre espèces d'étude, tandis que l'interaction entre la 3D^{pol} et MAVS semble, elle, spécifique à la forme porcine de la protéine (456). L'effet inhibiteur de la 3D^{pol} du FMDV sur la phase d'induction de la réponse IFN de type I a également été mis en évidence *via* des essais rapporteurs luciférase. Les interactions décrites à travers nos travaux font actuellement l'objet d'une étude, par approche « fragmentome », visant à déterminer les domaines de la 3D^{pol} nécessaires à ces interactions.

Le rôle potentiellement sous-estimé de la 3D^{pol} du FMDV dans la lutte contre la réponse antivirale, fait sens au regard des interactions mises en évidence entre les polymérases de divers picornavirus et des protéines impliquées dans l'immunité innée. C'est notamment le cas de la 3D^{pol} du Poliovirus, décrite comme interagissant avec



Sam68, de la 3D^{pol} du CVB3, décrite comme interagissant avec MDA5, de la 3D^{pol} de EV71, décrite comme interagissant avec MDA5 et NLRP3, ou encore de la 3D^{pol} du SVV également décrite comme interagissant avec NLRP3 (459–462). La 3D^{pol} du FMDV pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique souvent négligée jusqu’alors. De manière intéressante, il a pu être montré que l’immunisation de porcs à l’aide d’un virus de la vaccine exprimant la 3D^{pol} du FMDV leur avait conféré une immunité partielle contre le virus (387). De plus, ces travaux ont indiqué que cette protection partielle pouvait être corrélée à la reconnaissance d’épitopes de la 3D^{pol} par les lymphocytes T lors de l’infection, ouvrant la voie à une possible utilisation de ces épitopes dans la conception de vaccins sous-unitaires synthétiques dirigés contre la fièvre aphteuse.

Bien qu’aucun lien direct n’ait pu être fait dans cette étude entre les interactions protéiques impliquant la 3D^{pol} et la persistance virale, il est tout de même intéressant de replacer l’éventuel rôle de cette polymérase virale dans le contexte des différentes hypothèses proposées pour expliquer les phénomènes de persistance. Lors d’une infection persistante les titres viraux associés aux probang sont généralement faibles et inconstants. Ces observations pourraient être corrélées à une activité de réplication limitée du FMDV, due à une activité catalytique réduite de la 3D^{pol}. Les différents niveaux de réplication associés à l’infection aiguë d’une part et à l’infection persistante d’autre part, pourraient s’expliquer par la mise en place d’interactions protéiques régulant l’activité de la 3D^{pol}, ou au contraire par le délaissement de l’activité catalytique de la protéine 3D^{pol} au profit d’interactions protéiques permettant de contrer la réponse immunitaire de l’hôte afin de persister dans son organisme. En outre, il a été proposé que l’infection persistante soit associée à un cycle viral non lytique impliquant le détournement d’autophagosomes pour permettre au virus de sortir de la cellule (275,276). La voie IFN de type I étant étroitement liée aux



mécanismes d'autophagie et d'apoptose, en témoigne la capacité de la protéine MAVS à stimuler ces deux processus biologiques, il est possible que les interactions entre la 3D^{pol} et les protéines impliquées dans la voie IFN de type I puissent avoir des répercussions sur l'autophagie et plus particulièrement le détournement des autophagosomes (498,499). La subversion des structures de l'autophagie est également à l'origine de certaines organelles de réplication dans lesquelles le virus se réplique à l'abri des senseurs de la réponse antivirale (500). L'hypothèse de l'existence de formes de persistance dans des structures telles que les centres germinatifs et les ganglions lymphatiques a été confortée par la détection d'antigènes 3D^{pol} dans les MALT (279). En revanche, aucun signe de réplication virale n'a pu y être détecté. La 3D^{pol} occuperait ainsi un rôle non réplcatif dans ces structures, qui pourrait résider en la mise en place d'interactions protéiques visant à lutter contre la réponse antivirale. Alors qu'il avait également été envisagé que des mutations du génome viral au cours de l'infection puissent être à l'origine de la persistance du FMDV, des mutations de la 3D^{pol} ont pu être observées *in vivo*, dans le cadre du projet PersistOmics, suite à l'infection persistante de tissus bovins spécifiques (données internes au projet, non publiées).

Les interactions décrites dans cette première partie, à l'image de la totalité des interactions référencées dans la littérature entre le FMDV et la réponse antivirale de l'hôte, ont été mises en évidence grâce à des protocoles expérimentaux impliquant la surexpression des protéines testées (42,62,86,290). Plus d'une centaine d'interactions protéiques ont ainsi été mises en lumière. Toutefois, en prenant du recul, il est possible de se questionner quant à la significativité biologique de ce grand nombre d'interactions. En effet, la plupart des méthodes utilisées reposent uniquement sur la compatibilité biochimique des couples d'interacteurs testés. Les deux protéines étant



exprimées simultanément, en quantité importante et dans un espace restreint, l'interaction semble de fait grandement facilitée. Afin de s'assurer de la véracité des interactions identifiées, il est ainsi primordial de combiner les méthodes utilisées. Le moyen le plus fiable de vérifier l'existence d'une interaction demeure toutefois de l'étudier dans un cadre le plus proche possible du système biologique, c'est-à-dire en contexte infectieux, dans des cellules adaptées à l'étude du FMDV et sans induire la surexpression des protéines d'intérêt. Dans un tel contexte, la mise en place d'une interaction protéique ne repose plus uniquement sur la compatibilité biochimique des deux interacteurs mais également sur leur expression concomitante, leur distribution subcellulaire et sur la présence d'autres partenaires éventuels. Investiguer les interactions existant dans ces conditions n'est cependant pas chose aisée puisqu'il convient de disposer à la fois de modèles *in vitro* adaptés à l'étude de l'infection par le FMDV et de réactifs d'immunodétection permettant de reconnaître les protéines virales et cellulaires d'intérêt.

La seconde partie de cette thèse avait ainsi pour objectif de développer un modèle cellulaire adapté à l'étude du FMDV chez le porc et de poursuivre les travaux initiés concernant la mise en place d'un modèle cellulaire ovin. Dans cette optique, nous nous sommes largement inspirés des travaux de Hägglund *et al.* portant sur le développement d'un modèle de cellules DSP bovines cultivées en multicouches à l'interface air-liquide, de manière à mimer un épithélium pluristratifié infecté par le FMDV (289). Ces travaux ont notamment permis l'établissement d'un modèle d'infection persistante par le FMDV et la caractérisation des réponses transcriptionnelles de l'hôte lors de l'infection aiguë et persistante par le virus (288). Nous avons ainsi mis en culture et caractérisé des cellules épithéliales provenant de DSP porcin, un des sites de réplication primaire du FMDV chez le porc, ainsi que de



DSP et PT ovins, sites de réplication primaire et sites de persistance du virus chez l'ovine. La sensibilité de ces cellules primaires au FMDV a été évaluée en monocouches et en multicouches cultivées à l'interface air-liquide. L'infection de ces modèles a été suivie pendant plusieurs semaines afin de pouvoir identifier d'éventuels signes de persistance virale. Conformément à ce qui a été décrit *in vivo* chez le porc, aucun indicateur de persistance n'a pu être détecté lors de l'infection des DSP porcines (226). En revanche, contrairement aux observations réalisées *in vivo* chez l'ovine, l'infection des cellules primaires ovines n'a pas permis d'établir une infection persistante, le virus remportant systématiquement le rapport de force établi avec les cellules (196,501). Malgré cela, le développement de tels modèles cellulaires permet de compléter celui précédemment développé chez le bovin, offre l'opportunité d'étudier l'infection par le FMDV et rend possible la caractérisation des réponses transcriptionnelles des différents hôtes d'intérêt lors de l'infection par le virus. Bien que ces modèles soient amplement plus satisfaisants au regard de la physiopathologie du virus que le recours à des cellules de lignées provenant de tissus et ou d'espèces non adaptés à l'étude du FMDV, ils restent perfectibles. En effet, il a été proposé que le maintien de la persistance virale puisse être lié aux tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (263,323,333). Or, les modèles dont nous disposons ne contiennent que des cellules épithéliales et ne permettent pas d'apprécier la globalité de l'environnement naturel du virus. Le développement de modèles cellulaires associant cellules épithéliales et cellules immunitaires, tels que des organoïdes, permettrait ainsi une meilleure représentation des phénomènes observés *in vivo*, notamment en ce qui concerne les interactions entre le virus et son hôte. Le développement d'organoïdes, *i.e.* systèmes de culture tridimensionnelle au sein desquels des cellules de natures diverses s'auto-organisent en une structure complexe et présentant des caractéristiques proches des organismes biologiques, a permis des avancées considérables concernant l'étude de



certain entérovirus ou de virus respiratoires tels que les virus influenza et les coronavirus (447,450). Bien qu'aucun système de ce type n'ait fait l'objet d'une publication concernant le FMDV, il est tout à fait envisageable qu'il soit un jour possible de constituer un modèle d'épithélium stratifié associé à des tissus lymphoïdes comme c'est le cas dans l'organisme naturel afin d'étudier la physiopathologie du FMDV, la réponse de l'hôte, ainsi que les interactions virus-hôte lors de l'infection aiguë et persistante, de la manière la plus fidèle possible.

En attendant, les cellules primaires bovines, ovines et porcines mises en culture au laboratoire pourraient faire l'objet d'une immortalisation afin de produire des lignées cellulaires pertinentes pour l'étude du FMDV. De plus, il est prévu d'évaluer la sensibilité des DSP porcines à l'infection par d'autres virus concernés par le diagnostic différentiel de la fièvre aphteuse, tels que le SVV, le *Vesicular stomatitis virus* (VSV) ou le *Swine vesicular disease virus* (SVDV).

Le développement d'un modèle cellulaire caprin, bien que non essentiel en raison de l'existence de la lignée ZZ-R127, dérivée d'épithélium de langue de chèvre, pourrait être envisagé en vue de disposer de cellules comparables à celles obtenues à partir des hôtes bovin, ovin et porcin. La mise en place d'un modèle provenant de cellules de buffle africain pourrait également être considérée. En effet, bien qu'il s'agisse d'un bovin, la physiopathologie du FMDV chez le buffle, se traduisant essentiellement par des infections subcliniques ou des signes cliniques modérés, est éloignée de celle observée chez le bovin domestique (212). Cette espèce, connue comme particulièrement sujette aux co-infections *in vivo* et susceptible d'être infectée de manière persistante jusqu'à cinq ans, constitue ainsi un modèle d'étude intéressant au regard de la persistance du FMDV (131,132,274). L'infection du buffle africain par les sérotypes SAT a notamment été largement caractérisée par Maree *et al.*, mettant en lumière une corrélation entre la virulence et la capacité de ces souches à persister (145). Le développement d'un tel



modèle pourrait être accompagné par la construction d'une banque de vecteurs permettant l'expression des protéines impliquées dans la réponse IFN de type I, à l'image de celles réalisées pour le bovin, l'ovin, le caprin et le porc. Le génome du buffle africain n'étant actuellement pas complètement annoté, il est difficile de cloner avec certitudes les séquences codantes d'intérêt (502).

Toujours dans l'optique de pouvoir éprouver les interactions préalablement mises en évidence, dans un modèle cellulaire adapté, en contexte d'infection, la troisième partie de ces travaux de thèse avait pour objectifs d'identifier des réactifs d'immunodétection permettant de reconnaître les protéines cellulaires d'intérêt sous leur forme bovine, ovine, caprine et porcine, puis de mettre au point une méthode permettant la recherche d'interactions entre les protéines virales et endogènes. Parmi les dix références évaluées, seules trois ont permis de détecter les protéines IKK ϵ , NEMO et TRAF3 bovines, ovines, caprines et porcines. Les protéines IKK ϵ et NEMO ayant été démontrées comme impliquées dans des interactions avec la 3D^{pol} du FMDV, ces deux anticorps ont été utilisés afin de développer une méthode de confirmation des interactions protéiques en contexte infection par immunoprécipitation. Pour ce faire, des cinétiques d'apparition de la 3D^{pol} ainsi que des protéines cellulaires d'intérêt ont été réalisées afin de déterminer le moment durant lequel les protéines sont co-exprimées. Alors que le protocole d'immunoprécipitation doit encore être optimisé, il n'a pour l'heure pas été possible de confirmer les interactions préalablement démontrées dans la première partie de ces travaux de thèse. Ceci s'explique notamment par la difficulté d'induire une réponse IFN de type I importante étant donné la rapidité à laquelle le FMDV lyse le tapis cellulaire infecté. Il se pourrait ainsi que ces interactions n'aient pas lieu lors de la phase précoce de l'infection, mais à des temps plus tardifs. Très peu de données sont actuellement disponibles quant à la temporalité



des interactions établies entre le virus et son hôte. Gladue *et al.* ont toutefois montré que l'interaction entre la protéine 2C du FMDV et Beclin-1, extrêmement fugace, n'était détectée qu'entre 2h30 et 3h30 post-infection (300). Il semble ainsi important de considérer les interactions virus-hôte comme un équilibre dynamique, développé au cours de la coévolution des deux partenaires, et non comme un système figé. A certains moments de l'infection, le FMDV paraît ainsi capable d'établir des interactions facilitant sa réplication, en ciblant notamment les voies de l'autophagie. La stabilisation des autophagosomes et le blocage de la fusion aux lysosomes, médié par l'interaction 2C-Beclin-1 a notamment été décrit comme bénéfique à la réplication virale (503,504). Il semble parfois bénéfique au virus de mettre en place des interactions visant à stimuler la réponse inflammatoire de l'hôte, comme c'est le cas lors de l'interaction entre VP3 et TLR4, ou, à l'inverse, permettant de bloquer le déclenchement de la réponse IFN de type I comme c'est le cas lors de l'interaction entre 3B et RIG-I (505,506).

Il est ainsi tout à fait envisageable que certaines interactions protéiques spécifiques participent à l'établissement et/ou au maintien de l'infection persistante par le FMDV. Au vu des décennies de recherche consacrées à la compréhension des mécanismes de persistance du virus, il n'est toutefois que très peu probable que quelques interactions protéine-protéine soient à elles seules responsables de ce phénomène. De nombreux facteurs, tels que des interactions entre le virus et les différentes voies cellulaires (voie IFN, voies de l'autophagie, mécanismes d'apoptose), des phénomènes de régulations de la réplication virale, des mutations du génome viral ou encore des structures de persistance particulières, sont potentiellement impliqués dans la mise en place de ce phénomène complexe.



Afin de poursuivre les investigations concernant un lien éventuel entre les interactions protéiques identifiées et la persistance du FMDV, il serait extrêmement intéressant de réaliser une étude similaire à celle réalisée à partir du FMDV O/FRA/1/2001 Clone 2.2, en utilisant les souches SAT, caractérisées par Maree *et al.* et connues pour persister de manière importante chez le buffle africain (145). Les souches en question, isolées directement sur des buffles, n'étant actuellement pas disponibles au laboratoire, nous essayons de nous les procurer auprès de nos homologues sud-africains, malgré une certaine difficulté sur le plan des règles d'envoi de matériel biologique infectieux et d'échanges de souches. Il semblerait également judicieux de poursuivre l'étude des interactions mises en évidence entre la 3D^{pol} et les protéines impliquées dans la voie IFN de type I, afin d'une part de déterminer les domaines d'interaction, et d'autre part de s'assurer de l'existence de ces interactions lors de l'infection de cellules adaptées à l'étude du FMDV. Enfin, il paraît pertinent de poursuivre les essais d'infection à court et à long terme des modèles porcins et ovins développés dans le cadre de ces travaux de thèse, afin de pouvoir caractériser les réponses transcriptionnelles de ces modèles à l'infection par le FMDV et de comparer les résultats à ceux obtenus lors de l'infection des DSP bovines.

S'il n'a pas été possible, dans le cadre de ces travaux de thèse, de mettre en évidence un lien direct entre les interactions protéiques observées et la persistance du FMDV, la révélation de nouveaux antagonismes entre la 3D^{pol} et la voie IFN de type I pourrait conforter l'hypothèse impliquant un équilibre entre la présence du virus et la réponse de l'hôte. Dans l'attente de la détermination des mécanismes complexes à l'origine de l'établissement d'une infection persistante, il semble primordial d'améliorer les moyens de détecter les animaux porteurs sains. L'amélioration des connaissances relatives aux réponses transcriptionnelles et traductionnelles de l'hôte pourrait servir à l'identification des voies de signalisation impliquées dans la modulation de la réponse



antivirale médiée par le FMDV afin de proposer des pistes de contrôle thérapeutique. De manière plus spécifique, il pourrait ainsi être envisagé de rechercher des marqueurs prédictifs de l'infection persistante, tels que des ISG différentiellement exprimés entre l'infection aiguë et l'infection persistante. La détection précoce de l'infection persistante permettrait une prise en charge plus rapide de ces animaux, réduisant le risque de transmission associé aux porteurs sains. L'impact de la persistance virale sur le contrôle de la fièvre aphteuse serait alors grandement limité, facilitant la lutte contre la maladie.



Bibliographie

1. Sobrino F, Sáiz M, Jiménez-Clavero MA, Núñez JI, Rosas MF, Baranowski E, et al. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res.* 2001;32(1):1-30.
2. Fracastorius H. De sympathia et antipathia rerum liber unus. De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione. Libri III. Venecia-Italia : Heirs of L. Giunta., 1546;
3. FMD history [Internet]. [cité 22 févr 2023]. Disponible sur: https://www.picornaviridae.com/caphthovirinae/aphthovirus/fmdv/fmd_history.htm
4. Loeffler F, Frosch P. Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institute für Infektionskrankheiten in Berlin. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.* 1897;22(10/11):257-9.
5. Waldmann O, Pape J. künstliche Übertragung der Maul- und Klauenseuche auf das Meerschweinchen. *Berliner tierärztliche Wochenschrift.* 1920;36(44):519-20.
6. Vallée H, Carré H. Sur la pluralité du virus aphteux. *CR Acad Sci Paris* 174:1498–1500. 1922;
7. Waldmann O, Trautwein K. Experimentelle Untersuchungen über die Pluralität des Maul-und Klauenseuchevirus. *Berl Tierärztl Wschr.* 1926;42 (35): 569-571.
8. Brooksby JB. The Virus of Foot-and-Mouth Disease. In: Smith KM, Lauffer MA, éditeurs. *Advances in Virus Research* [Internet]. Academic Press; 1958 [cité 12 janv 2023]. p. 1-37. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352708606703>
9. Dhanda MR, Gopalakrishnan VR, Dhillon HS. NOTE ON THE OCCURRENCE OF ATYPICAL STRAINS OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN INDIA. *Ind J Vet Sci.* 1957;27: 79-84.
10. Paton DJ, Di Nardo A, Knowles NJ, Wadsworth J, Pituco EM, Cosivi O, et al. The history of foot-and-mouth disease virus serotype C: the first known extinct serotype? *Virus Evol.* 19 mars 2021;7(1):veab009.
11. Nocard EIE, Leclainche E. Les maladies microbiennes des animaux par Ed. Nocard et E. Leclainche. [Internet]. Masson; 1903 [cité 21 mars 2023]. Disponible sur: <http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/33411>
12. Fleckinger R. Évolution commentée de la fièvre aphteuse en France (1919-1991). *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France.* 1992;145(3):339-53.
13. La lutte contre l'épizootie de fièvre aphteuse - Tome I : Rapport [Internet]. [cité 12 janv 2023]. Disponible sur: https://www.senat.fr/rap/r00-405-1/r00-405-1_mono.html
14. Gourreau JM, Leforban Y, Moutou F, Angot JL, Goffette R, Le Bigot C, et al. Le système de surveillance de la fièvre aphteuse en France. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 1 mai 2005;35(5):269-72.
15. Fièvre aphteuse [Internet]. OMSA - Organisation mondiale de la santé animale. [cité 12 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.woah.org/fr/maladie/fievre-aphteuse/>



16. Jamal SM, Belsham GJ. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res.* 2013;44(1):116.
17. Valarcher JF, Knowles NJ, Zakharov V, Scherbakov A, Zhang Z, Shang YJ, et al. Multiple Origins of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype Asia 1 Outbreaks, 2003–2007. *Emerg Infect Dis.* juill 2009;15(7):1046-51.
18. Valdazo-González B, Knowles NJ, Hammond J, King DP. Genome Sequences of SAT 2 Foot-and-Mouth Disease Viruses from Egypt and Palestinian Autonomous Territories (Gaza Strip). *J Virol.* août 2012;86(16):8901-2.
19. Ahmed HA, Salem S a. H, Habashi AR, Arafa AA, Aggour MGA, Salem GH, et al. Emergence of Foot-and-Mouth Disease Virus SAT 2 in Egypt During 2012. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2012;59(6):476-81.
20. Elhaig MM, Elsheery MN. Molecular investigation of foot-and-mouth disease virus in domestic bovids from Gharbia, Egypt. *Trop Anim Health Prod.* 1 déc 2014;46(8):1455-62.
21. Émergence de la fièvre aphteuse SAT-2 au Proche-Orient [Internet]. [cité 13 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.pplateforme-esa.fr/fr/emergence-de-la-fievre-aphteuse-sat-2-au-proche-orient>
22. Santé animale : la lutte contre la fièvre aphteuse, du risque sanitaire à l'enjeu économique - Tome II - Auditions [Internet]. [cité 12 janv 2023]. Disponible sur: https://www.senat.fr/rap/r00-405-2/r00-405-2_mono.html
23. Knight-Jones TJD, Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease – What are they, how big are they and where do they occur? *Prev Vet Med.* 1 nov 2013;112(3-4):161-73.
24. Otte A, Costales A, Dijkman T, Pica-Ciamarra U, Robinson T, Ahuja V, et al. Le développement du secteur de l'élevage pour la réduction de la pauvreté: perspectives économique et politique - Les nombreuses vertus de l'élevage. Rome. FAO; 2013.
25. Kamuanga M. Rôle de l'animal et de l'élevage dans les espaces et les systèmes agraires des savanes soudano-sahéliennes : note introductive au thème 3. 2003;7 p.
26. Parajuli P, Pandit S, Kaphle K. Foot and Mouth Disease (FMD) among Animals in Nepal. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology.* 29 mars 2020;8(1):7-13.
27. Jarvis L, Cancino J, Bervejillo J. The Effect of Foot and Mouth Disease on Trade and Prices in International Beef Markets. 1 févr 2005;
28. Shanafelt DW, Perrings CA. Foot and mouth disease: the risks of the international trade in live animals: -EN- -FR- Fièvre aphteuse : les risques liés aux échanges internationaux d'animaux vivants -ES- Fiebre aftosa y riesgos del comercio internacional de animales vivos. *Rev Sci Tech OIE.* 1 déc 2017;36(3):839-65.
29. Knight-Jones TJD, McLaws M, Rushton J. Foot-and-Mouth Disease Impact on Smallholders - What Do We Know, What Don't We Know and How Can We Find Out More? *Transboundary and Emerging Diseases.* 2017;64(4):1079-94.
30. M.g G, B.s F, J.g M. Economic aspects of foot and mouth disease: perspectives of a free country, Australia. *Janv 2002;21(3):625.*



31. Cottam EM, Haydon DT, Paton DJ, Gloster J, Wilesmith JW, Ferris NP, et al. Molecular Epidemiology of the Foot-and-Mouth Disease Virus Outbreak in the United Kingdom in 2001. *J Virol.* nov 2006;80(22):11274-82.
32. D.k T, P M, D R, P O, A B, M R, et al. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *janv 2002*;21(3):675.
33. Feng S, Patton M, Davis J. Market Impact of Foot-and-Mouth Disease Control Strategies: A UK Case Study. *Frontiers in Veterinary Science* [Internet]. 2017 [cité 27 janv 2023];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2017.00129>
34. Tozer P, Marsh TL. Domestic and trade impacts of foot-and-mouth disease on the Australian beef industry. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics.* 2012;56(3):385-404.
35. Jiang P, Liu Y, Ma HC, Paul AV, Wimmer E. Picornavirus Morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* sept 2014;78(3):418-37.
36. Hollister JR, Vagnozzi A, Knowles NJ, Rieder E. Molecular and phylogenetic analyses of bovine rhinovirus type 2 shows it is closely related to foot-and-mouth disease virus. *Virology.* 10 avr 2008;373(2):411-25.
37. Yuan H, Li P, Ma X, Lu Z, Sun P, Bai X, et al. The pH stability of foot-and-mouth disease virus. *Virol J.* 28 nov 2017;14(1):233.
38. Acharya R, Fry E, Stuart D, Fox G, Rowlands D, Brown F. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature.* févr 1989;337(6209):709-16.
39. Parvez MK. Geometric architecture of viruses. *World J Virol.* 25 août 2020;9(2):5-18.
40. Zandi R, Reguera D, Bruinsma RF, Gelbart WM, Rudnick J. Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2 nov 2004;101(44):15556-60.
41. Agol VI, Paul AV, Wimmer E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Research.* 1 août 1999;62(2):129-47.
42. Sarry M, Vitour D, Zientara S, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. Foot-and-Mouth Disease Virus: Molecular Interplays with IFN Response and the Importance of the Model. *Viruses.* 27 sept 2022;14(10):2129.
43. Forss S, Strebel K, Beck E, Schaller H. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research.* 24 août 1984;12(16):6587-601.
44. Clarke BE, Brown AL, Currey KM, Newton SE, Rowlands DJ, Carroll AR. Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 11 sept 1987;15(17):7067-79.
45. Kloc A, Diaz-San Segundo F, Schafer EA, Rai DK, Kenney M, de los Santos T, et al. Foot-and-mouth disease virus 5'-terminal S fragment is required for replication and modulation of the innate immune response in host cells. *Virology.* 1 déc 2017;512:132-43.
46. Yang F, Zhu Z, Cao W, Liu H, Wei T, Zheng M, et al. Genetic Determinants of Altered Virulence of Type O Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol.* 17 mars 2020;94(7):e01657-19.
47. Mason PW, Grubman MJ, Baxt B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Research.* janv 2003;91(1):9-32.



48. Penza V, Russell SJ, Schulze AJ. The long-lasting enigma of polycytidine (polyC) tract. *PLOS Pathogens*. 4 août 2021;17(8):e1009739.
49. Rieder E, Bunch T, Brown F, Mason PW. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol*. sept 1993;67(9):5139-45.
50. Toyoda H, Franco D, Fujita K, Paul AV, Wimmer E. Replication of Poliovirus Requires Binding of the Poly(rC) Binding Protein to the Cloverleaf as Well as to the Adjacent C-Rich Spacer Sequence between the Cloverleaf and the Internal Ribosomal Entry Site. *J Virol*. sept 2007;81(18):10017-28.
51. Zhu Z, Yang F, Cao W, Liu H, Zhang K, Tian H, et al. The Pseudoknot Region of the 5' Untranslated Region Is a Determinant of Viral Tropism and Virulence of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology*. 3 avr 2019;93(8):e02039-18.
52. Ward JC, Lasecka-Dykes L, Neil C, Adeyemi OO, Gold S, McLean-Pell N, et al. The RNA pseudoknots in foot-and-mouth disease virus are dispensable for genome replication, but essential for the production of infectious virus. *PLOS Pathogens*. 6 juin 2022;18(6):e1010589.
53. Tiley L, King AMQ, Belsham GJ. The Foot-and-Mouth Disease Virus cis-Acting Replication Element (cre) Can Be Complemented in trans within Infected Cells. *J Virol*. févr 2003;77(3):2243-6.
54. Belsham GJ. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;288:43-70.
55. Belsham GJ, Brangwyn JK. A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J Virol*. nov 1990;64(11):5389-95.
56. Martínez-Salas E, Ramos R, Lafuente E, López de Quinto S 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *Journal of General Virology*. 1 mai 2001;82(5):973-84.
57. Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*. avr 2004;17(2):465-93.
58. Serrano P, Pulido MR, Sáiz M, Martínez-Salas E. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol*. oct 2006;87(Pt 10):3013-22.
59. García-Nuñez S, Gismondi MI, König G, Berinstein A, Taboga O, Rieder E, et al. Enhanced IRES activity by the 3'UTR element determines the virulence of FMDV isolates. *Virology*. 5 janv 2014;448:303-13.
60. Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, Lu Z, Carreno A, Vagnozzi A, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*. mai 2005;79(10):6487-504.
61. Gao Y, Sun SQ, Guo HC. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virol J* [Internet]. 22 juin 2016 [cité 17 juin 2021];13. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4917953/>
62. Medina GN, Segundo FDS, Stenfeldt C, Arzt J, de Los Santos T. The Different Tactics of Foot-and-Mouth Disease Virus to Evade Innate Immunity. *Front Microbiol*. 2018;9:2644.



63. Belsham GJ, Kristensen T, Jackson T. Foot-and-mouth disease virus: Prospects for using knowledge of virus biology to improve control of this continuing global threat. *Virus Res.* mai 2020;281:197909.
64. Belsham GJ, Normann P 2008. Dynamics of picornavirus RNA replication within infected cells. *Journal of General Virology.* 2008;89(2):485-93.
65. Han SC, Guo HC, Sun SQ. Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions. *Arch Virol.* 1 janv 2015;160(1):1-16.
66. Belsham GJ. Towards improvements in foot-and-mouth disease vaccine performance. *Acta Vet Scand.* 20 mai 2020;62:20.
67. Chow M, Newman JFE, Filman D, Hogle JM, Rowlands DJ, Brown F. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature.* juin 1987;327(6122):482-6.
68. Sun P, Zhang S, Qin X, Chang X, Cui X, Li H, et al. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP2 activates the cellular EIF2S1-ATF4 pathway and induces autophagy via HSPB1. *Autophagy.* 29 janv 2018;14(2):336-46.
69. Borca MV, Pacheco JM, Holinka LG, Carrillo C, Hartwig E, Garriga D, et al. Role of arginine-56 within the structural protein VP3 of foot-and-mouth disease virus (FMDV) O1 Campos in virus virulence. *Virology.* janv 2012;422(1):37-45.
70. Fry EE, Newman JWI, Curry S, Najjam S, Jackson T, Blakemore W, et al. Structure of Foot-and-mouth disease virus serotype A1061 alone and complexed with oligosaccharide receptor: receptor conservation in the face of antigenic variation. *Journal of General Virology.* 86(7):1909-20.
71. Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, Curry S, Jackson T, King A, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature.* avr 1993;362(6420):566-8.
72. Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Sevilla N, Andreu D, Beck E, Domingo E. Cell Recognition by Foot-and-Mouth Disease Virus That Lacks the RGD Integrin-Binding Motif: Flexibility in Aphthovirus Receptor Usage. *J Virol.* févr 2000;74(4):1641-7.
73. Knox C, Moffat K, Ali S, Ryan M, Wileman T 2005. Foot-and-mouth disease virus replication sites form next to the nucleus and close to the Golgi apparatus, but exclude marker proteins associated with host membrane compartments. *Journal of General Virology.* 1 mars 2005;86(3):687-96.
74. Roberts PJ, Belsham GJ. Identification of critical amino acids within the foot-and-mouth disease virus leader protein, a cysteine protease. *Virology.* 20 oct 1995;213(1):140-6.
75. Cao X, Bergmann IE, Füllkrug R, Beck E. Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* janv 1995;69(1):560-3.
76. Medina M, Domingo E, Brangwyn JK, Belsham GJ. The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology.* mai 1993;194(1):355-9.
77. López de Quinto S, Martínez-Salas E. Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology.* 15 mars 1999;255(2):324-36.



