

# Interactions virus myxomateux-cellules hôtes: application à la vaccination chez les ruminant

Béatrice Pignolet

## ▶ To cite this version:

Béatrice Pignolet. Interactions virus myxomateux-cellules hôtes : application à la vaccination chez les ruminant. Sciences du Vivant [q-bio]. Paul Sabatier Université Toulouse III - Paul Sabatier (UPS), 2007. Français. NNT : 2007TOU30275 . tel-04713396

# HAL Id: tel-04713396 https://hal.science/tel-04713396v1

Submitted on 29 Sep 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.

## **UNIVERSITÉ TOULOUSE III - PAUL SABATIER**

#### UMR 1225 IHAP

#### Institut National de la Recherche Agronomique/Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

23, chemin des Capelles-BP 87614- 31076 Toulouse Cedex 3

#### **THESE**

En vue de l'obtention du

# DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE Délivré par l'Université Toulouse III-Paul Sabatier

Discipline : Microbiologie

présentée et soutenue

par Béatrice, Sylvie, Laurence PIGNOLET le 19 décembre 2007

# Interactions virus myxomateux-cellules hôtes: application à la vaccination chez les ruminants

#### <u>JURY</u>

M. Maxence DELVERDIER	Professeur à l'ENV de Toulouse, directeur de Thèse
M. Stéphane BERTAGNOLI	Maître de Conférence à l'ENVT, co-directeur de Thèse
M. Robert DRILLIEN	Directeur de Recherches à l'INSERM, rapporteur
M. Jean-Marc BALLOUL	Chef de département à Transgène, rapporteur
M. Christophe PASQUIER	Professeur à l'UPS de Toulouse, examinateur
M. Max BERGOIN	Professeur à l'Université Montpellier II, examinateur

A notre jury de thèse qui nous a fait l'honneur de juger ce travail, hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Stéphane Bertagnoli, « CHEF ! », merci beaucoup pour tout !!!

A Monsieur le **Professeur Maxence Delverdier** qui a accepté de pendre le relais dans l'encadrement de cette thèse, mes remerciements

A Monsieur le **Professeur Robert Drillien** pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse chez les « poxvirologistes toulousains » pour la nième fois, mes plus sincères et respectueux remerciements.

A Monsieur le **Docteur Jean-Marc Balloul** pour avoir accepté d'être rapporteur, mes très sincères remerciements.

A Monsieur le **Professeur Max Bergoin** pour avoir accepté de participer à notre jury de thèse, mes respectueux remerciements.

A Monsieur le **Professeur Christophe Pasquier**, qui nous a fait l'honneur d'être présent dans ce jury de thèse. Je pense que le virus de la myxomatose n'a plus de secret pour vous !!! Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude renouvelée.

Cette thèse a été cofinancée par l'**INRA** et l'**AFSSA**. Je tiens donc à remercier l'**AFSSA** et plus particulièrement **Stéfan Zientara** et **Emmanuel Bréard**, ainsi que toute l'équipe de l'animalerie A3 de Sophia Antipolis.

Merci à toute l'équipe d'Emmanuel Albina, Aurélie Pérrin, Catherine Cêtre-Sossah...du CIRAD de Montpellier. Un très grand merci

A toute l'équipe de l'IHVV : «Chef » bien sûr, merci de m'avoir fait confiance, Gillou, Jacky, Jean-Luc, Romain, Christelle, les 2 Martines, Brigitte, Josy, Robert, Sylvie, Isabelle, Aurélie, Madame Coste. Bien sûr un grand merci à tous les stagiaires et plus particulièrement à ceux que j'ai encadré (Bochra, Kunta), les thèsardes véto (Marjo et Agathe).

Un grand merci à tous les étudiants de l'IHVV: Soph, Magalou, Kunta, Sébastien, Aude, Sylvain, Béryl, ....

Merci à « l'Imm Team » et plus particulièrement au Grand Gilles et à Eliane qui m'ont fait découvrir l'univers merveilleux des cellules dendritiques. J'espère que notre collaboration aura été fructueuse !!!! Merci à Séverine, Christian et Cécile.

Merci à l'équipe Coli, avec une spéciale dédicace à Jean-Phi et à Ascel. Je n'oublie pas Maria et Xavier.

Merci à Laurence, Michelle et Marie.

Merci à l'équipe de microscopie électronique de Rangueil et tout particulièrement à Jean-Luc.

## A Frédérique Messud

Je ne sais pas par où commencer... Les années passent, mais ton souvenir reste à jamais gravé dans le laboratoire et dans le cœur de ceux qui t'aiment et qui t'ont côtoyé. Je tiens à te dédier cette thèse. A tous mes amis, anciens et nouveaux,

Sandra, parce que même à l'autre bout du monde je sais qu'on sera toujours là

Soph, merci pour tout

Elise, P'tite Stèph

A tous mes coloc', et ils sont nombreux: dans l'ordre chronologique: Olive (3 fois et oui, c'est mon frère !!), Yann, Sylvain, Elisa, Nico, Soph, P'ti Sylvain, Nico (pas le même), Sophie.

#### Merci à Jérôme

Merci aux CPV bien sûr: Nicoco, Dodo, Piote, Petio, Soph. Les années passent et nous prouvent que même à l'autre bout du monde, on ne se perdra jamais de vue !!!! Merci au « poulailler »: Soph, Magalou, Kunta !!!

A Yom, Patou, Lolotte, Yan, P'tit Sylvain, Nico, Sophie, Simon, Elé, Toph, Brice, Pascale, Coco, Seb, Erwan, Sarah, Isa, Yan, Isa....

Spéciale dédicace aux Airbusséens: Gérald, Ben, Benji, JD, Florent.

Cette thèse est aussi dédiée

A Fabien

A toute ma famille, en particulier à mon grand-père, je sais que tu aurais aimé être à mes côtés. J'espère qu'où que tu sois tu es fier de moi...

A mes parents

A mes frères, Olivier et Christophe

## Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
APC	Antigen Presenting Cell ou cellule présentatrice d'antigène
ARN	Acide RiboNucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNm	ARN messager
ATP	Adénosine TriPhosphate
<b>BM-DC</b>	Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse
BT	Bluetongue
BTV	Bluetongue Virus ou virus de la Bluetongue
CEV	Cell-associated Enveloped Virus ou virus enveloppé associé à la cellule
СМН	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DC	Dendritic Cell ou Cellule Dendritique
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
EEV	Extracellular Enveloped Virus ou virus enveloppé extracellulaire
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidemal Growth Factor
eIF	eukaryotic initiation factor ou facteur d'initiation eucaryote
FCO	Fièvre catharrale ovine
GFP	Green Florescent Protein
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HIV	Human Immunodeficiency Virus ou virus de l'immunodeficience humaine
IEV	Intracellular Enveloped Virus ou virus enveloppé intracellulaire
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMV	Intracellular Mature Virus ou virus mature intracellulaire
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
kDa	kilo Dalton
kpb	Kilo Paire de bases
LB	Lymphocyte B
LC	Langerhans Cell ou cellule de Langerhans
LT	Lymphocyte T
LPS	Lipopolysaccharide
MGF	Myxoma Growth Factor ou facteur de croissance du MYXV
MNF	Myxoma Nuclear factor
Mo-DC	Monocyte-derived DC ou DC dérivées de monocytes
MOI	Muliplicity Of Infection ou multiplicité d'infection
MTS	Mitochodrial Target Signal ou signal de localisation mitochondriale
MVA	Modified Vaccinia virus strain Ankara
MYXV	MYXoma Virus ou virus de la myxomatose
NK	cellule Natural Killer
nm	nanomètre
2'5' oligo A	2'5' oligoadénylate
2'5' OS	2'5' oligoadénylate synthetase
ORF	Open Reading Frame ou cadre de lecture ouvert

РВМС	Peripheral Blood Mononuclear Cell ou cellule mononucléé du sang
PRS	Phosphate-Buffered Saline
nDC	plasmitoïd DC ou cellule dendritique plasmitoïde
PCR	Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
PFA	naraformaldéhyde
PFU	Plage Formant Unité
PKR	Protein Kinase dépendante de l'ARN double brin
PMA/Iono	Phorbol Myristate Acetate/Ionomycine
RE	Réticumum Endonlasmique
RHDV	Rabbit Hemoragic Disease Virus ou virus de la maladie hémorragique du lapin
RING	Really Interesting New Gene
RIT	Région Inversée Terminale
RK13	Rabbit Kidney cells ou cellules de rein de lapin
RL5	Rabbit Lymphocyte ou lymphocyte de lapin (lignée cellulaire)
RNase 1	Ribonuclease L
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMIc	RPMI complet
RT	Reverse Transcription
SFGF	Shope Fibroma Growth Factor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	Sérum de Veau Foetal
TCR	T-cell receptor
ТК	Thymidine Kinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Récepteur du TNF
VACV	Vaccinia Virus ou virus de la vaccine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VGF	Vaccinia virus Growth Factor

# Table des illustrations

# Liste des Figures

Figure 1 : Observation du MYXV en microscopie électronique à transmission
Figure 2: Représentation schématique des poxvirus (sauf <i>Parapoxvirus</i> )p6
Figure 3: Représentation schématique du génome des <i>Poxviridae</i> (modèle: VACV)p6
Figure 4: Représentation schématique de l'organisation génomique du MYXVp8
Figure 5: Le cycle de réplication des poxvirusp10
Figure 6: Pathogénie du MYXV chez le lapin européenp18
Figure 7: Myxomatose classique chez le lapin européen
Figure 8: Mécanisme d'échappement du MYXV à l'apoptosep29
Figure 9: Mécanisme d'inhibition des voies de l'IFNy par le MYXV et le
VACV
Figure 10: Contrôle de la voie de l'IFN de type I et de l'état anti-viral induit par l'ARNdb
par le MYXV et le VACVp37
Figure 11: Méthode de construction de poxvirus recombinésp44
Figure 12: Structure du virus de la Bluetongue
Figure 13: Contrôle de l'expression et de la production d'ARNm des virus SG33
recombinantsp102
Figure 14: Protocole expérimental de vaccination contre une épreuve virulente
Bluetonguep104
Figure 15: Suivi clinique des moutons lors de l'essai de vaccination protectionp106
Figure 16: Localisation de la protéine GFP-M022L p144
Figure 17: M022L possède un site PLD-Like impliqué dans le trafic intracellulaire de la
protéinep14
<b>Figure 18:</b> Infection de cellules RK13 par le virus recombinant T1-GFP-M022Lp149
Figure 19: Détection de la GFP par le sérum du lapin 40541 prélevé à J30 post-
infectionp150
Figure 20: Détection de la protéine M2 par les sérums de lapins
Figure 21: Détection de la protéine M2 par les sérums de sourisp154

Figure 22: Réponse cellulaire contre un antigène témoin, la GFP, chez le r	nouton inoculé
avec le virus T1-Ngfp-M022L	p155
Figure 23: Construction du plasmide de transfert utilisé pour l'obtention du v	irus recombiné
T1-Ngfp-M022L	p180
Figure 24: Construction du plasmide de transfert pour l'obtention du virus	recombiné T1-
M2-M022L	p181

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification des Chordopoxvirinae
<b>Tableau 2 :</b> Les membres du genre <i>Leporipoxvirus</i> et les pathologies associées
<b>Tableau 3 :</b> Séquences consensus des différents promoteurs des gènes de la vaccinep14
Tableau 4: Exemples de spécificité in vitro et spectre d'hôte in vivo de certains
poxvirusp24
Tableau 5: Liste des amorces utilisées pour construire les plasmides de transfert pNS1,
pNS2, pNS3, pVP2 et pVP7p172
<b>Tableau 6:</b> Description du système de « scoring »p176
<b>Tableau 7:</b> Liste des amorces utilisées pour les fusions à M022Lp179

# Table des matières

# Introduction bibliographique...1

A. Les poxvirus: généralités1
<b>1. Classification</b>
2. Structure des poxvirus
-a- La structure des virions1
-b- Le génome viral7
-c- Le virus de la myxomatose9
3. Cycle réplicatif
-a- L'entrée du virus dans la cellule11
-b- L'expression des gènes viraux et sa régulation12
-c- Expression des gènes précoces13
-d- Réplication du génome viral15
-e- Expression des gènes intermédiaires et tardifs16
-f- L'assemblage et la maturation des virions16
B. la myxomatose: généralités19
<b>1. Pathogénie du MYXV chez le lapin européen</b> 19
2. Réponse immunitaire contre l'infection par le MYXV
C. Interactions poxvirus/hôtes23
1. Tropisme cellulaire
-a- Liaison et pénétration dans la cellule cible25
-b- Contrôle du cycle cellulaire25
-c- Contrôle de l'apoptose26

Apoptose induite par des signaux exte	ernes : voie extrinsèque ou des
récepteurs de mort	
Contournement de l'apoptose par le M	<b>IYXV</b> 27
MT-2	
МТ-4	
MT-5	
M11L	
Serp2	
M143R	
-d- Facteurs d'hôte	
-e- Inhibition de la voie IFN et de l'état anti-viral	
Synthèse des IFN	
Mode d'action des IFN	
Exemples d'inhibiteurs poxviraux	
MT-7	
M029L/E3L	
M156R/K3L/C8L	
Contournement des réponses immunitaires de l'hôte par	le MYXV
-a- Inhibition de la presentation par les	molecules du complexe majeur
d'histocompatibilité (CMH)	
СМН-1	
	40
-b- Modulation de l'inflammation	41
M13L	41
M141R	41
<b>W1128L</b>	41
MANE	
MNF	

<b>1. Méthodes générales de production, avantages et limites d'emploi</b>
-a- Méthodes de production45
-b- Avantages46
-c- Limites46
2. Sites d'insertion d'ADN étranger
-a- Insertion intergénique47
-b- Insertion dans un gène ou un locus non essentiel47
La thymidine kinase (TK)48
Le locus MGF/M11L48
-c- Insertion dans un site essentiel49
-d- Fusion avec une protéine virale49
<b>3. Exemples de vecteurs poxviraux</b> 50
-a- Virus de la vaccine et dérivés50
-b- Avipoxvirus
-c- Capripox virus
-d- Le virus de la myxomatose52

# Résultats... 53

A. Interactions MYXV-ruminants	55
1. Introduction	55
2. Résultats	55
-a- Tropisme chez les bovins	55
Article #1	57
-b- Etude chez les ovins	59
Article #2	61
3. Discussion	96

B. Application à la vaccination contre la fièvre catarrhale ovine	99
1 Introduction	00
1. Introduction	
2. Construction des virus recombinés	101
-a- Construction des plasmides de transfert	101
-b- Obtention et analyse des virus recombinés	101
-c- Contrôle de l'expression des protéines d'intérêt	101
3. Test de protection contre la Bluetongue souche Corse BTV-2	103
-a- Protocole de vaccination	103
-b- Suivi clinique des animaux	103
Suivi de la température	
« Scoring » clinique	105
-c- Test sérologique : réponse contre les protéines VP7, NS1 et NS3	107
4. Discussion	107
C. Interactions entre le MYXV et les cellules dendritiques ovines	110
1. Introduction	110
2. Résultats	111
Article #3	113
3. Discussion	141
D. Amélioration du vecteur MYXV	143
1. Introduction	143

-a- M022L possède certains caractères originaux par rapport à son homologue F13L145
-b- Etude in vivo des virus T1-N-gfp-M022L et T1-M2e-M022L151
Suivi clinique151
Le MYXV recombiné induit des anticorps contre le produit du transgène.151
Chez l'espèce cible151
Chez une espèce non-cible153
Le virus T1-N-gfp-M022L induit une réponse cellulaire contre le produit du
transgène chez les ovins153
<b>3. Conclusion</b>

# Discussion générale et perspectives...157

Annexes...169

# Références bibliographiques...186

## Introduction bibliographique

## A. Les poxvirus : généralités

#### 1. Classification

La famille des *Poxviridae* est divisée en deux sous-familles dont les membres infectent soit les vertébrés pour la sous-famille des *Chordopoxvirinae* soit les invertébrés pour les *Entomopoxvirinae*.

La sous-famille des *Chordopoxvirinae* est elle-même subdivisée en 8 genres (**Tableau 1**) (Van Regenmortel et al., 2000). Le prototype de cette famille est le virus de la vaccine (VACV). Il représente le genre des *Orthopoxvirus*. Il a été utilisé comme vaccin contre la variole, maladie humaine due à un autre *Orthopoxvirus*, jusqu'à son éradication en 1980 (Kempe, 1960).

Le virus myxomateux (MYXV) quant à lui, appartient au genre *Leporipoxvirus*. Il est l'agent étiologique d'une maladie, la myxomatose, souvent fatale pour le lapin européen *Oryctolagus cuniculus*, chez qui il occasionne la formation de lésions cutanées, appelées myxomes, associées à une grave immunodépression. Le MYXV a été utilisé avec un certain succès contre la multiplication jusque là incontrôlée du lapin européen en Australie. Il s'agit là du seul exemple de lutte biologique organisée contre une espèce animale « nuisible ». L'ensemble des membres du genre *Leporipoxvirus*, leurs hôtes respectifs et les maladies associées sont rassemblés dans le **Tableau 2**.

#### 2. Structure des poxvirus

-a- la structure des virions

Les poxvirus font partie des plus gros virus animaux connus. Les virions sont de forme ovoïde et mesurent environ 400x300x200 nm (Murphy et al., 1999).

Genre	Espèce type	Principales autres espèces
Orthopoxvirus	Virus de la vaccine	Mousepox (ectromélie) Cowpox virus Virus de la variole du chameau Virus de la variole du singe Virus de la variole humaine Raccoonpox virus Taterapox virus Volepox virus
Parapoxvirus	Orf virus	Virus de la stomatite papuleuse des bovins Pseudocowpox virus Squirrel parapoxvirus Parapoxvirus of red deer in New Zealand
Avipoxvirus	Virus de la variole aviaire	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille + virus spécifiques de plusieurs espèces d'oiseaux
Capripoxvirus	Virus de la clavelée	Virus de la variole caprine Lumpy skin disease virus
Leporipoxvirus	Virus de la myxomatose	Virus du fibrome de Shope Virus du fibrome malin du lapin Virus du fibrome du lièvre Virus du fibrome de l'écureuil
Suipoxvirus	Virus de la variole porcine	
Molluscipoxvirus	Virus du Molluscum contagiosum	
Yatapoxvirus	Tanapox virus de l'homme	Virus Yaba de la tumeur du singe
ND	Crocodilpox virus	

Tableau 1 : Classification of	des	Chordopoxvirinae.	D'après	Van	Regenmortel	et	al.,
2000. ND = non déterminé.							

Virus	Pathologie chez l'hôte naturel	Pathologie chez Oryctolagus cuniculus			
Virus de la myxomatose	<i>Sylvilagus</i> sp : myxome bénin localisé	Myxomatose généralisée et immunodépression			
Virus du fibrome de Shope	<i>Sylvilagus floridanus</i> : fibrome bénin localisé	Fibrome bénin localisé, généralisation chez les nouveaux-nés			
Virus du fibrome malin du lapin	ND	Nodules dermiques, immunodépression généralisée			
Virus du fibrome de l'écureuil	Sciurus sp : fibromes multiples	Non sensible			
Virus du fibrome du lièvre	<i>Lepus</i> sp : fibromes cutanés localisés	Fibromes bénins localisés			

Tableau 2: Les membres du genre Leporipoxvirus et les pathologiesassociées. ND = non déterminé. (Fenner & Woodroofe, 1965; Woodroofe & Fenner, 1965)

Plus précisément, les leporipoxvirus mesurent 300x250x200 nm (Van Regenmortel et al., 2000; Fauquet, 2005) (**Figure 1**).

Le virion est constitué du core, et d'un nombre variable de membranes et d'enveloppes (**Figure 2**) (Vilagines, 1985). Des structures supplémentaires situées dans les concavités du core ont aussi été décrites et sont appelées les « corps latéraux » (Moss, 1992, Vilagines, 1985).

Pour certains auteurs, il ne s'agirait que d'artéfacts de microscopie électronique (Dubochet et al., 1994), bien que d'autres réfutent cette théorie (Griffiths et al., 2001). Des analyses en cryomicroscopie ont montré qu'ils avaient une réalité physique (Cyrklaff et al., 2005).

La nature et le nombre d'enveloppes permettent de distinguer trois formes distinctes de virions: les IMV (virions intracellulaires matures), les IEV (virions intracellulaires enveloppés) et les EEV (virions extracellulaires enveloppés)/CEV (virions enveloppés associés à la cellule).

Les IMV sont formés dans le cytoplasme. On leur attribue classiquement une seule membrane ce qui a été confirmé par des observations en microscopie électronique. Les IMV représentent la très grande majorité de la progénie virale et sont libérés lors de la lyse de la cellule hôte (Moss, 2001). Cette forme est la plus résistante et serait adaptée au passage du virus d'un hôte à l'autre (Moss, 2001).

Au cours du cycle viral, une petite partie des IMV acquiert une double enveloppe supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi (Smelzt et al., 1994) ou des endosomes (Tooze et al., 1993) constituant les formes virales IEV. Les IEV migrent à la surface cellulaire grâce aux microtubules du cytosquelette (Hollinshead et al., 2001; Rietdorf et al., 2001) et fusionnent avec la membrane cellulaire. Ils perdent ainsi leur enveloppe la plus externe et libèrent des EEV dans le milieu extracellulaire. Une partie des virions, les CEV, est retenue à la surface cellulaire.





<u>100 nm</u>

1<u>00 nm</u>

MYXV intracellulaire en microscopie

MYXV purifié sur gradient de saccharose et coloré à l'acide phosphotungstique

Figure 1 : Observation du MYXV en microscopie électronique à transmission.



Figure 2: Représentation schématique des poxvirus (sauf *Parapoxvirus*). (d'après Van Regenmortel et al., 2000).



Figure 3. Représentation schématique du génome des *Poxviridae* (modèle : VACV). RIT : Répétitions inversées terminales (Fenner et al., 1989).

Les EEV et les CEV sont indiscernables d'après leur structure physique. Ils contiennent une membrane de plus que les IMV (et une de moins que les IEV) (Smith et al., 2002). Ils ne représentent qu'une faible proportion de la progénie virale (entre 1% à 30% selon les souches et les systèmes cellulaires). Leur enveloppe supplémentaire leur confère des propriétés particulières en terme de reconnaissance des cellules cibles et de protection contre les effecteurs du système immunitaire (Vanderplasschen et al., 1998b). Les CEV assurent l'infection des cellules de proche en proche grâce à des projections cellulaires d'actine qui se forment à la jonction virus-cellule pour les propulser vers les cellules voisines. Les EEV quant à eux, permettent une dissémination virale sur de plus longues distances à la fois en culture cellulaire et chez l'hôte (Smith et al., 2002). De plus, il a été montré leur rôle important dans la virulence.