78. Brown CC, Piccone ME, Mason PW, McKenna TS, Grubman MJ. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J Virol.* août 1996;70(8):5638-41.
79. Chinsangaram J, Mason PW, Grubman MJ. Protection of swine by live and inactivated vaccines prepared from a leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and-mouth disease virus. *Vaccine.* oct 1998;16(16):1516-22.
80. Zhu J, Weiss M, Grubman MJ. Differential gene expression in bovine cells infected with wild type and leaderless foot-and-mouth disease virus | Elsevier Enhanced Reader. *Virol J* [Internet]. 15 août 2010 [cité 25 oct 2021];404(1). Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0042682210002710?token=236D292145AC4F49453B5F7447187DA00D057A4276B31B1ED4532DE837C43BB66C256831B915BAB603873B1675938CF6&originRegion=eu-west-1&originCreation=20211025143602>
81. Belsham GJ. Influence of the Leader protein coding region of foot-and-mouth disease virus on virus replication. *J Gen Virol.* juill 2013;94(Pt 7):1486-95.
82. Gradi A, Foeger N, Strong R, Svitkin YV, Sonenberg N, Skern T, et al. Cleavage of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4GII within Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cells: Identification of the L-Protease Cleavage Site In Vitro. *J Virol.* avr 2004;78(7):3271-8.
83. Kirchwegger R, Ziegler E, Lamphear BJ, Waters D, Liebig HD, Sommergruber W, et al. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol.* sept 1994;68(9):5677-84.
84. Guarné A, Tormo J, Kirchwegger R, Pfistermueller D, Fita I, Skern T. Structure of the foot-and-mouth disease virus leader protease: a papain-like fold adapted for self-processing and eIF4G recognition. *EMBO J.* 15 déc 1998;17(24):7469-79.
85. Ohlmann T, Rau M, Morley SJ, Pain VM. Proteolytic cleavage of initiation factor eIF-4 gamma in the reticulocyte lysate inhibits translation of capped mRNAs but enhances that of uncapped mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 11 févr 1995;23(3):334-40.
86. Li K, Wang C, Yang F, Cao W, Zhu Z, Zheng H. Virus–Host Interactions in Foot-and-Mouth Disease Virus Infection. *Front Immunol.* 26 févr 2021;12:571509.
87. Donnelly MLL, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, et al. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein « cleavage » mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal « skip ». *J Gen Virol.* mai 2001;82(Pt 5):1013-25.
88. Donnelly MLL, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, Ten Dam E, Gani D, et al. The « cleavage » activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring « 2A-like » sequences. *J Gen Virol.* mai 2001;82(Pt 5):1027-41.
89. Nieva JL, Madan V, Carrasco L. Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(8):563-74.
90. Giorda KM, Hebert DN. Viroporins customize host cells for efficient viral propagation. *DNA Cell Biol.* oct 2013;32(10):557-64.
91. Ao D, Guo HC, Sun SQ, Sun DH, Fung TS, Wei YQ, et al. Viroporin Activity of the Foot-and-Mouth Disease Virus Non-Structural 2B Protein. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125828.
92. Moffat K, Howell G, Knox C, Belsham GJ, Monaghan P, Ryan MD, et al. Effects of Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Proteins on the Structure and Function of the



Early Secretory Pathway: 2BC but Not 3A Blocks Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport. *J Virol.* avr 2005;79(7):4382-95.

93. Moffat K, Knox C, Howell G, Clark SJ, Yang H, Belsham GJ, et al. Inhibition of the Secretory Pathway by Foot-and-Mouth Disease Virus 2BC Protein Is Reproduced by Coexpression of 2B with 2C, and the Site of Inhibition Is Determined by the Subcellular Location of 2C. *J Virol.* févr 2007;81(3):1129-39.

94. Teterina NL, Gorbalenya AE, Egger D, Bienz K, Rinaudo MS, Ehrenfeld E. Testing the modularity of the N-terminal amphipathic helix conserved in picornavirus 2C proteins and hepatitis C NS5A protein. *Virology.* 20 janv 2006;344(2):453-67.

95. Lawrence P, Rieder E. Identification of RNA Helicase A as a New Host Factor in the Replication Cycle of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol.* nov 2009;83(21):11356-66.

96. Sweeney TR, Cisnetto V, Bose D, Bailey M, Wilson JR, Zhang X, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 2C Is a Hexameric AAA+ Protein with a Coordinated ATP Hydrolysis Mechanism. *J Biol Chem.* 6 août 2010;285(32):24347-59.

97. Zhang C, Yang F, Wojdyla JA, Qin B, Zhang W, Zheng M, et al. An anti-picornaviral strategy based on the crystal structure of foot-and-mouth disease virus 2C protein. *Cell Reports.* 5 juill 2022;40(1):111030.

98. Knowles NJ, Davies PR, Henry T, O'Donnell V, Pacheco JM, Mason PW. Emergence in Asia of Foot-and-Mouth Disease Viruses with Altered Host Range: Characterization of Alterations in the 3A Protein. *J Virol.* févr 2001;75(3):1551-6.

99. Núñez JI, Baranowski E, Molina N, Ruiz-Jarabo CM, Sánchez C, Domingo E, et al. A Single Amino Acid Substitution in Nonstructural Protein 3A Can Mediate Adaptation of Foot-and-Mouth Disease Virus to the Guinea Pig. *J Virol.* avr 2001;75(8):3977-83.

100. Beard CW, Mason PW. Genetic Determinants of Altered Virulence of Taiwanese Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol.* janv 2000;74(2):987-91.

101. Falk MM, Sobrino F, Beck E. VPg gene amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* avr 1992;66(4):2251-60.

102. Arias A, Perales C, Escarmís C, Domingo E. Deletion Mutants of VPg Reveal New Cytopathology Determinants in a Picornavirus. *PLoS One.* 20 mai 2010;5(5):e10735.

103. Paul AV, Wimmer E. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Research.* 3 août 2015;206:12-26.

104. Pacheco JM, Henry TM, O'Donnell VK, Gregory JB, Mason PW. Role of Nonstructural Proteins 3A and 3B in Host Range and Pathogenicity of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol.* déc 2003;77(24):13017-27.

105. Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. Factors Required for the Uridylylation of the Foot-and-Mouth Disease Virus 3B1, 3B2, and 3B3 Peptides by the RNA-Dependent RNA Polymerase (3Dpol) In Vitro. *J Virol.* juin 2005;79(12):7698-706.

106. Pacheco J, Picconne M, Rieder E, Pauszek SJ, Borca MV, Rodriguez LL. Domain disruptions of individual 3B proteins of foot-and-mouth disease virus do not alter growth in cell culture or virulence in cattle | Elsevier Enhanced Reader. *Virology Journal* [Internet]. 2010 [cité 29 oct 2020]; Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0042682210003806?token=A41CC11F5FA1B3D>



1B16B06C50E9367E285218421EF7FFA1338154D6C8C2557D4C9194B7B704EF8EAA7DF68C3B6BBE7F7

107. Park JH, Tark D, Lee KN, Lee SY, Ko MK, Lee HS, et al. Novel foot-and-mouth disease virus in Korea, July-August 2014. *Clin Exp Vaccine Res.* janv 2016;5(1):83-7.
108. Birtley JR, Knox SR, Jaulent AM, Brick P, Leatherbarrow RJ, Curry S. Crystal Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease: NEW INSIGHTS INTO CATALYTIC MECHANISM AND CLEAVAGE SPECIFICITY*. *Journal of Biological Chemistry.* 25 mars 2005;280(12):11520-7.
109. Belsham GJ, McInerney GM, Ross-Smith N. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Induces Cleavage of Translation Initiation Factors eIF4A and eIF4G within Infected Cells. *J Virol.* janv 2000;74(1):272-80.
110. Sanchez-Aparicio MT, Rosas MF, Sobrino F. Characterization of a nuclear localization signal in the foot-and-mouth disease virus polymerase. *Virology.* sept 2013;444(1-2):203-10.
111. Tesar M, Marquardt O. Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology.* févr 1990;174(2):364-74.
112. Falk MM, Grigera PR, Bergmann IE, Zibert A, Multhaup G, Beck E. Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol.* févr 1990;64(2):748-56.
113. Robertson BH, Morgan DO, Moore DM, Grubman MJ, Card J, Fischer T, et al. Identification of amino acid and nucleotide sequence of the foot-and-mouth disease virus RNA polymerase. *Virology.* 30 avr 1983;126(2):614-23.
114. Ferrer-Orta C, Arias A, Escarmís C, Verdaguer N. A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol.* févr 2006;16(1):27-34.
115. Loundras EA, Streetley J, Herod MR, Thompson R, Harris M, Bhella D, et al. Higher-order structures of the foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase required for genome replication. *Commun Biol.* 17 janv 2022;5(1):61.
116. Ferrer-Orta C, Agudo R, Domingo E, Verdaguer N. Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase. *Current Opinion in Structural Biology.* 1 déc 2009;19(6):752-8.
117. Ferrer-Orta C, Ferrero D, Verdaguer N. RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms. *Viruses.* 6 août 2015;7(8):4438-60.
118. Kloc A, Rai DK, Gladue DP, Schafer E, Kenney M, Rieder E. Residues within the Foot-and-Mouth Disease Virus 3Dpol Nuclear Localization Signal Affect Polymerase Fidelity. *J Virol.* 17 août 2020;94(17):e00833-20.
119. Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, et al. Basic concepts in RNA virus evolution. *The FASEB Journal.* 1996;10(8):859-64.
120. Thiry E, Baranowski E, Domingo E. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA FIEVRE APHTEUSE. 1 janv 2001;
121. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* juin 2012;76(2):159-216.



122. Domingo E, Baranowski E, Escarmús C, Sobrino F. Foot-and-mouth disease virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1 oct 2002;25(5):297-308.
123. Dopazo J, Sobrino F, Palma EL, Domingo E, Moya A. Gene encoding capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. sept 1988;85(18):6811-5.
124. Bachanek-Bankowska K, Di Nardo A, Wadsworth J, Mioulet V, Pezzoni G, Grazioli S, et al. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot-and-mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind-2001 lineage. *Sci Rep*. 02 2018;8(1):14693.
125. Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research*. 1 janv 2003;91(1):65-80.
126. Carrillo C. Foot and Mouth Disease Virus Genome [Internet]. *Viral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions*. IntechOpen; 2012 [cité 20 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/state.item.id>
127. Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, Lu Z, Carreno A, Vagnozzi A, et al. Comparative Genomics of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol*. mai 2005;79(10):6487-504.
128. Heath L, van der Walt E, Varsani A, Martin DP. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol*. déc 2006;80(23):11827-32.
129. Jackson AL, O'Neill H, Maree F, Blignaut B, Carrillo C, Rodriguez L, et al. Mosaic structure of foot-and-mouth disease virus genomes. *J Gen Virol*. févr 2007;88(Pt 2):487-92.
130. Ferretti L, Pérez-Martín E, Zhang F, Maree F, de Klerk-Lorist LM, van Schalkwyk L, et al. Pervasive within-host recombination and epistasis as major determinants of the molecular evolution of the foot-and-mouth disease virus capsid. *PLoS Pathog*. 6 janv 2020;16(1):e1008235.
131. Childs K, Juleff N, Moffat K, Seago J. Demonstration of Co-Infection and Trans-Encapsidation of Viral RNA In Vitro Using Epitope-Tagged Foot-and-Mouth Disease Viruses. *Viruses*. déc 2021;13(12):2433.
132. Childs K, Jackson B, Harvey Y, Seago J. Trans-Encapsidation of Foot-and-Mouth Disease Virus Genomes Facilitates Escape from Neutralizing Antibodies. *Viruses*. 27 mai 2022;14(6):1161.
133. Palinski RM, Brito B, Jaya FR, Sangula A, Gakuya F, Bertram MR, et al. Viral Population Diversity during Co-Infection of Foot-And-Mouth Disease Virus Serotypes SAT1 and SAT2 in African Buffalo in Kenya. *Viruses*. 25 avr 2022;14(5):897.
134. Fish I, Stenfeldt C, Spinard E, Medina GN, Azzinaro PA, Bertram MR, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Interserotypic Recombination in Superinfected Carrier Cattle. *Pathogens*. 3 juin 2022;11(6):644.
135. Arzt J, Fish IH, Bertram MR, Smoliga GR, Hartwig EJ, Pauszek SJ, et al. Simultaneous and Staggered Foot-and-Mouth Disease Virus Coinfection of Cattle. *Journal of Virology* [Internet]. 29 sept 2021 [cité 3 janv 2022]; Disponible sur: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.01650-21>



136. Bolwell C, Clarke BE, Parry NR, Ouldrige EJ, Brown F, Rowlands DJ. Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* janv 1989;70 (Pt 1):59-68.
137. Mateu MG, Camarero JA, Giralt E, Andreu D, Domingo E. Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology.* 10 janv 1995;206(1):298-306.
138. Mahapatra M, Hamblin P, Paton DJ. Foot-and-mouth disease virus epitope dominance in the antibody response of vaccinated animals. *J Gen Virol.* mars 2012;93(Pt 3):488-93.
139. Grazioli S, Fallacara F, Brocchi E 2013. Mapping of antigenic sites of foot-and-mouth disease virus serotype Asia 1 and relationships with sites described in other serotypes. *Journal of General Virology.* 94(3):559-69.
140. Lea S, Hernández J, Blakemore W, Brocchi E, Curry S, Domingo E, et al. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure.* 15 févr 1994;2(2):123-39.
141. Baxt B, Vakharia V, Moore DM, Franke AJ, Morgan DO. Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* mai 1989;63(5):2143-51.
142. Thomas AA, Woortmeijer RJ, Puijk W, Barteling SJ. Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J Virol.* août 1988;62(8):2782-9.
143. McCullough KC, De Simone F, Brocchi E, Capucci L, Crowther JR, Kihm U. Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J Virol.* avr 1992;66(4):1835-40.
144. Jori F, Etter E. Transmission of foot and mouth disease at the wildlife/livestock interface of the Kruger National Park, South Africa: Can the risk be mitigated? *Preventive Veterinary Medicine.* 1 avr 2016;126:19-29.
145. Maree F, de Klerk-Lorist LM, Gubbins S, Zhang F, Seago J, Pérez-Martín E, et al. Differential Persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in African Buffalo Is Related to Virus Virulence. *J Virol.* 29 avr 2016;90(10):5132-40.
146. Omondi GP, Gakuya F, Arzt J, Sangula A, Hartwig E, Pauszek S, et al. The role of African buffalo in the epidemiology of foot-and-mouth disease in sympatric cattle and buffalo populations in Kenya. *Transbound Emerg Dis.* 17 avr 2020;
147. Waters RA, Wadsworth J, Mioulet V, Shaw AE, Knowles NJ, Abdollahi D, et al. Foot-and-mouth disease virus infection in the domestic dog (*Canis lupus familiaris*), Iran. *BMC Veterinary Research.* 1 févr 2021;17(1):63.
148. Wernery U, Kinne J. Foot and mouth disease and similar virus infections in camelids: a review. *déc 2012;31(3):907.*
149. Larska M, Wernery U, Kinne J, Schuster R, Alexandersen G, Alexandersen S. Differences in the susceptibility of dromedary and Bactrian camels to foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol Infect.* avr 2009;137(4):549-54.
150. Rahman H, Dutta PK, Dewan JN. Foot and Mouth Disease in Elephant (*Elephas maximus*). *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* 1988;35(1-10):70-1.



151. Capella GL. Foot and mouth disease in human beings. *The Lancet*. 20 oct 2001;358(9290):1374.
152. Van Bekkum: Observations on the carrier state of... - Google Scholar [Internet]. [cité 19 janv 2022]. Disponible sur: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Observations+on+the+carrier+state+of+cattle+exposed+to+foot-and-mouth+disease+virus&author=van+Bekkum+J.+G.&author=Frenkel+H.+S.&author=Frederiks+H.+H.+J.&author=Frenkel+S.&publication+year=1959&journal=Tijdschr.+Diergeneesk.&volume=84
153. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 20 sept 2002;110(6):673-87.
154. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*. sept 2001;305(3):285-98.
155. O'Donnell V, Pacheco JM, Gregg D, Baxt B. Analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Integrin Receptor Expression in Tissues from Naïve and Infected Cattle. *Journal of Comparative Pathology*. 1 août 2009;141(2):98-112.
156. Clark R a. f., Ashcroft G s., Spencer MJ, Larjava H, Ferguson M w. j. Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from $\alpha\beta 5$ to $\alpha\beta 6$ integrins. *British Journal of Dermatology*. 1996;135(1):46-51.
157. Monaghan P, Gold S, Simpson J, Zhang Z, Weinreb PH, Violette SM, et al. The $\alpha(v)\beta 6$ integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol*. oct 2005;86(Pt 10):2769-80.
158. Burman A, Clark S, Abrescia NGA, Fry EE, Stuart DI, Jackson T. Specificity of the VP1 GH Loop of Foot-and-Mouth Disease Virus for αv Integrins. *J Virol*. oct 2006;80(19):9798-810.
159. Berryman S, Clark S, Kakker NK, Silk R, Seago J, Wadsworth J, et al. Positively Charged Residues at the Five-Fold Symmetry Axis of Cell Culture-Adapted Foot-and-Mouth Disease Virus Permit Novel Receptor Interactions. *Journal of Virology*. août 2013;87(15):8735-44.
160. Meneghetti MCZ, Hughes AJ, Rudd TR, Nader HB, Powell AK, Yates EA, et al. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J R Soc Interface*. 6 sept 2015;12(110):20150589.
161. Martín-Acebes MA, González-Magaldi M, Sandvig K, Sobrino F, Armas-Portela R. Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology*. 5 déc 2007;369(1):105-18.
162. O'Donnell V, Larocco M, Baxt B. Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J Virol*. sept 2008;82(18):9075-85.
163. Chen S, Yang F, Zhu Z, Cao W, Lian K, Zhang W, et al. The endocytosis of foot-and-mouth disease virus requires clathrin and caveolin and is dependent on the existence of Rab5 and Rab7 in CHO-677 cells. *Vet Microbiol*. 25 août 2022;274:109550.
164. Vázquez-Calvo Á, Saiz JC, McCullough KC, Sobrino F, Martín-Acebes MA. Acid-dependent viral entry. *Virus Research*. 1 août 2012;167(2):125-37.



165. GropPELLI E, Levy HC, Sun E, Strauss M, Nicol C, Gold S, et al. Picornavirus RNA is protected from cleavage by ribonuclease during virion uncoating and transfer across cellular and model membranes. *PLoS Pathog.* 6 févr 2017;13(2):e1006197.
166. Panjwani A, Strauss M, Gold S, Wenham H, Jackson T, Chou JJ, et al. Capsid Protein VP4 of Human Rhinovirus Induces Membrane Permeability by the Formation of a Size-Selective Multimeric Pore. *PLOS Pathogens.* 7 août 2014;10(8):e1004294.
167. O'Donnell V, LaRocco M, Duque H, Baxt B. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol.* juill 2005;79(13):8506-18.
168. Pilipenko EV, Pestova TV, Kolupaeva VG, Khitrina EV, Poperechnaya AN, Agol VI, et al. A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev.* 15 août 2000;14(16):2028-45.
169. Pilipenko EV, Viktorova EG, Guest ST, Agol VI, Roos RP. Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *EMBO J.* 3 déc 2001;20(23):6899-908.
170. Walter BL, Parsley TB, Ehrenfeld E, Semler BL. Distinct Poly(rC) Binding Protein KH Domain Determinants for Poliovirus Translation Initiation and Viral RNA Replication. *J Virol.* déc 2002;76(23):12008-22.
171. López de Quinto S, Sáiz M, de la Morena D, Sobrino F, Martínez-Salas E. IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res.* 15 oct 2002;30(20):4398-405.
172. López de Quinto S, Lafuente E, Martínez-Salas E. IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA.* sept 2001;7(9):1213-26.
173. Stassinopoulos IA, Belsham GJ. A novel protein-RNA binding assay: functional interactions of the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site with cellular proteins. *RNA.* janv 2001;7(1):114-22.
174. Pierce DM, Hayward C, Rowlands DJ, Stonehouse NJ, Herod MR. Insights into Polyprotein Processing and RNA-Protein Interactions in Foot-and-Mouth Disease Virus Genome Replication. *Journal of Virology.* 8 mai 2023;0(0):e00171-23.
175. Ferrer-Orta C, Arias A, Agudo R, Pérez-Luque R, Escarmís C, Domingo E, et al. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J.* 22 févr 2006;25(4):880-8.
176. Kempf BJ, Barton DJ. Picornavirus RNA polyadenylation by 3Dpol, the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Research.* 3 août 2015;206:3-11.
177. Malik N, Kotecha A, Gold S, Asfor A, Ren J, Huiskonen JT, et al. Structures of foot and mouth disease virus pentamers: Insight into capsid dissociation and unexpected pentamer reassociation. *PLoS Pathog.* 22 sept 2017;13(9):e1006607.
178. Grubman MJ, Morgan DO, Kendall J, Baxt B. Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells. *J Virol.* oct 1985;56(1):120-6.
179. Logan G, Newman J, Wright CF, Lasecka-Dykes L, Haydon DT, Cottam EM, et al. Deep Sequencing of Foot-and-Mouth Disease Virus Reveals RNA Sequences Involved in Genome Packaging. *J Virol.* 14 déc 2017;92(1):e01159-17.



180. Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DJ, Hogle JM. Role and mechanism of the maturation cleavage of VPO in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* oct 1994;3(10):1651-69.
181. Curry S, Abrams CC, Fry E, Crowther JC, Belsham GJ, Stuart DI, et al. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol.* janv 1995;69(1):430-8.
182. Gullberg M, Muszynski B, Organtini LJ, Ashley RE, Hafenstein SL, Belsham GJ, et al. Assembly and characterization of foot-and-mouth disease virus empty capsid particles expressed within mammalian cells. *J Gen Virol.* août 2013;94(Pt 8):1769-79.
183. Curry S, Fry E, Blakemore W, Abu-Ghazaleh R, Jackson T, King A, et al. Dissecting the roles of VPO cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology.* déc 1997;71(12):9743-52.
184. Newman J, Rowlands DJ, Tuthill TJ. An Engineered Maturation Cleavage Provides a Recombinant Mimic of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Assembly-Disassembly. *Life (Basel).* 29 mai 2021;11(6):500.
185. Kitching RP, Hutber AM, Thrusfield MV. A review of foot-and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modelling of the disease. *Vet J.* mars 2005;169(2):197-209.
186. Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJM. The Pathogenesis and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Comparative Pathology.* 1 juill 2003;129(1):1-36.
187. Paton DJ, Gubbins S, King DP. Understanding the transmission of foot-and-mouth disease virus at different scales. *Current Opinion in Virology.* 1 févr 2018;28:85-91.
188. Suttmoller P, Barteling SS, Olascoaga RC, Sumption KJ. Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Research.* 1 janv 2003;91(1):101-44.
189. Kitching P, Hammond J, Jeggo M, Charleston B, Paton D, Rodriguez L, et al. Global FMD control--is it an option? *Vaccine.* 26 juill 2007;25(30):5660-4.
190. World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 1.1.4: Biosafety and biosecurity: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratory and animal facilities. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [Internet]. 2021. Disponible sur: Available online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.04_BIOSAFETY_BIOSECURITY.pdf
191. Stenfeldt C, Bertram MR, Smoliga GR, Hartwig EJ, Delgado AH, Arzt J. Duration of Contagion of Foot-And-Mouth Disease Virus in Infected Live Pigs and Carcasses. *Front Vet Sci* [Internet]. 11 juin 2020 [cité 18 janv 2021];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7300267/>
192. Bartley LM, Donnelly CA, Anderson RM. Review of foot-and mouth disease virus survival in animal excretions and on fomites. *Veterinary Record.* 2002;151(22):667-9.
193. Brown E, Nelson N, Gubbins S, Colenutt C. Airborne Transmission of Foot-and-Mouth Disease Virus: A Review of Past and Present Perspectives. *Viruses.* 9 mai 2022;14(5):1009.



194. Cannon RM, Garner MG. Assessing the risk of wind-borne spread of foot-and-mouth disease in Australia. *Environment International*. 1 sept 1999;25(6):713-23.
195. Arzt J, Juleff N, Zhang Z, Rodriguez LL. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease I: Viral Pathways in Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2011;58(4):291-304.
196. Arzt J, Baxt B, Grubman MJ, Jackson T, Juleff N, Rhyan J, et al. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease II: Viral Pathways in Swine, Small Ruminants, and Wildlife; Myotropism, Chronic Syndromes, and Molecular Virus–Host Interactions. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2011;58(4):305-26.
197. Chis Ster I, Dodd PJ, Ferguson NM. Within-farm transmission dynamics of foot and mouth disease as revealed by the 2001 epidemic in Great Britain. *Epidemics*. août 2012;4(3):158-69.
198. Hayer SS, VanderWaal K, Ranjan R, Biswal JK, Subramaniam S, Mohapatra JK, et al. Foot-and-mouth disease virus transmission dynamics and persistence in a herd of vaccinated dairy cattle in India. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65(2):e404-15.
199. Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-Mouth Disease. *Clin Microbiol Rev*. avr 2004;17(2):465-93.
200. Yadav S, Stenfeldt C, Branan MA, Moreno-Torres KI, Holmstrom LK, Delgado AH, et al. Parameterization of the Durations of Phases of Foot-And-Mouth Disease in Cattle. *Frontiers in Veterinary Science* [Internet]. 2019 [cité 31 mars 2022];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2019.00263>
201. Singh I, Deb R, Kumar S, Singh R, Andonissamy J, Smita S, et al. Deciphering foot-and-mouth disease (FMD) virus-host tropism. *J Biomol Struct Dyn*. nov 2019;37(18):4779-89.
202. Arzt J, Pacheco JM, Stenfeldt C, Rodriguez LL. Pathogenesis of virulent and attenuated foot-and-mouth disease virus in cattle. *Virology Journal*. 2 mai 2017;14(1):89.
203. Sebastian R, Sravanthi M, Umapathi V, Krishnaswamy N, Priyanka M, Dechamma HJ, et al. Foot and mouth disease virus undergoes non-progressive replication in mice peritoneal macrophages and induces M1 polarization. *Virus Res*. mai 2020;281:197906.
204. Yoon H, Yoon SS, Wee SH, Kim YJ, Kim B. Clinical manifestations of foot-and-mouth disease during the 2010/2011 epidemic in the Republic of Korea. *Transbound Emerg Dis*. déc 2012;59(6):517-25.
205. Meyer RF, Knudsen RC. Foot-and-mouth disease: a review of the virus and the symptoms. *J Environ Health*. nov 2001;64(4):21-3.
206. Mahadappa P, Mahendran K, Winter RL, Umapathi V, Krishnaswamy N, Gopalakrishnan A, et al. Characterization of arrhythmias, evaluation of cardiac biomarkers and their association with survival in calves suffering from foot-and-mouth disease. *J Vet Cardiol*. août 2021;36:64-76.
207. Stenfeldt C, Eschbaumer M, Rekant SI, Pacheco JM, Smoliga GR, Hartwig EJ, et al. The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle. *Journal of Virology*. 90(14):6344-64.
208. Arzt J, Fish I, Pauszek SJ, Johnson SL, Chain PS, Rai DK, et al. The evolution of a super-swarm of foot-and-mouth disease virus in cattle. *PLoS One*. 25 avr 2019;14(4):e0210847.



209. Stenfeldt C, Arzt J. The Carrier Conundrum; A Review of Recent Advances and Persistent Gaps Regarding the Carrier State of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Pathogens* [Internet]. 28 févr 2020 [cité 19 juill 2020];9(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157498/>
210. Jolles A, Gorsich E, Gubbins S, Beechler B, Buss P, Juleff N, et al. Endemic persistence of a highly contagious pathogen: Foot-and-mouth disease in its wildlife host. *Science*. 1 oct 2021;374(6563):104-9.
211. Perez-Martin E, Beechler B, Zhang F, Scott K, de Klerk-Lorist LM, Limon G, et al. Viral dynamics and immune responses to foot-and-mouth disease virus in African buffalo (*Syncerus caffer*). *Vet Res*. 2022;53:63.
212. Gainaru MD, Thomson GR, Bengis RG, Esterhuysen JJ, Bruce W, Pini A. Foot-and-mouth disease and the African buffalo (*Syncerus caffer*). II. Virus excretion and transmission during acute infection. *Onderstepoort J Vet Res*. juin 1986;53(2):75-85.
213. Vosloo W, de Klerk LM, Boshoff CI, Botha B, Dwarka RM, Keet D, et al. Characterisation of a SAT-1 outbreak of foot-and-mouth disease in captive African buffalo (*Syncerus caffer*): clinical symptoms, genetic characterisation and phylogenetic comparison of outbreak isolates. *Vet Microbiol*. 10 mars 2007;120(3-4):226-40.
214. Samara SI, Pinto AA. Detection of foot-and-mouth disease carriers among water buffalo (*Bubalus bubalis*) after an outbreak of the disease in cattle. *Vet Rec*. 12 nov 1983;113(20):472-3.
215. Brückner GK, Vosloo W, Du Plessis BJA, Kloeck PELG, Connaway L, Ekron MD, et al. Foot and mouth disease: the experience of South Africa. *Rev Sci Tech*. déc 2002;21(3):751-64.
216. Di Nardo A, Libeau G, Chardonnet B, Chardonnet P, Kock RA, Parekh K, et al. Serological profile of foot-and-mouth disease in wildlife populations of West and Central Africa with special reference to *Syncerus caffer* subspecies. *Veterinary Research*. 8 juill 2015;46(1):77.
217. Alexandersen S, Zhang Z, Reid SM, Hutchings GH, Donaldson AI. Quantities of infectious virus and viral RNA recovered from sheep and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus O UK 2001. *J Gen Virol*. août 2002;83(Pt 8):1915-23.
218. Eblé PL, Orsel K, van Hemert-Kluitenberg F, Dekker A. Transmission characteristics and optimal diagnostic samples to detect an FMDV infection in vaccinated and non-vaccinated sheep. *Vet Microbiol*. 15 mai 2015;177(1-2):69-77.
219. Kitching R, Hughes G. Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats. *Revue scientifique et technique* [Internet]. 2002 [cité 24 janv 2023]; Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/Clinical-variation-in-foot-and-mouth-disease%3A-sheep-Kitching-Hughes/df1a2cb505011a0ab99330doeb93726ee6c8577f>
220. Sellers R, Gloster J. Foot-and-mouth disease: A review of intranasal infection of cattle, sheep and pigs. *The Veterinary Journal*. 1 août 2008;177(2):159-68.
221. Arzt J, Branan MA, Delgado AH, Yadav S, Moreno-Torres KI, Tildesley MJ, et al. Quantitative impacts of incubation phase transmission of foot-and-mouth disease virus. *Sci Rep* [Internet]. 25 févr 2019 [cité 18 janv 2021];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6389902/>



222. Murphy C, Bashiruddin JB, Quan M, Zhang Z, Alexandersen S. Foot-and-mouth disease viral loads in pigs in the early, acute stage of disease. *Vet Rec.* 2 janv 2010;166(1):10-4.
223. Stenfeldt C, Diaz-San Segundo F, de los Santos T, Rodriguez LL, Arzt J. The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs. *Front Vet Sci* [Internet]. 23 mai 2016 [cité 29 oct 2020];3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4876306/>
224. Kitching RP, Alexandersen S. Clinical variation in foot and mouth disease: pigs. *Rev Sci Tech.* déc 2002;21(3):513-8.
225. Orsel K, Bouma A, Dekker A, Stegeman JA, de Jong MCM. Foot and mouth disease virus transmission during the incubation period of the disease in piglets, lambs, calves, and dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine.* 1 févr 2009;88(2):158-63.
226. Stenfeldt C, Pacheco JM, Smoliga GR, Bishop E, Pauszek SJ, Hartwig EJ, et al. Detection of Foot-and-mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2016;63(2):152-64.
227. Stenfeldt C, Pacheco JM, Rodriguez LL, Arzt J. Early Events in the Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Pigs; Identification of Oropharyngeal Tonsils as Sites of Primary and Sustained Viral Replication. *PLoS One* [Internet]. 3 sept 2014 [cité 18 janv 2021];9(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4153717/>
228. Mezcencio JMS, Babcock GD, Kramer E, Brown. F. Evidence for the Persistence of Foot-and-mouth Disease Virus in Pigs. *The Veterinary Journal.* 1 mai 1999;157(3):213-7.
229. Mohamed F, Swafford S, Petrowski H, Bracht A, Schmit B, Fabian A, et al. Foot-and-Mouth Disease in Feral Swine: Susceptibility and Transmission. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2011;58(4):358-71.
230. Zhang Z, Bashiruddin JB. Quantitative analysis of foot-and-mouth disease virus RNA duration in tissues of experimentally infected pigs. *The Veterinary Journal.* 1 avr 2009;180(1):130-2.
231. Orsel K, Roest HIJ, Elzinga-Bril EM, van Hemert-Kluitenberg F, Dekker A. Detection of foot-and-mouth disease virus in infected pigs by rt-pcr four weeks after challenge. *Veterinary Record.* 2008;162(23):753-4.
232. Sarry M, Romey A, Lefebvre D, Benfrid S, Dufour B, Durand B, et al. Le virus de la fièvre aphteuse : transmission, pathogénèse, diagnostic et surveillance. *Virologie.* 1 sept 2022;26(5):355-73.
233. Boldogh I, Albrecht T, Porter DD. Persistent Viral Infections. In: Baron S, éditeur. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th éd. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cité 25 janv 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8538/>
234. Tsai KN, Kuo CF, Ou JHJ. Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends Microbiol.* janv 2018;26(1):33-42.
235. Jackson SA, DeLuca NA. Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 24 juin 2003;100(13):7871-6.