-b- le génome viral :

Le core abrite le génome viral. Celui-ci est constitué d'une molécule unique d'ADN linéaire double brin dont les extrémités sont constituées de boucles covalentes en épingle à cheveux (**Figure 3**) (Van Regenmortel et al., 2000; Fauquet, 2005). La taille de l'ADN varie de 130 à 375 kpb dans l'ensemble de la famille (Moss, 2001).

L'organisation générale du génome est commune à tous les *Poxviridae* (Figure 3). On distingue ainsi une région centrale, très conservée au sein d'un même genre, avec plus particulièrement 90 gènes retrouvés dans tous les genres (Gubser et al., 2004). Cette région contient les gènes essentiels à la réplication du virus. Elle est encadrée par deux régions terminales répétées inversées (RIT) de 10 à 15 kbp, codant essentiellement des facteurs de pathogénicité (Moss, 2001) (Figure 3).

La plupart des génomes de poxvirus a été séquencée et leur séquence complète est disponible sur le site internet suivant: <u>http://www.poxvirus.org</u>



### Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation génomique du MYXV.

Les rectangles en dessous de l'axe représentent les gènes transcrits vers la gauche. Les rectangles au dessus de la ligne bleue représentent les gènes transcrits vers la droite.

-c- le virus de la myxomatose:

Le MYXV mesure 300x250x200 nm. La taille de son génome est de 161773 pb. Sa structure génomique a été d'abord étudiée par Russell et Robbins, au travers d'une analyse de profils de restriction de 3 souches virales (Russell & Robbins, 1989). Un séquençage fragmentaire de certaines zones d'intérêt du génome a ensuite fait place au séquençage complet de la souche Lausanne du MYXV (Cameron et al., 1999). On a pu ainsi dénombrer 170 cadres de lecture ouverts au total (158 uniques et 12 présents en double copies dans les RIT). En région centrale, 120 kpb correspondent aux gènes structuraux largement conservés parmi les *Poxviridae*, alors que 40 kpb (15 à gauche et 25 à droite) codent des gènes non-essentiels plus spécifiques des *Leporipoxvirus* (**Figure 4**). Les RIT du MYXV se distinguent de celles des autres poxvirus par l'absence de séquences non-codantes entre les cadres de lecture (Cameron et al., 1999).

La distinction entre formes virales (IMV, IEV, EEV, CEV) est aussi valable pour le MYXV (Duteyrat et al., 2006). Plusieurs gènes du VACV codant des protéines spécifiques aux EEV trouvent d'ailleurs des homologues dans le génome du MYXV (Cameron et al., 1999)



3 : transcription des gènes précoces; 4 : déshabillage du core; 5 : réplication de l'ADN et formation de concatémères; 6 : transcription des gènes intermédiaires; 7 : transcription des gènes tardifs; 8 : début de l'assemblage avec les premiers fragments de membrane; 9 : résolution des concatémères et incorporation d'ADN; 10 : maturation et formation des IMV; 11 : acquisition d'une double enveloppe (IEV); 12 : migration vers la Figure 5 : le cycle de réplication des poxvirus. 1 : attachement à la cellule; 2 : pénétration dans la cellule et libération du core dans le cytoplasme; surface cellulaire à l'aide du cytosquelette; 13 : fusion avec la membrane plasmique cellulaire, formation des CEV et libération d'EEV (Moss, 2001)

#### 3. Cycle réplicatif

Le cycle réplicatif des poxvirus a été étudié en détail et à l'échelle moléculaire en prenant pour modèle le virus de la vaccine.

L'une des principales caractéristiques des poxvirus est leur cycle réplicatif se déroulant intégralement dans le cytoplasme de la cellule infectée. Sa durée varie de 12 à 24 h pour le VACV (Moss, 2001) et environ 16 h pour le MYXV (Duteyrat et al., 2006). Il peut se décomposer en plusieurs étapes : l'entrée du virus dans la cellule et son déshabillage, l'expression des gènes précoces, la réplication du génome viral, l'expression des gènes intermédiaires et tardifs et finalement l'assemblage et le relarguage des virions nouvellement formés (Moss, 2001) (**Figure 5**).

-a- L'entrée du virus dans la cellule

Plusieurs mécanismes de la pénétration des poxvirus dans les cellules cibles ont été proposés. Selon certains auteurs, les IMV perdraient leur enveloppe avant d'entrer dans la cellule, et seul le core traverserait la membrane plasmique (Locker et al., 2000; Sodeik & Krijnse-Locker, 2002).

L'hypothèse la plus généralement admise est cependant que la pénétration des IMV se ferait par fusion membranaire. Des images de microscopie électronique montrent d'ailleurs la continuité des membranes virale et cellulaire (Carter et al., 2005). Les IMV déclencheraient un signal intracellulaire à l'origine de protrusions membranaires actiniques, essentielles pour la pénétration dans la cellule (Locker et al., 2000).

Les hypothèses quant aux mécanismes d'entrée dans la cellule des particules EEV sont encore plus controversées. Selon certains auteurs, les EEV pénètreraient par endocytose et seraient pris en charge par des vésicules intracellulaires. Le pH acide des vésicules induirait la rupture de l'enveloppe externe et le core serait libéré par fusion de la membrane des IMV avec celle des vésicules (Vanderplasschen et al., 1998b; Ichihashi, 1996). Cependant, un autre mécanisme a été proposé, sur les bases d'observations en microscopie électronique. La membrane des EEV se romprait au contact de la membrane cellulaire, et resterait à l'extérieur

de la cellule (Law et al., 2006). La particule IMV ainsi libérée pénètrerait alors par fusion membranaire, comme décrit ci-dessus (Carter et al., 2005).

Aucun récepteur cellulaire utilisé par le VACV n'a pu être identifié à ce jour. Il est vraisemblable que des interactions peu spécifiques, via des heparane et/ou chondroïtine sulfates interviennent dans les contacts précoces entre les IMV et la cellule cible. Ainsi, les protéines A27L, D8L et H3L du VACV se fixent-elles aux glycosaminoglycanes présents à la surface des cellules (Chung et al., 1998, Hsiao et al., 1999, Lin et al., 2000). Les protéines A28L, H2R et G3L sont également indispensables à l'entrée des IMV du VACV dans la cellule (Senkevich et al., 2004a).

Enfin, l'entrée des IMV du VACV dépend aussi de leur fixation à la laminine, protéine de la matrice extracellulaire (Law et al., 2004).

On dispose de peu de renseignements concernant les interactions des EEV avec la cellule. La rupture de l'enveloppe des EEV du VACV au contact de la cellule, comme précédemment suggéré, impliquerait cependant des polyanions tels que les glycosaminoglycanes cellulaires ainsi que les protéines virales B5R et A34R (Law et al., 2006).

En ce qui concerne l'entrée du MYXV dans la cellule, une étude semble confirmer l'existence du mécanisme d'entrée des EEV par rupture préalable de l'enveloppe et entrée des IMV (Duteyrat et al., 2006). Des images d'endocytose et macropinocytose ont également été observées (Duteyrat et al., 2006) et la liaison aux récepteurs de type héparane/chondroitine sulfates a été décrite pour le MYXV (Chung et al., 1998), par contre la dépendance à la laminine évoquée chez le VACV n'a pas été rapportée chez le MYXV (Law et al., 2004). Enfin, si l'utilisation originale des récepteurs aux chemokines CCR5 et CXCR4 par le MYXV a été évoquée (Lalani et al., 1999), ce parallèle séduisant entre le MYXV et le HIV n'a pas été confirmé et les résultats n'ont pu être reproduits (Masters et al., 2001).

-b- L'expression des gènes viraux et sa régulation

Leur cycle se déroulant entièrement dans le cytoplasme de la cellule infectée, les *Poxviridae* sont relativement autonomes pour les processus de réplication et de transcription qui ont habituellement lieu dans le noyau. En effet, ils codent leurs propres enzymes et principaux

facteurs de transcription et ils disposent d'une machinerie pour la réplication et la transcription de leur génome.

L'expression des gènes est séquentielle. On distingue ainsi les gènes précoces, transcrits avant la réplication du génome viral, des gènes intermédiaires et gènes tardifs, transcrits après. Cette succession d'évènements contrôle l'expression des gènes : la transcription des gènes intermédiaires nécessite l'intervention de protéines exprimées précocement, celle des gènes tardifs faisant appel aux protéines intermédiaires et celle des gènes précoces aux protéines tardives qui sont encapsidées et disponibles pour le cycle suivant.

Les mécanismes de transcription semblent conservés au sein de la famille (Broyles, 2003). Une même ARN polymérase à 9 sous-unités est utilisée pour la transcription des trois types de gènes.

-c- Expression des gènes précoces

Les gènes précoces codent principalement des facteurs impliqués dans l'immunorégulation, la synthèse d'ADN et la réplication de l'ADN. Ils représentent environ la moitié des gènes du VACV (Oda & Joklik, 1967). Les ARNm précoces viraux sont produits avant la réplication du génome viral et les premiers transcrits apparaissent dans les minutes qui suivent l'entrée du virus dans la cellule. Ils sont synthétisés au sein même du core viral encore intègre. Ceci est possible grâce à la présence, dans le core, d'une enzyme de coiffage des ARNm, d'une poly(A) polymérase, d'une 2'-O-methyltransferase et de toute la machinerie nécessaire à la synthèse d'ARN. Les transcrits s'échappent ensuite par des pores à la surface du core, et sont traduits grâce aux ribosomes cellulaires. La transcription des gènes précoces ne semble ainsi faire appel à aucune protéine cellulaire (Broyles, 2003).

Les promoteurs précoces ont une taille de 30 pb environ (voir **Tableau 3**). Ils possèdent un résidu guanine presque toujours placé à - 21 ou - 22 en amont du site d'initiation de la transcription, et flanqué par des régions variables riches en bases A et T (Davison & Moss, 1989). Les séquences régulatrices sont assez conservées entre les genres, puisque des promoteurs d'*Avipoxvirus* peuvent fonctionner chez le VACV et vice versa. Les promoteurs poxviraux sont généralement interchangeables.

Ceci est également valable pour les *Leporipoxvirus*. La transcription s'initie en général 15 à 30 bases en aval du promoteur.

Promoteurs	Séquences consensus
Précoces	(A/T) <sub>8</sub> G(A/T) <sub>8</sub> N <sub>12</sub> ( <u>G/A</u> )
Intermédiaires	(A/T) <sub>8</sub> N <sub>12</sub> T <mark>A</mark> AA(T/A)GG
Tardifs	(A/T) <sub>6</sub> N <sub>9</sub> T <u>A</u> AAT

Tableau 3 : Séquences consensus des différents promoteurs des gènes de lavaccine. D'après Broyles, 2003. Rouge souligné : site d'initiation de la transcription.

Le signal de terminaison de la transcription des gènes précoces est situé juste en aval de l'ORF et est constitué par la séquence TTTTTNT (Yuen et al., 1987). Cette séquence a été identifiée non seulement chez le VACV, mais aussi à la fin de certains gènes d'*Avipoxvirus*, de *Capripoxvirus* et de *Leporipoxvirus* dont le MYXV, ce qui suggère un emploi commun chez les *Poxviridae*.

Les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, la biosynthèse des nucléotides, la transcription des gènes intermédiaires mais aussi certains mécanismes d'échappement aux défenses de l'hôte sont exprimées précocement.

#### -d- Réplication du génome viral

Après désintégration du core, l'ADN viral devient totalement accessible aux enzymes. Sa réplication se déroule de façon autonome dans le cytoplasme de la cellule infectée, à l'aide d'enzymes d'origine essentiellement virale. L'ADN viral nu s'associe aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) qui l'enveloppent pour former un compartiment dans lequel la réplication s'initie (Mallardo et al., 2002).

Au début du cycle, la boucle de chaque télomère de l'ADN viral est coupée par une endonucléase spécifique. Les télomères poxviraux sont, par analogie aux chromosomes eucaryotes, des séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités de la molécule linéaire d'ADN viral. C'est dans les télomères qu'a lieu, de toute évidence, l'initiation et la terminaison de la réplication (DeLange & McFadden, 1990). Cependant, il ne semble pas exister d'origine de réplication spécifique.

Pendant la réplication de l'ADN, chaque extrémité en épingle à cheveux du télomère est momentanément convertie en palindrome imparfait dont l'axe de symétrie est situé à la fin de la boucle d'origine. Plusieurs unités génomiques linéaires se juxtaposent au niveau de la structure palindromique du télomère viral et forment des concatémères de haut poids moléculaire, considérés comme des intermédiaires de réplication. La résolution de concatémères aboutit à la formation de molécules d'ADN matures qui seront incorporées dans les particules virales, en fin de processus infectieux. Cette résolution pourrait être effectuée par la protéine K4L du VACV, dont il a été montré *in vitro* qu'elle est capable de résoudre de

telle molécule (Eckert et al., 2005). Cependant, K4L ne possèdent pas d'homologue chez tous les poxvirus et notamment chez le MYXV.

-e- Expression des gènes intermédiaires et tardifs

La transcription de ces gènes nécessite la synthèse *de novo* de l'ARN polymérase (Hooda-Dhingra et al., 1989). Elle requiert également la participation de protéines de la cellule hôte (Rosales et al., 1994b; Gunasinghe et al., 1998).

Les promoteurs des ARNm intermédiaires et tardifs, présentés dans le **Tableau 3**, se composent d'une séquence respectivement de type TAAA(T/A) et TAAAT(G/A) au site d'initiation de la transcription, et d'une séquence plus variable mais riche en AT en amont (Rosel et al., 1986; Baldick et al., 1992).

De nombreux gènes intermédiaires de la vaccine ont ainsi longtemps été confondus avec des gènes tardifs. Les ARNm intermédiaires possèdent une séquence polyA en 3' d'environ 30 nucléotides non codés par le génome (Baldick & Moss, 1993). Peu de gènes intermédiaires sont connus. La plupart est impliquée dans la régulation de la transcription des gènes tardifs. Les deux catégories de gènes se distinguent cependant par la distance qui sépare la région variable en AT du site initiateur, plus courte dans les gènes tardifs (Broyles, 2003). L'extrémité 3' des gènes intermédiaires et tardifs est très variable (Xiang et al., 2000) et

aucune séquence signalant la fin de la transcription n'a été identifiée.

Les gènes intermédiaires et tardifs codent respectivement les acteurs de la transcription des gènes tardifs et précoces, ainsi que des protéines participant à la morphogenèse et l'assemblage des virions (Rosel & Moss, 1985).

#### -f- L'assemblage et la maturation des virions

Les virions s'assemblent dans des régions circonscrites du cytoplasme, identifiables en microscopie électronique. Ces sites, appelés virosomes, apparaissent 4 à 5 heures postinfection. Des membranes virales commencent par s'y accumuler. Leur origine est très discutée. Elles seraient synthétisées *de novo* ou dériveraient des membranes du compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Sodeik et al., 1993) ou encore résulteraient de la fusion de petites vésicules issues d'organites (Tellam et al., 2001). Après incorporation du génome, des éléments de la nucléocapside et maturation, les IMV sont formés. Certains s'entourent d'une double enveloppe supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi ou d'endosomes et se dirigent vers la surface cellulaire. Ce déplacement fait appel à la polymérisation, l'utilisation des microtubules et à la destruction du centrosome (Ploubidou et al., 2000, Smith et al., 2002). Ils fusionnent avec la membrane plasmique et perdent leur enveloppe la plus externe pour libérer des EEV et CEV. Les CEV restent accolés à la membrane cellulaire puis sont expulsés par une microvillosité « actinique ». D'autres projections, identifiées par microscopie électronique, sont aussi susceptibles de véhiculer les CEV vers les cellules voisines (Duteyrat et al., 2006). De nombreuses protéines virales impliquées dans la morphogenèse et la libération des virions ont déjà été identifiées, et d'autres sont découvertes régulièrement (Grubisha & Traktman, 2003).


**Figure 6: Pathogénie du MYXV chez le lapin européen.** L'arthropode vecteur, au cours de son repas de sang, permet au MYXV d'infecter des cellules dendritiques où il pourra se répliquer (flèche rouge). Celles-ci vont migrer jusqu'au nœud lymphatique drainant où les LT seront à leur tour infectés. Le virus se réplique entraînant une diminution du nombre de LT à ce niveau. Le virus est ensuite disséminé à partir du nœud lymphatique vers d'autres organes tels que les poumons, les testicules et la peau.

# B. La myxomatose : généralités

Le virus de la myxomatose est l'agent étiologique d'une maladie majeure du lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*, la myxomatose. Elle est systémique et rapidement létale. Elle se caractérise par l'apparition sur l'animal de larges lésions cutanées mucoïdes, nommées myxomes dont la première description remonte en 1896 à l'Institut d'Hygiene de Montevideo. Les hôtes naturels du MYXV sont des lapins américains de type *Sylvilagus* dont le lapin brésilien, *Sylvilagus brasiliensis*. Chez ces animaux, la maladie est bénigne (fibrome cutané uniquement et il n'est relevé aucune immunodépression générale). Il semble ainsi que le MYXV ait franchi la barrière d'espèce pour provoquer chez le lapin européen cette maladie fulgurante, accompagnée d'un tableau clinique très caractéristique d'immunodépression généralisée suivie de la mort de l'animal.

Le MYXV est transmis de façon passive par certains arthropodes piqueurs (pas de réplication du virus dans les arthropodes), comme le moustique et la puce, à partir des lésions cutanées des animaux infectés et il se réplique de façon intensive chez *Oryctolagus cuniculus*.

Ce virus reste la seule arme biologique à avoir été sciemment utilisée pour détruire une population de vertébrés à grande échelle, comme en témoigne son introduction volontaire en Australie en 1950 pour éliminer les lapins, responsables de dommages agronomiques, écologiques et économiques considérables dans le pays. Le MYXV est devenu un exemple de virus ayant réussi une adaptation à un nouvel hôte, le lapin européen, et peut désormais être transmis entre *Oryctolagus cuniculus* en l'absence de son hôte naturel.

#### 1. Pathogénie du MYXV chez le lapin européen

Après un repas sanguin, l'arthropode piqueur permet au MYXV d'infecter directement les cellules du derme, majoritairement les cellules dendritiques, exprimant le CMH-II (**Figure** 6). Il est clairement établi que ces cellules représentent le site primaire de réplication du MYXV (Best et al., 2000).

Vingt-quatre heures après inoculation, le virus est détectable au niveau des nœuds lymphatiques drainant le site d'inoculation. A ce niveau, le MYXV infecte majoritairement les lymphocytes T (LT) du paracortex du nœud lymphatique (**Figure 6**), entraînant une



Figure 7: Myxomatose classique chez le lapin européen.

réduction massive du nombre de LT. Le virus est ensuite disséminé à partir du nœud lymphatique vers les autres tissus (**Figure 6**), principalement le poumon, les testicules et la peau (site majeur de dissémination, comme la paupière et autres sites cutanéo-muqueux).

Ainsi, le MYXV se réplique dans les lymphocytes et les macrophages, cellules exprimant le CMH-II, et le dysfonctionnement de ces cellules-clés du système immunitaire explique le tableau général d'immunodépression caractéristique de la maladie.

Les premiers signes cliniques de la maladie se manifestent entre le  $2^{ième}$  et le  $5^{ième}$  jour postinfection (**Figure 7**) et se caractérisent par une lésion cutanée érythémateuse au niveau du point d'inoculation qui progressera en une lésion oedémateuse, le myxome. Des myxomes secondaires envahissent les paupières, les oreilles et la zone anogénitale et souvent accompagnés d'écoulements muqueux puis purulents dans la sphère oculo-nasale. A partir du  $6-8^{ème}$  jour, les myxomes secondaires envahissent tout le corps de l'animal. Des surinfections bactériennes font aussi leur apparition. La mort intervient vers le  $10-12^{ème}$  jour de l'infection dans les cas les plus graves.

Il faut cependant noter que l'évolution de la maladie dépend à la fois de la souche virale mais aussi de la résistance naturelle de l'hôte. Ainsi, cinq grades d'infectiosité peuvent être distingués, le grade I étant le plus élevé, estimé selon le temps de survie, le taux de mortalité, l'aspect du myxome primaire, l'intensité et le temps de génération de la maladie, l'apparition ou non de signe nerveux, la teneur en virus et la virulence des lésions (Fenner & Marshall, 1957; Fenner & Ratcliffe, 1965, Joubert et al., 1972).

# 2. Réponse immunitaire contre l'infection par le MYXV

La mise en place de la réponse immunitaire contre le MYXV débute avec l'infection des cellules dendritiques, cellules de Langerhans (dans le derme) et des LT (au niveau des nœuds lymphatiques drainant). Les lapins développent des IgM et IgG contre le virus. Si ces anticorps peuvent neutraliser le virus, il semble cependant ne pas être suffisants pour protéger les lapins, comme en témoignent des expériences d'immunisation passive, avec une mortalité observée de 17 lapins sur 20 après transfert d'un sérum contre le MYXV, puis épreuve virulente (Fenner & Marshall, 1954). De plus, les vaccins à virus inactivés n'ont pas permis

de protéger les lapins contre la myxomatose, alors même que des anticorps étaient produits (Fenner & Ratcliffe, 1965), contrairement aux vaccins à virus atténués qui sont eux bien protecteurs. Ces données suggèrent que si des anticorps préexistants peuvent conférer une relative protection, en tout état de cause, les anticorps développés durant la phase clinique ne sont pas une donnée cruciale dans la survie des lapins. Ceci fait donc apparaître l'importance de la réponse à médiation cellulaire dans le contrôle de l'infection par le MYXV.

Le MYXV possède des armes pour contourner et interférer avec les acteurs responsables de la mise en place de la réponse cellulaire. Tout d'abord, le MYXV possède une capacité de dérégulation des molécules du CMH-I à la surface des cellules infectées (Guerin et al., 2002; Mansouri et al., 2003; Collin et al., 2005), ce qui altèrerait la capacité de présentation aux cellules T CD8+ actrices de la réponse cellulaire. Le MYXV infecte des cellules impliquées dans la réponse à médiation cellulaire telles que les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Kerr & McFadden, 2002). L'apoptose des cellules et notamment celle des lymphocytes dans la zone paracorticale des nœuds lymphatiques (dès 4 jours post-infection) est un élément clé de la virulence du MYXV. L'inflammation est également un phénomène important dans le contrôle de l'infection par le MYXV. Le virus possède en effet plusieurs protéines aux propriétés anti-inflammatoires, des inhibiteurs d'interférons, de chemokines et de cytokines, ce qui empêche la mise en place d'une réponse immune à médiation cellulaire efficace (Stanford et al., 2007). Pour terminer, il semble que des lymphocytes T infectés par le MYXV soient *in vitro* incapables de répondre à un stimulus mitogène dès 4 jours post-infection.