236. Efstathiou S, Preston CM. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research*. 1 août 2005;111(2):108-19.
237. Trivedi P, Horejsh D, Hinds SB, Hinds PW II, Wu MS, Salvato MS, et al. Intrarectal transmission of simian immunodeficiency virus in rhesus macaques: selective amplification and host responses to transient or persistent viremia. *Journal of Virology*. oct 1996;70(10):6876-83.
238. Zhang H, Sha H, Qin L, Wang N, Kong W, Huang L, et al. Research Progress in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus–Host Protein Interactions. *Animals (Basel)*. 27 mai 2022;12(11):1381.
239. Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y 2013. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *Journal of General Virology*. 94(10):2141-63.
240. Laemmle L, Goldstein RS, Kinchington PR. Modeling Varicella Zoster Virus Persistence and Reactivation – Closer to Resolving a Perplexing Persistent State. *Front Microbiol*. 24 juill 2019;10:1634.
241. Tan CT, Goh KJ, Wong KT, Sarji SA, Chua KB, Chew NK, et al. Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann Neurol*. juin 2002;51(6):703-8.
242. Lipton HL. Persistent Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection in Mice depends on Plaque Size. *Journal of General Virology*. 1980;46(1):169-77.
243. Julien J, Leparc-Goffart I, Lina B, Fuchs F, Foray S, Janatova I, et al. Postpolio syndrome: poliovirus persistence is involved in the pathogenesis. *J Neurol*. 1 juin 1999;246(6):472-6.
244. Billinis C, Paschaleri-Papadopoulou E, Psychas V, Vlemmas J, Leontides S, Koumbati M, et al. Persistence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets. *Veterinary Microbiology*. 1 déc 1999;70(3):171-7.
245. Bergmann IE, de Mello PA, Neitzert E, Beck E, Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res*. juin 1993;54(6):825-31.
246. Hawko S, Burrai GP, Polinas M, Angioi PP, Dei Giudici S, Oggiano A, et al. A Review on Pathological and Diagnostic Aspects of Emerging Viruses—Senecavirus A, Torque teno sus virus and Linda Virus—In Swine. *Veterinary Sciences*. sept 2022;9(9):495.
247. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infections: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*. janv 2011;19(1):33-9.
248. Thorley-Lawson DA. EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;390(Pt 1):151-209.
249. Kane M, Golovkina T. Common Threads in Persistent Viral Infections. *Journal of Virology*. mai 2010;84(9):4116-23.
250. Pozzetto B, Gagnaire J, Berthelot P, Bourlet T, Pillet S. Les virus dans l'environnement, considérations virologiques et exemples de leur impact en santé humaine. *Rev Francoph Lab*. mars 2023;2023(550):33-43.
251. Griffin DE. Measles virus persistence and its consequences. *Curr Opin Virol*. avr 2020;41:46-51.



252. Rivera-Benitez JF, Martínez-Bautista R, Pérez-Torres A, García-Contreras A del C, Reyes-Leyva J, Hernández J, et al. Persistence of porcine rubulavirus in experimentally infected boars. *Veterinary Microbiology*. 23 mars 2013;162(2):491-8.
253. Hindmarsh P, Leis J. Retroviral DNA Integration. *Microbiol Mol Biol Rev*. déc 1999;63(4):836-43.
254. Poletti V, Mavilio F. Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 16 mars 2018;8:31-41.
255. Castro-Gonzalez S, Colomer-Lluch M, Serra-Moreno R. Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1 sept 2018;34(9):739-59.
256. Chen J, Zhou T, Zhang Y, Luo S, Chen H, Chen D, et al. The reservoir of latent HIV. *Front Cell Infect Microbiol*. 28 juill 2022;12:945956.
257. Johnson WE, Desrosiers RC. Viral Persistence: HIV's Strategies of Immune System Evasion. *Annual Review of Medicine*. 2002;53(1):499-518.
258. Smith KA. To cure chronic HIV infection, a new therapeutic strategy is needed. *Current Opinion in Immunology*. 1 oct 2001;13(5):617-24.
259. Vansant G, Bruggemans A, Janssens J, Debyser Z. Block-And-Lock Strategies to Cure HIV Infection. *Viruses*. 10 janv 2020;12(1):84.
260. Maggioli MF, Fernandes MHV, Joshi LR, Sharma B, Tweet MM, Noll JCG, et al. Persistent Infection and Transmission of Senecavirus A from Carrier Sows to Contact Piglets. *J Virol*. 15 oct 2019;93(21):e00819-19.
261. World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 3.1.8: Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease virus). Available online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf (accessed on 11 April 2022). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [Internet]. 2021. Disponible sur: Available online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf
262. Han L, Xin X, Wang H, Li J, Hao Y, Wang M, et al. Cellular response to persistent foot-and-mouth disease virus infection is linked to specific types of alterations in the host cell transcriptome. *Sci Rep* [Internet]. 22 mars 2018 [cité 17 juin 2021];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5864922/>
263. Pacheco JM, Smoliga GR, O'Donnell V, Brito BP, Stenfeldt C, Rodriguez LL, et al. Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in the Nasopharynx of Cattle; Tissue-Specific Distribution and Local Cytokine Expression. *PLoS One*. 21 mai 2015;10(5):e0125698.
264. Stenfeldt C, Pacheco JM, Singanallur NB, Vosloo W, Rodriguez LL, Arzt J. Virulence beneath the fleece; a tale of foot-and-mouth disease virus pathogenesis in sheep. *PLoS One*. 31 déc 2019;14(12):e0227061.
265. Salt JS. The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J*. juin 1993;149(3):207-23.
266. Moonen P, Schrijver R. Carriers of foot-and-mouth disease virus: a review. *Vet Q*. oct 2000;22(4):193-7.
267. Verin BC. The possible role and significance of carrier swamp buffalo in the transmission of Foot and Mouth Disease in South East Asia (SEA).



268. Firdaus I. Atlas of Topographical Anatomy of the Domestic Animals: Volume I (Head and Neck). Peter Popesko [Internet]. 1 janv 1990 [cité 25 mai 2023]; Disponible sur: https://www.academia.edu/47875321/Atlas_of_Topographical_Anatomy_of_the_Domestic_Animals_Volume_I_Head_and_Neck
269. Gortázar C, Barroso P, Nova R, Cáceres G. The role of wildlife in the epidemiology and control of Foot-and-mouth-disease And Similar Transboundary (FAST) animal diseases: a review. *Transbound Emerg Dis*. 15 juill 2021;
270. Stenfeldt C, Fish I, Meek HC, Arzt J. Heterogeneity and Recombination of Foot-and-Mouth Disease Virus during Multi-Strain Coinfection of Cattle. *mSphere*. 24 avr 2023;e0064322.
271. Horsington J, Zhang Z. Consistent change in the B-C loop of VP2 observed in foot-and-mouth disease virus from persistently infected cattle: implications for association with persistence. *Virus Res*. avr 2007;125(1):114-8.
272. Pauszek SJ, Eschbaumer M, Brito B, de Carvalho Ferreira HC, Vu LT, Phuong NT, et al. Site-specific substitution (Q172R) in the VP1 protein of FMDV isolates collected from asymptomatic carrier ruminants in Vietnam. *Virology Reports*. 1 déc 2016;6:90-6.
273. Ramirez-Carvajal L, Pauszek SJ, Ahmed Z, Farooq U, Naeem K, Shabman RS, et al. Genetic stability of foot-and-mouth disease virus during long-term infections in natural hosts. *PLoS One*. 2018;13(2):e0190977.
274. Cortey M, Ferretti L, Pérez-Martín E, Zhang F, de Klerk-Lorist LM, Scott K, et al. Persistent Infection of African Buffalo (*Syncerus caffer*) with Foot-and-Mouth Disease Virus: Limited Viral Evolution and No Evidence of Antibody Neutralization Escape. *J Virol*. 1 août 2019;93(15):e00563-19.
275. Taylor MP, Kirkegaard K. Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. *Autophagy*. 1 avr 2008;4(3):286-9.
276. Richards AL, Jackson WT. How Positive-Strand RNA Viruses Benefit from Autophagosome Maturation. *J Virol*. sept 2013;87(18):9966-72.
277. Brown F, Cartwright B. Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibody. *Journal of Immunology*. 1960;85:309-13.
278. Arzt J, Belsham GJ, Lohse L, Bøtner A, Stenfeldt C. Transmission of Foot-and-Mouth Disease from Persistently Infected Carrier Cattle to Naive Cattle via Transfer of Oropharyngeal Fluid. *mSphere*. 12 sept 2018;3(5):e00365-18.
279. Juleff N, Windsor M, Reid E, Seago J, Zhang Z, Monaghan P, et al. Foot-and-mouth disease virus persists in the light zone of germinal centres. *PLoS One*. 2008;3(10):e3434.
280. Stenfeldt C, Hartwig EJ, Smoliga GR, Palinski R, Silva EB, Bertram MR, et al. Contact Challenge of Cattle with Foot-and-Mouth Disease Virus Validates the Role of the Nasopharyngeal Epithelium as the Site of Primary and Persistent Infection. *mSphere*. 12 déc 2018;3(6):e00493-18.
281. Salt JS, Mulcahy G, Kitching RP. Isotype-specific antibody responses to foot-and-mouth disease virus in sera and secretions of "carrier" and "non-carrier" cattle. *Epidemiol Infect*. oct 1996;117(2):349-60.



282. Maddur MS, Gajendragad MR, Kishore S, Chockalingam AK, Suryanarayana VVS, Gopalakrishna S, et al. Enhanced mucosal immune response in cattle persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 oct 2008;125(3-4):337-43.
283. Zhu JJ, Stenfeldt C, Bishop EA, Canter JA, Eschbaumer M, Rodriguez LL, et al. Mechanisms of Maintenance of Foot-and-Mouth Disease Virus Persistence Inferred From Genes Differentially Expressed in Nasopharyngeal Epithelia of Virus Carriers and Non-carriers. *Frontiers in Veterinary Science* [Internet]. 2020 [cité 27 mars 2023];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00340>
284. de la Torre JC, Martínez-Salas E, Diez J, Villaverde A, Gebauer F, Rocha E, et al. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol.* juin 1988;62(6):2050-8.
285. Kopliku L, Relmy A, Romey A, Gorna K, Zientara S, Bakkali-Kassimi L, et al. Establishment of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection in MDBK cells | SpringerLink. *Arch Virol* [Internet]. 2015 [cité 30 sept 2020]; Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-015-2526-8>
286. O'Donnell V, Pacheco JM, Larocco M, Gladue DP, Pauszek SJ, Smoliga G, et al. Virus-host interactions in persistently FMDV-infected cells derived from bovine pharynx. *Virology.* nov 2014;468-470:185-96.
287. Eschbaumer M, Stenfeldt C, Smoliga GR, Pacheco JM, Rodriguez LL, Li RW, et al. Transcriptomic Analysis of Persistent Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus in Cattle Suggests Impairment of Apoptosis and Cell-Mediated Immunity in the Nasopharynx. *PLoS One* [Internet]. 19 sept 2016 [cité 30 sept 2020];11(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5028045/>
288. Pfaff F, Hägglund S, Zoli M, Blaise-Boisseau S, Laloy E, Koethe S, et al. Proteogenomics Uncovers Critical Elements of Host Response in Bovine Soft Palate Epithelial Cells Following In Vitro Infection with Foot-And-Mouth Disease Virus. *Viruses* [Internet]. 12 janv 2019 [cité 30 sept 2020];11(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6356718/>
289. Hägglund S, Laloy E, Näslund K, Pfaff F, Eschbaumer M, Romey A, et al. Model of persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate. *Transbound Emerg Dis.* janv 2020;67(1):133-48.
290. Grubman MJ, Moraes MP, Diaz-San Segundo F, Pena L, de los Santos T. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* juin 2008;53(1):8-17.
291. Ma X xia, Ma L na, Chang Q yan, Ma P, Li LJ, Wang Y ying, et al. Type I Interferon Induced and Antagonized by Foot-and-Mouth Disease Virus. *Front Microbiol* [Internet]. 13 août 2018 [cité 29 oct 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6099088/>
292. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal.* 20 janv 2014;20(3):460-73.
293. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* nov 2005;12(2):1542-52.



294. Joubert PE, Grégoire IP, Meiffren G, Rabourdin-Combe C, Faure M. Autophagie et pathogènes - « Bon appétit Messieurs ! ». *Med Sci (Paris)*. 1 janv 2011;27(1):41-7.
295. Choi Y, Bowman JW, Jung JU. Autophagy during viral infection — a double-edged sword. *Nat Rev Microbiol*. juin 2018;16(6):341-54.
296. Richetta C, Faure M. Autophagy in antiviral innate immunity. *Cellular Microbiology*. 2013;15(3):368-76.
297. Zhang W, Yang F, Zhu Z, Yang Y, Wang Z, Cao W, et al. Cellular DNAJA3, a Novel VP1-Interacting Protein, Inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus Replication by Inducing Lysosomal Degradation of VP1 and Attenuating Its Antagonistic Role in the Beta Interferon Signaling Pathway. *Journal of Virology* [Internet]. 1 juill 2019 [cité 8 avr 2021];93(13). Disponible sur: <https://jvi.asm.org/content/93/13/e00588-19>
298. Ma X, Ling Y, Li P, Sun P, Cao Y, Bai X, et al. Cellular Vimentin Interacts with Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Protein 3A and Negatively Modulates Viral Replication. *J Virol*. 30 juill 2020;94(16).
299. Sun D, Wen X, Wang M, Mao S, Cheng A, Yang X, et al. Apoptosis and Autophagy in Picornavirus Infection. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cité 17 juin 2021];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02032/full>
300. Gladue DP, O'Donnell V, Baker-Branstetter R, Holinka LG, Pacheco JM, Fernandez-Sainz I, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Protein 2C Interacts with Beclin1, Modulating Virus Replication. *J Virol*. nov 2012;86(22):12080-90.
301. Visser LJ, Aloise C, Swatek KN, Medina GN, Olek KM, Rabouw HH, et al. Dissecting distinct proteolytic activities of FMDV Lpro implicates cleavage and degradation of RLR signaling proteins, not its deISGylase/DUB activity, in type I interferon suppression. *PLoS Pathog* [Internet]. 15 juill 2020 [cité 30 mars 2021];16(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7384677/>
302. Yang W, Li D, Ru Y, Bai J, Ren J, Zhang J, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 3A Protein Causes Upregulation of Autophagy-Related Protein LRRC25 To Inhibit the G3BP1-Mediated RIG-Like Helicase-Signaling Pathway. *J Virol* [Internet]. 31 mars 2020 [cité 30 oct 2020];94(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7108857/>
303. Fan X, Han S, Yan D, Gao Y, Wei Y, Liu X, et al. Foot-and-mouth disease virus infection suppresses autophagy and NF- κ B antiviral responses via degradation of ATG5-ATG12 by 3Cpro. *Cell Death Dis*. janv 2017;8(1):e2561.
304. Monier B, Gettings M, Gay G, Mangeat T, Schott S, Guarner A, et al. Le dernier sursaut des cellules mourantes - Étape clé de la morphogenèse tissulaire. *Med Sci (Paris)*. 1 mai 2015;31(5):475-7.
305. You F, Sun H, Zhou X, Sun W, Liang S, Zhai Z, et al. PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. *Nat Immunol*. déc 2009;10(12):1300-8.
306. Abdullah SW, Wu J, Zhang Y, Bai M, Guan J, Liu X, et al. DDX21, a Host Restriction Factor of FMDV IRES-Dependent Translation and Replication. *Viruses*. 3 sept 2021;13(9):1765.
307. Feng HH, Zhu ZX, Cao WJ, Yang F, Zhang XL, Du XL, et al. Foot-and-mouth disease virus induces lysosomal degradation of NME1 to impair p53-regulated interferon-inducible



- antiviral genes expression. *Cell Death Dis* [Internet]. 29 août 2018 [cité 30 oct 2020];9(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6115381/>
308. Wang J, Wang Y, Liu J, Ding L, Zhang Q, Li X, et al. A critical role of N-myc and STAT interactor (Nmi) in foot-and-mouth disease virus (FMDV) 2C-induced apoptosis. *Virus Res.* déc 2012;170(1-2):59-65.
309. Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* août 2011;45(2):189-201.
310. Habiela M, Seago J, Perez-Martin E, Waters R, Windsor M, Salguero FJ, et al. Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: a review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity. *J Gen Virol.* nov 2014;95(Pt 11):2329-45.
311. Pega J, Bucafusco D, Di Giacomo S, Schammas JM, Malacari D, Capozzo AV, et al. Early Adaptive Immune Responses in the Respiratory Tract of Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cattle. *J Virol.* mars 2013;87(5):2489-95.
312. Juleff N, Windsor M, Lefevre EA, Gubbins S, Hamblin P, Reid E, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Can Induce a Specific and Rapid CD4+ T-Cell-Independent Neutralizing and Isotype Class-Switched Antibody Response in Naïve Cattle. *J Virol.* avr 2009;83(8):3626-36.
313. Pacheco JM, Butler JE, Jew J, Ferman GS, Zhu J, Golde WT. IgA Antibody Response of Swine to Foot-and-Mouth Disease Virus Infection and Vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* avr 2010;17(4):550-8.
314. Doel TR. Natural and Vaccine Induced Immunity to FMD. In: Mahy BWJ, éditeur. *Foot-and-Mouth Disease Virus* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005 [cité 31 janv 2023]. p. 103-31. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/3-540-27109-0_5
315. Rigden RC, Carrasco CP, Summerfield A, McCullough KC. Macrophage phagocytosis of foot-and-mouth disease virus may create infectious carriers. *Immunology.* août 2002;106(4):537-48.
316. Sei JJ, Waters RA, Kenney M, Barlow JW, Golde WT. Effect of Foot-and-Mouth Disease Virus Infection on the Frequency, Phenotype and Function of Circulating Dendritic Cells in Cattle. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152192.
317. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 19 mars 1998;392(6673):245-52.
318. Bautista EM, Ferman GS, Gregg D, Brum MCS, Grubman MJ, Golde WT. Constitutive Expression of Alpha Interferon by Skin Dendritic Cells Confers Resistance to Infection by Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Virol.* avr 2005;79(8):4838-47.
319. Guzylack-Piriou L, Bergamin F, Gerber M, McCullough KC, Summerfield A. Plasmacytoid dendritic cell activation by foot-and-mouth disease virus requires immune complexes. *European Journal of Immunology.* 2006;36(7):1674-83.
320. McCullough KC, Parkinson D, Crowther JR. Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology.* oct 1988;65(2):187-91.
321. Golde WT, de los Santos T, Robinson L, Grubman MJ, Sevilla N, Summerfield A, et al. Evidence of Activation and Suppression during the Early Immune Response to Foot-and-Mouth Disease Virus. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2011;58(4):283-90.



322. Segundo FDS, Rodríguez-Calvo T, Avila A de, Sevilla N. Immunosuppression during Acute Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus in Swine Is Mediated by IL-10. *PLOS ONE*. 21 mai 2009;4(5):e5659.
323. Rodríguez-Habibe I, Celis-Giraldo C, Patarroyo ME, Avendaño C, Patarroyo MA. A Comprehensive Review of the Immunological Response against Foot-and-Mouth Disease Virus Infection and Its Evasion Mechanisms. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 14 déc 2020 [cité 17 juin 2021];8(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7765147/>
324. Guo Z, Zhao Y, Zhang Z, Li Y. Interleukin-10-Mediated Lymphopenia Caused by Acute Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus in Mice. *Viruses*. déc 2021;13(12):2358.
325. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol*. avr 2004;65(4):282-90.
326. Díaz-San Segundo F, Salguero FJ, de Avila A, Fernández de Marco MM, Sánchez-Martín MA, Sevilla N. Selective Lymphocyte Depletion during the Early Stage of the Immune Response to Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in Swine. *J Virol*. mars 2006;80(5):2369-79.
327. Bautista EM, Ferman GS, Golde WT. Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 20 mars 2003;92(1):61-73.
328. Sanz-Parra A, Sobrino F, Ley V. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *Journal of General Virology*. 1998;79(3):433-6.
329. Abubakar M, Manzoor S, Ahmed A. Interplay of foot and mouth disease virus with cell-mediated and humoral immunity of host. *Reviews in Medical Virology*. 2018;28(2):e1966.
330. Patch JR, Dar PA, Waters R, Toka FN, Barrera J, Schutta C, et al. Infection with foot-and-mouth disease virus (FMDV) induces a natural killer (NK) cell response in cattle that is lacking following vaccination. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 1 sept 2014;37(4):249-57.
331. Toka FN, Nfon CK, Dawson H, Estes DM, Golde WT. Activation of Porcine Natural Killer Cells and Lysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Infected Cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. mars 2009;29(3):179-92.
332. Toka FN, Nfon C, Dawson H, Golde WT. Natural Killer Cell Dysfunction during Acute Infection with Foot-and-Mouth Disease Virus. *Clin Vaccine Immunol*. déc 2009;16(12):1738-49.
333. Belz GT. Intercellular and lymphatic pathways associated with tonsils of the soft palate in young pigs. *Anat Embryol*. 1 mars 1998;197(4):331-40.
334. Meek HC, Stenfeldt C, Arzt J. Morphological and Phenotypic Characteristics of the Bovine Nasopharyngeal Mucosa and Associated Lymphoid Tissue. *J Comp Pathol*. 8 sept 2022;198:62-79.
335. Nouvelles du Réseau OMSA/FAO de Laboratoires de référence pour la fièvre aphteuse [Internet]. *Bulletin OMSA*. [cité 1 févr 2023]. Disponible sur: https://bulletin.woah.org/?officiel=08-4-1-2022-1_oie-fao-fmd-ref-lab&lang=fr



336. Brückner G, Saraiva-Vieira VE. OIE STRATEGY FOR THE CONTROL AND ERADICATION OF FOOT AND MOUTH DISEASE AT REGIONAL AND GLOBAL LEVELS. 2010;
337. Commission européenne de lutte contre la fièvre aphteuse | La santé animale | Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture [Internet]. [cité 1 févr 2023]. Disponible sur: <https://www.fao.org/animal-health/programmes/eufmd/fr/>
338. Doherr MG, Audigé L. Monitoring and surveillance for rare health-related events: a review from the veterinary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29 juill 2001;356(1411):1097-106.
339. Abd El-Rahim IHA, Asghar AH, Mohamed AM, Fat'hi SM. The impact of importation of live ruminants on the epizootiology of foot and mouth disease in Saudi Arabia. *Rev Sci Tech.* déc 2016;35(3):769-78.
340. Kouato BS, Clercq KD, Abatih E, Pozzo FD, King DP, Thys E, et al. Review of epidemiological risk models for foot-and-mouth disease: Implications for prevention strategies with a focus on Africa. *PLOS ONE.* 13 déc 2018;13(12):e0208296.
341. Charrier F, Barbier M. Le socio-pathosystème : une notion pour comprendre et construire l'action de gestion de la santé animale. *Nat Sci Soc.* 1 oct 2021;29(4):396-409.
342. Canini L, Blaise-Boisseau S, Nardo AD, Shaw AE, Romey A, Relmy A, et al. Identification of diffusion routes of O/EA-3 topotype of foot-and-mouth disease virus in Africa and Western Asia between 1974 and 2019 – a phylogeographic analysis. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2022;69(5):e2230-9.
343. Rautureau S, Dufour B, Durand B. Structuring the Passive Surveillance Network Improves Epizootic Detection and Control Efficacy: A Simulation Study on Foot-and-Mouth Disease in France. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2012;59(4):311-22.
344. Ammendrup S, Barcos LO. The implementation of traceability systems.
345. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen SS, Alvarez J, Bicout DJ, Calistri P, Canali E, et al. Scientific Opinion on the assessment of the control measures for category A diseases of Animal Health Law: Foot and Mouth Disease. *EFSA Journal.* 2021;19(6):e06632.
346. Bachrach HL, Breese SS, Callis JJ, Hess WR, Patty RE. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. *Proc Soc Exp Biol Med.* mai 1957;95(1):147-52.
347. World Organization for Animal Health (OIE). Chapter 1.1.4: Biosafety and biosecurity: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratory and animal facilities. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* [Internet]. 2021. Disponible sur: Available online: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.04_BIOSAFETY_BIOSECURITY.pdf
348. Knowledge Bank: Datation des lésions de Fièvre Aphteuse Guide pratique [Internet]. [cité 1 févr 2023]. Disponible sur: https://eufmdlearning.works/mod/page/view.php?id=17169&lang=en_us
349. Zhang Z, Waters R, Li Y. Pathogenesis of non-epithelial foot-and-mouth disease in neonatal animals. *Veterinary Microbiology.* 1 mars 2021;254:108961.



350. Ferris NP, Nordengrahn A, Hutchings GH, Reid SM, King DP, Ebert K, et al. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *J Virol Methods*. janv 2009;155(1):10-7.
351. Romey A, Relmy A, Gorna K, Laloy E, Zientara S, Blaise-Boisseau S, et al. Safe and cost-effective protocol for shipment of samples from Foot-and-Mouth Disease suspected cases for laboratory diagnostic. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65(1):197-204.
352. Wong CL, Yong CY, Ong HK, Ho KL, Tan WS. Advances in the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *Frontiers in Veterinary Science* [Internet]. 2020 [cité 1 févr 2023];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00477>
353. King DP, Ferris NP, Shaw AE, Reid SM, Hutchings GH, Giuffre AC, et al. Detection of foot-and-mouth disease virus: comparative diagnostic sensitivity of two independent real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *J Vet Diagn Invest*. janv 2006;18(1):93-7.
354. Roeder PL, Le Blanc Smith PM. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res Vet Sci*. sept 1987;43(2):225-32.
355. Grazioli S, Ferris NP, Dho G, Pezzoni G, Morris AS, Mioulet V, et al. Development and validation of a simplified serotyping ELISA based on monoclonal antibodies for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, C and Asia 1. *Transbound Emerg Dis*. nov 2020;67(6):3005-15.
356. Gray A, Wood B, Henry E, Azhar M, King D, Mioulet V. Evaluation of Cell Lines for the Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus and Other Viruses Causing Vesicular Disease. *Frontiers in Veterinary Science*. 28 juill 2020;7.
357. Knowles NJ, Wadsworth J, Bachanek-Bankowska K, King DP. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev Sci Tech*. déc 2016;35(3):741-55.
358. Mackay DK, Bulut AN, Rendle T, Davidson F, Ferris NP. A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*. sept 2001;97(1-2):33-48.
359. Goris N, De Clercq K. Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay--Part I. Quality assurance: development of secondary and working standards. *Rev Sci Tech*. déc 2005;24(3):995-1004.
360. Foglia EA, Lembo T, Kazwala R, Ekwem D, Shirima G, Grazioli S, et al. Combining Multiple Assays Improves Detection and Serotyping of Foot-and-Mouth Disease Virus. A Practical Example with Field Samples from East Africa. *Viruses*. 10 août 2021;13(8):1583.
361. Isoda N, Kadohira M, Sekiguchi S, Schuppers M, Stärk KDC. Review: Evaluation of Foot-and-Mouth Disease Control Using Fault Tree Analysis. *Transbound Emerg Dis*. juin 2015;62(3):233-44.
362. Wada M, Stevenson M, Cogger N, Carpenter T. Evaluation of the Control Strategy for the 2010 Foot-and-Mouth Disease Outbreak in Japan Using Disease Simulation. *Transbound Emerg Dis*. juin 2017;64(3):978-89.
363. Park JH, Lee KN, Ko YJ, Kim SM, Lee HS, Shin YK, et al. Control of foot-and-mouth disease during 2010-2011 epidemic, South Korea. *Emerg Infect Dis*. avr 2013;19(4):655-9.



364. Rivera AM, Sanchez-Vazquez MJ, Pituco EM, Buzanovsky LP, Martini M, Cosivi O. Advances in the eradication of foot-and-mouth disease in South America: 2011-2020. *Front Vet Sci.* 2022;9:1024071.
365. Barteling SJ. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. *Rev Sci Tech.* déc 2002;21(3):577-88.
366. Vallée H. Sur l'immunisation anti-aphteuse par le virus formolé. *Rev gén Méd vét.* 1926;129-34.
367. Schmidt S. Immunisierung des meerschweinchen gegen drei verschiedene typen von maul-und-klauensechevirus vermittels eines trivalent aluminumhydroxydadsorbates. *Immunitätforsch.* 1936;88-91.
368. Waldmann O, Köbe K. Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul- und Klauenseuche. *Deutsches Tierärzteblatt.* 1938;5:318-20.
369. Barteling SJ, Woortmeyer R. Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus. Conditions for the preparation of safe vaccine. *Arch Virol.* 1984;80(2-3):103-17.
370. Bahnemann HG. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine.* août 1990;8(4):299-303.
371. Barteling SJ. Foot-and-mouth disease vaccine production and research in the Netherlands. *Veterinary Quarterly.* 1 nov 1987;9(sup1):5-15.
372. McKercher PD, Gailunas P. Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of immunity and local tissue reaction. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1969;28(2):165-76.
373. Freund J, Thomson KJ. A Simple, Rapid Technic of Preparing Water-in-Oil Emulsions of Penicillin, Drugs and Biologics. *Science.* 4 mai 1945;101(2627):468-9.
374. de los Santos T, Diaz-San Segundo F, Rodriguez LL. The need for improved vaccines against foot-and-mouth disease. *Current Opinion in Virology.* 1 avr 2018;29:16-25.
375. Pasick J. Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. *Anim Health Res Rev.* déc 2004;5(2):257-62.
376. Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, Paton DJ, Sammin DJ, Greiner M, et al. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine.* 17 nov 2006;24(47-48):6966-79.
377. Mahapatra M, Parida S. Foot and mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives. *Expert Rev Vaccines.* juill 2018;17(7):577-91.
378. Paton DJ, Valarcher JF, Bergmann I, Matlho OG, Zakharov VM, Palma EL, et al. Selection of foot and mouth disease vaccine strains--a review. *Rev Sci Tech.* déc 2005;24(3):981-93.
379. Diaz-San Segundo F, Medina GN, Stenfeldt C, Arzt J, de Los Santos T. Foot-and-mouth disease vaccines. *Vet Microbiol.* juill 2017;206:102-12.
380. Robinson L, Knight-Jones TJD, Charleston B, Rodriguez LL, Gay CG, Sumption KJ, et al. Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 3 - Vaccines. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2016;63(S1):30-41.