Tous ces éléments indiquent que la réponse à médiation cellulaire est très certainement la composante majeure du contrôle immunitaire de l'infection du lapin européen par le MYXV.

# C. Interactions poxvirus/hôtes

Le spectre d'hôte et le tropisme cellulaire sont intimement liés et sont encore mal compris. Il est difficile, voire impossible de dissocier les mécanismes qui régissent l'un ou l'autre.

Le tropisme cellulaire se caractérise par le fait que l'interaction virus-cellule puisse être permissive, semi-permissive ou abortive (ou encore restrictive) selon les lignées cellulaires ou cultures de cellules *ex vivo*. Il peut être influencé par des facteurs purement cellulaires, mais aussi des facteurs viraux. *In vivo*, combiné au tropisme cellulaire, la capacité du virus à contourner la réponse immunitaire de l'hôte est une des clés du spectre d'hôte. Afin de pouvoir assurer leur survie lors de l'infection, les poxvirus ont développé des stratégies pour contourner, détourner et échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Ces virus codent notamment des homologues de protéines cellulaires impliquées par exemple dans la mise en place de la réponse immunitaire. Ces protéines qui miment ces facteurs cellulaires, permettent ainsi au virus de bloquer des voies de signalisation. Ainsi, la pathogénie et les signes cliniques pour un organisme infecté sont directement influencés par les caractéristiques évoquées précédemment.

Dans cette partie, nous allons nous attarder sur différents mécanismes impliqués dans le contrôle du tropisme cellulaire et du spectre d'hôte, en se focalisant plus particulièrement sur le virus de la myxomatose.

## 1. Tropisme cellulaire

Bien que les poxvirus arborent un spectre d'hôte assez strict *in vivo*, cette spécificité peut varier dans les lignées cellulaires cultivées *in vitro*. En effet, selon les conditions expérimentales, on peut observer que certaines cellules dérivées d'espèces non hôtes peuvent être permissives à l'infection *in vitro*. Ainsi, le virus de la myxomatose, spécifique du lapin, peut se répliquer *in vitro* dans des cellules transformées d'origine humaine ou simienne (Sypula et al., 2004), ou encore dans des fibroblastes primaires humains ou de rongeurs (Wang et al., 2004a; Johnston et al., 2005a). Il est donc important de noter que chaque poxvirus possède une spécificité *in vitro* distincte de son spectre d'hôte *in vivo* (**Tableau 4**).

noxvirus	aenre	Hôtes	Hôtes	Cellules
poxiliuo	genie	Réservoirs	sensibles	permissives
Variole	Orthopoxvirus	Homme	primates	La plupart des cellules de mammifères
Molluscum contagiosum	Molluscipoxvirus	Homme	Homme, cheval	Kératocytes humains différenciés
Monkeypox	Orthopoxvirus	Rongeurs, écureuil	Singe, homme	La plupart es cellules de mammifères, sauf les cellules PEK
Cowpox	Orthopoxvirus	Rongeurs	Homme, vache, chat, renard, animaux de zoo	La plupart des cellules de mammifères
Vaccine	Orthopoxvirus	Inconnu	Large spectre, incluant l'homme	La plupart des cellules de mammifères sauf les CHO
Ectromelia	Orthopoxvirus	Rongeurs	Souris de laboratoire	La plupart des cellules de mammifères sauf les CHO
Orf	Parapoxvirus	Ruminants	Homme, chat, herbivores	Les fibroblastes primaires ovins et bovins
Tanapox	Yatapoxvirus	Rongeurs ? insectes ?	Homme, singe	Cellules de singes sélectionnées
Virus de la myxomatose	Leporipoxvirus	Lapins américains	Lapin européen	Cellules de lapins, cellules de singes sélectionnées et les cellules de tumeur humaines

Tableau 4 : Exemples de spécificité *in vitro* et spectre d'hôte *in vivo* de certains poxvirus.

-a- Liaison et pénétration dans la cellule cible

Pour la plupart des virus, la spécificité du tropisme en culture cellulaire est directement liée à la présence de récepteurs cellulaires spécifiques permettant la liaison et la pénétration du virus dans la cellule cible. En revanche, en ce qui concerne les poxvirus, aucun récepteur spécifique n'a été identifié, bien qu'une étude récente ait montré la présence d'un récepteur non identifié à la surface des lymphocytes T humains activés permettant la liaison avec le virus de la vaccine (Chahroudi et al., 2005). Des corrélations ont pu être établies entre les taux d'expression de récepteurs à la surface cellulaire (Eppstein et al., 1985; Lalani & McFadden, 1999). Des travaux supplémentaires ont montré que les poxvirus sont capables de se lier et de pénétrer à la fois dans les cellules permissives et les cellules restrictives, mais que ce sont des évènements post-entrée qui influent spécifiquement sur le devenir du cycle viral (Johnston et al., 2003). Tous les poxvirus sont probablement capables de se lier et de pénétrer dans la plupart des cellules animales. La capacité d'un poxvirus donné à compléter l'intégralité de son cycle varie selon les lignées cellulaires ou leur origine. Ainsi, les déterminants cellulaires requis pour la liaison et l'initiation de la fusion membranaire entre le virus et la cellule cible sont présents de façon ubiquitaire à la surface de la cellule (les glycosaminoglycanes, les éléments de la matrice extracellulaire) (Chung et al., 1998; Hsiao et al., 1998; Hsiao et al., 1999; Lin et al., 2000; Senkevich et al., 2004b). De la même manière, les chordopoxvirus, comme le virus de la vaccine, peuvent se lier, entrer et initier le cycle de réplication viral dans des cellules d'insectes (Li et al., 1998). C'est donc après pénétration du virus dans le cytoplasme de la cellule cible que la confrontation entre le virus et la cellule va commencer, dictée par des évènements intracellulaires.

# -b- Contrôle du cycle cellulaire

La plupart des poxvirus produit des facteurs de croissance homologues aux facteurs de croissance cellulaire tels que l'EGF (Epidermal growth factor) ou encore le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ces homologues, comme le VGF (Vaccina virus Growth Factor) du virus de la vaccine, le MGF (Myxoma Growth Factor) du virus de la myxomatose ou encore le SFGF (Shope Fibroma virus Growth Factor) du virus du fibrome de Shope sont capables de réguler la prolifération et la différentiation cellulaire (Laurence & Gusterson,

1990) et de stimuler la mitose des cellules adjacentes. *In vivo*, le MGF est un facteur de virulence essentiel puisque la maladie est fortement atténuée lorsque des lapins sont inoculés avec un virus n'exprimant plus ce facteur de croissance (Cameron et al., 1999).

-c- Contrôle de l'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de défense cellulaire qui consiste en la mort programmée de la cellule. Elle contribue à l'élimination de cellules endommagées, mutées, âgées ou encore infectées, finalement lorsque l'intégrité cellulaire est menacée.

Deux mécanismes principaux sont impliqués dans le déclenchement de l'apoptose. Le premier est généré par des signaux internes, déclenchés au sein même de la cellule (voie intrinsèque), le second via des signaux externes (voie extrinsèque).

# Apoptose induite par des signaux internes: voie intrinsèque ou mitochondriale

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des facteurs impliqués dans la réponse à l'apoptose. Parmi elles, certaines ont des activités anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xl), tandis que d'autres sont au contraire pro-apoptotiques (Gross et al., 1999; Cory et al., 2003). Ces protéines proapoptotiques spécialisées sont nommées protéines de type BH3 (Bad, Bak, Bax et Bid) et sont étroitement régulées (Huang & Strasser, 2000). Ainsi, le déclenchement de l'apoptose dépend de l'équilibre subtil entre les facteurs pro et anti-apoptotiques.

Les protéines pro-apoptotiques sont des facteurs présents dans le cytosol et agissent comme des détecteurs de signaux de stress ou de dommages cellulaires. Suite à un message de stress, ces protéines pro-apoptotiques vont transloquer à la surface des mitochondries où sont localisées les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl. L'interaction entre les protéines anti et pro apoptotiques altère les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 et Bcl-xl. Cela aboutit à la formation de pores dans la mitochondrie et au relarguage de cytochrome c. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c se lie à la protéine Apaf-1 (apoptose protease activating factor 1) et recrute la pro-caspase 9 (Li et al., 1997). Ces trois facteurs forment ainsi un complexe protéique appelé l'apoptosome qui active la caspase 9 qui elle-même déclenche une cascade d'activation des caspases en aval (caspases 3 et la 7) et finalement aboutit à l'apoptose. Les

caspases constituent une famille de protéines qui sont les principaux « exécuteurs » de l'apoptose (Thornberry & Lazebnik, 1998; Shi, 2002). En effet, elles provoquent des cascades protéolytiques qui aboutissent à la digestion des protéines structurales du cytoplasme et la dégradation de l'ADN. Finalement, ces cellules seront éliminées par phagocytose.

# Apoptose induite par des signaux externes: voies extrinsèque ou des récepteurs de mort

Deux importants exemples d'initiation de l'apoptose incluent le modèle induit par le TNF (Tumor Necrosis Factor) et le modèle médié par l'interaction Fas-Fas ligand, ces deux voies impliquant des récepteurs de la famille des récepteurs au TNF (TNFR) couplés à un signal extrinsèque.

Le TNF est une cytokine produite principalement par les macrophages activés et il est le principal médiateur extrinsèque de l'apoptose. La plupart des cellules humaines possède deux récepteurs pour le TNF : le TNF-R1 et le TNF-R2. Il a été montré que la liaison du TNF au TNF-R1 initie l'activation de la caspase 8 (Ashkenazi, 2002). La liaison du TNF peut aussi indirectement déclencher l'activation de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, impliqués dans la survie et les réponses inflammatoires.

Le récepteur Fas, ou CD95, se lie au FasL. Cette interaction permet la formation du DISC (death-inducing signaling complex) qui contient notamment les caspases 8 et 10 (Ashkenazi, 2002). Après activation de ces caspases, elles initient une cascade d'activation de caspases qui joueront leur rôle d'effecteur de mort.

# Contournement de l'apoptose par le MYXV

Six protéines du MYXV ont pour le moment été identifiées comme agents anti-apoptotiques: M-T2, M-T4, M-T5, M11L ou Serp2.

#### **M-T2:**

La protéine M-T2 fut le premier virorecepteur identifié, et ce, en se basant sur l'homologie de séquence avec le domaine de liaison N-terminal du TNF cellulaire. L'inhibition de l'action du TNF bloque une des voies majeures de l'apoptose (voie extrinsèque). En effet, l'apoptose est également déclenchée par l'action des cellules NK et LT CD8+ qui reconnaissent les cellules infectées puis induisent une cascade d'activation via des cytokines telles que le TNF, la libération de perforine ou granzyme, ou encore par l'activation de Fas à la surface de la cellule cible. C'est pourquoi la capacité de M-T2 à se lier au TNF et à le séquestrer, l'empêche d'atteindre sa cible, et de déclencher l'apoptose (**Figure 8**). Cependant, l'activité anti-apoptotique de M-T2 semble être plus complexe que cela et se déroulerait principalement par un autre mécanisme, intracellulaire et non par liaison au TNF. En effet, les formes tronquées de la protéine, qui elles ne peuvent se lier au TNF, conservent leurs propriétés anti-apoptotiques (Schreiber et al., 1997). M-T2 possède 4 domaines riches en cystéine, les trois premiers sont responsables de la liaison de M-T2 (Xu et al., 2000).

#### **M-T4:**

M-T4 a été initialement identifié comme facteur de virulence. En effet, des lapins infectés avec le virus knockout développent une maladie atténuée (Barry et al., 1997; Hnatiuk et al., 1999). La protéine M-T4 est codée par un gène présent en double copie, l'une au niveau de la RIT droite et l'autre de la gauche. Il s'agit d'une protéine de 30 kDA localisée au niveau du réticulum endoplasmique des lymphocytes infectés (Barry et al., 1997). Comme la plupart des protéines réticulaires, elle possède une séquence caractéristique de localisation endoplasmique RDEL. Cependant l'absence de ce site ne modifie pas la localisation de la protéine mais influe cependant sur sa stabilité (Hnatiuk et al., 1999). L'étude d'un virus M-T4 knockout montre que les cellules infectées (lignées RL5 ou lymphocytes périphériques *ex vivo*) subissent une apoptose plus importante qu'avec le virus sauvage. Ainsi, M-T4 possède des capacités anti-apoptotiques (Hnaituk et al., 1999). M-T4 serait capable d'inhiber l'activité de la protéine BAP31, protéine réticulaire associée aux protéines Bcl2/BxL et à la caspase 8 (**Figure 8**).



**Figure 8:** Mécanisme d'échappement du MYXV à l'apoptose. La protéine M-T2 sous sa forme excrétée inhibe la fixation du TNFα à son ligand spécifique, le TNFα-R. Sous sa forme réticulaire, elle serait capable d'empêcher la translocation du TNFα-R à la surface de la membrane cellulaire. L'interaction de M-T4 et de la protéine BAP31 inhibe le clivage pro-apoptotique de cette dernière. M-T5 inhibe l'apoptose en agissant sur le cycle cellulaire (p27). La protéine M11L est capable de se lier aux protéines mitochondriales Bak et Bax inhibant leur activité pro-apoptotique. La serpine Serp2 interfère avec la voie des caspases. M-T4 possède des capacités anti-apoptotiques en inhibant l'activité de la protéine BAP31, protéine réticulaire associée aux protéines Bcl2/BxL et à la caspase-8.

### **M-T5:**

Lorsque des lapins sont infectés avec le virus mutant n'exprimant pas la protéine M-T5, la maladie est largement atténuée et l'infection n'arrive pas à progresser au-delà du stade des myxomes au niveau du site d'inoculation (Mossman et al., 1996a).

M-T5 fait partie des protéines possédant des répétitions ankyrines, séquences impliquées dans des interactions protéine-protéine. Quand les cellules RL5 sont infectées avec un virus déficient incapable de produire M-T5, elles entrent en apoptose, et on note une forte inhibition de la synthèse protéique virale et cellulaire (Mossman et al., 1996a). La protéine M-T5 serait essentielle aux cellules infectées en intervenant au niveau du cycle cellulaire en levant l'arrêt en phase Go/G1 induit naturellement par l'infection et induisant le déclenchement de l'apoptose pour lutter contre l'infection (Johnston et al., 2005c). Cette hypothèse a été renforcée puisque M-T5 interagit directement avec la cullin-1, une E3 ligase cellulaire qui augmente la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire comme CDK p27<sup>Kip</sup> (Johnston et al., 2005c) (**Figure 8**).

# M11L:

Après un stress cellulaire générant l'activation de la protéine p53, la protéine Bax s'oligomérise sous forme d'un complexe au niveau de la membrane mitochondriale, en présence de la protéine Bak. Ce complexe permet le relarguage du cytochrome c, ce qui aboutit à la mort cellulaire *via* la voie de la procaspase 9 et une déstabilisation mitochondriale. La protéine de régulation de l'apoptose Bcl-2 joue un rôle clé dans le contrôle de ces mécanismes puisqu'il s'agit d'un facteur anti-apoptotique inhibant l'oligomérisation de Bax et le relargage du cytochrome c.

Dans les cellules infectées par le MYXV, M11L s'insère dans la membrane externe des mitochondries et est exposée au niveau de la face cytoplasmique de l'organelle. Cette protéine possède un signal de ciblage mitochondrial (MTS pour mitochondrial targeting signal). M11L interagit avec le récepteur aux benzodiazépides, une protéine pro-apoptotique de la membrane externe mitochondriale et cette interaction serait entre autre impliquée dans la protection contre l'apoptose (Everett et al., 2002). Il a été montré que M11L interagit avec une autre protéine pro-apoptotique, la protéine Bak, membre de la famille Bcl-2 qui est constitutivement présente au niveau des mitochondries (Wang et al., 2004b). M11L prévient le relarguage du cytochrome c des mitochondries ainsi que la dissipation du potentiel de membrane  $\Delta\Psi$ m induit par le traitement avec des produits inducteurs (Everett et al., 2002).

M11L bloque l'activation de Bax au niveau de la mitochondrie en empêchant ses changements conformationnels (Su et al., 2006).

Bien qu'aucune homologie de séquence n'ait pu être identifiée avec les protéines de la famille Bcl-2, une analyse de structure tridimensionnelle révèle que M11L est capable d'adopter une structure tridimensionnelle identique à celle de Bcl-2 (Kvansakul et al., 2007). Cela lui permettrait de s'associer aux domaines de type BH3 caractéristiques des protéines proapoptotiques et plus particulièrement à ceux des protéines Bax et Bak (**Figure 8**).

Il semble donc que la protéine M11L soit impliquée dans différents mécanismes tous impliqués dans l'action anti-apoptotique.

# Serp2:

Le virus de la myxomatose code aussi un facteur de virulence Serp2 dont l'absence se traduit par des signes modérés de la maladie chez des lapins infectés par le virus knockout. De plus, l'infection de lapins par le virus délété induit une forte apoptose *in vivo* détectée par marquages immunohistochimiques (Messud-Petit et al., 1998), indiquant que Serp2 a une véritable action anti-apoptotique *in vivo* (**Figure 8**). Cette protéine appartient à la famille des Serpine (serine protease inhibitor) (Petit et al., 1996). Serp2 a longtemps été considérée comme homologue à CrmA du *Cowpox virus*, puissant inhibiteur de l'apoptose (Tewari & Dixit, 1995). Cependant, la faible homologie de séquence (35%) avec CrmA et le fait que les deux protéines ne soient pas interchangeables remet en cause cette similarité fonctionnelle (Turner et al., 1999; Nathaniel et al., 2004). De plus, Serp2 possède une faible affinité pour les ligands naturels de CrmA, à savoir granzyme B et ICE (Interleukine-1β converting enzyme/caspase 1) (Turner et al., 1999).

# M143R

La protéine M143R du virus de la myxomatose appartient à la famille des protéines poxvirales RING (Really Interesting New Gene) parmi lesquelles on trouve aussi la protéine p28 de l'ectromelia virus. Il faut cependant noter que bien que cette protéine soit codée par les membres des genres *Leporipoxvirus* et *Orthopoxvirus*, la souche WR du VacV contient un copie tronquée de p28 et la souche Copenhague, quant à elle, est entièrement délétée pour ce gène (Senkevich et al., 1994, Upton et al., 1994). Bien que la fonction exacte de ces protéines poxvirales reste encore à déterminer, p28 a été liée à l'inhibition de l'apoptose, et la

pathogénicité du virus ectromelia délété est fortement diminuée avec un croissance réduite dans les macrophages et une élimination complète du virus par des souris infectées (Senkevich et al., 1994; Senkevich et al., 1995; Brick et al., 1998; Brick et al., 2000). Il a été récemment montré que p28 et M143R sont des ubiquitines ligases dont le substrat reste encore inconnu (Nerenberg et al., 2005). Il reste donc encore à déterminer comment relier cette activité au pouvoir pathogène, à son rôle dans l'infection des macrophages et l'apoptose.

Le nombre de facteurs viraux impliqués dans le contrôle de l'apoptose montre que la régulation de ce mécanisme de défense cellulaire est essentielle pour le virus.

## -d- Facteurs d'hôte

La troisième catégorie d'évènements intracellulaires requis pour la réplication des poxvirus implique des facteurs agissant en *trans*, détournés par le virus pour compléter son cycle. C'est tout particulièrement le cas des protéines cellulaires de la machinerie de traduction dont dépend le virus pour la production de ses protéines. Cependant, il est admis que cette machinerie est ubiquitaire dans les cellules de mammifères et donc n'influencerait pas la capacité de réplication virale. En revanche, la disponibilité des facteurs de transcription cellulaires est requise pour la transcription des ARNm intermédiaires et tardifs comme cela a été montré avec le facteur VITF-2 qui peut être présent en taux limité dans certaines cellules (Rosales et al., 1994a; Rosales et al., 1994b, Sanz & Moss, 1998; Broyles, 2003). Un autre facteur intervenant directement dans la propagation des poxvirus est la protéine chaperonne Hsp90. Elle s'associe avec des facteurs présents au niveau des sites d'assemblage viraux et régule l'efficacité de réplication du VACV en interagissant avec la protéine 4a du core viral, nécessaire pour l'assemblage du virion (Hung et al., 2002).

-e- Inhibition de la voie IFN et de l'état anti-viral

La cascade la plus étudiée est sûrement celle qui régit l'état antiviral médié par les interférons (IFN), mécanisme antiviral pas excellence. En effet, la plupart des virus a développé des stratégies de défense contre les effecteurs des voies d'activation des interférons. Dans le cas

des poxvirus, ces stratégies incluent des inhibiteurs de l'induction, des récepteurs qui miment des ligands, des phosphatases qui bloquent la cascade STAT-1 de transduction du signal ou encore des inhibiteurs d'effecteurs tels que la protéine kinase R (Samuel, 2000; Sen, 2001; Katze et al., 2002; Seet et al., 2003).

# Synthèse des IFN

Il existe deux principaux types d'IFN: l'IFN de type I (en particulier les IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) et l'IFN de type II (IFN- $\gamma$ ).

La plupart des cellules d'un organisme est capable de produire de l'IFN de type I. L'IFN- $\alpha$  est principalement produit par les leucocytes (macrophages, cellules dendritiques...), tandis que l'IFN- $\beta$  est préférentiellement produit par les fibroblastes. L'infection d'une cellule par un virus conduit généralement à la présence d'ARN bicaténaire provenant soit directement du génome viral (exemple des virus de la famille *Reoviridae*), soit d'intermédiaires lors de la réplication du génome (virus à ARN simple brin possédant une ARN-polymérase ARN-dépendante) ou encore lors de la transcription du génome viral (Jacobs & Langland, 1996). C'est cette production ARNdb qui est à l'origine de la synthèse d'interféron de type I. En effet, la protéine PKR dépendante de l'ARNdb (Maran et al., 1994, Yang et al., 1995) va activer la sous-unité IKK $\beta$  de la kinase IkB, inhibiteur cytoplasmique de la protéine NFkB (Zamanian-Daryoush et al., 2000), conduisant à la phosphorylation d'IkB, libérant ainsi le facteur de transcription NFkB qui va transloquer dans le noyau et permettre en particulier la synthèse d'iARNm de l'IFN de type I.