381. Parida S, Anderson J, Cox SJ, Barnett PV, Paton DJ. Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. *Vaccine*. 20 févr 2006;24(8):1107-16.
382. Kenubih A. Foot and Mouth Disease Vaccine Development and Challenges in Inducing Long-Lasting Immunity: Trends and Current Perspectives. *Vet Med (Auckl)*. 2021;12:205-15.
383. Lu Z, Yu S, Wang W, Chen W, Wang X, Wu K, et al. Development of Foot-and-Mouth Disease Vaccines in Recent Years. *Vaccines (Basel)*. 28 oct 2022;10(11):1817.
384. Kamel M, El-Sayed A, Castañeda Vazquez H. Foot-and-mouth disease vaccines: recent updates and future perspectives. *Arch Virol*. juin 2019;164(6):1501-13.
385. Forner M, Cañas-Arranz R, Defaus S, de León P, Rodríguez-Pulido M, Ganges L, et al. Peptide-Based Vaccines: Foot-and-Mouth Disease Virus, a Paradigm in Animal Health. *Vaccines (Basel)*. 8 mai 2021;9(5):477.
386. Cao Y. Adjuvants for foot-and-mouth disease virus vaccines: recent progress. *Expert Rev Vaccines*. nov 2014;13(11):1377-85.
387. Garcí a-Briones MM, Blanco E, Chiva C, Andreu D, Ley V, Sobrino F. Immunogenicity and T cell recognition in swine of foot-and-mouth disease virus polymerase 3D. *Virology*. 1 mai 2004;322(2):264-75.
388. Mitoma S, Carr BV, Harvey Y, Moffat K, Sekiguchi S, Charleston B, et al. The detection of long-lasting memory foot-and-mouth disease (FMD) virus serotype O-specific CD4+ T cells from FMD-vaccinated cattle by bovine major histocompatibility complex class II tetramer. *Immunology*. 2021;164(2):266-78.
389. Grubman MJ. New approaches to control foot-and-mouth disease: antivirals and novel vaccines. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006;19(3):341-6.
390. Dias CC, Moraes MP, Weiss M, Segundo FDS, Perez-Martin E, Salazar AM, et al. Novel Antiviral Therapeutics to Control Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. oct 2012;32(10):462-73.
391. Pariente N, Sierra S, Airaksinen A. Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res*. févr 2005;107(2):183-93.
392. Gu CJ, Zheng CY, Zhang Q, Shi LL, Li Y, Qu SF. An Antiviral Mechanism Investigated with Ribavirin as an RNA Virus Mutagen for Foot-and-mouth Disease Virus. *BMB Reports*. 2006;39(1):9-15.
393. Soumajit S, Tamil Selvan RP, Bhanuprakash V. In vitro antiviral efficacy of pleconaril and ribavirin on foot-and-mouth disease virus replication. *Virusdisease*. déc 2019;30(4):562-70.
394. Theerawatanasirikul S, Semkum P, Lueangaramkul V, Chankeeree P, Thangthamniyom N, Lekcharoensuk P. Non-Nucleoside Inhibitors Decrease Foot-and-Mouth Disease Virus Replication by Blocking the Viral 3Dpol. *Viruses*. 30 déc 2022;15(1):124.
395. Avila AI de, Moreno E, Perales C, Domingo E. Favipiravir can evoke lethal mutagenesis and extinction of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research*. 2017;233:105.



396. M. S. Wassel M, M. Gamal Eldin W, Ragab A, A. M. Elhag Ali G, A. Ammar Y. Antiviral Activity Of Adamantane-Pyrazole Derivatives Against Foot And Mouth Disease Virus Infection In Vivo And In Vitro With Molecular Docking Study. *Journal of Applied Veterinary Sciences*. 1 oct 2020;5(4):37-46.
397. Nishi T, Fukai K, Masujin K, Kawaguchi R, Ikezawa M, Yamada M, et al. Administration of the antiviral agent T-1105 fully protects pigs from foot-and-mouth disease infection. *Antiviral Research*. 1 déc 2022;208:105425.
398. Medina GN, de los Santos T, Diaz-San Segundo F. Use of IFN-Based Biotherapeutics to Harness the Host Against Foot-And-Mouth Disease. *Front Vet Sci* [Internet]. 11 août 2020 [cité 30 oct 2020];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431487/>
399. Moraes MP, de los Santos T, Koster M, Turecek T, Wang H, Andreyev VG, et al. Enhanced Antiviral Activity against Foot-and-Mouth Disease Virus by a Combination of Type I and II Porcine Interferons. *J Virol*. juill 2007;81(13):7124-35.
400. Vidalain PO, Lucas-Hourani M, Helynck O, Tangy F, Munier-Lehmann H. Activation de la réponse innée antivirale par des inhibiteurs de la biosynthèse des pyrimidines - Les surprises d'un criblage phénotypique. *Med Sci (Paris)*. 1 janv 2015;31(1):98-104.
401. Li SF, Gong MJ, Sun YF, Shao JJ, Zhang YG, Chang HY. In Vitro and in Vivo Antiviral Activity of Mizoribine Against Foot-And-Mouth Disease Virus. *Molecules*. 3 mai 2019;24(9):1723.
402. Li S fang, Gong M jiao, Sun Y feng, Shao J jun, Zhang Y guang, Chang H yun. Antiviral activity of brequinar against foot-and-mouth disease virus infection in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 août 2019;116:108982.
403. Mei-Jiao G, Shi-Fang L, Yan-Yan C, Jun-Jun S, Yue-Feng S, Ting-Ting R, et al. Antiviral effects of selected IMPDH and DHODH inhibitors against foot and mouth disease virus. *Biomed Pharmacother*. oct 2019;118:109305.
404. Zhang Z, Zhang R, Yin J, Zhao S, Qin X, Chen F, et al. Antiviral Effect of Manganese against Foot-and-Mouth Disease Virus Both in PK15 Cells and Mice. *Viruses*. févr 2023;15(2):390.
405. Brown F. The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Research*. 1 janv 2003;91(1):3-7.
406. Arkwright JA, Burbury M, Bedson SP, Maitland HB. Observations on Foot-and-Mouth Disease: Section I. Transmission of Foot-and-Mouth Disease to Rodents. Section II. Tide Attempted Cultivation of the Virus and its Reaction to Various Agents, Chemical and Physical. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1 janv 1925;38:229-55.
407. Skinner HH. Propagation of Strains of Foot-and-Mouth Disease Virus in Unweaned White Mice. *Proc R Soc Med*. déc 1951;44(12):1041-4.
408. Beattie JM, Morcos Z, Peden D. Transmission of Foot-and-mouth Disease in Rodents by Contact: II. The Spread Of Foot-And-Mouth Disease By Rats, Rabbits, And Birds. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1 janv 1928;41:353-62.
409. Bedson SP, Maitland HB, Burbury YM. Further Observations on Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1 janv 1927;40:5-36.



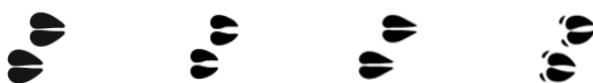
410. Skinner HH. Infection of Chickens and Chick Embryos with the Viruses of Foot-and-mouth Disease and of Vesicular Stomatitis. *Nature*. déc 1954;174(4440):1052-3.
411. Fernández FM, Borca MV, Sadir AM, Fondevila N, Mayo J, Schudel AA. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: Susceptibility and immune response of adult mice. *Veterinary Microbiology*. 1 juin 1986;12(1):15-24.
412. Skinner HH, Henderson WM, Brooksby JB. Use of unweaned white mice in foot-and-mouth disease research. *Nature*. 10 mai 1952;169(4306):794-5.
413. Knudsen RC, Groocock CM, Andersen AA. Immunity to foot-and-mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune responses. *Infect Immun*. juin 1979;24(3):787-92.
414. Cartwright SF, Pay TWF, Henderson WM. Multiplication of the Virus of Foot-and-Mouth Disease in Culture. *Journal of General Microbiology*. 1 juin 1957;16(3):730-48.
415. Maitland MC, Maitland HB. Cultivation of Foot-And-Mouth Disease Virus. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1 janv 1931;44:106-13.
416. Frenkel H. La culture de la virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. *Bull Off Int des Epizoot*. 1947;155-62.
417. Bachrach HL, Callis JJ, Hess WR, Patty RE. A plaque assay for foot-and-mouth disease virus and kinetics of virus reproduction. *Virology*. 1 oct 1957;4(2):224-36.
418. House C, House JA. Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: Comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. *Veterinary Microbiology*. 1 juin 1989;20(2):99-109.
419. Fukai K, Morioka K, Yamada M, Nishi T, Yoshida K, Kitano R, et al. Comparative performance of fetal goat tongue cell line ZZ-R 127 and fetal porcine kidney cell line LFBK- $\alpha\beta 6$ for Foot-and-mouth disease virus isolation. *J Vet Diagn Invest*. juill 2015;27(4):516-21.
420. Zabal O, Fondevila N. Selection of Highly Susceptible Cell Lines to Foot and Mouth Disease Virus Infection. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 16 août 2013;3(5):263-6.
421. Jones AL. Growth of Foot and Mouth Disease Virus in Organ Cultures of Mouse Pancreas. *Nature*. août 1965;207(4997):665-6.
422. Lee J, Byeon JS, Gu NY, Lee S, Lee SA, Jeong DU, et al. Bovine tongue epithelium-derived cells: A new source of bovine mesenchymal stem cells. *Biosci Rep*. 17 avr 2020;40(4):BSR20181829.
423. A A, Ab Z, U F, A L, K N, M A, et al. Comparative Sensitivity of LFBK and LFBK $\alpha\beta 6$ Cell Lines for Isolation of Foot and Mouth Disease Virus from Riverine Buffaloes by Using Oro-Pharyngeal Fluids. *Journal of Virology & Antiviral Research [Internet]*. 13 févr 2020 [cité 16 févr 2023];2019. Disponible sur: <https://www.scitechnol.com/abstract/comparative-sensitivity-of-lfbk-and-lfbk-v6-cell-lines-for-isolation-of-foot-and-mouth-disease-virus-from-riverine-buffaloes-by-us-8371.html>
424. Yasmin A, Moffat K, Reid E, Charleston B, Milling S, Seago J. Characterisation of bovine dendritic cells following FMDV infection. *Access Microbiology*. 2019;1(1A):586.
425. Paprocka G. Applying primary lamb kidney cell culture in diagnosing foot-and-mouth disease. *Medycyna Weterynaryjna*. 2008;64(3):332-4.



426. Mao R, Sun D, Yang F, Tian H, Zhu Z, Zheng H, et al. Establishment and Evaluation of a Stable Bovine Thyroid Cell Line for Investigating Foot-and-Mouth Disease Virus. *Front Microbiol.* 2018;9:2149.
427. Dill V, Zimmer A, Beer M, Eschbaumer M. Investigation of cell culture conditions for optimal foot-and-mouth disease virus production. *BMC Biotechnology.* 7 juin 2019;19(1):33.
428. Barteling SJ, Vreeswijk J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine.* 1 févr 1991;9(2):75-88.
429. Dinka SK, Swaney LM, McVicar JW. Selection of a stable clone of the MVPK-1 fetal porcine kidney cell for assays of foot-and-mouth disease virus. *Can J Microbiol.* mars 1977;23(3):295-9.
430. Pulido MR, Martínez-Salas E, Sobrino F, Sáiz M. MDA5 cleavage by the Leader protease of foot-and-mouth disease virus reveals its pleiotropic effect against the host antiviral response. *Cell Death Dis.* 2 sept 2020;11(8):718.
431. Lagrée AC, Fasani F, Rouxel C, Pivet M, Pourcelot M, Fablet A, et al. Bovine Organospecific Microvascular Endothelial Cell Lines as New and Relevant In Vitro Models to Study Viral Infections. *International Journal of Molecular Sciences.* janv 2020;21(15):5249.
432. Madin SH, Darby NB. Established Kidney Cell Lines of Normal Adult Bovine and Ovine Origin. *Experimental Biology and Medicine.* 1 juill 1958;98(3):574-6.
433. Kim SM, Kim SK, Lee KN, Park JH, Kim B. Stable Expression of Bovine Integrin Beta-6 Increases Susceptibility of Goat Kidney Cell Line to Foot-and-mouth Disease Virus. *J Bacteriol Virol.* 9 mars 2020;50(1):35-43.
434. Brehm KE, Ferris NP, Lenk M, Riebe R, Haas B. Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J Clin Microbiol.* oct 2009;47(10):3156-60.
435. Gray AR, Wood BA, Henry E, King DP, Mioulet V. Elimination of Non-cytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus From the LFBK- $\alpha\beta 6$ Cell Line. *Frontiers in Veterinary Science* [Internet]. 2021 [cité 21 mars 2023];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.715120>
436. Holinka-Patterson LG, Fish IH, Bertram MR, Hartwig EJ, Smoliga GR, Stenfeldt C, et al. Genome of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Contaminating a Continuous LFBK- $\alpha\beta 6$ Cell Line. *Microbiol Resour Announc.* 11(2):e01167-21.
437. Harvey Y, Jackson B, Carr BV, Childs K, Moffat K, Freimanis G, et al. An Improved $\alpha\beta 6$ -Receptor-Expressing Suspension Cell Line for Foot-and-Mouth Disease Vaccine Production. *Viruses.* 16 mars 2022;14(3):621.
438. Wang Y, Mao Q, Chang H, Wu Y, Pan S, Li Y, et al. Inability of FMDV replication in equine kidney epithelial cells is independent of integrin $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 6$. *Virology.* 1 mai 2016;492:251-8.
439. Barteling SJ. Certain aspects of foot--and--mouth disease. Virus production in growing BHK suspended cell cultures. *Dev Biol Stand.* 1976;35:55-60.
440. Dill V, Pfaff F, Zimmer A, Beer M, Eschbaumer M. Adherent and suspension baby hamster kidney cells have a different cytoskeleton and surface receptor repertoire. *PLoS One.* 2021;16(6):e0246610.



441. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2020;21(6):341-52.
442. Guarino M. Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 1 janv 2007;39(12):2153-60.
443. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 1 juin 2009;119(6):1420-8.
444. Zhang X, Yang F, Li K, Cao W, Ru Y, Chen S, et al. The Insufficient Activation of RIG-I–Like Signaling Pathway Contributes to Highly Efficient Replication of Porcine Picornaviruses in IBRS-2 Cells. *Molecular & Cellular Proteomics.* 1 janv 2021;20:100147.
445. Ruggli N, Bird BH, Liu L, Bauhofer O, Tratschin JD, Hofmann MA. Npro of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN- α/β induction. *Virology.* 30 sept 2005;340(2):265-76.
446. He B, Chen G, Zeng Y. Three-dimensional cell culture models for investigating human viruses. *Virol Sin.* 27 oct 2016;31(5):363-79.
447. Harb A, Fakhreddine M, Zaraket H, Saleh FA. Three-Dimensional Cell Culture Models to Study Respiratory Virus Infections Including COVID-19. *Biomimetics (Basel).* 25 déc 2021;7(1):3.
448. Geiser J, Boivin G, Huang S, Constant S, Kaiser L, Tapparel C, et al. RSV and HMPV Infections in 3D Tissue Cultures: Mechanisms Involved in Virus-Host and Virus-Virus Interactions. *Viruses.* janv 2021;13(1):139.
449. Iverson E, Kaler L, Agostino EL, Song D, Duncan GA, Scull MA. Leveraging 3D Model Systems to Understand Viral Interactions with the Respiratory Mucosa. *Viruses.* déc 2020;12(12):1425.
450. Tsang JOL, Zhou J, Zhao X, Li C, Zou Z, Yin F, et al. Development of Three-Dimensional Human Intestinal Organoids as a Physiologically Relevant Model for Characterizing the Viral Replication Kinetics and Antiviral Susceptibility of Enteroviruses. *Biomedicines.* janv 2021;9(1):88.
451. Sridhar A, Simmini S, Ribeiro CMS, Tapparel C, Evers MM, Pajkrt D, et al. A Perspective on Organoids for Virology Research. *Viruses.* nov 2020;12(11):1341.
452. Dash P, Barnett PV, Denyer MS, Jackson T, Stirling CMA, Hawes PC, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus Replicates Only Transiently in Well-Differentiated Porcine Nasal Epithelial Cells. *J Virol.* sept 2010;84(18):9149-60.
453. Hannezo E, Prost J, Joanny JF. Theory of epithelial sheet morphology in three dimensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 7 janv 2014;111(1):27-32.
454. Kurn H, Daly DT. Histology, Epithelial Cell [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021 [cité 9 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559063/>
455. Robinson L, Knight-Jones TJD, Charleston B, Rodriguez LL, Gay CG, Sumption KJ, et al. Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 7 – Pathogenesis and Molecular Biology. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2016;63(S1):63-71.



456. Sarry M, Caignard G, Dupré J, Zientara S, Vitour D, Bakkali Kassimi L, et al. Host-Specific Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D Polymerase and the Type-I Interferon Pathway. *Viruses*. 1 mars 2023;15(3):666.
457. Rai DK, Lawrence P, Kloc A, Schafer E, Rieder E. Analysis of the interaction between host factor Sam68 and viral elements during foot-and-mouth disease virus infections. *Virol J* [Internet]. 23 déc 2015 [cité 30 oct 2020];12. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689063/>
458. Xue Q, Liu H, Zeng Q, Zheng H, Xue Q, Cai X. The DEAD-Box RNA Helicase DDX1 Interacts with the Viral Protein 3D and Inhibits Foot-and-Mouth Disease Virus Replication. *Virol Sin*. 29 juill 2019;34(6):610-7.
459. Choudhury SM, Ma X, Zeng Z, Luo Z, Li Y, Nian X, et al. Senecavirus a 3D Interacts with NLRP3 to Induce IL-1 β Production by Activating NF- κ B and Ion Channel Signals. *Microbiol Spectr*. 10(2):e02097-21.
460. Wang W, Xiao F, Wan P, Pan P, Zhang Y, Liu F, et al. EV71 3D Protein Binds with NLRP3 and Enhances the Assembly of Inflammasome Complex. *PLoS Pathog*. 6 janv 2017;13(1):e1006123.
461. Kuo RL, Chen CJ, Wang RYL, Huang HI, Lin YH, Tam EH, et al. Role of Enteroviral RNA-Dependent RNA Polymerase in Regulation of MDA5-Mediated Beta Interferon Activation. *J Virol*. 1 mai 2019;93(10):e00132-19.
462. McBride AE, Schlegel A, Kirkegaard K. Human protein Sam68 relocalization and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 mars 1996;93(6):2296-301.
463. Qiu S, Ogino M, Luo M, Ogino T, Green TJ. Structure and Function of the N-Terminal Domain of the Vesicular Stomatitis Virus RNA Polymerase. *J Virol*. 30 déc 2015;90(2):715-24.
464. Morel J, Sedano L, Lejal N, Da Costa B, Batsché E, Muchardt C, et al. The Influenza Virus RNA-Polymerase and the Host RNA-Polymerase II: RPB4 Is Targeted by a PB2 Domain That Is Involved in Viral Transcription. *Viruses*. 3 mars 2022;14(3):518.
465. Fablet A, Kundlacz C, Dupré J, Hirchaud E, Postic L, Sailleau C, et al. Comparative Virus-Host Protein Interactions of the Bluetongue Virus NS4 Virulence Factor. *Viruses*. 19 janv 2022;14(2):182.
466. Vidalain PO, Jacob Y, Hagemeyer MC, Jones LM, Neveu G, Roussarie JP, et al. A Field-Proven Yeast Two-Hybrid Protocol Used to Identify Coronavirus–Host Protein–Protein Interactions. *Coronaviruses*. 18 déc 2014;1282:213-29.
467. Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ. [14] Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1983 [cité 11 mai 2023]. p. 228-45. (Recombinant DNA Part C; vol. 101). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687983010174>
468. Walhout AJM, Vidal M. High-Throughput Yeast Two-Hybrid Assays for Large-Scale Protein Interaction Mapping. *Methods*. 1 juill 2001;24(3):297-306.
469. D'Agostino M, Risselada HJ, Mayer A. Steric hindrance of SNARE transmembrane domain organization impairs the hemifusion-to-fusion transition. *EMBO Rep*. nov 2016;17(11):1590-608.



470. Røgen P. Quantifying steric hindrance and topological obstruction to protein structure superposition. *Algorithms for Molecular Biology*. 27 févr 2021;16(1):1.
471. Ohashi K, Mizuno K. A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. *Methods Mol Biol*. 2014;1174:247-62.
472. Petiot E, El-Wajjali A, Esteban G, Gény C, Pinton H, Marc A. Real-time monitoring of adherent Vero cell density and apoptosis in bioreactor processes. *Cytotechnology*. août 2012;64(4):429-41.
473. Petiot E, Guedon E, Blanchard F, Gény C, Pinton H, Marc A. Kinetic characterization of vero cell metabolism in a serum-free batch culture process. *Biotechnol Bioeng*. 1 sept 2010;107(1):143-53.
474. Schley D, Ward J, Zhang Z. Modelling foot-and-mouth disease virus dynamics in oral epithelium to help identify the determinants of lysis. *Bull Math Biol*. juill 2011;73(7):1503-28.
475. Martin-Latil S, Gnädig NF, Mallet A, Desdouits M, Guivel-Benhassine F, Jeannin P, et al. Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood*. 19 juill 2012;120(3):572-80.
476. Ramboer E, De Craene B, De Kock J, Vanhaecke T, Berx G, Rogiers V, et al. Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *J Hepatol*. oct 2014;61(4):925-43.
477. Maqsood MI, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int*. oct 2013;37(10):1038-45.
478. Fukuda T, Furuya K, Takahashi K, Orimoto A, Sugano E, Tomita H, et al. Combinatorial expression of cell cycle regulators is more suitable for immortalization than oncogenic methods in dermal papilla cells. *iScience*. 22 janv 2021;24(1):101929.
479. Katakura Y, Alam S, Shirahata S. Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol*. 1998;57:69-91.
480. Hopfer U, Jacobberger JW, Gruenert DC, Eckert RL, Jat PS, Whitsett JA. Immortalization of epithelial cells. *Am J Physiol*. janv 1996;270(1 Pt 1):C1-11.
481. Lipps C, May T, Hauser H, Wirth D. Eternity and functionality - rational access to physiologically relevant cell lines. *Biol Chem*. déc 2013;394(12):1637-48.
482. Lipps C, Klein F, Wahlicht T, Seiffert V, Butueva M, Zauers J, et al. Expansion of functional personalized cells with specific transgene combinations. *Nat Commun*. 8 mars 2018;9(1):994.
483. Kuburich NA, den Hollander P, Pietz JT, Mani SA. Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. *Seminars in Cancer Biology*. 1 nov 2022;86:816-26.
484. Drillien R, Pradeau-Aubreton K, Batisse J, Mezher J, Schenckbecher E, Marguin J, et al. Efficient production of protein complexes in mammalian cells using a poxvirus vector. *PLoS One*. 2022;17(12):e0279038.
485. Hebben M, Brants J, Birck C, Samama JP, Wasylyk B, Spohner D, et al. High level protein expression in mammalian cells using a safe viral vector: modified vaccinia virus Ankara. *Protein Expr Purif*. déc 2007;56(2):269-78.
486. White SD, Conwell K, Langland JO, Jacobs BL. Use of a negative selectable marker for rapid selection of recombinant vaccinia virus. *Biotechniques*. mai 2011;50(5):303-9.



487. Falkner FG, Moss B. Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol.* juin 1988;62(6):1849-54.
488. Stellmann C, Bornarel P. [Calculation tables of D 50 titres of viral suspensions and their accuracy]. *Ann Inst Pasteur (Paris).* déc 1971;121(6):825-33.
489. Cavallius J, Zoll W, Chakraborty K, Merrick WC. Characterization of yeast EF-1 alpha: non-conservation of post-translational modifications. *Biochim Biophys Acta.* 21 avr 1993;1163(1):75-80.
490. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* sept 2006;72(2):211-22.
491. Sambucetti LC, Schaber M, Kramer R, Crowl R, Curran T. The fos gene product undergoes extensive post-translational modification in eukaryotic but not in prokaryotic cells. *Gene.* 1986;43(1-2):69-77.
492. Gómez S, López-Esteba M, Fernández FJ, Vega MC. Protein Complex Production in Alternative Prokaryotic Hosts. *Adv Exp Med Biol.* 2016;896:115-33.
493. Xu L, Peng L, Gu T, Yu D, Yao YG. The 3'UTR of human MAVS mRNA contains multiple regulatory elements for the control of protein expression and subcellular localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 1 janv 2019;1862(1):47-57.
494. Cocchiararo I, Cornut M, Soldati H, Bonavoglia A, Castets P. Back to basics: Optimization of DNA and RNA transfer in muscle cells using recent transfection reagents. *Exp Cell Res.* 15 déc 2022;421(2):113392.
495. Kwon M, Firestein BL. DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol.* 2013;1018:107-10.
496. Wang D, Fang L, Li K, Zhong H, Fan J, Ouyang C, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Cleaves NEMO To Impair Innate Immune Signaling. *J Virol.* sept 2012;86(17):9311-22.
497. Jullien L, Gautier A. Des sondes fluorescentes hybrides pour l'imagerie « à la demande » des protéines cellulaires. *Med Sci (Paris).* 1 juin 2017;33(6-7):576-8.
498. Shi Y, Liu Y, Zheng Y, Tang Y, Zhu G, Qiu W, et al. Autophagy triggered by MAVS inhibits Coxsackievirus A16 replication. *Acta Virol.* 1 janv 2019;63(4):392-402.
499. Cheng J, Liao Y, Xiao L, Wu R, Zhao S, Chen H, et al. Autophagy regulates MAVS signaling activation in a phosphorylation-dependent manner in microglia. *Cell Death Differ.* févr 2017;24(2):276-87.
500. Wileman T. Aggresomes and Autophagy Generate Sites for Virus Replication. *Science.* 12 mai 2006;312(5775):875-8.
501. Burrows R. The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. *J Hyg (Lond).* déc 1968;66(4):633-40.
502. Glanzmann B, Möller M, le Roex N, Tromp G, Hoal EG, van Helden PD. The complete genome sequence of the African buffalo (*Syncerus caffer*). *BMC Genomics.* 7 déc 2016;17(1):1001.



503. O'Donnell V, Pacheco JM, LaRocco M, Burrage T, Jackson W, Rodriguez LL, et al. Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology*. 5 févr 2011;410(1):142-50.
504. Gannagé M, Rämer PC, Münz C. Targeting Beclin 1 for viral subversion of macroautophagy. *Autophagy*. janv 2010;6(1):166-7.
505. Zhang J, Li D, Yang W, Wang Y, Li L, Zheng H. Foot-and-mouth disease virus VP3 protein acts as a critical proinflammatory factor by promoting toll-like receptor 4-mediated signaling. *Journal of Virology*. 15 sept 2021;0(ja):JVI.01120-21.
506. Zhang X, Zhu Z, Wang C, Yang F, Cao W, Li P, et al. Foot-and-Mouth Disease Virus 3B Protein Interacts with Pattern Recognition Receptor RIG-I to Block RIG-I-Mediated Immune Signaling and Inhibit Host Antiviral Response. *J. Biol. Chem.* 11 sept 2020;295(18):6133-44.



Annexes

Annexe 1 : Revue Sarry *et al.* 2022 : Le virus de la fièvre aphteuse : transmission, pathogenèse, diagnostic et surveillance.

Sarry M, Romey A, Lefebvre D, Benfrid S, Dufour B, Durand B, Zanella G, De Regge N, Zientara S, Bakkali Kassimi L, Blaise-Boisseau S. **Le virus de la fièvre aphteuse : transmission, pathogenèse, diagnostic et surveillance.** [Foot and mouth disease virus: transmission, pathogenesis, diagnosis and surveillance]. *Virologie* (Montrouge). 2022 Sep 1;26(5):355-373. French. doi: 10.1684/vir.2022.0972. PMID: 36413121.



Le virus de la fièvre aphteuse : transmission, pathogénèse, diagnostic et surveillance

Foot and mouth disease virus: transmission, pathogenesis, diagnosis and surveillance

Morgan Sarry^{1,2}
Aurore Romey¹
David Lefebvre³
Souheyla Benfrid¹
Barbara Dufour⁴
Benoit Durand⁵
Gina Zanella⁵
Nick De Regge³
Stéphan Zientara¹
Labib Bakkali Kassimi¹
Sandra Blaise-Boisseau¹

¹ Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, UMR Virologie Inrae, École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, Laboratoire européen de référence pour la fièvre aphteuse Anses/Sciensano, 94700 Maisons-Alfort, France

² AgroParistech, 16 rue Claude-Bernard, 75005 Paris, France

³ Sciensano, Maladies infectieuses animales, service « Maladies exotiques et vectorielles », Laboratoire européen de référence pour la fièvre aphteuse Anses/Sciensano Groeselenberg 99, 1180 Bruxelles, Belgique

⁴ Université Paris Est, École vétérinaire d'Alfort, Unité EpiMAI-ENVA usc Anses, Maisons-Alfort, 94700, France

⁵ Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, Unité d'épidémiologie, 94700 Maisons-Alfort, France

Résumé. La fièvre aphteuse (FA) est l'une des maladies virales animales les plus contagieuses. Bien que très ancienne, la FA reste toujours d'actualité et représente une menace permanente de réémergence pour les pays indemnes. Le virus de la FA ou FMDV (pour *foot-and-mouth disease virus*), de la famille *Picornaviridae*, genre *Aphthovirus*, affecte les artiodactyles domestiques comme sauvages (principalement bovins, ovins, caprins, porcins, camélidés et cervidés). La fièvre aphteuse a un impact socio-économique considérable sur la production et le commerce agricoles en zone d'enzootie mais également en cas d'incursion dans une zone précédemment indemne comme ce fut le cas en 2001 en Europe. Le virus de la FA est historiquement l'un des virus les plus étudiés. Par sa grande variabilité génétique et antigénique, l'absence d'immunité croisée entre ses sept sérotypes, sa capacité de survie dans l'environnement, sa grande contagiosité, son large spectre d'hôtes ainsi que sa biologie particulière, ce virus reste d'intérêt majeur en santé animale et l'objet de nombreux travaux de recherche. Cette revue vise à présenter différents aspects de l'infection par le virus de la fièvre aphteuse et ses problématiques actuelles, de la biologie fondamentale au diagnostic en passant par la surveillance et les moyens de lutte.

Mots clés : fièvre aphteuse, épidémiologie, diagnostic, transmission, surveillance

Abstract. Foot-and-mouth disease (FMD) is one of the most contagious viral animal diseases. It is an old disease which still poses a permanent threat of re-emergence for free zones. Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV), a *Picornavirus* belonging to genus *Aphthovirus* affects domestic and wild artiodactyls. FMD has a considerable socio-economic impact on agricultural production and trade in endemic regions, but also when incursions occur into FMD free areas, as in Europe in 2001. FMDV is historically one of the most studied viruses. Due to its high genetic and antigenic variability, the absence of cross-immunity between its seven serotypes, its ability to survive in the environment, its high contagiousness, its wide range of hosts and its particular biology, FMDV remains of major interest in animal health and the subject of many research projects. This review presents different aspects of FMDV infection, ranging from basic biology to diagnosis, surveillance and control.

Key words: foot-and-mouth disease, FMDV, diagnostics, molecular epidemiology, control

Article accepté le 29 septembre 2022

Correspondance : M. Sarry : S. Blaise-Boisseau
<morgan.sarry@anses.fr>
<sandra.blaise-boisseau@anses.fr>

Introduction

La fièvre aphteuse (FA) est une maladie animale virale transfrontalière grave affectant principalement les artiodactyles, soit plus de 70 espèces domestiques et sauvages.



La FA est une maladie ancienne, connue depuis l'Antiquité, mais pas pour autant une maladie du passé. Elle reste en effet une menace d'actualité majeure dans le domaine de la santé animale (production de bétail, commerce régional et international des animaux et/ou de leurs produits). Son impact annuel en termes de pertes de production visibles et de vaccination dans les seules régions enzootiques se situe entre 6,5 et 21 milliards de dollars US [1]. La FA est une maladie répertoriée dans la liste des maladies à notification obligatoire de l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA, fondée en tant qu'OIE, Office international des épizooties). Elle est l'une des 49 maladies des animaux terrestres réglementées par la nouvelle loi de santé animale (LSA) européenne entrée en application le 21 avril 2021 et fait plus particulièrement partie des 5 maladies majeures citées dans l'article 5 de cette loi. Bien que de nombreux progrès aient été accomplis au niveau mondial pour le contrôle de la FA, avec le soutien de l'OMSA (ex-OIE) et la FAO (Food and Agriculture Organisation), la maladie est encore enzootique dans une centaine de pays et le virus circule dans plus de 75 % du cheptel mondial [2, 3]. Cette revue présente différents aspects de l'infection par le virus de la FA ou FMDV (*foot and mouth disease virus*) et ses problématiques actuelles, de la biologie fondamentale au diagnostic en passant par la surveillance et les moyens de lutte.

Historique de la maladie

La fièvre aphteuse est une maladie très ancienne dont la première description est attribuée à Hieronymus Fracastorius qui, en 1546, a décrit une épizootie survenue chez des bovins près de Vérone, en Italie [4]. Cette origine a été rétrospectivement corroborée par des études phylogénétiques plaçant l'ancêtre commun du virus de la FA aux années 1500 [5, 6]. Dans ses écrits, Fracastorius décrit une maladie hautement contagieuse ne touchant que le bétail, les animaux atteints présentant des aphtes dans la cavité buccale et sur les pieds. C'est cependant à Francisco Toggia et à ses observations dans le Piémont en 1799 que la fièvre aphteuse doit son nom.

La maladie est ensuite apparue fréquemment en France, en Allemagne et en Italie au cours des XVII^e et XVIII^e siècles. Sa première description en Asie remonte à 1842, en Amérique du Sud à 1871 et en Afrique à 1892. En 1897, Loeffler et Frosch mirent en évidence la nature virale de l'agent responsable de la fièvre aphteuse [7]. Il s'agissait d'une découverte historique car c'était la première démonstration d'une maladie animale causée par un agent filtrable, et donc le premier virus animal découvert. Une deuxième étape importante

dans les recherches sur la fièvre aphteuse fut l'établissement par Waldmann et Pape d'un modèle animal expérimental de la maladie sur cobaye [8]. Cette découverte a ouvert la voie pour la recherche sur le virus et la maladie en utilisant un modèle peu onéreux et chez qui le déroulement de la maladie est comparable à ce qui est observé chez le bovin. En 1951, Skinner a démontré la sensibilité des souris au virus de la FA. Ces animaux succombent à l'infection 2 à 5 jours après infection en présentant des signes de paralysie des membres postérieurs [9]. Une autre découverte majeure dans l'histoire de la fièvre aphteuse a été réalisée par Vallée et Carrée en 1922 [10] puis par Waldmann et Trautwein en 1926 [11] lorsqu'ils ont démontré qu'il existait différents types antigéniques du virus de la FA (sérotypes). Vallée et Carré ont identifié le sérotype A (Ardennes) et le sérotype O (Oise) en France puis Waldmann et Trautwein ont identifié le sérotype C en Allemagne. Cette découverte sérologique présente des implications importantes pour le contrôle de la maladie par vaccination car après infection par un virus d'un sérotype donné, aucune protection croisée n'est induite contre l'infection par d'autres sérotypes. Quatre autres sérotypes, trois sud-africains SAT 1, 2 et 3 (*South African Territories*) et un sérotype asiatique (*Asia 1*) ont été identifiés par la suite par les Anglais à l'Institut Pirbright en 1934 et 1954 respectivement [12, 13].

Le développement, dans les années 1930, de techniques *in vitro* pour la multiplication du virus a été crucial pour la production à grande échelle de vaccins et pour le dosage de l'infectiosité du virus [14]. De 1926 à 1936, les travaux de Vallée, Carré et Rinjard (action du formol sur le virus provenant de l'épithélium lingual bovin infecté) [15], ceux de Schmidt (adsorbabilité du virus de la FA sur hydroxyde d'aluminium) [16] et ceux de Waldmann et Köbe [17] (immunisation active des bovins contre la fièvre aphteuse) ont ensuite permis d'obtenir le premier vaccin contre la fièvre aphteuse : un virus inactivé au formol, adsorbé sur hydroxyde d'aluminium et chauffé. Ces premiers travaux, suivis par la démonstration cruciale de Frenkel en 1947 [18] que de grandes quantités du virus pouvaient être produites dans l'épithélium lingual, ont constitué la base des programmes de vaccination lancés en Europe dans les années 50. Avec certaines améliorations (mise en culture des tissus épithéliaux de la langue de bovin, selon la technique de Frenkel, en 1947 ; culture de lignées cellulaires...), ces programmes de vaccination ont permis par la suite d'éradiquer la maladie en Europe puis d'arrêter la vaccination dans l'Union européenne en 1991 [19]. La fièvre aphteuse reste cependant toujours d'actualité dans de nombreuses autres parties du monde, y compris aux portes de l'Europe et ce notamment en raison de la biologie particulière de son agent infectieux.



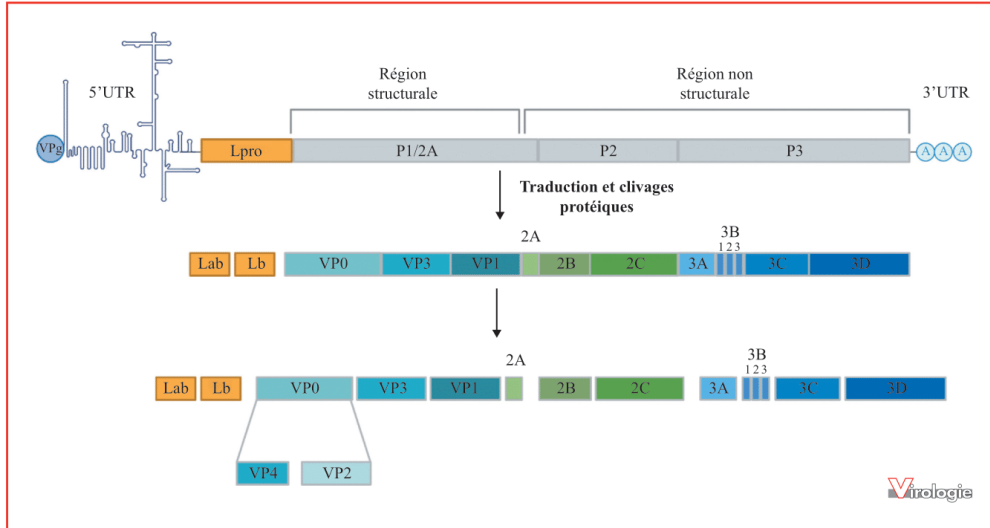


Figure 1. Structure du génome du virus de la fièvre aphteuse et expression des protéines virales. Le virus de la FA possède un génome de petite taille (environ 8,5 kb) codant 4 protéines structurales, VP4, VP2, VP3 et VP1, formant la capsid, et 11 protéines non structurales, Lab pro, Lb pro, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C et 3D, responsables du cycle infectieux. Adapté de Sarry *et al.* 2022 [23]. Créé avec BioRender.com.

Le virus de la fièvre aphteuse : classification, structure, organisation du génome et variabilité

Le virus responsable de la FA, appartient au genre Aphthovirus dans la famille Picornaviridae [19]. À ce jour, cette famille se compose de 158 espèces classées en 68 genres au sein de cinq sous-familles (ICTV, mars 2022, [20]). Les Picornavirus sont de petits virus non enveloppés ayant une capsid caractéristique de symétrie icosaédrique et un génome à ARN simple brin, de polarité positive, d'une longueur comprise entre 6,7 et 10,1 kb. La majorité des Picornavirus connus peut affecter un faible nombre d'espèces hôtes, à l'exception du virus de la FA et du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), qui sont des virus à large spectre. Les virus de cette famille infectent principalement les mammifères et les oiseaux, mais certains ont aussi été détectés chez les reptiles, les amphibiens et les poissons. Le genre Aphthovirus – du grec *aphtha* (ulcère superficiel douloureux de la muqueuse) – comprend quatre espèces virales qui ne sont pathogènes que pour les animaux et qui présentent une extrême sensibilité aux variations de pH, notamment pH acide : le virus de la rhinite bovine A (BRAV), le virus de la rhinite bovine B (BRBV), le virus

de la rhinite équine A (ERAV) et le virus de la FA (inactivé si pH < 6 mais également si pH > 9).

Le virus de la FA est un virus de petite taille mesurant entre 25 et 30 nm de diamètre. Sa capsid est divisée en 60 unités, elles-mêmes organisées en 12 pentamères. Ces pentamères sont composés des quatre protéines structurales du virus de la FA à savoir les protéines virales (*viral protein*) VP1, VP2, VP3 et VP4. Chacune de ces protéines est ainsi présente à raison de 60 monomères par capsid [21].

Le génome du virus de la FA, constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive, a une taille d'environ 8,5 kb (*figure 1*). Cet ARN génomique a la particularité d'être lié de façon covalente, *via* son extrémité 5', à une petite protéine du virus nommée VPg (*viral genome linked protein*), essentielle à la réplication virale. Ne comprenant qu'un seul cadre de lecture ouvert, le génome du virus de la FA code une unique polyprotéine de près de 2300 acides aminés, qui, après une succession de clivages essentiellement opérés par les protéases virales Lpro (existant sous deux formes, Lab pro et Lb pro) et 3C, aboutit à différents précurseurs et *in fine*, 15 protéines matures structurales et non structurales. Parmi ces protéines, sont présentes les quatre protéines structurales impliquées dans l'architecture de la capsid et 11 protéines non structurales,

Copyright © 2022, John Libbey Eurotext. Téléchargé par M DAMIEN VITOUR le 28/11/2022.



que sont Lab pro, Lb pro 2A, 2B, 2C, 3A, 3B₁, 3B₂, 3B₃, 3C et 3D, impliquées dans l'accomplissement du cycle viral ainsi que dans l'échappement du virus à la réponse de l'hôte [22-24].

La faible fidélité de la polymérase virale et le cycle répliatif court du virus de la FA favorisent l'émergence de quasi-espèces virales au sein de l'hôte infecté [25]. L'évolution génomique du virus de la FA est rapide, particulièrement pour les régions du génome codant les protéines de capsid soumises à la pression de sélection immunitaire présentant un taux de substitution autour de 10^{-3} nt/site/an [26-28]. Sept sérotypes immunologiquement distincts du virus de la FA ont été caractérisés et aucun nouveau sérotype n'a été identifié depuis la découverte du sérotype Asia I [12] malgré l'avènement du séquençage et l'examen de milliers d'échantillons de fièvre aphteuse d'origine très variée depuis les années 1960 (<https://www.foot-and-mouth.org/FMDV-nomenclature-working-group/nomenclature>). Par ailleurs, la surveillance internationale n'a confirmé aucun cas de sérotype C, dans le monde entier, depuis plus de 15 ans, malgré plus de 2000 soumissions cliniques par an aux laboratoires de référence. La probable extinction de ce sérotype a conduit à une réflexion internationale sur le maintien d'utilisation de ce virus à des fins diagnostiques ou vaccinales en regard du risque d'échappement de ce sérotype des laboratoires [29].

Carillo *et al.* ont montré que dans le cadre de lecture de la polyprotéine (un peu moins de 7000 nt) le pourcentage d'identité moyen en considérant tous les sérotypes pour n'importe quel couple de séquences est d'au moins 73 % [30]. Cependant, l'identité de séquence pour la région du génome codant pour la protéine VP1 (639 nt environ) chute entre 50 et 70 % selon la proximité sérotypique [31]. Cette séquence de la région codant pour VP1 présente d'ailleurs le plus faible taux d'acides aminés invariants (24 %) de toutes les protéines virales de la fièvre aphteuse [30]. Cette grande variabilité de la région VP1 permet de classer moléculairement les virus de fièvre aphteuse en topotypes, lignages et sous-lignages [32-34]. Dans cette nomenclature internationale, un seuil d'identité de 80-85 % permet de définir le niveau de topotype, 90 % le niveau de lignage et 95 % le niveau de sous-lignage [31]. Ce spectre de « sous-types » diversifié est le résultat d'un processus de sélection équilibré entre la pression de sélection immunitaire et la conservation des propriétés d'attachement aux cellules, d'entrée et d'internalisation du virus [35]. Les possibilités d'adaptation de chaque souche virale corrént de ce fait à des déterminants antigéniques critiques, décisifs dans la réussite de la protection vaccinale mais également dans l'infection des cellules cibles et la transmissibilité [36].

Cycle viral et modes de transmission

Au contraire de la plupart des autres Picornavirus, le virus de la FA se caractérise par un très large spectre d'hôtes. Il est ainsi capable d'infecter plus de 70 espèces, essentiellement les artiodactyles (mammifères ongulés à nombre pair de doigts), qu'ils soient sauvages ou domestiques. Parmi les espèces domestiques figurent de nombreuses espèces d'intérêt économique majeur tels que les bovins, les ovins, les caprins et les porcins. De nombreuses espèces sauvages sont sensibles au virus. C'est par exemple le cas des antilopes, des sangliers, des cerfs, des chameaux ou encore des buffles d'Asie et d'Afrique. Ces derniers sont notamment considérés comme jouant un rôle important en tant que réservoirs de virus dans certains pays [19, 24]. Quelques cas d'infections naturelles ont été mis en évidence chez des espèces ne faisant pas partie des espèces dites sensibles au virus, comme l'éléphant d'Asie ou d'Afrique, le hérisson, le kangourou, l'ours noir du Tibet et plus récemment le chien domestique [37]. Chez l'humain, seuls de très rares cas cliniques bénins ont été signalés. À noter que la fièvre aphteuse est essentiellement une maladie animale et n'est pas liée à la maladie humaine « pied-main-bouche » causée par un virus Coxsackie. La fièvre aphteuse chez l'humain est considérée comme très rare, voire anecdotique [38].

La fièvre aphteuse est une maladie hautement contagieuse, induisant un taux de morbidité proche de 100 % chez les espèces sensibles. Sa transmission peut s'effectuer par contact direct entre animaux infectés et animaux sains (en phase aiguë, toutes les excréments et sécrétions d'un animal infecté contiennent du virus : l'air expiré, les sécrétions nasales, la salive, l'urine et les fèces). Cette voie directe est notamment très importante chez les porcs qui excrètent en phase aiguë de grandes quantités de virus. La transmission peut également s'effectuer par contact indirect *via* des vecteurs animés (personnes ou animaux) ou inanimés (« fomites » : véhicules, outils agricoles). Les conditions climatiques peuvent également contribuer à la dissémination virale. Le vent peut notamment propager le virus sur de longues distances selon les conditions de vitesse et d'humidité relative [39, 40]. La capacité remarquable du virus de la FA à survivre dans l'environnement en dehors de son hôte explique en grande partie la très grande dissémination de la fièvre aphteuse, avec des variations selon la souche virale considérée (composition de la capsid) et les conditions de température et humidité [41]. Les carcasses d'animaux infectés peuvent également être des sources importantes de virus. Il a ainsi été montré que le pouvoir infectieux du virus de la FA dans l'épithélium vésiculaire de carcasses de porcs intactes conservées à 4 °C reste très élevé pendant au moins 11 semaines *post mortem*. Le virus reste également infectieux pendant de nombreux mois dans la moelle et les ganglions lymphatiques [42].



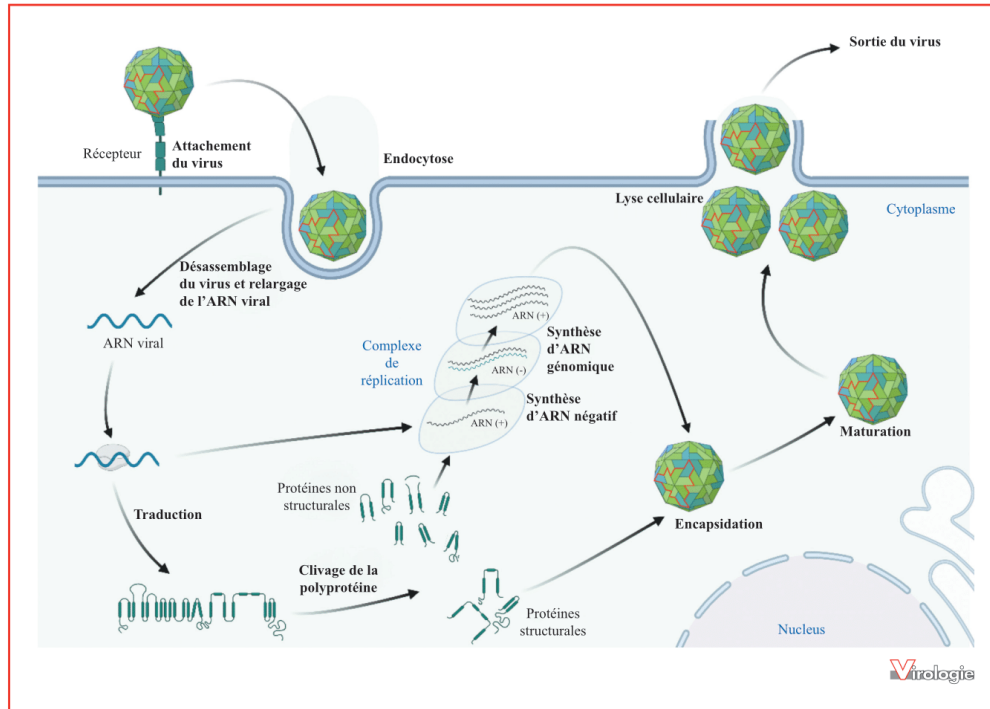


Figure 2. Cycle viral du virus de la fièvre aphteuse. Créé avec BioRender.com.

Copyright © 2022, John Libbey Eurotext. Téléchargé par M DAMIEN VITOUR le 28/11/2022.

Si la contagiosité de la fièvre aphteuse est liée aux propriétés physico-chimiques de son agent viral et à ses capacités de survie dans l'environnement, elle est aussi liée au très court cycle viral du virus de la FA, accompli entre 4 à 6 heures selon la multiplicité d'infection [19]. Le cycle viral du virus de la FA (schématisé en *figure 2*) peut être décomposé en neuf phases distinctes : l'attachement, l'internalisation, la décapsidation, la traduction, le clivage, la réplication, l'encapsidation, la morphogenèse et la libération des particules virales. L'infection débute par l'attachement de la capsidation sur les récepteurs cellulaires membranaires *via* un motif RGD (Arg-Gly-Asp) hautement conservé à la surface de la protéine VP1. Dans la plupart des cas, le virus se lie à des récepteurs appartenant à la famille des intégrines, notamment aux intégrines $\alpha V\beta 6$ qui sont fortement exprimées dans les cellules épithéliales [43]. Plus rarement, le virus de la FA peut se lier à des récepteurs alternatifs tels que les héparanes sulfate. Une fois adsorbés, les virions sont internalisés, généralement par endocytose clathrine-dépendante. Bien que les mécanismes de décapsidation du

virus de la FA soient encore incomplètement compris, il semble que l'acidification de l'endosome entraîne la décapsidation du virus, ce qui conduit à la libération de l'ARN simple brin positif dans le cytoplasme de la cellule [44]. En effet, il a été démontré qu'à des valeurs de pH correspondant aux endosomes précoces, la capsidation se dissocie en sous-unités pentamériques, libérant l'ARN et la protéine interne VP4. L'ARN génomique est ensuite traduit, en commençant par les séquences IRES (*internal ribosome entry site*), pour produire un grand polypeptide appelé polyprotéine précurseure. Cette polyprotéine est clivée au cours de la traduction en pré-protéines qui sont à leur tour clivées en pré-protéines secondaires. Alors que le virus de la FA détourne voire interrompt la traduction de l'hôte, sa réplication est assurée par l'ARN polymérase ARN-dépendante 3D, ainsi que par les protéines 2B, 2C et 3A, dans des structures membranaires dérivées du réticulum endoplasmique (RE) et du Golgi. Un ARN intermédiaire négatif est d'abord synthétisé à partir du brin positif. Cet ARN anti-génomique sert à son tour de matrice





Figure 3. Signes cliniques et lésions. Chez les bovins : a) jetage nasal ; b) bouche, lésion fraîche ; c) lésion de la langue ; d) lésion interdigitée ; e) lésions des mamelles. Chez les porcins : f) groin, vésicules non rompues ; g) patte, lésion avec détachement de l'onglon ; h) groin, lésion fraîche ; i) lésion interdigitée ; j) porc présentant des lésions sur les pattes ; chez les petits ruminants : k) vésicule fraîchement rompue sur la langue d'une chèvre ; l) lésion sur la langue d'un mouton ; m) pied de mouton avec une lésion de la bande coronaire cicatrisée ; n) lésion interdigitée chez une chèvre ; o) la boiterie est généralement le premier signe de la fièvre aphteuse chez les moutons. Sources : Photo A : J.-F. Valarcher, avec permission. Photos B à J puis K et N : EuFMD, avec autorisation. Photo J : issue de la publication Pozzi et al, *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 2019, avec permission. Photos L et M : © Crown copyright [2022]. Licensed under the Open Government Licence v3.0., © UK DEFRA, avec permission. Photo o : Kitching et Hugues (2002), *Clinical variation in foot and mouth disease: sheep and goats*, doi: 10.20506/rst.21.3.1342, reproduit avec permission.

Copyright © 2022, John Libbey Eurotext. Téléchargé par M DAMIEN VITOUR le 28/11/2022.

pour la synthèse de l'ARN génomique. L'achèvement du cycle infectieux nécessite ensuite l'assemblage des protéines structurales qui sont organisées en pentamères, s'associant entre eux pour former la capsid. L'ARN génomique se lie alors à cette capsid immature pour former un provirion. Un clivage protéique final du précurseur VP0 en VP2 et VP4 se produit alors, transformant le provirion en une particule virale mature. Les virions s'accumulent rapidement dans le cytoplasme des cellules infectées, induisant la lyse cellulaire et entraînant la sortie des virus néoformés qui pourront alors disséminer vers d'autres cellules ou être excrétés dans l'environnement [19, 24].

Signes cliniques et progression de l'infection

La dose infectieuse du virus de la FA varie selon l'espèce hôte et la voie d'exposition mais reste très faible. Les signes cliniques sont également dépendants de l'espèce hôte ainsi

que de la virulence propre à la souche à l'origine du foyer. Chez un animal non immunisé, l'infection par le virus de la FA se caractérise par une phase d'incubation (infection pré-clinique) suivie d'une étape de dissémination virale (virémie). Le stade clinique de la FA se caractérise par une hyperthermie, l'apparition de vésicules ou aphtes au niveau de tous les épithéliums, un état d'abattement et une perte d'appétit. Les signes cliniques sont assez nets chez les bovins domestiques (« révélateurs ») – entraînant des pertes de production grave, notamment chez la vache laitière – mais moins marqués chez les petits ruminants (disséminateurs/introducteurs) et chez le buffle africain (infection subclinique). Les porcs sont particulièrement sensibles au virus de la FA et la phase clinique est souvent sévère. De plus, les porcs représentent de véritables amplificateurs de virus. Porcs et petits ruminants présentent souvent des boiteries, conséquences directes de lésions podales (figure 3). Si le taux de morbidité des bovins et porcins peut atteindre 100 %, le taux de mortalité associé à la fièvre aphteuse est relativement faible, essentiellement lié à des myocardites survenant chez les jeunes animaux [45].



L'infection primaire par le virus de la FA se produit dans les cellules épithéliales de la muqueuse de l'oropharynx ou du nasopharynx selon les espèces cibles. Les bovins sont très réceptifs à l'infection par inhalation (sites identifiés au niveau du nasopharynx) alors que les porcs sont plus efficacement infectés par voie orale (cryptes épithéliales des amygdales). Les sites primaires d'infection sont moins bien connus et décrits chez les petits ruminants mais les deux voies d'infection pourraient être efficaces [45].

Si, comme de nombreux virus, le virus de la FA a développé différentes stratégies pour contrer la réponse innée, première ligne de défense de la cellule hôte [22, 23, 46], il induit cependant une forte réponse systémique. Des anticorps spécifiques du virus de la FA sont en effet détectables 4 à 7 jours après exposition virale. Si la virémie est de courte durée, le virus est en revanche présent jusqu'à 14 jours au niveau des lésions épithéliales [47].

Au terme de la phase clinique, les ruminants entrent dans une phase de « transition » au cours de laquelle soit le virus est éliminé soit ce dernier persiste (plus de 50 % de l'effectif). Cette persistance du virus de la FA chez les ruminants a été décrite dès la fin des années 1950 et est définie par la présence de virus infectieux dans les prélèvements oropharyngés plus de 28 jours après infection [48]. Dans ce cas, le virus infectieux est capable de persister dans l'organisme de l'hôte pendant une durée variable selon l'espèce : jusqu'à 2,5 ans chez les bovins domestiques, neuf mois chez les petits ruminants et plus de cinq ans chez le buffle africain [49, 50] indépendamment du statut vaccinal de l'animal. Les phénomènes de persistance associés au virus de la FA ont été décrits chez les bovins et les petits ruminants mais pas chez le porc qui élimine le virus en quatre semaines [51]. Les porteurs sains, ruminants guéris suite à une infection par le virus de la FA, constituent une autre source de contamination. Si la probabilité de transmission du virus à partir de ces individus est considérée comme faible, le grand nombre de porteurs sains associés à la grande diversité d'hôtes de ce virus en font une menace réelle et non négligeable. De plus, il a été montré récemment qu'en cas de surinfection par une autre souche du virus de la FA, les porteurs sains constituent une source d'émergence de nouveaux recombinants susceptibles d'être excrétés dans leur environnement. Il a ainsi été montré dans le cadre d'infections expérimentales « échelonnées », la présence de virus de la FA recombinant présentant la région codante non structurale du virus « persistant » (de type A) et la partie structurale du virus de type 0 utilisé pour la surinfection. L'analyse génomique a pu démontrer que la pression immunitaire de l'hôte est un facteur important de l'émergence de ces recombinants, qui tous possèdent des régions codant pour la capsid, dérivées du virus surinfectant contre lequel les animaux n'avaient pas d'anticorps détectables au moment de la surinfection [51, 52].

Les nombreuses études menées à ce sujet depuis les années 1980 ont permis de mettre en évidence une coévolution entre le virus et son hôte lors d'une infection persistante, cependant les mécanismes sous-jacents restent encore à ce jour largement méconnus. La caractérisation des réponses transcriptionnelles lors de l'infection aiguë et à long terme dans un modèle de cellules épithéliales primaires bovines isolées de nasopharynx a mis en évidence des phénomènes de modulation de la réponse immunitaire innée qui se retrouve diminuée et inefficace pour éliminer le virus de la FA dans le cas d'une infection persistante [53, 54]. Diverses hypothèses sont actuellement explorées afin d'expliquer ces phénomènes de persistance. Il est notamment envisagé que ce virus soit capable de moduler la réponse immunitaire de son hôte *via* des interactions protéines-protéines afin de se prémunir d'une action antivirale trop importante. Dans le cas du virus de la FA, l'immunité repose grandement sur la production d'interféron (IFN), permettant d'induire un état antiviral dans la cellule et les cellules alentour. De manière intéressante, il s'avère que de très nombreuses interactions ont été mises en évidence entre les protéines du virus de la FA et les protéines impliquées dans la réponse IFN [22, 23, 46]. S'il n'est pour l'heure pas possible d'identifier clairement un lien entre ces interactions protéiques et l'établissement de la persistance virale, il existe tout de même un faisceau de présomptions qui mérite d'être approfondi.

Vaccination anti-fièvre aphteuse

Les vaccins anti-fièvre aphteuse sont parmi les premiers vaccins à avoir été développés en matière de santé animale. La protection contre la fièvre aphteuse est corrélée à la présence d'anticorps neutralisants mais la grande diversité antigénique des virus de la FA et l'absence d'immunité croisée même au sein d'un sérotype, contribuent à la complexité de la vaccination anti fièvre aphteuse. Il est en effet essentiel que le vaccin déployé soit efficace contre la souche de terrain circulante.

Les premiers vaccins étaient formulés à base de virus cultivé sur cellules épithéliales de langue de bovin puis inactivé par le formol, adsorbé sur hydroxyde d'alumine et chauffé [15, 18]. Les vaccins conventionnels actuels, développés dans les années 1960 sont produits sur cellules BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*, cellules de rein de hamster nouveau-né) cultivées en suspension et inactivés par le BEI (éthylèneimine binaire, technique mise au point en 1976). Leur production est réalisée dans des laboratoires de haut niveau de confinement et nécessite une étape de purification pour obtenir des capsides dépourvues de protéines non



structurales contaminantes qui seront formulées avec adjuvant (huile, aluminium ou saponine) [55]. Cette purification permet l'utilisation ultérieure de tests sérologiques basés sur la détection des anticorps dirigés contre ces protéines virales non structurales (PNS, liées à l'accomplissement du cycle viral chez l'animal infecté et donc « témoins » de l'infection virale), afin de distinguer des animaux vaccinés avec ce type de vaccin hautement purifié et les animaux infectés (concept DIVA, pour « *differentiating infected from vaccinated animals* », i.e distinguant les animaux vaccinés des animaux infectés naturellement).

La vaccination protège contre l'apparition des signes cliniques mais ne prévient pas la persistance virale chez les ruminants. De plus, seuls les vaccins hautement purifiés permettent la distinction ultérieure entre animal vacciné et animal infecté. Une autre limitation des vaccins actuels repose sur l'évolution génétique et donc antigénique constante, des virus circulants, incluant les recombinaisons (y compris chez les animaux porteurs sains) [51, 52] et les phénomènes de trans-encapsidation. Lors de co-infections par le virus de la FA, la production de particules virales chimériques contenant le génome d'un virus entièrement encapsidé dans les protéines codées par l'autre virus co-infectant a été mise en évidence *in vitro* [56]. La trans-encapsidation peut ainsi permettre un échappement complet aux anticorps neutralisants qui reconnaissent alors seulement les capsides codées par le génome encapsidé, permettant ainsi l'infection d'un hôte immunisé. Il faut donc en permanence produire des vaccins adaptés aux virus circulants et prédire leur efficacité par des tests de concordance vaccinale.

À l'heure actuelle et malgré plusieurs décennies de recherche, seuls les vaccins inactivés hautement purifiés sont utilisés. Jusqu'alors, les tentatives d'utiliser des protéines de capsidie individuelles ou des peptides synthétiques comme vaccins candidats se sont révélées peu fructueuses. Les perspectives en matière d'amélioration des vaccins anti-fièvre aphteuse reposent actuellement sur trois types de stratégies : la production puis purification de pseudo-particules virales, l'utilisation de vecteurs défectifs pour la réplication permettant la production de capsides vides directement chez l'animal hôte mais également le recours à des virus vivants atténués comme souches vaccinales plus sûres en termes de biosécurité et potentiellement moins coûteuses à produire. Des vaccins sous-unitaires ou vaccins ADN ou encore vivants vectorisés (basés sur l'adénovirus par exemple) n'ont qu'un usage très limité faute d'efficacité [55, 57]. L'amélioration des vaccins « marqueurs » reste donc un défi en termes de contrôle et de lutte contre la fièvre aphteuse.

Distribution spatio-temporelle et épidémiologie moléculaire

L'origine géographique initiale de la fièvre aphteuse a d'abord été suggérée en Europe continentale au XVI^e siècle, établissant l'exploration coloniale comme moteur de la diffusion de la fièvre aphteuse en Afrique, Asie et Amérique du Sud. Des analyses phylogénétiques plus récentes ont permis de replacer l'ancêtre commun aux virus de la FA au Moyen Âge, 200 à 300 ans avant sa première description littéraire et les reconstructions d'évolution suggèrent que le virus serait plutôt apparu à l'origine dans le bassin méditerranéen [28]. L'origine européenne ou africaine de la fièvre aphteuse reste cependant à éclaircir, l'implantation actuelle forte de la maladie en Afrique avec une grande diversité virale laissant penser à une origine précoce sur ce continent avec une circulation parmi les animaux sauvages (buffles, impalas) comme réservoirs de la maladie [5, 58]. Cette origine méditerranéenne établit clairement les routes de commerce depuis les pays de la Méditerranée vers l'Europe du Nord et l'Asie comme premières voies de propagation de la maladie [59]. L'Europe a ensuite joué le rôle de foyer de diffusion de la fièvre aphteuse à travers les empires coloniaux par le commerce mondial, notamment vers le continent sud-américain avec le premier foyer rapporté en 1870, peu après les transports massifs de bétail recensés à la fin des années 1860 depuis l'Europe vers l'Argentine [60]. La FA est aujourd'hui enzootique dans la plupart des pays d'Afrique et d'Asie, et sporadique en Amérique du Sud. Les programmes de contrôle et de prévention contre la fièvre aphteuse (*progressive control pathway*, PCP) mis en place par la FAO/l'EuFMD (European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease)/l'OMSA sont largement dépendants de la connaissance du statut de chaque pays vis-à-vis de la maladie et de la distribution spatio-temporelle des différents virus de la FA.