L'IFN- $\gamma$  (IFN de type II) intervient, quant à lui, dans le développement de la réponse immunitaire adaptative. Il est sécrété par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ après présentation d'antigènes par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, ...)(Young, 1996). Les voies de production de l'IFN- $\gamma$  sont encore mal connues mais sembleraient impliquer les protéines p38 et MAP kinase (Rincon et al., 1998; Lu et al., 1999). Les interleukines IL-12 et IL-18 sont impliquées dans sa production et pourraient stimuler la production d'IFN- $\gamma$  par une voie indépendante de la présentation des antigènes. Il faut noter que les NK peuvent produire de l' IFN- $\gamma$  sans passer par la présentation d'antigène (Singh et al., 2000).

## Mode d'action des IFN

Les IFN de type I et II possèdent des récepteurs distincts, IFNAR et IFNGR respectivement. La fixation de l'IFN à son récepteur spécifique active une cascade de signalisation par l'intermédiaire du système Jak/STAT permettant ainsi la transcription d'un ensemble de gènes impliqués dans la résistance anti-virale. Dans ce sens, les IFN induisent la synthèse de nombreuses protéines cellulaires qui contribuent à inhiber la réplication virale.

Parmi ces protéines, on trouve l'oligoadenylate synthétase qui polymérise l'ATP en une série d'oligomères liés en 2'-5' (les acides nucléiques étant normalement liés en 3'-5'). Cela active une endoribonucléase, la RNase L, capable de dégrader l'ARN viral (Sen & Lengyel, 1992; Rebouillat & Hovanessian, 1999). Une seconde protéine est activée par l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$ , il s'agit de la sérine-thréonine kinase PKR (Clemens & Elia, 1997). Cette enzyme phosphoryle le facteur d'initiation de synthèse protéique eIF- $2\alpha$ , inhibant la traduction et contribuant ainsi à l'inhibition de la réplication virale (Ernst et al., 1979). De plus, l'activation de la PKR régule aussi d'autres facteurs de transcription tels que l'IRF-3 impliqué dans l'induction de l'apoptose induite par l'infection (Heylbroeck et al., 2000) et c-Jun (Chu et al., 1999). La PKR contrôle aussi différents processus cellulaires comme la croissance cellulaire, la différenciation (Petryshyn et al., 1984), l'apoptose (Lee & Esteban, 1994), la réponse au stress (Tan & Katze, 1999) mais aussi l'activité antivirale (Lee & Esteban, 1993) et antitumorale (Koromilas et al., 1992).

#### **Exemples d'inhibiteurs poxviraux:**

# **M-T7**

Le gène M-T7 est présent en deux copies sur le génome du MYXV. M-T7 est essentiel à la pathogénicité du virus *in vivo*. En effet, une diminution importante des signes cliniques et de la dissémination virale vers les sites secondaires est observée lors d'infection de lapins par le virus vMyxT7KO par rapport à l'infection avec la souche virale sauvage (Mossman et al., 1996b). Une forte infiltration de leucocytes est observée au niveau du site d'infection ainsi

qu'un afflux de lymphocytes au niveau des organes secondaires tels que la rate ou encore les nœuds lymphatiques. M-T7 est une protéine sécrétée qui possède une forte homologie avec le récepteur de l'IFN- $\gamma$  humain et murin (Mossman et al., 1995). Cette protéine est capable de se lier à l'IFN- $\gamma$  et d'inhiber son action (Upton et al., 1990) (**Figure 9**), mais aussi d'interagir avec les membres de la famille des chemokines CXC, CC et C (Lalani et al., 1997). De plus, M-T7 pourrait interférer avec les gradients de chemokines (Boomker et al., 2005).

Lorsque les deux copies de ce gène sont interrompues, cela n'affecte pas la capacité du virus recombiné à se répliquer dans des fibroblastes de lapins *in vitro* (Mossman et al., 1996b). Il serait interressant de tester la capacité du virus délété à se répliquer dans une culture de cellules en présence d'IFN $\gamma$  ou de cellules qui produisent de l'IFN $\gamma$ , comme les lymphocytes T activés, les macrophages ou encore les cellules dendritiques.

# M029L (MYXV) / E3L (VacV)

La protéine M029L du MYXV est l'orthologue de la protéine E3L du virus de la vaccine. M029L possède 44 % d'identité et 64 % de similarité avec E3L. Aucune étude à ce jour n'a été menée sur M029L. En ce qui conserne E3L, il a été montré que cette protéine est nécessaire à la pathogénicité du VACV dans un modèle souris (Brandt & Jacobs, 2001). Des études plus moléculaires ont montré que cette protéine possède un motif de liaison à l'ARNdb (Chang et al., 1992; Chang & Jacobs, 1993) essentiel pour la résistance à l'IFN et au large spectre d'hôte du VACV (Beattie et al., 1995, Chang et al., 1995) (**Figure 10**). Il a aussi été montré qu'E3L est un inhibiteur de la PKR à la fois *in vitro* et *in vivo* (Chang et al., 1992) par la séquestration et la liaison directe des deux protéines (Romano et al., 1998, Sharp et al., 1998). E3L est aussi capable d'inhiber le système 2-5OAS (Rivas et al., 1998) et empêche la phosphorylation et donc l'activation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Smith et al., 2001). De plus, l'expression d'E3L est capable d'inhiber la phosphorylation d'eIF-2 $\alpha$  et la dégradation d'IkB $\alpha$  en réponse à l'ARNdb (Garcia et al., 2002). Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée sur M029L, de part son homologie avec E3L, elle pourrait être impliquée dans le contrôle de l'état anti-viral des cellules infectées.



Figure 9 : Mécanisme d'inhibition des voies de l'IFN $\gamma$  par le MYXV et le VACV. Suite à la présentation d'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes, les LT vont sécréter de l'IFN $\gamma$ . En produisant la protéine M-T7, le MYXV va inhiber la liaison de l'IFN $\gamma$ à son récepteur spécifique constitué des sous-unités IFNGR1 et IFNGR2. Les complexes de transcription ISG3 (constitué de Stat1 et Stat2 phosphorylés) et AAF/GAF (Stat1 phophorylés) ne pourront pas transloquer dans le noyau et se fixer à leur séquence d'ADN spécifique (ISRE et GAS respectivement). La transcription de gènes dont les produits sont impliqués dans la résistance anti-virale sera altérée. La protéine **B8R** du VACV est elle aussi un homolgue du récepteur de l'IFN $\gamma$ .



**Figure 10 : Contrôle de la voie de l' IFN de type l et de l'état anti-viral induit par l'ARNdb par le MYXV et le VACV.** Au cours de son cycle viral, le VACV produit la protéine **B18R**, homologue au récepteur IFNAR. En séquestrant l'IFNα et l'IFNβ, **B18R** va inhiber la cascade de signalisation conduisant à la production d'effecteurs antiviraux (IRF-7, PKR, 2'-5'OS) via le complexe ISGF3. La protéine **E3L** du VACV (homologue à **M029L** du MYXV) inhibe les voies antivirale de la PKR et de la 2'-5'OS, en se liant à l'ARNdb au

dépend de la PKR et de la 2'-5' OS. Les protéines **M156R** du MYXV et **K3L** du VACV sont toutes les deux des homologues structuraux du facteur eIF2. En tant que pseudosubstrats de phosphorylation de la PKR, elles interfèrent avec l'activation d'eIF2 en empêchant sa phosphorylation et inhibe la réponse antivirale médiée par cette voie.

## M156R (MYXV) / K3L (VacV) / C8L (Swinepox virus)

La protéine M156R fait partie de nombreuses protéines dont le rôle possible dans l'immunomodulation est basé sur des similarités avec des protéines cellulaires ou des homologies avec des protéines virales, notamment avec K3L du virus de la vaccine et C8L du *swinepox virus* (Cameron et al., 1999). Ces deux orthologues poxviraux sont des inhibiteurs de la PKR (Beattie et al., 199; Davies et al., 1992; Carroll et al., 1993; Kawagishi-Kobayashi et al., 1997; Kawagishi-Kobayashi et al., 2000). De part leur homologie avec le facteur de transcription eIF2 $\alpha$  (Beattie et al., 1991; Kawagishi-Kobayashi et al., 1997), K3L et C8L peuvent entrer en compétition avec eIF2 $\alpha$  et interférer avec la liaison d'eIF2 $\alpha$  et de la PKR (Beattie et al., 1991; Kawagishi-Kobayashi et al., 1997) (**Figure 10**). Cependant, contrairement aux protéines K3L et C8L, M156R fonctionnerait différemment en tant qu'inhibiteur de la PKR. En effet, il n'a pas été montré d'interaction entre M156R et la PKR et entrer en compétition avec eIF2 $\alpha$  (Ramelot et al., 2002).

# 2. Contournement des réponses immunitaires de l'hôte par le MYXV

-a- Inhibition de la présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

### > CMH-I

Les molécules du CMH-I permettent la présentation des peptides dérivés de protéines cytosoliques à la surface des cellules infectées (peptides du soi ou encore issus d'antigènes viraux...). Le peptide couplé au MHC-I interagit avec le récepteur TCR (T cell receptor) des LT CD8+ et induit la multiplication clonale de LT CD8+ spécifiques.

### M-T4

La protéine M-T4 du MYXV, que nous avons précédemment évoqué pour son activité antiapoptotique, semblerait aussi capable de bloquer les molécules du CMH-I au sein du réticulum endoplasmique (Zuniga et al., 1999). Des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé que M-T4 interagit avec le CMH-I. De plus, M-T4 interagit avec la protéine BAP31, qui outre ses capacités anti-apoptotiques, régule la progression des molécules du CMH-I au sein du RE. M-T4 en interagissant avec BAP31 bloquerait deux fonctions: à la fois la fonction pro-apoptotique de BAP31, mais aussi sa capacité à intervenir dans l'export des molécules de classe I, faisant d'une pierre deux coups.

## **MV-Lap**

Une autre protéine du MYXV est impliquée dans la dérégulation des molécules du CMH-I: il s'agit de la protéine MV-Lap. MV-Lap est codé par le gène M153R. Le virus mutant MV-Lap- possède une virulence atténuée par rapport à la souche sauvage pour le lapin européen. Cette protéine fait partie d'une nouvelle famille de protéines virales impliquées dans la déregulation de marqueurs immuns : les scrapines (Surface Cell Receptor Abductor Proteins) (Guerin et al., 2002). Cette scrapine est capable de déréguler les molécules CMH-I, CD95 (Guerin et al., 2002) ou encore le CD4 (Mansouri et al., 2003). De plus, il a été montré récemment que cette faculté à réguler la présence du CMH-I à la surface cellulaire est dépendante d'une part de la présence des différents domaines composant la protéine, de sa localisation, et d'autre part de la présence d'un cofacteur spécifique du virus myxomateux (Collin et al., 2005).

# > CMH-II

Les molécules de classe II, MHC-II, sont exprimées uniquement à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC), et se fixent aux peptides extracellulaires issus des voies d'endocytose. Le complexe MHC-II/antigène interagit avec le récepteur TCR des LT CD4+. Aucun facteur poxviral interférant avec la voie CMH-II n'a pu être identifié, bien que les cellules exprimant les molécules de classe II, telles que les LT ou encore les cellules dendritiques, soient les clés dans la dissémination et la pathogénie du virus de la myxomatose. La réponse CD8+ induite via la présentation de peptides viraux par les molécules du CMH - I est un des mécanismes les plus importants dans la lutte antivirale, il n'est donc pas étonnant de voir que les poxvirus, et en particulier le MYXV, aient développé toute une batterie de facteurs pour lutter contre cette voie d'action du système immunitaire.