Les avancées en biologie moléculaire ont permis la caractérisation génétique des souches isolées de foyers épidémiques avec une grande précision et une relative rapidité [31]. Il a alors été proposé de définir, pour les régions enzootiques, sept pools géographiques présentant des virus de même sérotype [61, 62] représentés en *figure 4*. Ces présences concomitantes au sein des pools résultent le plus souvent de similarités écologiques, d'échanges commerciaux d'animaux entre territoires conjoints et de traditions culturelles partagées concernant les pratiques d'élevage. Le pool 1 regroupe les régions de l'Est et du Sud-Est asiatique, le pool 2 l'Asie du Sud et le Pool 3 l'Eurasie et le Moyen-Orient. Dans ces trois pools circulent des virus de la FA appartenant aux sérotypes A, O et Asia-1 [63, 64]. Le pool 4 est localisé en Afrique de l'Est et le



Copyright © 2022, John Libbey Eurotext. Téléchargé par M DAMIEN VITOUR le 28/11/2022.

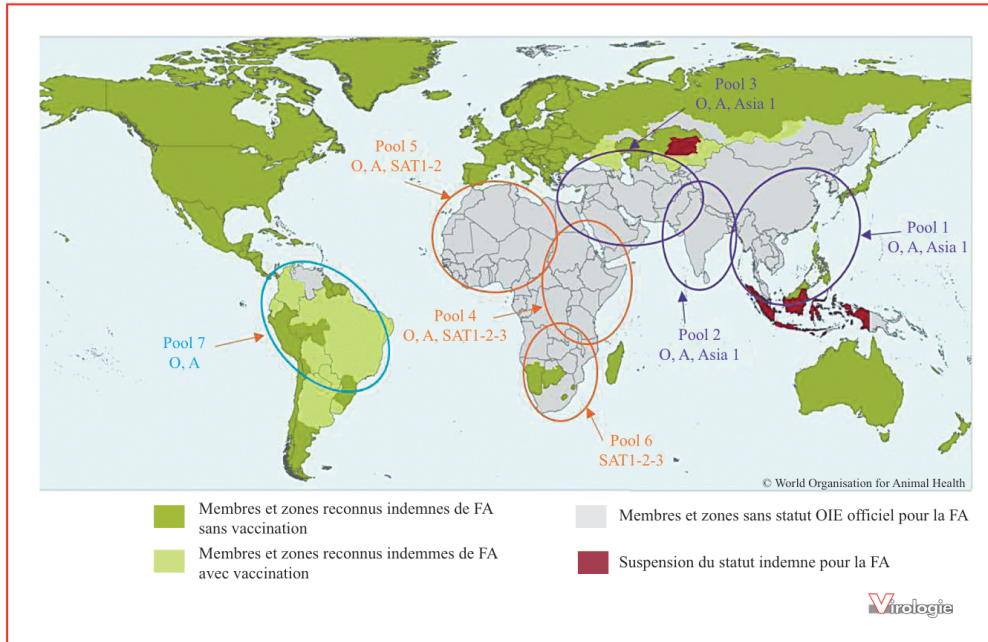


Figure 4. Situation mondiale de la fièvre aphteuse : carte officielle du statut fièvre aphteuse des pays membres de l'OMSA (ex OIE) et localisation des pools de virus. D'après Organisation mondiale de la santé animale (OMSA) et adapté de Hammond, *et al. Viruses* 2021, avec mise à jour de mai 2022.

pool 5 en Afrique centrale et de l'Ouest. Dans ces deux pools circulent des virus de fièvre aphteuse appartenant aux sérotypes O, A, SAT-1 et SAT-2 [65, 66]. Le pool 6 est localisé en Afrique du Sud et présente essentiellement des virus appartenant aux sérotypes SAT-1, 2 et 3 même si une incursion récente de sérotype O a eu lieu en Tanzanie et Namibie [67]. Le pool 7 est localisé en Amérique du Sud où circulent des virus de sérotype O et A [68, 69].

À partir des données génétiques, il est possible de tracer et de suivre les migrations de certains lignages du virus de la FA à l'échelle mondiale, particulièrement ceux dont les propriétés favorisent leur diffusion sporadique au-delà de leur région endémique initiale vers d'autres pools. Ce fut le cas pour le lignage O/ME-SA/Ind-2001 qui a réalisé plus de 15 échappements hors de sa région d'origine (pool 2) durant la période 2013-2017. Après sa réémergence en 2008 en Inde, il a en effet été détecté en 2013 en Asie du Sud-Est (pool 1), avant d'atteindre le statut de pandémie en se propageant vers le Moyen-Orient, l'Arabie saoudite (pool 3) et

la Libye puis de toucher en 2014-2015 la Tunisie, l'Algérie, le Maroc et l'île Maurice à l'été 2016 (pool 6) [26, 70]. De manière similaire, le topotype O/EA-3 a migré depuis sa région d'origine en Afrique de l'Est dans un mouvement ascendant vers le nord-est (Egypte avant 2004 puis Moyen-Orient autour de 2014) et dans un mouvement longitudinal vers l'ouest africain (2004-2008) avant de se propager au nord-ouest (2014-2018) pour atteindre Algérie, Tunisie et Maroc en 2018-2019 [71].

Ces exemples démontrent le caractère imprévisible de la diffusion du virus de la FA à l'heure de la mondialisation et cette particularité exacerbe le besoin d'établir une stratégie intégrée de lutte comprenant la coordination globale et régionale des efforts pour le contrôle et la surveillance de la fièvre aphteuse. Les caractéristiques locales en termes d'hôte, d'environnement et de souches virales doivent être considérées avec attention, de même que les routes migratoires empruntées permettant la diffusion de ces souches virales.



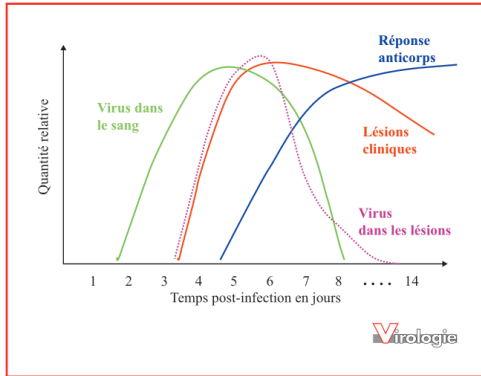


Figure 5. Fenêtre de détection du virus de la fièvre aphteuse dans le sang et les lésions, et des anticorps dans le sérum, en fonction du temps post-infection, en parallèle du suivi de l'apparition des lésions cliniques. Adapté de King et al., 2012.

Diagnostic

La confirmation de l'infection des animaux par le virus de la FA est réalisée par la mise en évidence du virus et/ou ses constituants. Pour les animaux infectés de façon aiguë, dès l'apparition des signes cliniques (figure 5), les échantillons préférés sont le liquide vésiculaire et l'épithélium provenant de vésicules non rompues ou fraîchement rompues [72]. Le sérum, la salive, les écouvillons pharyngés ou le lait peuvent servir de source alternative de virus [72]. En raison d'une courte virémie débutant avant l'apparition de signes cliniques et chutant ensuite très rapidement, le sang n'est pas un échantillon de choix. En cas de mortalité chez les jeunes animaux, le muscle cardiaque peut être utilisé pour le diagnostic [73]. Chez les ruminants infectés de façon chronique (« porteurs »), le virus peut être mis en évidence dans des échantillons de liquide oropharyngé prélevés à l'aide d'un probang [74]. Le virus de la FA étant sensible à la température et au pH [75], les échantillons doivent être immédiatement réfrigérés ou congelés. L'OMSA préconise l'utilisation d'un milieu de transport, décrit dans le *Manuel terrestre* [72]. Tous ces échantillons doivent être transportés conformément aux réglementations internationales [76]. Ensuite, en fonction du contexte épidémiologique et de la situation sanitaire, différents types d'analyses de laboratoires sont mises en place, répondant ainsi à des objectifs distincts (figure 6) y compris le recours au diagnostic différentiel par rapport à : la stomatite vésiculeuse, la maladie vésiculeuse du porc et maladie due au Senecavirus A, pour lesquelles l'Europe est également indemne.

La présence du virus de la FA peut être mise en évidence par la détection de l'ARN viral, des protéines virales ou du virus vivant. La détection de l'ARN viral est généralement réalisée à l'aide d'une RT-PCR en temps réel qui détecte le génome de tous les sérotypes du virus de la FA [77]. Cette technique est rapide et fiable et détecte le virus de la FA avec une sensibilité et une spécificité élevées. La confirmation d'un résultat positif s'effectue généralement par la mise en évidence des protéines virales par ELISA antigénique et/ou par l'isolement du virus vivant sur culture cellulaire. L'ELISA de capture d'antigène utilise des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques du sérotype et permet donc également d'identifier le sérotype du virus [78, 79]. Cette technique étant adaptée au diagnostic du virus de la FA dans le fluide vésiculaire et l'épithélium frais, pour la plupart des autres types d'échantillons, il est nécessaire d'amplifier d'abord le virus sur culture cellulaire. Alors qu'historiquement, la plupart des laboratoires de référence utilisaient des cellules primaires pour isoler ce virus, des lignées cellulaires établies sont maintenant couramment utilisées [80, 81]. Lorsque le virus se réplique dans les cellules, l'effet cytopathique (ECP) est observé au microscope optique. La formation d'un ECP à part entière peut toutefois prendre jusqu'à 48 h voire 72 heures. Il peut également être nécessaire d'effectuer plus d'un passage avant d'observer l'ECP. Une fois l'ECP observé, la présence de virus FA dans le surnageant de ces cellules lysées doit être confirmée par une autre méthode telle que la RT-PCR ou l'ELISA de capture d'antigène. Le surnageant cellulaire peut également être utilisé pour la caractérisation du sérotype par ELISA antigénique ou par des méthodes moléculaires. En raison de la grande diversité génétique et antigénique du virus de la FA et sa sensibilité aux conditions de conservation, il est conseillé de combiner plusieurs tests de diagnostic pour améliorer sa détection et l'identification du sérotype impliqué [77, 82].

Les méthodes de caractérisation moléculaire les plus courantes reposent sur des RT-PCR [77, 82] spécifiques du sérotype, souvent associées au séquençage et à une analyse phylogénétique. Le séquençage du gène VP1, gène le plus variable du virus de la FA, permet non seulement de révéler ou de confirmer le sérotype impliqué mais aussi, par l'analyse phylogénétique associée, d'identifier précisément le topotype et d'obtenir ainsi des informations sur l'épidémiologie moléculaire du virus [83].

Les méthodes de RT-PCR en temps réel, d'ELISA antigénique et de caractérisation moléculaire peuvent être appliquées sur des échantillons inactivés et peuvent donc être réalisées dans des installations autorisées de niveau de sécurité biologique 2 (NSB2). Les tests utilisant le virus vivant de la FA ou des échantillons non inactivés ne peuvent être réalisés que dans des installations NSB3 spécialement



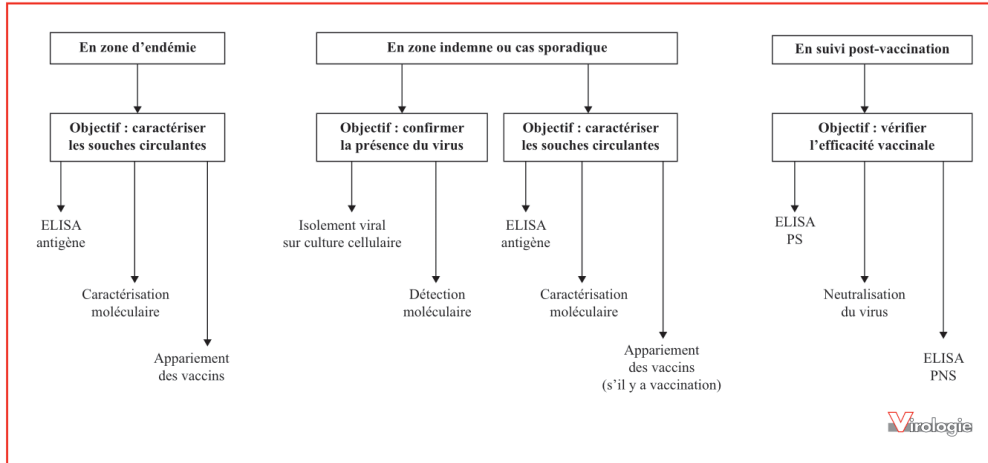


Figure 6. Analyses de laboratoire à mettre en place en priorité, en fonction du contexte épidémiologique et sanitaire.
 PS : protéines structurales ; PNS : protéines non structurales.

Copyright © 2022, John Libbey Eurotext. Téléchargé par M DAMIEN VITOUR le 28/11/2022.

conçues et autorisées répondant à des normes de biosécurité telles que celles décrites par l’EuFMD [84, 85]. L’EuFMD est la commission de contrôle et de lutte contre la FA, créée en 1954 par la FAO puis placée plus tard sous l’égide de l’Union européenne.

Il existe également des outils de diagnostic utilisables directement sur le terrain, par exemple les tests immunochromatographiques sur bandelettes [86] ou les dispositifs de biologie moléculaire portables RT-LAMP [87]. Ces tests donnent une indication rapide de la présence ou de l’absence du virus de la FA dans un troupeau. Cependant, leur sensibilité est insuffisante pour s’appuyer uniquement sur ce genre de test pour diagnostiquer la fièvre aphteuse sans confirmation supplémentaire en laboratoire [72]. En revanche ces dispositifs appelés « *penside tests* » ou « tests rapides », en cas de signal positif, peuvent être inactivés par immersion dans une solution d’acide citrique 0,2 % pendant 15 min et utilisés pour l’envoi à faible coût, de prélèvements depuis les zones d’enzootie vers les laboratoires de référence comme décrit par Romey *et al.* [88].

Une semaine après l’apparition des lésions dues à l’infection par le virus de la FA (figure 5), les titres de virus dans les tissus affectés ont déjà considérablement diminué, tandis que les lésions guérissent rapidement et que la plupart des animaux ont déjà mis en place une réponse immunitaire [89]. Les animaux guéris d’une infection ou vaccinés peuvent être diagnostiqués par la détection d’anticorps contre le virus de la FA en laboratoire. Les ani-

maux infectés produisent des anticorps contre les protéines structurales (PS) et non structurales (PNS) du virus. Pour une détection rapide et fiable des anticorps anti-SP, induits par l’infection ou la vaccination, le test ELISA sérotype spécifique est le plus souvent utilisé [90, 91]. Il est adapté aux sérums de différentes espèces animales. Les résultats de SP-ELISA sont confirmés par le test de neutralisation du virus (VNT) [72] pour démontrer la présence d’anticorps anti-PS neutralisants. Bien que des réactions croisées soient parfois observées entre les différents sérotypes de virus de la FA, le test VNT reste plus spécifique que les ELISA anti-PS [92]. Ces derniers peuvent être appliqués à partir d’échantillons et de réactifs viraux inactivés ou recombinants et peuvent donc être réalisés dans des installations autorisées NSB2, contrairement au test VNT qui utilise le virus vivant et ne peut donc être réalisé que dans des installations NSB3.

Les vaccins traditionnels contre la fièvre aphteuse sont formulés à partir de virus, cultivés dans des lignées cellulaires établies, qui sont chimiquement inactivés et mélangés à un adjuvant approprié. Ces vaccins inactivés contiennent des quantités concentrées de capsides virales intactes et sont hautement purifiés des protéines non structurales du virus [72] ce qui permet de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés (DIVA) à l’aide de tests sérologiques [93]. Certains ELISA utilisent des PNS recombinantes et sont capables de détecter les anticorps anti-PNS dirigés contre les sept sérotypes du virus de la FA à partir de sérum de différentes espèces animales [94]. En Amérique du Sud,



un test de confirmation par immunoblotting est disponible [95], mais cette technique n'a pas été mise en œuvre sur les autres continents.

Les méthodes sérologiques traditionnelles visant à indiquer quelles souches vaccinales peuvent être efficaces contre la souche identifiée sur le terrain, appelées « appariement des vaccins » (*vaccine matching* en anglais), reposent sur la comparaison des titres d'un sérum vaccinal de référence vis-à-vis de la souche vaccinale et du virus de terrain. Cette comparaison peut être effectuée dans un format ELISA de détection des anticorps ou dans un format VNT [72, 96].

Surveillance, prévention, mesures de contrôle et gestion en cas d'épizootie

L'évolution des programmes de lutte en Europe

Au fil des siècles, en Europe, les agriculteurs ont développé des méthodes pragmatiques pour réduire l'impact de la fièvre aphteuse, telles que l'aphtisation (infection délibérée du bétail) faite avec du matériel infectieux obtenu dans des fermes infectées du voisinage, afin de raccourcir la période pendant laquelle la maladie était présente dans la ferme [39]. Au début du xx^e siècle, il était bien établi que les animaux pouvaient être protégés par l'application de sérum hyper-immun et dans certains pays ce traitement était devenu obligatoire avant l'envoi des animaux aux expositions ou marchés. Cette mesure a permis de réduire la propagation du virus à partir de ces sites de rassemblement de bétail.

En 1892, le Royaume-Uni a été le premier pays à mettre en place un véritable programme de lutte contre la fièvre aphteuse, fondé sur l'abattage et la destruction de tous les animaux infectés et de leurs contacts sensibles, suivi du nettoyage et de la désinfection des installations. Les éleveurs étaient indemnisés pour la perte de leurs animaux [39]. Par la suite, l'Irlande et la Norvège ont également adopté ces mesures. Le succès de ces mesures pour le contrôle de la FA dans ces pays a été largement attribué à leur situation insulaire ou péninsulaire.

En Allemagne, peu avant la Seconde Guerre mondiale, un vaccin inactivé fabriqué à partir de virus issu de bovins infectés a été mis au point et a permis de protéger efficacement les troupeaux contre la fièvre aphteuse [39]. Bien que ces vaccins aient contribué à réduire le nombre d'épizooties en Europe, la capacité de production restait insuffisante pour permettre la vaccination de tous les bovins. Ce n'est que lorsque Frenkel a mis au point un vaccin fondé sur la culture *in vitro* du virus de la FA qu'il a été possible de produire une quantité suffisante de vaccin. L'association de mesures d'abattage et de désinfection similaires à celles mises en œuvre dans les îles britanniques avec l'utilisation

à grande échelle du vaccin produit selon cette technologie a d'abord permis d'éliminer la maladie aux Pays-Bas. D'autres pays européens ont suivi l'exemple néerlandais et, dans les années 1960-70, la plupart des pays européens étaient pratiquement indemnes. En 1985, l'Union européenne (UE) a décidé d'appliquer une politique de non-vaccination et a maintenu cette décision, malgré deux épizooties majeures en Italie (en 1985 et 1987). En France, en Belgique et aux Pays-Bas, le vaccin de type Frenkel a été utilisé jusqu'en 1991, date à laquelle la vaccination a été abandonnée dans toute l'Europe. Après 1992, des épizooties sont apparues en Italie (1993), en Grèce (1994 et 1996), et aux frontières de l'UE, en Bulgarie (1994), en Albanie (1996), en Macédoine (1996) et en Yougoslavie (1996). Pour contrôler ces épizooties, des mesures d'abattage-désinfection ont été appliquées dans les États de l'UE. Dans les autres pays européens, ces mesures ont été associées à la vaccination, généralement avec le soutien de l'UE [39].

En 2001, une épizootie de grande ampleur due à un virus de sérotype O est apparue en Grande Bretagne puis en Irlande. Le Royaume-Uni était alors indemne depuis 1981. Malgré son extension tant géographique qu'en termes de nombre de foyers (plus de 2000 foyers) une politique strictement sanitaire (abattage sans utilisation de la vaccination) a été mise en œuvre, mais il fallut presque six mois pour éradiquer le virus et 6,5 millions d'animaux ont été abattus [97]. Les échanges commerciaux ont étendu les foyers d'une part aux Pays-Bas (25 foyers) où la vaccination a été pratiquée et d'autre part en France où les deux foyers ont été éradiqués sans recours à la vaccination grâce à des mesures rapides et vigoureuses [98].

Situation actuelle dans l'UE

Actuellement, tous les pays de l'UE doivent avoir un plan d'urgence adapté aux besoins du pays pour faire face aux foyers de fièvre aphteuse. La fièvre aphteuse est une maladie à déclaration obligatoire, et les États membres doivent informer la Commission européenne et les autres pays membres de l'UE en cas d'apparition d'un foyer. Les plans d'urgence des États membres sont fondés sur la directive du Conseil 2003/85/EC, remplacée par la loi de santé animale depuis le 21 avril 2021 (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02016R0429-20191214>). Cette directive établit les mesures minimales qui doivent être prises en réponse à un foyer de fièvre aphteuse, mais les pays peuvent choisir de faire plus que ce minimum. Le plan d'urgence contre la fièvre aphteuse pour chaque État membre de l'UE doit détailler comment seraient mises en œuvre les mesures prévues dans la directive. Les mesures à prendre en cas de suspicion de la maladie incluent la mise sous surveillance de l'exploitation et éventuellement



d'une zone de contrôle temporaire pendant 72 heures. En cas de suspicion forte, les autorités vétérinaires peuvent mettre en œuvre un abattage préventif au niveau de l'exploitation, sans attendre les résultats des tests de laboratoire. Si la fièvre aphteuse est confirmée dans une exploitation, il est préconisé d'abattre tous les animaux sensibles et d'instaurer une zone de protection de 3 km de rayon et une zone de surveillance de 7 km de rayon autour de cette zone de protection, dans lesquelles des mesures spécifiques doivent être appliquées qui interdisent la circulation des animaux et de leurs produits, et visent à réduire la circulation des personnes. La réglementation européenne inclut également des préconisations concernant la régionalisation, afin de distinguer au sein du pays membre concerné les zones où l'épizootie est en cours, soumises à des mesures de restriction sévères, et les zones qui sont indemnes de fièvre aphteuse où aucune mesure de restriction ne s'applique. La directive définit par ailleurs les circonstances dans lesquelles la décision de vacciner peut être prise et les conditions d'un retour au statut indemne. Ainsi, lorsque la maladie a été éradiquée sans vaccination dans un pays de l'UE, au moins 3 mois doivent s'écouler depuis le dernier cas confirmé de fièvre aphteuse avant que le statut indemne d'infection puisse être déclaré, et l'ensemble des mesures de restriction levées. Si la vaccination est utilisée, la période minimale est de 3 mois après l'abattage du dernier animal vacciné et d'au moins 6 mois depuis la fin de la vaccination ou du dernier foyer si les animaux vaccinés ne sont pas abattus. Dans les deux cas, des enquêtes sérologiques approfondies doivent avoir démontré l'absence d'animaux porteurs d'anticorps (autres que ceux induits par la vaccination le cas échéant).

Rapide historique de la lutte en France

La France est indemne de fièvre aphteuse depuis 2001. Auparavant, dans les années 1950, cette maladie constituait un fléau économique redoutable en raison de son extraordinaire contagiosité ; ainsi, en 1952 environ 320 000 foyers furent identifiés pour environ 1 000 000 d'exploitations agricoles bovines présentes à l'époque sur le territoire national [99]. Les conséquences économiques gravissimes des épizooties annuelles de fièvre aphteuse conduisirent donc différents pays, dont la France, à utiliser à partir de 1961 puis généraliser en 1963 l'utilisation de la vaccination (vaccin contre les types A, O et C) chez les bovins pour, d'une part, réduire les pertes et, d'autre part, tenter de limiter la diffusion de la maladie en vue, à terme, de son éradication sur le territoire national. Le résultat fut spectaculaire puisqu'en quelques années le nombre de foyers chuta de plusieurs dizaines de milliers (près de 100 000 en 1957) à 17 foyers en 1967. Dans ce contexte, il était légitime

d'espérer atteindre l'éradication en conjuguant à cette prophylaxie médicale, des mesures sanitaires d'élimination des quelques foyers résiduels et des mesures de protection du territoire vis-à-vis d'introductions (prophylaxie médico-sanitaire).

À partir de 1981, bien que toujours soumise à la vaccination obligatoire des bovins, la France n'observa plus de nouveau foyer (jusqu'en 2001) et obtint donc le statut indemne avec vaccination [3]. Le 1^{er} avril 1991, conformément à une décision européenne, la France, modifia son dispositif de lutte contre la fièvre aphteuse. La vaccination fut interdite et les mesures de surveillance et de lutte renforcées.

Dispositif de surveillance et de lutte en France

En France, le dispositif de lutte comprend, depuis 1991, une surveillance événementielle des suspicions cliniques associée à une prophylaxie sanitaire stricte en cas de foyer fondée sur l'euthanasie de tous les animaux des espèces sensibles des troupeaux atteints et la détermination d'une zone d'interdiction autour des foyers.

Afin d'activer le dispositif de surveillance événementiel reposant sur le couple éleveur/vétérinaire, des campagnes nationales de sensibilisations ont été organisées à plusieurs reprises. La plus récente remonte à 2015 au travers d'une visite sanitaire dont le thème était plus particulièrement consacré à la fièvre aphteuse [100]. Leur objectif est d'informer les éleveurs des espèces sensibles des premiers signes devant générer une alerte et du caractère urgent de cette démarche.

En cas de suspicion, le vétérinaire praticien est alors censé effectuer une série d'actions bien codifiées et notamment (i) prendre des mesures de biosécurité pour entrer dans l'exploitation suspecte, (ii) effectuer un examen clinique et (iii) prévenir en urgence les services vétérinaires (un numéro d'urgence est à leur disposition dans chaque département, *figure 7*). Les services vétérinaires décident d'affirmer ou infirmer la suspicion clinique avec l'aide à distance d'un vétérinaire spécialiste (cellule d'alerte de l'Anses, à Maisons-Alfort). En cas de confirmation de la suspicion, l'exploitation est mise sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS). Le vétérinaire praticien doit également réaliser les prélèvements requis, effectuer le recensement de toutes les espèces animales présentes sur l'exploitation, prescrire les mesures de confinement, et prendre toutes les mesures de biosécurité pour sortir de l'exploitation. Les prélèvements sont acheminés d'urgence et par transporteur spécial au laboratoire de santé animale de l'Anses situé à Maisons-Alfort (laboratoire national de référence). Les prélèvements sont traités immédiatement et en urgence 24 h/24 et 7 j/7. En cas de résultat positif, la police sanitaire s'applique, les services vétérinaires veillent à prendre un arrêté préfectoral de déclaration d'infection



Copyright © 2022, John Libbey Eurotext. Téléchargé par M DAMIEN VITOUR le 28/11/2022.

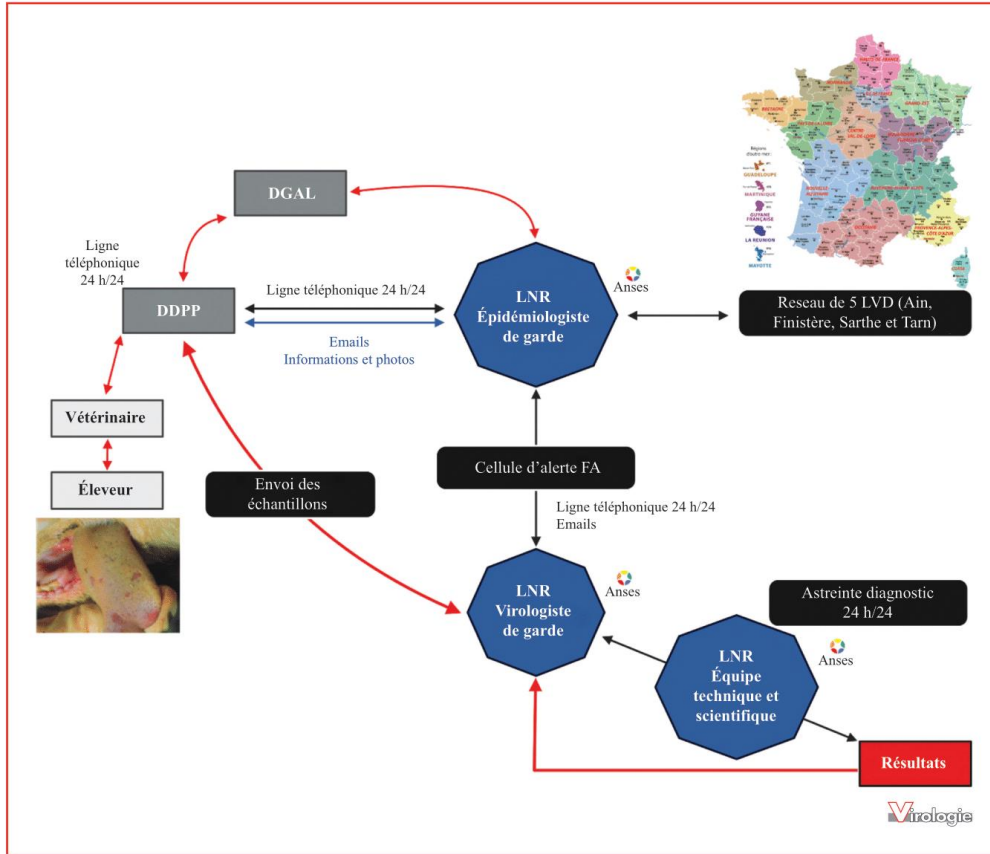


Figure 7. Dispositif français de surveillance de la fièvre aphteuse.
 LNR : laboratoire national de référence, DGAL : Direction générale de l'alimentation, DDPP : Direction départementale de la protection des populations, LVD : laboratoire vétérinaire départemental.
 © Crown copyright [2022]. Licensed under the Open Government Licence v3.0., © UK DEFRA, avec permission.

(APDI) et tous les animaux des espèces réceptives de l'élevage sont immédiatement abattus sur place (pour éviter une contamination d'autres élevages au cours de leur déplacement vers un abattoir) puis leur cadavre est éliminé à l'équarrissage de préférence. Les éleveurs sont indemnisés de leurs pertes par l'État. Une triple désinfection est ensuite pratiquée ; la première *in situ*, la seconde après avoir nettoyé l'exploitation et la troisième 15 jours après. Un vide sanitaire de 30 jours est ensuite respecté avant tout repeuplement. Une enquête épidémiologique est également conduite le plus rapidement possible afin de tenter de comprendre

d'où vient l'infection et surtout d'identifier les élevages en lien épidémiologiques avec ce foyer. Parallèlement à ces mesures, une zone de protection et une zone de surveillance sont instaurées d'après la directive du Conseil 2003/85/EC décrite plus haut. En complément de ces mesures de bases, deux démarches complémentaires peuvent être appliquées pour aider à endiguer l'extension de l'épizootie : (i) L'abattage préventif des élevages en lien épidémiologiques ou identifiés comme à risque particulier en raison notamment de leur proximité géographique ou par exemple d'achats d'animaux provenant de l'élevage foyer ;



(ii) La vaccination en anneau autour des foyers avec des vaccins hautement purifiés et permettant ultérieurement la distinction entre les animaux infectés et les animaux vaccinés. Cette vaccination conduisant à un recouvrement du statut indemne de la zone plus long et plus difficile que sans son usage, elle est cependant rarement mise en œuvre.

D'une manière générale, il est essentiel de rappeler qu'indépendamment de la vigilance concernant l'importation d'animaux ou de produits contaminés, le contrôle et la maîtrise de la fièvre aphteuse en zone indemne comme la France repose sur la précocité de la détection (surveillance) et la sévérité des mesures mises en œuvre (abattage destruction des carcasses et zonage) le plus tôt possible après la découverte d'un foyer afin d'éviter toute propagation de ce virus particulièrement contagieux.

Programmes de lutte dans d'autres régions du monde

Les États-Unis ont aussi appliqué avec succès une stratégie sanitaire similaire à celle adoptée par la Grande-Bretagne : la dernière épizootie y a eu lieu en 1929 [39]. Le Canada a également contrôlé les foyers de 1951/1952 en Saskatchewan grâce à cette stratégie, et a été déclaré indemne de fièvre aphteuse en 1953. En 1946, la fièvre aphteuse a été introduite au Mexique, probablement par l'importation de zébus infectés en provenance du Brésil. Pour éradiquer la maladie, le gouvernement mexicain a reçu l'aide des États-Unis pour la surveillance, la mise en quarantaine et l'abattage massif. Malgré un programme intensif et coûteux, la maladie a continué à se propager. En conséquence, un programme de vaccination a été établi qui a porté ses fruits. La maladie a été éradiquée et la dernière campagne de vaccination a eu lieu en 1950.

Comme conséquence directe de l'épizootie de fièvre aphteuse au Mexique et de l'introduction des sérotypes O et A de la fièvre aphteuse au Venezuela et en Colombie en 1950/1951, le Centre panaméricain de la fièvre aphteuse (Panaftosa) a été créé à Rio de Janeiro, Brésil [39]. L'Organisation des États américains a établi un programme d'assistance technique avec l'Organisation panaméricaine de la santé (OPS), en tant qu'agence exécutive du Panaftosa. En 1968, Panaftosa a été incorporé dans le programme régulier de l'OPS. Panaftosa a joué un rôle majeur dans la coordination et l'organisation de la prévention et du contrôle de la fièvre aphteuse, dans l'établissement de normes pour le diagnostic, pour la qualité des vaccins et dans la formation des personnels de terrain pour les pays des Amériques. En 1972, la Commission sud-américaine de contrôle de la fièvre aphteuse (Cosalfa) a été créée. Les objectifs de la Cosalfa sont la coordination régionale, la promotion et l'évaluation des programmes de prévention, de contrôle et d'éradication, l'harmonisation des normes

sanitaires ainsi que la promotion et évaluation des accords bilatéraux et multilatéraux pour le contrôle de la maladie. En 1982, la Cosalfa a approuvé le document « Politique et stratégies de lutte contre la fièvre aphteuse en Amérique du Sud pour la décennie 1981/1990 », qui établissait des directives générales d'action pour parvenir à l'élimination de la maladie dans les principales zones d'élevage de la région. Grâce à la vaccination, la plupart des pays de l'Amérique du Sud sont devenus des pays « indemnes de fièvre aphteuse où la vaccination est pratiquée » et certains d'entre eux possèdent des zones où la vaccination n'est pas pratiquée (Argentine, Bolivie, Brésil, Colombie, Équateur).

Dans de nombreuses autres parties du monde, un *statu quo* est maintenu. Bien qu'une vaccination régulière puisse être pratiquée dans certaines grandes exploitations laitières et dans les élevages industriels de porcs, les petits élevages familiaux où les éleveurs pratiquant le pastoralisme ne peuvent souvent pas assumer les coûts de la vaccination et la maladie se maintient ainsi dans la région.

La coordination internationale

La fièvre aphteuse nécessite un échange d'informations internationales en temps réel et exige une coordination des mesures de lutte à l'échelle mondiale. Dans ce domaine l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA, ex-OIE) joue un rôle important. Après la lutte contre la peste bovine, la fièvre aphteuse est devenue une maladie prioritaire pour l'OMSA. Aujourd'hui, des règles sont établies dans le cadre de l'OMSA pour la prévention de la propagation des maladies contagieuses par le biais du commerce international. Par ailleurs, la fièvre aphteuse est une maladie répertoriée dans la liste des maladies de l'OMSA et doit faire l'objet de déclarations obligatoires auprès de l'Organisation. Il s'agit de la première maladie pour laquelle l'OMSA a établi une procédure de reconnaissance officielle de statut sanitaire. Les pays membres peuvent également demander à l'OMSA la reconnaissance officielle de leurs programmes de contrôle.

En 2009 la FAO et l'OMSA ont lancé un plan de lutte conjoint pour éradiquer la maladie au niveau mondial. La FAO a joué un rôle majeur dans la mise en place de laboratoires et d'unités de production de vaccins contre la fièvre aphteuse dans les pays du Sud. Cependant, après l'arrêt du soutien de la FAO, la production de vaccins s'est souvent arrêtée en raison de l'absence d'une infrastructure technique suffisante. En 1954, sous l'égide de la FAO, un certain nombre de pays européens ont créé l'EuFMD (The European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease) [39]. Cette institution a stimulé les programmes de lutte dans les pays européens et a également encouragé l'étude de la fièvre aphteuse et des méthodes pour améliorer son contrôle. La FAO est également impliquée, avec



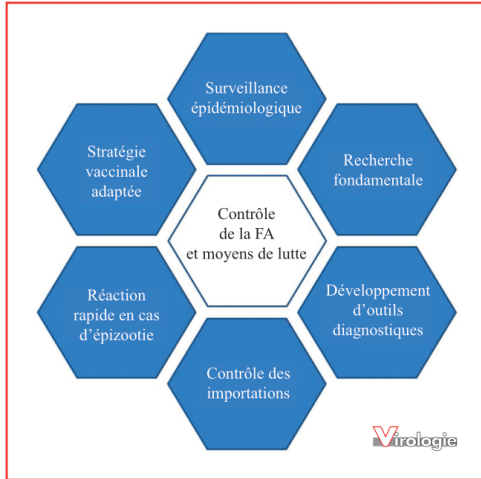


Figure 8. Prophylaxie de la fièvre aphteuse.

l'UE, dans le comité tripartite qui met en œuvre des mesures visant à prévenir la propagation de la fièvre aphteuse de la Turquie vers l'Europe. La vaccination des bovins et des ovins en Thrace, Turquie, est l'une des actions soutenues par ce comité.

Conclusion

La fièvre aphteuse reste une maladie majeure dans le domaine de la santé animale et représente dans de nombreux pays un obstacle pour le commerce des animaux de production et/ou leurs produits. L'amélioration continue du contrôle de cette maladie est bénéfique pour les pays en zone d'enzootie mais également pour les zones indemnes à risque de réintroduction avec les conséquences socio-économiques que cela engendrerait.

La lutte contre la fièvre aphteuse repose sur la combinaison de différentes actions résumées en figure 8, sur les réseaux de laboratoires au niveau international et sur de solides collaborations et actions de formation. Une surveillance épidémiologique permanente permet d'adapter la stratégie vaccinale à déployer en cas de foyer, pour les zones où la vaccination est autorisée. Un contrôle strict des importations et autres mouvements d'animaux permet des réactions rapides en cas d'épizootie pour limiter la propagation de la maladie. Pour pouvoir mieux caractériser les souches circulantes, la priorité doit être également donnée

à un meilleur diagnostic sur le terrain. Pour cela, développer des méthodes facilitant la soumission des échantillons depuis les zones d'enzootie vers les laboratoires de référence est essentiel. L'amélioration continue des méthodes diagnostiques et notamment celles applicables sur le terrain (test rapide) contribue également à lutter efficacement contre cette maladie majeure. Enfin, continuer à élucider la biologie de ce virus particulier (notamment ses mécanismes de persistance) et développer de nouvelles stratégies vaccinales contribuera à élaborer de nouveaux moyens de contrôle et de futurs outils thérapeutiques. La disparition apparente du sérotype C et le statut indemne de l'Europe démontrent que la lutte est possible pour imaginer faire de la fièvre aphteuse, à terme, une maladie du passé.

Liens d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Knight-Jones TJD, Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease - what are they, how big are they and where do they occur? *Prev Vet Med* 2013 ; 112(3-4) : 161-73.
2. Capozzo AV, Pérez-Filgueira M, Vosloo W, Gay CG. Editorial: FMD research: bridging the gaps with novel tools. *Front Vet Sci* [Internet] 2021. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.686141/full> (accessed on 04/06/2021).
3. Zientara S, Bakkali Kassimi L. L'exemple de l'éradication de la fièvre aphteuse en France. *Revue Prat* 2021 ; 71 : 102-5.
4. Fracastorius H. *De sympathia et antipathia rerum liber unus. De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione Libri III*. Venecia-Italia : Heirs of L. Giunta, 1546.
5. Tully DC, Fares MA. The tale of a modern animal plague: tracing the evolutionary history and determining the time-scale for foot and mouth disease virus. *Virology* 2008 ; 382(2) : 250-6.
6. Yoon SH, Park W, King DP, Kim H. Phylogenomics and molecular evolution of foot-and-mouth disease virus. *Mol Cells* 2011 ; 31(5) : 413-21.
7. Brown F. The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Res* 2003 ; 91(1) : 3-7.
8. Waldmann O, Pape J. Die künstliche Übertragung der Maul-und Klauen-seuche auf das Meerschweinchen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1920 ; 36 : 519-20.
9. Skinner HH. Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc R Soc Med* 1951 ; 44(12) : 1041-4.
10. Vallée H, Carré H. Sur la pluralité du virus aphteux. *Acad Sci* 1922 ; 174 : 1498-500.
11. Waldmann O, Trautwein K. Experimentelle untersuchungen ueber die pluralitet des maul-und klauenseuche virus. *Berl Iterarztl Wschr* 1926 ; 42 : 569-71.
12. Brooksby J-B, Rogers A. *Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease viruses*. France : European Productivity Agency of the Organisation for European Economic Co-operation (OEEC), 1957.
13. Brooksby JB. The virus of foot-and-mouth disease. *Adv Virus Res* 1958 ; 5 : 1-37.
14. Cartwright SF, Pay TWF, Henderson WM. Multiplication of the virus of foot-and-mouth disease in culture. *J Gen Microbiol* 1957 ; 16(3) : 730-48.

Copyright © 2022, John Libbey Eurotext. Téléchargé par M DAMIEN VITOUR le 28/11/2022.



15. Vallée H, Carré H, Rinjard P. Sur l'immunisation anti-aphtheuse par le virus formolé. *Rev Gen Med Vet* 1926 ; 129-34.
16. Schmidt S. Immunisierung des meerschweinchons gegen drei verschiedene typen von maul-und-klaeusechevirus vermittels eines trivalent aluminiumhydroxydadsorbates. *Z Immunitätsforsch* 1936 ; 88-91.
17. Waldman O, Köbe K. Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul-undKlaeuseuche. *Berl tierärztl Wschr* 1938 ; 317.
18. Frenkel HS. La culture de la virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés. *Bull Off Int des Epizoot* 1947 ; 28 : 155-62.
19. Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* 2004 ; 17(2) : 465-93.
20. Zell R, Knowles NJ, Simmonds P. A proposed division of the family Picornaviridae into subfamilies based on phylogenetic relationships and functional genomic organization. *Arch Virol* 2021 ; 166(10) : 2927-35.
21. Parvez MK. Geometric architecture of viruses. *World J Virol* 2020 ; 9(2) : 5-18.
22. Medina GN, Segundo FDS, Stenfeldt C, Arzt J, de Los Santos T. The different tactics of foot-and-mouth disease virus to evade innate immunity. *Front Microbiol* 2018 ; 9 : 2644.
23. Sarry M, Vitour D, Zientara S, Bakkali Kassimi L, Blaise Boisseau S. Foot-and-mouth disease virus: molecular interplays with IFN response and the importance of the model. *Viruses* 2022 ; 14 : 2129.
24. Belsham GJ, Kristensen T, Jackson T. Foot-and-mouth disease virus: prospects for using knowledge of virus biology to improve control of this continuing global threat. *Virus Res* 2020 ; 281 : 197909.
25. Dopazo J, Sobrino F, Palma EL, Domingo E, Moya A. Gene encoding capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85(18) : 6811-5.
26. Bachanek-Bankowska K, Di Nardo A, Wadsworth J, et al. Reconstructing the evolutionary history of pandemic foot-and-mouth disease viruses: the impact of recombination within the emerging O/ME-SA/Ind-2001 lineage. *Sci Rep* 2018 ; 8(1) : 14693.
27. Duchatel F, Bronsvort BM de C, Lycett S. Phylogeographic analysis and identification of factors impacting the diffusion of foot-and-mouth disease virus in Africa. *Front Ecol Evol* [Internet] 2019 ; 7. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fevo.2019.00371> (accessed 17/05/2022).
28. Aiewsakun P, Pamornchainavakul N, Inchaisri C. Early origin and global colonisation of foot-and-mouth disease virus. *Sci Rep* 2020 ; 10(1) : 15268.
29. Paton DJ, Di Nardo A, Knowles NJ, et al. The history of foot-and-mouth disease virus serotype C: the first known extinct serotype? *Virus Evol* 2021 ; 7(1) : veab009.
30. Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 2005 ; 79(10) : 6487-504.
31. Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Research* 2003 ; 91(1) : 65-80.
32. Klein J. Understanding the molecular epidemiology of foot-and-mouth-disease virus. *Infect Genet Evol* 2009 ; 9(2) : 153-61.
33. Samuel AR, Knowles NJ. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J Gen Virol* 2001 ; 82(Pt 3) : 609-21.
34. Mohapatra JK, Subramaniam S, Pandey LK, et al. Phylogenetic structure of serotype A foot-and-mouth disease virus: global diversity and the Indian perspective. *J Gen Virol* 2011 ; 92(Pt 4) : 873-9.
35. Dicara D, Burman A, Clark S, et al. Foot-and-mouth disease virus forms a highly stable, EDTA-resistant complex with its principal receptor, integrin alphavbeta6: implications for infectiousness. *J Virol* 2008 ; 82(3) : 1537-46.
36. Kristensen T, Belsham GJ. Identification of plasticity and interactions of a highly conserved motif within a picornavirus capsid precursor required for virus infectivity. *Sci Rep* 2019 ; 9(1) : 11747.
37. Waters RA, Wadsworth J, Mioulet V, et al. Foot-and-mouth disease virus infection in the domestic dog (*Canis lupus familiaris*), Iran. *BMC Vet Res* 2021 ; 17(1) : 63.
38. Capella GL. Foot and mouth disease in human beings. *The Lancet* 2001 ; 358(9290) : 1374.
39. Suttmoller P, Barteling SS, Olascoaga RC, Sumption KJ. Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res* 2003 ; 91(1) : 101-44.
40. Brown E, Freimanis G, Shaw AE, Horton DL, Gubbins S, King D. Characterising foot-and-mouth disease virus in clinical samples using nanopore sequencing. *Front Vet Sci* 2021 ; 8 : 656256.
41. Bartley LM, Donnelly CA, Anderson RM. Review of foot-and mouth disease virus survival in animal excretions and on fomites. *Vet Rec* 2002 ; 151(22) : 667-9.
42. Stenfeldt C, Bertram MR, Smoliga GR, Hartwig EJ, Delgado AH, Arzt J. Duration of contagion of foot-and-mouth disease virus in infected live pigs and carcasses. *Front Vet Sci* [Internet] 2020 ; 7 : 334. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7300267/> (accessed on 18/01/2021).
43. O'Donnell V, Pacheco JM, Gregg D, Baxt B. Analysis of foot-and-mouth disease virus integrin receptor expression in tissues from naïve and infected cattle. *J Comp Pathol* 2009 ; 141(2) : 98-112.
44. Vázquez-Calvo Á, Saiz JC, McCullough KC, Sobrino F, Martín-Acebes MA. Acid-dependent viral entry. *Virus Res* 2012 ; 167(2) : 125-37.
45. Stenfeldt C, Arzt J. The carrier conundrum; a review of recent advances and persistent gaps regarding the carrier state of foot-and-mouth disease virus. *Pathogens* [Internet] 2020 ; 9(3) : 167. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7157498/> (accessed on 19/06/2022).
46. Yang B, Zhang X, Zhang D, et al. Molecular mechanisms of immune escape for foot-and-mouth disease virus. *Pathogens* 2020 ; 9(9) : 729.
47. Eschbaumer M, Stenfeldt C, Rekan SI, et al. Systemic immune response and virus persistence after foot-and-mouth disease virus infection of naïve cattle and cattle vaccinated with a homologous adenovirus-vectored vaccine. *BMC Vet Res* 2016 ; 12 : 205.
48. Van Bekkum JG, Frenkel HS, Frederiks HHJ, Frenkel S. Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease carriers. *Tijdschr Diergeneesk* 1959 ; 84 : 1159-64.
49. Salt JS. The carrier state in foot and mouth disease—an immunological review. *Br Vet J* 1993 ; 149(3) : 207-23.
50. Moonen P, Schrijver R. Carriers of foot-and-mouth disease virus: a review. *Vet Q* 2000 ; 22(4) : 193-7.
51. Arzt J, Fish IH, Bertram MR, et al. Simultaneous and staggered foot-and-mouth disease virus coinfection of cattle. *J Virol* [Internet] 2021 (accessed on 03/01/2022) <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.01650-21>.
52. Fish I, Stenfeldt C, Spinard E, et al. Foot-and-mouth disease virus interserotypic recombination in superinfected carrier cattle. *Pathogens* 2022 ; 11(6) : 644.
53. Pfaff F, Hägglund S, Zoli M, et al. Proteogenomics uncovers critical elements of host response in bovine soft palate epithelial cells following in vitro infection with foot-and-mouth disease virus. *Viruses* 2019 ; 11(1) : 53.
54. Hägglund S, Laloy E, Näslund K, et al. Model of persistent foot-and-mouth disease virus infection in multilayered cells derived from bovine dorsal soft palate. *Transbound Emerg Dis* 2020 ; 67(1) : 133-48.



55. Belsham GJ. Towards improvements in foot-and-mouth disease vaccine performance. *Acta Vet Scand* 2020; 62(1): 20.
56. Childs K, Jackson B, Harvey Y, Seago J. Trans-encapsidation of foot-and-mouth disease virus genomes facilitates escape from neutralizing antibodies. *Viruses* 2022; 14(6): 1161.
57. Diaz-San Segundo F, Medina GN, Stenfeldt C, Arzt J, de Los Santos T. Foot-and-mouth disease vaccines. *Vet Microbiol* 2017; 206: 102-12.
58. Hall MD, Knowles NJ, Wadsworth J, Rambaut A, Woolhouse MEJ. Reconstructing geographical movements and host species transitions of foot-and-mouth disease virus serotype SAT 2. *mBio* 2013; 4(5): e00591-613.
59. Blancou J, Parsonson I. Historical perspectives on long distance transport of animals. *Vet Ital* 2008; 44(1): 19-30.
60. Saraiva V. Foot-and-mouth disease in the Americas: epidemiology and ecologic changes affecting distribution. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1026: 73-8.
61. Rweyemamu M, Roeder P, Mackay D, et al. Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide. *Transbound Emerg Dis* 2008; 55(1): 57-72.
62. Paton DJ, Sumption KJ, Charleston B. Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009; 364(1530): 2657-67.
63. Subramaniam S, Mohapatra JK, Das B, Sanyal A, Pattnaik B. Genetic and antigenic analysis of foot-and-mouth disease virus serotype O responsible for outbreaks in India during 2013. *Infect Genet Evol* 2015; 30: 59-64.
64. Jamal SM, Ferrari G, Ahmed S, Normann P, Belsham GJ. Molecular characterization of serotype Asia-1 foot-and-mouth disease viruses in Pakistan and Afghanistan; emergence of a new genetic Group and evidence for a novel recombinant virus. *Infect Genet Evol* 2011; 11(8): 2049-62.
65. Hammond JM, Maulidi B, Henning N. Targeted FMD vaccines for eastern africa: the AgResults foot and mouth disease vaccine challenge project. *Viruses* 2021; 13(9): 1830.
66. Ularanu HG, Lefebvre DJ, Haegeman A, et al. Complex circulation of foot-and-mouth disease virus in cattle in Nigeria. *Front Vet Sci [Internet]* 2020; 7: 466 (accessed on 28/09/2020) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7468398/>.
67. Banda F, Shilongo A, Hikufe EH, et al. The first detection of a serotype O foot-and-mouth disease virus in Namibia. *Transbound Emerg Dis [Internet]* 2022; 69(5): e3261-7 (accessed on 14/04/2022) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.14561>.
68. Malirat V, Bergmann IE, Campos R de M, et al. Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O circulating in the Andean region of South America during 2002-2008. *Vet Microbiol* 2011; 152(1-2): 74-87.
69. Maradei E, Malirat V, Beascochea CP, et al. Emergence of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus serotype O in Ecuador and preliminary evaluation of a field strain as a vaccine candidate. *Vaccine* 2014; 32(21): 2446-51.
70. Pezzoni G, Calzolari M, Foglia EA, et al. Characterization of the O/ME-SA/Ind-2001d foot-and-mouth disease virus epidemic recorded in the Maghreb during 2014-15. *Transbound Emerg Dis [Internet]* 2022; 65(9): e2641-52 (accessed 12/06/2022) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.14611>.
71. Canini L, Blaise-Boisseau S, Wadsworth J, et al. Identification of diffusion routes of O/EA-3 toptotype of foot-and-mouth disease virus in Africa and Western Asia between 1974 and 2019 - a phylogeographic analysis. *Transbound Emerg Dis* 2022; 69(5): e2230-9.
72. World Organization for Animal Health (OIE). Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* [Internet]. OIE, 2021. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf (accessed on 11 April 2022).
73. Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJM. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* 2003; 129(1): 1-36.
74. Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI. Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals-the carrier problem. *Microbes Infect* 2002; 4(10): 1099-110.
75. Bachrach HL, Breese SS, Callis JJ, Hess WR, Patty RE. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by pH and temperature changes and by formaldehyde. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 95(1): 147-52.
76. World Organization for Animal Health (OIE). Transport of biological materials. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* [Internet]. 2021. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.03_TRANSPORT.pdf.
77. King DP, Ferris NP, Shaw AE, et al. Detection of foot-and-mouth disease virus: comparative diagnostic sensitivity of two independent real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18(1): 93-7.
78. Roeder PL, Le Blanc Smith PM. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res Vet Sci* 1987; 43(2): 225-32.
79. Grazioli S, Ferris NP, Dho G, Pezzoni G, Morris AS, Mioulet V, et al. Development and validation of a simplified serotyping ELISA based on monoclonal antibodies for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, C and Asia 1. *Transbound Emerg Dis [Internet]* 2020; 67(6): 3005-15 (accessed on 15/06/2020) <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.13677>.
80. Brehm KE, Ferris NP, Lenk M, Riebe R, Haas B. Highly sensitive fetal goat tongue cell line for detection and isolation of foot-and-mouth disease virus. *J Clin Microbiol* 2009; 47(10): 3156-60.
81. Gray AR, Wood BA, Henry E, Azhar M, King DP, Mioulet V. Evaluation of cell lines for the isolation of foot-and-mouth disease virus and other viruses causing vesicular disease. *Front Vet Sci* 2020; 7: 426.
82. Foglia EA, Lembo T, Kazwala R, et al. Combining multiple assays improves detection and serotyping of foot-and-mouth disease virus. A practical example with field samples from east africa. *Viruses* 2021; 13(8): 1583.
83. Knowles NJ, Wadsworth J, Bachanek-Bankowska K, King DP. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev Sci Tech* 2016; 35(3): 741-55.
84. European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (EuFMD). *Minimum Biorisk Management Standards for foot-and-mouth disease laboratories (MBRMS)*. 2021. Available from: Available online: <https://www.fao.org/3/cb7172en/cb7172en.pdf>.
85. World Organization for Animal Health (OIE). Biosafety and biosecurity: standard for managing biological risk in the veterinary laboratory and animal facilities. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* [Internet]. OIE, 2021. Available from: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.04_BIOSAFETY_BIOSECURITY.pdf.



86. Ferris NP, Nordengrahn A, Hutchings GH, *et al.* Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *J Virol Methods* 2009; 155(1): 10-7.
87. Howson ELA, Kurosaki Y, Yasuda J, *et al.* Defining the relative performance of isothermal assays that can be used for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods* 2017; 249: 102-10.
88. Romey A, Relmy A, Gorna K, *et al.* Safe and cost-effective protocol for shipment of samples from Foot-and-Mouth Disease suspected cases for laboratory diagnostic. *Transbound Emerg Dis* 2017; 65(1): 197-204.
89. King DP, Madi M, Mioulet V, *et al.* New technologies to diagnose and monitor infectious diseases of livestock: challenges for sub-Saharan Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 2012; 79(2): 456.
90. Mackay DK, Bulut AN, Rendle T, Davidson F, Ferris NP. A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods* 2001; 97(1-2): 33-48.
91. Goris N, De Clercq K. Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay—Part I. Quality assurance: development of secondary and working standards. *Rev Sci Tech* 2005; 24(3): 995-1004.
92. Di Nardo A, Libeau G, Chardonnet B, *et al.* Serological profile of foot-and-mouth disease in wildlife populations of West and Central Africa with special reference to *Syncerus caffer* subspecies. *Vet Res* 2015; 46: 77.
93. Pasick J. Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. *Anim Health Res Rev* 2004; 5(2): 257-62.
94. Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, Paton DJ, Sammin DJ, Greiner M, *et al.* Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 2006; 24(47-48): 6966-79.
95. Bergmann IE, de Mello PA, Neitzert E, Beck E, Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res* 1993; 54(6): 825-31.
96. Mahapatra M, Parida S. Foot and mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives. *Expert Rev Vaccines* 2018; 17(7): 577-91.
97. Knowles NJ, Samuel AR, Davies PR, Kitching RP, Donaldson AI. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain. *Vet Rec* 2001; 148(9): 258-9.
98. Chmitelin I, Moutou F. Foot and mouth disease: lessons to be learned from the experience of France. *Rev Sci Tech* 2002; 21(3): 731-7.
99. Joubert L, Mackowiak C. *La fièvre aphteuse, Vol 3.* France : Fondation Mérieux, 1968.
100. Raut N. *Sensibilisation des éleveurs et des vétérinaires à la fièvre aphteuse en France en 2015: analyse des résultats de la visite sanitaire bovine.* 2018.



Annexe 2 : Poster Journées Francophones de Virologie (JFV) 2022 : « Interaction de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I : un lien avec la persistance virale ? » Strasbourg, France, 11-12 avril 2022.



Interaction de la polymérase 3D du virus de la fièvre aphteuse avec la réponse interféron de type I : un lien avec la persistance virale ?



Morgan Sarry^{1,2}, Souheyla Benfrid¹, Cindy Bernellin-Cottet¹, Anthony Relmy¹, Aurore Romey¹, Anne-Laure Salomez¹, Caignard Gregory¹, Stephan Zientara¹, Damien Vitour¹, Labib Bakkali Kassimi¹ et Sandra Blaise-Boisseau¹

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France. ² Ecole doctorale ABIES – AgroParisTech – 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

Correspondance : morgan.sarry@anses.fr

P.020

Contexte & Objectif de l'étude

- La fièvre aphteuse (FA) est une maladie virale hautement contagieuse causée par un Picornavirus affectant les artiodactyles sauvages et domestiques.
 - L'une des problématiques liées à la FA est la persistance de son agent étiologique le Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) chez les ruminants¹.
 - La création d'un équilibre virus-hôte basé sur des interactions protéine-protéine (IPP) fait partie des pistes pouvant expliquer la persistance du FMDV².
 - La persistance du FMDV a été démontrée chez les bovins et les petits ruminants mais pas chez le porc².
- L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les IPP entre le FMDV et la réponse interféron de type I (IFN I) et de déterminer leur éventuelle spécificité d'hôte.



Méthodes

- Les interactions entre les protéines d'une souche de FMDV de type O et 16 protéines de la voie IFN I bovines, ovines, caprines et porcines ont été criblées par approche NanoLuc-2-Hybrid⁴.
- Cette méthode repose sur le rassemblement de deux sous-unités d'une molécule bioluminescente : la NanoLuciférase.
- La multiplication des combinaisons testées (sous-unités NanoLuc en N ou en C-terminal, 8 combinaisons au total, Fig 1) permet une meilleure spécificité et sensibilité⁴.
 - Pour cela, des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec 3 plasmides exprimant respectivement une protéine virale fusionnée à une sous-unité de NanoLuc, une protéine de la voie IFN I fusionnée à l'autre sous-unité de NanoLuc et la Renilla Luciférase servant à la normalisation des résultats (Fig 2).
- Les IPP mises en évidence par crible NanoLuc pour la banque bovine ont été confirmées par chromatographie d'affinité GST Pull-down.
- Pour cela, des cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec 2 plasmides exprimant respectivement une protéine virale étiquetée GST et une protéine de la voie IFN I étiquetée FLAG. Les protéines-GST ont ensuite été captées sur des billes de glutathion sépharose, puis les protéines-FLAG interagissant avec les protéines-GST sont détectées par immunomarquage.

Fig 1 : Combinaison des protéines de fusion NanoLuc

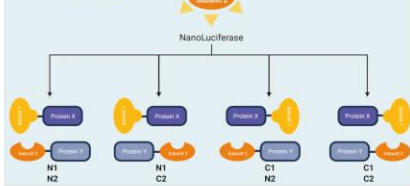
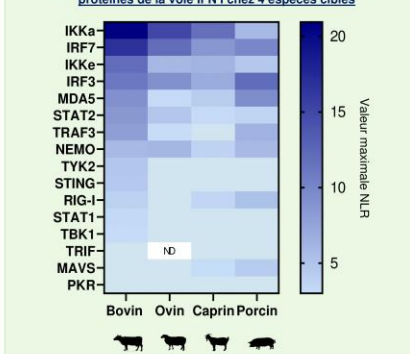


Fig 3 : Comparaison des interactions mises en évidence par approche NanoLuc entre la polymérase 3D et 16 protéines de la voie IFN I chez 4 espèces cibles



Résultats

$$\text{Normalized luminescence ratio (NLR)} = \frac{\text{Luminescence NanoLuciférase}_{3D-X} / \text{Luminescence Renilla Luciférase}_{intra}}{\text{Luminescence maximum}_{3D_stat}} \times 1000$$

Fig 2 : Crible des interactions 3D – banque bovine par approche NanoLuc

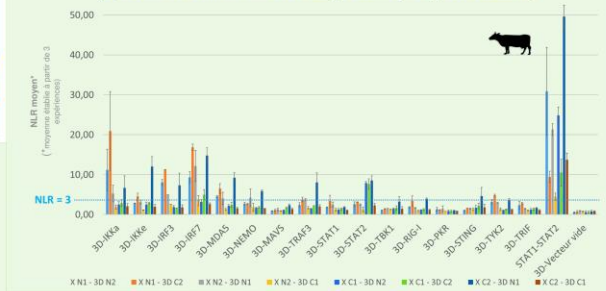
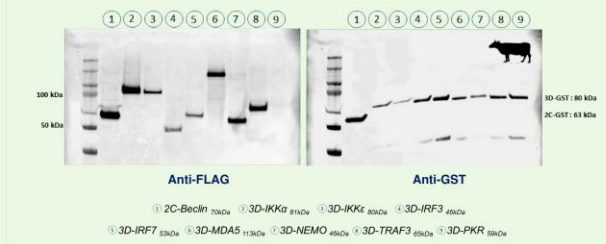


Fig 4 : Confirmation des IPP par GST Pull-down



Conclusions et perspectives

- Les cribles NanoLuc ont permis de mettre en évidence de nombreuses IPP impliquant différentes protéines virales.
- Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec la polymérase 3D pour laquelle aucune interaction avec la voie IFN I n'est décrite à ce jour.
- Ces IPP semblent conservées parmi les espèces testées mais avec des forces relatives variables (Fig 3).
- 7 IPP entre la polymérase 3D et la banque bovine ont pu être confirmées par GST Pull-down (Fig 4).
- Confirmation de ces IPP en cours par co-localisation.
- Confirmation des IPP en cours pour les autres espèces par GST Pull-down.
- Confirmation des IPP en contexte infectieux en cellules primaires à venir.

Références

1. Stenfeldt & Arzt 2020
2. Pfaff et al. 2019
3. Stenfeldt et al. 2014
4. Choi et al. 2019



Annexe 3 : Poster European Society for Veterinary Virology (ESVV) 2022 : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Gand, Belgique, 20-23 septembre 2022.



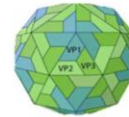
Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence?

Morgan Sarry^{1,2}, Souheyla Benfrid¹, Cindy Bernelin-Cottet¹, Anthony Relmy¹, Aurore Romey¹, Anne-Laure Salomez², Gregory Caignard¹, Stephan Zientara³, Damien Vitour⁴, Labib Bakkali Kassimi¹ et Sandra Blaise-Boisseau⁵

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France. ² Ecole doctorale ABIES – AgroParisTech – 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

INTRODUCTION & OBJECTIVES

- **Foot-and-mouth disease (FMD)** is a highly contagious viral disease caused by a **Picornavirus** affecting artiodactyls.
 - One issue associated with FMD is the **persistence** of its etiological agent **Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV)**, which has been demonstrated in ruminants but not in pigs^{1,2}.
 - A **virus-host balance** establishment based on **protein-protein interactions (PPI)** is one possible explanation for FMDV persistence³.
- This study aims to identify PPI between FMDV and the type I interferon (IFN I) response and to determine their possible host specificity.



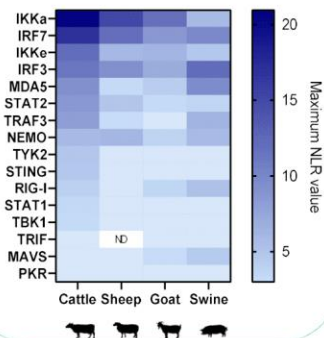
FMDV capsid

3D-IFN RESPONSE PPI

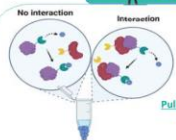


- **NanoLuc-2-Hybrid** screens revealed **new PPI** between **FMDV 3D polymerase** and **IFN I pathway** key proteins from 4 species⁴.
- PPI appear to be **conserved** between species but their relative importance differs.

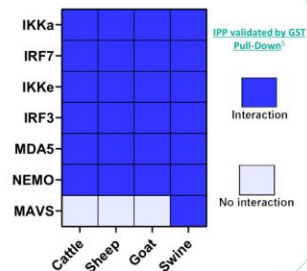
Comparison of the interactions between the 3D polymerase and 16 IFN I proteins from 4 targeted species⁴



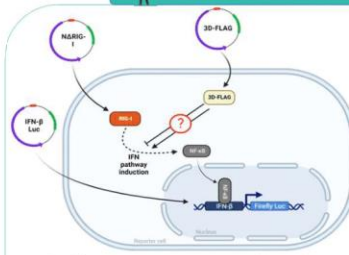
3D-IFN PPI CONFIRMATION



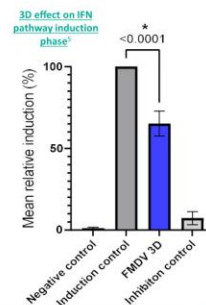
- Most of the identified PPI were confirmed by **GST Pull-Down assays**.
- FMDV **3D** thus interacts with **7 IFN I pathway proteins**.
- 3D only interacts with **swine MAVS**.



3D IMPACT ON IFN RESPONSE



- **Luciferase reporter assays** showed an **inhibitory** effect of 3D on the IFN pathway induction phase.



TAKE HOME MESSAGE

- FMDV 3D interacts with proteins involved in the upstream production of IFN I.
 - These interactions are characterised by a global inhibition of the induction phase of the IFN pathway.
- This study thus revealed an **unexpected role** for the FMDV polymerase in the subversion of the IFN I response.

¹ Stenfeldt & Artz 2020 ; ² Stenfeldt et al. 2014 ; ³ Pfaff et al. 2019 ; ⁴ Choi et al. 2019 ; ⁵ Sarry et al. (manuscript in preparation)



ESVV2022 12th International Congress For Veterinary Virology - September 20-23, 2022 - Ghent

For further information, come to my oral presentation, or email me at morgan.sarry@anses.fr



Annexe 4 : Poster Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES (JSDA) 2022 : « Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence? » Maisons-Alfort, France, 18-19 octobre 2022.



Anses scientific and doctoral days

18-19 October 2022



Interplay between Foot-and-Mouth Disease Virus 3D polymerase and the type I interferon response: a contribution to viral persistence?

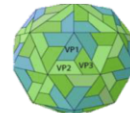
SARRY Morgan^{1,2}, BENFRID Souheyla¹, BERNELIN-COTTET Cindy¹, RELMY Anthony¹, ROMÉY Aurora¹, SALOMEZ Anne-Laure¹, CAIGNARD Gregory¹, ZIENTARA Stephan¹, VITOUR Damien¹, BAKKALI KASSIMI Labib¹ et BLAISE-BOISSEAU Sandra¹

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France.

² Ecole doctorale ABIES – AgroParisTech – 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

INTRODUCTION & OBJECTIVES

- **Foot-and-mouth disease (FMD)** is a highly contagious viral disease caused by a **Picornavirus** affecting artiodactyls.
 - One issue associated with FMD is the **persistence** of its etiological agent **Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV)**, which has been demonstrated in ruminants but not in pigs^{1,2}.
 - A **virus-host balance** establishment based on **protein-protein interactions (PPI)** is one possible explanation for FMDV persistence³.
- This study aims to identify PPI between FMDV and the type I interferon (IFN I) response and to determine their possible host specificity.



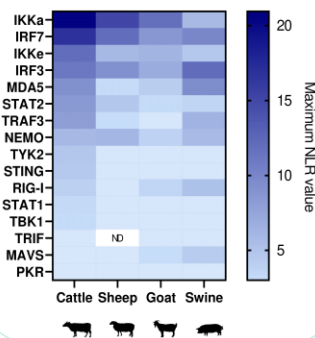
FMDV capsid

3D-IFN RESPONSE PPI

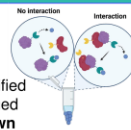


- **NanoLuc-2-Hybrid** screens revealed **new PPI** between **FMDV 3D polymerase** and **IFN I pathway** key proteins from 4 species⁴.
- PPI appear to be **conserved** between species but their relative importance differs.

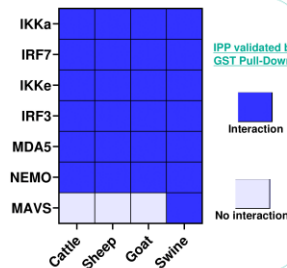
Comparison of the interactions between the 3D polymerase and 16 IFN I proteins from 4 targeted species⁵



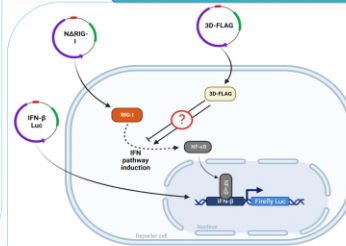
3D-IFN PPI CONFIRMATION



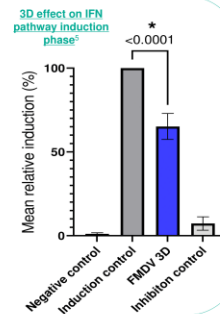
- Most of the identified PPI were confirmed by **GST Pull-Down assays**.
- **FMDV 3D** thus interacts with **7 IFN I pathway proteins**.
- 3D only interacts with **swine MAVS**.



3D IMPACT ON IFN RESPONSE



- **Luciferase reporter assays** showed an **inhibitory effect** of 3D on the IFN pathway induction phase.



TAKE HOME MESSAGE

- FMDV 3D interacts with proteins involved in the upstream production of IFN I.
- These interactions are characterised by a global inhibition of the induction phase of the IFN pathway.
- **This study thus revealed an unexpected role for the FMDV polymerase in the subversion of the IFN I response.**

¹ Stenfeldt & Arzt 2020 ; ² Stenfeldt *et al.* 2014 ; ³ Pfaff *et al.* 2019 ; ⁴ Choi *et al.* 2019 ; ⁵ Sarry *et al.* (manuscript in preparation)



Contact du projet : Morgan SARRY

Coordonnées complètes du contact : morgan.sarry@anses.fr

Partenaires du projet : AgroParisTech, Ecole doctorale ABIES



Annexe 5 : Poster Journées Francophones de Virologie (JFV) 2023 : « Développement d'un modèle de cellules primaires porcines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse. » Paris, France, 17-18 avril 2023



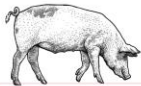
Développement d'un modèle de cellules primaires porcines pour la recherche et le diagnostic de la fièvre aphteuse.

P.045

Morgan Sarry^{1,2}, Cindy Bernelin-Cottet¹, Caroline Michaud¹, Anthony Relmy¹, Aurore Romey¹, Anne-Laure Salomez¹, Héliane Huet¹, Gregory Jouvion¹, Sara Hägglund³, Jean-François Valarcher⁴, Labib Bakkali Kassim¹ and Sandra Blaise-Boisseau¹

¹ UMR VIROLOGIE, INRAE, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France.
² Ecole doctorale ABIES – AgroParisTech – 16 Rue Claude Bernard, 75005 Paris, France
³ Unité d'Histologie et d'Anatomie pathologique, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700, Maisons-Alfort, France
⁴ Host Pathogen Interaction Group, Section of Ruminant Medicine, Department of Clinical Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SVA), Uppsala, Sweden

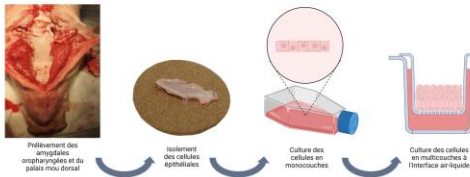
Correspondance : morgan.sarry@anses.fr



INTRODUCTION & OBJECTIF

- La fièvre aphteuse (FA) est une maladie virale contagieuse causée par un picornavirus du genre *Aphthovirus* et affectant les Artiodactyles sauvages et domestiques.
- Le virus de la FA est capable de persister (i.e. virus infectieux détecté après 28 jours post-infection (dpi)) plusieurs années dans l'épithélium pharyngé des ruminants après résolution des signes cliniques¹. Ce n'est pas le cas des porcs chez qui seuls des ARN viraux ont pu être détectés *in vivo* plus de 60 dpi dans les amygdales oropharyngées et le palais mou dorsal^{2,3}.
- Aucun modèle cellulaire porcine provenant d'un tissu d'intérêt, cible de l'infection par le virus de la FA, n'est aujourd'hui disponible.

➤ **Objectif :** Développer un modèle cellulaire spécifique permettant d'étudier l'infection par le virus de la FA chez le porc.

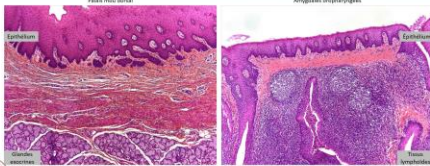


Méthodologie

- Les amygdales oropharyngées et le palais mou dorsal de jeunes porcs ont été prélevés.
- Les tissus épithéliaux ont été identifiés puis isolés ①.
- Les cellules épithéliales provenant des prélèvements de palais mou dorsal (DSP) ont été mises en culture en monocouche, caractérisées ② puis infectées par le FMDV ③.
- Ces cellules ont ensuite été cultivées en multicouche à l'interface air-liquide afin de recréer un épithélium pluristratifié, puis infectées par le FMDV ④.

① Caractérisation des structures épithéliales

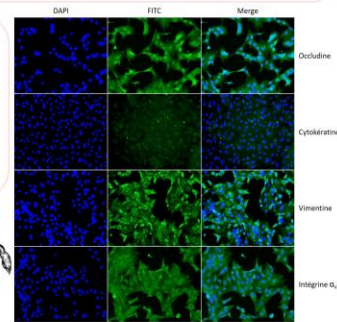
- Les prélèvements d'amygdales oropharyngées et de palais mou dorsal réalisés ont été caractérisés par marquage HES (Hémalaun-Eosine-Safran) afin de vérifier la présence d'épithéliums.
- Des structures épithéliales ont pu être identifiées à la fois dans les prélèvements d'amygdales oropharyngées et de DSP.



② Caractérisation des cellules DSP

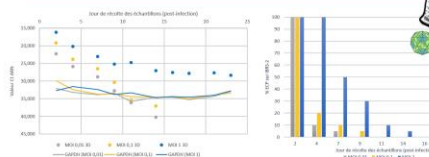
- Les cellules DSP ont été cultivées en monocouche, fixées puis marquées à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs épithéliaux (occludine, cytokeratine) et fibroblastiques (vimentine), ainsi qu'un anticorps dirigé contre le récepteur du virus de la FA (Intégrine $\alpha_2\beta_1$)

- Détection d'une expression importante d'occludine, signe d'une nature épithéliale.
- Détection d'une expression plus importante de vimentine que de cytokeratine, signe d'une transition épithélio-mésenchymateuse.
- Détection d'une expression importante du récepteur principal du virus de la FA.

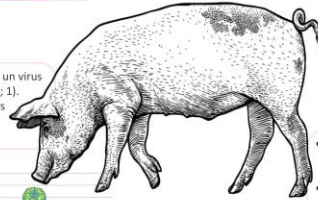


③ Infection des DSP en monocouche

- Les cellules DSP ont été cultivées en monocouche, puis infectées par un virus de la FA de sérotypage O à trois multiplicités d'infection (MOI 0,01 ; 0,1 ; 1).
- Les surnageants de culture ont été récoltés tous les deux ou trois jours jusqu'à 112 dpi, puis analysés à la recherche de virus infectieux, d'antigènes et d'ARN viraux.

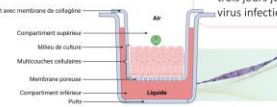


- La MOI 1 a été retenue comme la condition d'infection à privilégier pour ces cellules.
- Détection de virus infectieux par isolement viral jusqu'à 14 dpi dans les surnageants de culture.
- Détection d'antigènes viraux par immunofluorescence jusqu'à 16 dpi.
- Détection d'ARN viraux par RTqPCR jusqu'à 60dpi.

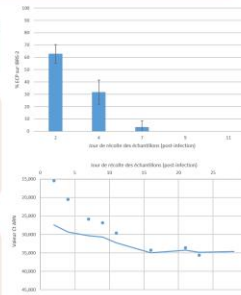


④ Infection des DSP en multicouche

- Les cellules DSP ont été cultivées en multicouche, sur membrane de collagène, à l'interface air-liquide, puis infectées par un virus de la FA de sérotypage O à la MOI 1.
- Les surnageants de culture ont été récoltés tous les deux ou trois jours jusqu'à 39 dpi, puis analysés à la recherche de virus infectieux, d'antigènes et d'ARN viraux.



- Détermination de l'épaisseur des multicouches par marquage HES.
- Détection de virus infectieux par isolement viral jusqu'à 7 dpi dans les surnageants de culture.
- Détection d'antigènes viraux par immunofluorescence jusqu'à 9 dpi.
- Détection d'ARN viraux par RTqPCR jusqu'à 23dpi.



Conclusion & perspectives

- Nous avons réussi à développer un modèle de cellules épithéliales issues du palais mou dorsal de porc, sensibles à l'infection par le virus de la FA.
- Un tel modèle n'a pas pu être développé à partir des cellules des amygdales oropharyngées qui n'ont pas survécu en culture.
- Conformément à ce qui a été observé *in vivo* chez le porc, aucun signe de persistance du virus de la FA n'a pu être détecté dans notre modèle cellulaire (aucun virus infectieux détecté après 28 dpi).

➤ Les cellules DSP porcines pourraient être immortalisées afin d'obtenir une lignée cellulaire adaptée à la recherche et au diagnostic du virus de la FA.
 ➤ Ces cellules pourraient constituer un outil de choix dans le diagnostic différentiel de la FA, sous réserve de sensibilité aux autres virus.

Références

1. Bakkali L, et al. The Center Question: A Review of Recent Advances and Potential Gaps Regarding the Current State of Foot-and-mouth Disease Virus. *Viruses* (Internet). 20 Nov 2022 [cited 27 sept 2023].
 2. Bakkali L, et al. Foot-and-mouth disease virus: A review of its epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Viruses* (Internet). 20 Nov 2022 [cited 27 sept 2023].
 3. Bakkali L, et al. Foot-and-mouth disease virus: A review of its epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Viruses* (Internet). 20 Nov 2022 [cited 27 sept 2023].

XXVèmes Journées Francophones de Virologie – Institut Pasteur de Paris – 17-18 avril 2023

AgroParisTech Talents d'avenir pluridisciplinaire

Ecole Doctorale ABIES



Merci à Benoit Lucelle et au PRBM pour la mise à disposition des porcs.

Annexe 7 : Oral Master 1 – Estelle Koulmann : « Détermination des domaines d'interaction minimums de la 3D^{pol} du FMDV O Mayenne Clone 2.2 par approche « fragmentome ». » Paris, France, 02 juin 2023



Détermination des domaines d'interaction minimums de la 3D^{pol} du FMDV O Mayenne Clone 2.2 par approche « fragmentome »



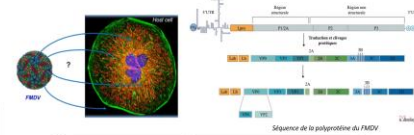
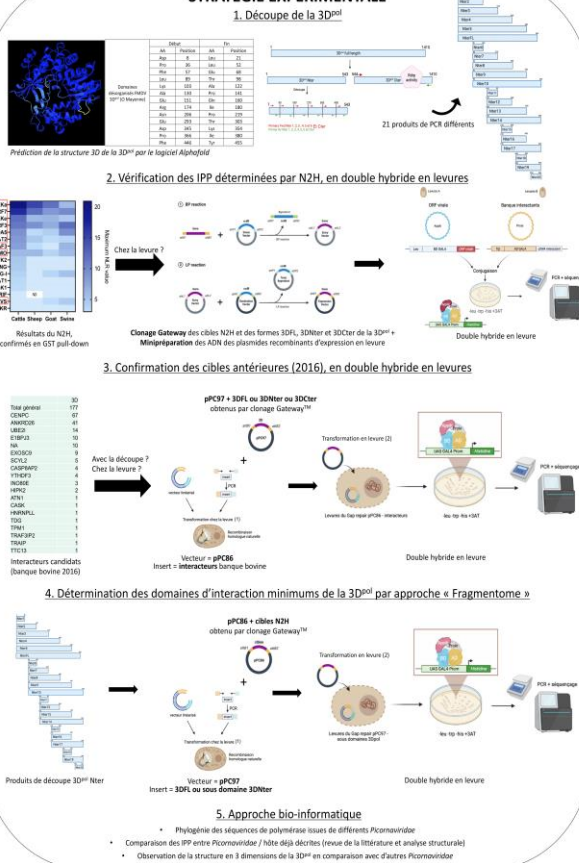
Estelle Koulmann^{1,2}, Morgan Sarry^{2,3}, Gregory Caignard², Damien Vitour², Labib Bakkali Kassimi² et Sandra Blaise-Boisseau²

¹ Stagiaire M1 Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Paris Cité, 5 rue Thomas More 75013 Paris, France
² UMRI Virologie, INRAE, Ecole Nationale Supérieure de l'Agrobiologie, ANSES Laboratoire de Santé Animale, Université Paris Est, 84700 Mazières-Matfroid, France
³ Ecole doctorale 8023 - Agrobiotech - 38 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

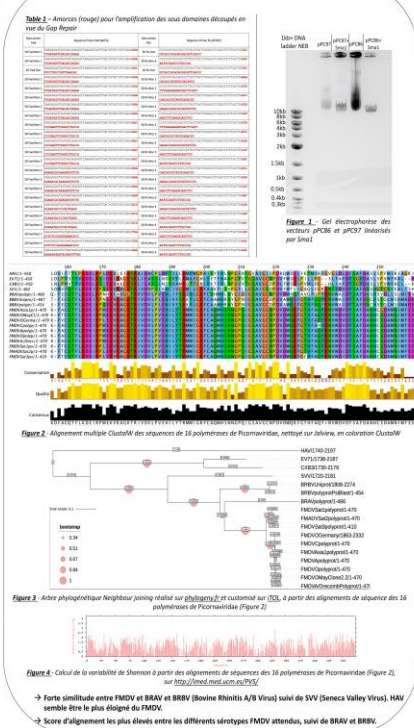
CONTEXTE & OBJECTIFS

- La fièvre aphteuse (FA) est une maladie virale très contagieuse causée par un Picornavirus, du genre *Aphthovirus* qui affecte les artiodactyles (principalement bovins, porcins, ovins et caprins). Son impact socio-économique est considérable en cas d'épizootie^{1,2,3}.
 - La persistance de l'agent étiologique de la FA (ou FMDV pour Foot-and-Mouth Disease Virus) concerne plus de 50% des ruminants et constitue un obstacle au contrôle de la maladie. Les mécanismes sous-jacents restent inconnus mais elle est associée à une coévolution virus-hôte. Par ailleurs, le laboratoire a participé à montrer dans un modèle *in vitro* bovin que l'infection persistante se caractérise par une réponse interféron (IFN) durable et diminuée donc inefficace pour la clairance virale^{4,5}.
 - Le génome ARN simple brin de polarité positive du FMDV code une polyprotéine contenant 4 protéines structurales (VP1, VP2, VP3 et VP4) et 11 protéines non structurales (Labpro, Lbpro, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B1, 3B2, 3B3, 3C et 3D^{pol})⁶.
 - Le FMDV, comme de nombreux virus, pirate la réponse immunitaire de l'hôte via des interactions protéines-protéines (IPP), ciblant notamment la voie IFN de type I. Ces IPP ont déjà été caractérisés en Nanoluc double hybride (N2H) et confirmés en GST pull-down chez 4 espèces sensibles (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa* et *Capra hircus*) dans le cadre du projet de thèse PerSifa : IKKa, IKKe, IRF3, IRF7, MDAS, NEMO, MAVS, TRAF3, STING, TYK2, TRIF, STAT1, STAT2, TBK1, PKR et RIG-I⁷. La 3D^{pol} est capable d'inhiber en partie la réponse IFN de type I.
- En partant des IPP identifiées entre 7 de ces protéines cellulaires (IKKa, IKKe, IRF3, IRF7, MDAS, NEMO et MAVS) et la polymérase (3D^{pol}) du FMDV, nous nous proposons de cartographier les domaines minimums impliqués dans ces IPP. Pour ce faire, nous avons découpé de façon progressive la partie Nter de la 3D^{pol} afin de pouvoir tester les capacités d'interaction des sous-domaines ainsi obtenus avec les 7 protéines cellulaires d'intérêt (bovines pour commencer).

STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE



RÉSULTATS



CONCLUSION & PERSPECTIVES

La première étape de ce projet sera la vérification en double hybride en levure des IPP déterminés par N2H et confirmées par chromatographie d'affinité GST pull-down. Il est cependant possible qu'un encombrement stérique au niveau du promoteur GAL4 ou des changements conformationnels dus à l'ajout des domaines AD ou BD aux partenaires protéiques puissent empêcher l'interaction en levure. Ces 7 interacteurs n'avaient pas été identifiés en 2016 en criblant la banque bovine, vraisemblablement car la voie IFN des cellules à l'origine de la banque de cDNA n'était pas activée. Pour cette étape-ci de confirmation en double hybride en levure, ces interacteurs seront surexprimés, ce qui augmentera les chances de retrouver les IPP. En parallèle, nous testerons le découpage Nter/Cter de la 3D^{pol} en restant des interactions précédemment identifiées en levure. Ces 2 premières étapes serviront de base pour envisager la troisième étape de fragmentome proprement dit. Enfin, si nous confirmons ces IPP entre 3D^{pol} et ses partenaires cellulaires bovins, il serait intéressant de passer ensuite aux protéines homologues des autres espèces sensibles d'intérêt. L'ensemble de ces travaux permettrait de mieux comprendre la modulation de la réponse innée par la 3D^{pol} du virus de la fièvre aphteuse et peut-être à terme, de mieux comprendre la persistance du FMDV.

¹ Boshuizen, G. et al. The Netherlands, 6 Nov. 2003. <https://www.researchgate.net/publication/238888888>
² Pongratz, A., et al. *Journal of Virology*, 2005. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7500-7508.2005>
³ Sarry, M., et al. *Journal of Virology*, 2018. <https://doi.org/10.1128/JVI.01111-18>
⁴ Sarry, M., et al. *Journal of Virology*, 2018. <https://doi.org/10.1128/JVI.01111-18>
⁵ Sarry, M., et al. *Journal of Virology*, 2018. <https://doi.org/10.1128/JVI.01111-18>
⁶ FMDV: Foot-and-mouth disease virus. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbiinfo/taxonomy/taxids/info?term=Foot-and-mouth+disease+virus&from_uid=10239
⁷ Sarry, M., et al. *Journal of Virology*, 2018. <https://doi.org/10.1128/JVI.01111-18>

Title : Foot-and-mouth disease virus persistence and innate antiviral response: study of virus/host molecular interactions using an "interferactomic" approach in four target species (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus* and *Sus scrofa*).

Keywords : Foot-and-Mouth Disease, Foot-and-Mouth Disease Virus persistence, Type I interferon pathway, Protein-protein interaction, Cell model

Abstract :

Foot-and-Mouth Disease (FMD) is a highly contagious viral animal disease affecting wild and domestic artiodactyls. More than five hundred years after it was first described, FMD remains a major threat to animal health. Following FMDV (Foot-and-Mouth Disease Virus) infection, more than 50% of ruminants become persistently infected. Interestingly, no signs of persistence have been identified in swine. Although decades have been spent studying the persistence of FMDV, the mechanisms underlying its establishment, maintenance and resolution remain to be elucidated. However, some insights have already been uncovered. A FMDV-host co-evolution has been demonstrated, as well as the immunomodulatory effect of the virus. Using a model of primary bovine cells derived from the dorsal soft palate, the main site of primary replication and persistence of the virus in vivo, it has been possible to characterise the transcriptional responses of the host during FMDV infection. It was shown that acute infection is characterised by the induction of a significant antiviral response, while persistent infection is associated with a long-lasting but diminished innate immune response that is ineffective in eliminating the virus. Like many viruses, FMDV has developed strategies for escaping the innate response, mainly by targeting type I interferons (IFN). Taken together, these data suggest that a balance is established between the virus presence and the host's response, through the establishment of protein-protein interactions during persistent infection.

Since the antagonisms described between FMDV proteins and type I IFN pathway proteins have been reported in cell systems from different species, often with little relevance with regard to the virus pathophysiology, the main purpose of this thesis project was to identify interactions between FMDV and the type I IFN pathway and to determine their possible host specificity. The interactions established between FMDV serotype O proteins and sixteen type I IFN pathway proteins involved in more than 75% of virus-host interactions, from three species in which the virus persists (*Bos taurus*, *Ovis aries* and *Capra hircus*) and one species in which it does not (*Sus scrofa*), were identified using an "interferactomic" approach. Seven new viral antagonisms involving the 3D polymerase, whose role in subverting the antiviral response is poorly documented, were identified. Six of these were identified as being conserved within the four species studied, while the interaction between the 3D polymerase and MAVS was only observed for the porcine form of this cellular protein.

This thesis work also enabled the development of primary porcine and ovine cell models adapted to the study of FMDV by analogy with that developed with primary bovine cells. The short- and long-term infection of these models by FMDV was characterised and compared with the in vivo observations presented in the literature. Ultimately, these models could provide an alternative to the cell lines currently used, which are not derived from tissues of interest. These models are also tools for studying host responses to FMDV infection and are intended to validate the protein interactions identified during this thesis in an infectious context. To this end, the reactivity of antibodies targeting type I IFN pathway proteins was tested against proteins from the four target species. The two references that were validated were then used to highlight the interactions between the IKK ϵ and NEMO proteins and the FMDV 3D polymerase.

Titre : Persistance du virus de la fièvre aphteuse et réponse antivirale innée : étude des interactions moléculaires virus/hôte par approche « interféromique » chez quatre espèces cibles (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus* et *Sus scrofa*)

Mots-clés : Fièvre aphteuse, *Persistance du virus de la fièvre aphteuse*, Voie interféron de type I, Interactions protéine-protéine, Modèles cellulaires

Résumé :

La fièvre aphteuse (FA) est une maladie animale virale hautement contagieuse affectant les artiodactyles domestiques et sauvages. Plus de cinq cents ans après sa première description, la FA demeure une menace majeure en santé animale. Suite à l'infection par le FMDV (*Foot-and-Mouth Disease Virus*), plus de 50% des ruminants deviennent infectés de manière persistante. De manière intéressante, aucun signe de persistance n'a été identifié chez le porc. Malgré des décennies consacrées à l'étude de la persistance du FMDV, les mécanismes inhérents à son établissement, son maintien et sa résolution restent à élucider. Des éléments de réponses ont toutefois déjà pu être apportés. Une coévolution entre le FMDV et son hôte a ainsi été démontrée, tout comme l'effet immunomodulateur du virus. L'utilisation d'un modèle de cellules primaires bovines, issues du palais mou dorsal, principal site de réplication primaire et de persistance du virus *in vivo*, a permis de caractériser les réponses transcriptionnelles de l'hôte lors de l'infection par le FMDV. Il a ainsi été montré que l'infection aiguë se caractérise par l'induction d'une réponse antivirale importante, tandis que l'infection persistante est associée à une réponse immunitaire innée durable mais diminuée et inefficace pour éliminer le virus. Comme de nombreux virus, le FMDV a développé des stratégies d'échappement à la réponse innée, en ciblant principalement les interférons (IFN) de type I. L'ensemble de ces données constitue ainsi un faisceau de présomptions concernant la mise en place d'un équilibre, entre présence du virus et réponse de l'hôte, *via* l'établissement d'interactions protéiques au cours de l'infection persistante.

Les antagonismes décrits entre les protéines du FMDV et les protéines de la voie IFN de type I ayant été rapportés dans des systèmes cellulaires issus de différentes espèces, souvent peu pertinents au regard de la physiopathologie du virus, l'objectif majeur de ce projet de thèse a été de mettre en évidence des interactions entre le FMDV et la voie IFN de type I et de déterminer leur éventuelle spécificité d'hôte. Les interactions établies entre les protéines du FMDV de sérotype O et seize protéines de la voie IFN de type I impliquées dans plus de 75% des interactions virus-hôte, provenant de trois espèces chez qui le virus persiste (*Bos taurus*, *Ovis aries* et *Capra hircus*) et d'une espèce chez qui le virus ne persiste pas (*Sus scrofa*) ont ainsi été mises en évidence par approche « interféromique ». Sept nouveaux antagonismes viraux impliquant la polymérase 3D, dont le rôle dans la subversion de la réponse antivirale est peu documenté, ont pu être identifiés. Parmi eux, six ont été identifiés comme conservés au sein des quatre espèces d'étude, tandis que l'interaction entre la polymérase 3D et MAVS n'a été observée que pour la forme porcine de cette protéine cellulaire.

Ces travaux de thèse ont également permis le développement de modèles de cellules primaires porcines et ovines adaptés à l'étude du FMDV par analogie avec celui développé avec des cellules primaires bovines. L'infection de ces modèles à court et long terme par le FMDV a été caractérisée et comparée aux observations *in vivo* présentées dans la littérature. A terme, ces modèles pourraient constituer une alternative aux lignées cellulaires actuellement utilisées et ne provenant pas de tissus d'intérêt. Ces modèles constituent également des outils permettant l'étude des réponses de l'hôte lors de l'infection par le FMDV et ont pour vocation de permettre la validation des interactions protéiques mises en évidence au cours de cette thèse, en contexte infectieux. Dans cette optique, la réactivité d'anticorps ciblant les protéines de la voie IFN de type I a été testée face aux protéines issues des quatre espèces d'étude. Les deux références ayant été validées ont ensuite été utilisées en vue de mettre en évidence les interactions entre les protéines IKK ϵ , NEMO et la polymérase 3D du FMDV.