-b- modulation de l'inflammation

## M13L

En absence de la protéine M13L, les lapins infectés ne développent pas la myxomatose bien que l'on observe une réponse inflammatoire exacerbée en réponse à l'infection (Johnston et al., 2005a). De plus, en absence de M13L, la capacité de réplication du MYXV recombiné dans les lymphocytes de lapins *in vitro* est altérée, alors qu'elle ne l'est pas dans les fibroblastes (Johnston et al., 2005a). Cela indique que l'atténuation de la virulence chez le virus M13L knockout pourrait être attribuée au fait que ce virus recombiné est incapable de se répliquer dans les lymphocytes de lapins et donc de disséminer dans l'organisme infecté.

#### M141R

M141R est essentielle pour le développement de la myxomatose chez des lapins sensibles. En effet, lors de l'infection de lapins par un virus incapable de produire la protéine M141R (vMyx141KO), seuls des signes légers de la maladie sont observés et tous les lapins survivent, de même qu'ils sont ensuite protégés lors d'une épreuve virulente (Cameron et al., 2005a). D'un point de vue histologique, un important recrutement et une forte activation des monocytes/macrophages ainsi que des lymphocytes exprimant de forts taux d'oxyde nitrique sont détectés au niveau des organes lymphoïdes infectés (Cameron et al., 2005a). De même, M141R réduit le taux d'activation des lymphocytes T dans les nœuds lymphatiques et inhibe la capacité des cellules T circulantes à répondre à la présentation antigénique (Cameron et al., 2005a). M141R est une protéine appartenant à la famille du CD200 cellulaire (OX-2) responsable de la régulation des cellules de lignée myéloïde (Barclay et al., 2002). Lors de l'infection de PBMC de lapin activées par le virus vMyx141KO, une augmentation du taux d'IFNγ est détectée (Cameron et al., 2005a). Toutes ces données montrent que M141R est essentielle à la pathogénicité du MYXV en inhibant la capacité des macrophages à présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T.

## M128L

La protéine M128L est une protéine membranaire exprimée à la surface cellulaire. Elle possède 23 % d'homologie avec le CD47 bovin (Cameron et al., 2005b). L'homologue du virus de la vaccine, A38L, possède quant à lui 28 % d'homologie avec le CD47 humain

(Parkinson et al., 1995). Le CD47 est une protéine associée aux intégrines (IAP pour integrinassociated protein) impliquée dans l'activation cellulaire, la modulation de l'adhésion, la mobilité et la phagocytose des leucocytes. L'étude de cette protéine est passée par une analyse *in vivo* de son implication sur la pathogénicité du virus délété pour M128L. Ainsi, bien que n'étant pas essentielle pour le virus *in vitro*, une atténuation du pouvoir pathogène est observée avec des symptômes modérés de la maladie et une rémission complète de tous les lapins infectés (Cameron et al., 2005b). Une analyse plus en détail des lésions révèle une forte activation des cellules de types monocytes/macrophages au niveau des tissus lymphoïdes et des tissus infectés (Cameron et al., 2005b).

#### Myxoma virus Nuclear Factor (MNF)

MNF est une protéine codée par le gène M150R. Cette protéine est une protéine à répétitions ankyrines. Elle en possède neuf. Une étude fonctionnelle de MNF a montré qu'il s'agit d'une protéine capable de se transloquer dans le noyau (Camus-Bouclainville et al., 2004). Il s'agit là de la première protéine nucléaire identifiée pour le virus myxomateux. De façon très intéressante, le huitième motif ankyrine de MNF possède une similarité avec le motif de localisation nucléaire de IkB qui régule l'activité de NFkB en le séquestrant dans le cytoplasme. MNF agirait en interférant avec la voie de NFkB. *In vivo*, les processus inflammatoires générés lors de l'infection par le MYXV sauvage sont fortement réduits lors de l'infection par le virus mutant  $\Delta$ MNF. Cela fait donc de MNF un facteur de virulence chez le lapin européen.

#### Serp-3

A ce jour, Serp3 n'a fait l'objet que d'une seule étude effectuée dans notre laboratoire (Guerin et al., 2001). La plus atypique de toutes les serpines en terme de conservation de motifs et de domaines structuraux semble réellement importante pour la virulence du MYXV, comme en témoigne le phénotype atténué du mutant Serp3- chez le lapin européen. De façon tout à fait remarquable, le virus Serp3- n'induit pas de lésions caractéristiques de la myxomatose au niveau des nœuds lymphatiques drainants. Le mode d'action et la cible moléculaire de Serp-3 restent encore inconnus.

# D. Les poxvirus vecteurs vaccinaux

Les vaccins classiques, fondés sur des souches atténuées ou inactivées, présentent certains inconvénients limitant leur utilisation. Tout d'abord, les souches atténuées présentent un risque de réversion et de réacquisition de leur pathogénicité initiale et pour certaines, un pouvoir pathogène résiduel non négligeable. Les vaccins à agents inactivés sont généralement moins immunogènes et induisent essentiellement une réponse humorale. L'utilisation de l'un ou de l'autre de ces type des vaccins pose aussi le problème de la différentiation entre un animal infecté et un animal vacciné. Des alternatives sont ainsi recherchées.

L'intérêt prêté aux poxvirus vient du fait que ce sont des outils aisément manipulables, capables d'exprimer des transgènes et d'induire une forte réponse immunitaire, à la fois humorale et cellulaire, contre le produit d'un transgène d'intérêt.

Tout l'enjeu actuel est de combiner l'efficacité et la sécurité d'emploi du vecteur vaccinal.

# 1. Méthodes générales de production, avantages et limites d'emploi

Les poxvirus présentent de nombreuses caractéristiques très avantageuses pour le développement de vecteurs vaccinaux. En effet, comme nous l'avons précédemment évoqué dans la première partie, le cycle réplicatif de cette famille de virus est exclusivement cytoplasmique ce qui leur confère une sécurité d'emploi non négligeable, en évitant l'intégration de séquences d'ADN étranger dans le propre génome de la cellule infectée. Ces virus ont de plus la capacité d'intégrer une grande quantité d'ADN étranger (jusqu'à 25 kb) dans leur génome par recombinaison homologue. En effet, ils possèdent toute la machinerie nécessaire à cette réaction.

Ces virus sont aussi capables d'exprimer correctement ces transgènes. En effet, en mettant sous contrôle d'un promoteur poxviral d'intérêt le gène choisi, celui-ci sera correctement transcrit par les ARN polymérases virales et l'ARNm sera ensuite pris en charge par la machinerie cellulaire de traduction. Les promoteurs poxviraux sont interchangeables. Leur



**Figure 11: Méthode de construction de poxvirus recombinés.** Après transfection par le plasmide de transfert de cellules infectées, deux évènements de recombinaison entre les séquences homologues du plasmide de transfert et de l'ADN viral parental sont nécessaires pour l'obtention d'un poxvirus recombiné.

structure est conservée entre tous les poxvirus. De plus des promoteurs synthétiques efficaces peuvent être utilisés.

Le principe d'obtention des poxvirus recombinants est commun à tous les genres utilisés et s'appuie sur les caractéristiques particulières des *Poxviridae*.

# -a- Méthodes de production

La méthode la plus répandue pour l'obtention de poxvirus recombinés consiste à infecter/transfecter des cellules avec le poxvirus d'intérêt et un plasmide de transfert (Figure **11**). Ce plasmide de transfert possède le gène d'intérêt sous contrôle d'un promoteur poxviral. Cette cassette est insérée dans un fragment cloné du génome viral. Lorsqu'une cellule est à la fois infectée et transfectée les régions d'ADN identiques (en l'occurrence les fragments d'ADN poxviraux clonés dans le plasmide de transfert et présents sur le génôme viral) peuvent recombiner entre elles de façon à générer un génome viral ayant intégré l'ensemble de l'ADN étranger. Deux événements de recombinaison de part et d'autre de l'ADN étranger sont donc nécessaires pour la production de ce nouveau génome viral. Ces événements de recombinaison, et à fortiori deux, sont rares, il est donc nécessaire d'insérer en même temps que l'ADN étranger d'intérêt soit une cassette de sélection soit un gène marqueur afin d'isoler le poxvirus recombiné. Les gènes permettant cela sont aussi soumis à la « loi poxvirale », à savoir ils seront mis sous contrôle d'un promoteur poxviral. L'avantage sélectif du virus recherché peut être directement donné par la résistance à l'acide mycophénolique (E. co gpt) ou encore la résistance à la géniticine. D'autres gènes marqueurs permettent la visualisation directe des plages de lyse contenant le virus recombiné: production de β-galactosidase (gène *LacZ*, coloration bleue), production de  $\beta$ -glucuronidase (gène *gus*, coloration bleue) ou encore détection par la production de protéine fluorescente telles que la GFP (Green Fluorecent Protein) ou le DsRed. D'autres méthodes peuvent être utilisées, en particulier celle reposant sur la sélection basé sur l'absence de la TK (Thymidine Kinase) (Mackett et al., 1982; Mackett et al., 1984). La TK est capable de phosphoryler le 5-bromodeoxyuridine (BUdR) ce qui devient toxique pour la cellule. Ce système de sélection nécessite la génération d'une lignée cellulaire TK-, puisque la TK cellulaire est elle aussi capable de phosphoryler le BUdR. Ainsi, lors d'infection de cellules TK-, les virus TK+ (souche sauvage) rendront les cellules sensibles au BUdR, tandis que les virus recombinés TK- pourront se répliquer.

#### -b- Avantages

De nombreux avantages font des poxvirus des outils de choix pour le développement de vecteur vaccinaux. Tout d'abord, tous possèdent un cycle de réplication strictement cytoplasmique, ce qui évite d'éventuelles complications liées à l'insertion d'ADN dans le génome de la cellule hôte. Le génome de grande taille tolère l'insertion de grandes quantités d'ADN étrangers (plus de 25 kb) (Smith & Moss, 1983), ainsi que la délétion de gènes non essentiels (Panicali et al., 1981). Les poxvirus possèdent leur propre machinerie de transcription et sont donc autonomes. Un gène mis sous la dépendance d'un promoteur poxviral sera correctement transcrit au cours du cycle viral. Les modifications posttraductionnelles de la protéine recombinante sont très proches de celles de la protéine native, et son activité est en général parfaitement conservée (Hruby, 1990). Les transcrits viraux ne sont ni épissés, ni transportés vers le cytoplasme de la cellule: ceci évite donc l'insertion de séquence régulatrice pour ces deux mécanismes, ce qui est particulièrement intéressant dans le cadre d'expression d'ADNc ou de gènes bactériens. Parallèlement à ces caractéristiques purement moléculaires, des avantages quant à la production de vaccin font aussi des poxvirus des candidats attractifs. En effet, le coût de production de la plupart des poxvirus est faible. Ceci est plus particulièrement vrai pour le virus de la vaccine qui est capable de se répliquer dans de nombreuses lignées cellulaires. De plus, les poxvirus recombinants étant des vaccins vivants, la dose protectrice minimale est plus faible qu'avec d'autres systèmes de vaccination (antigène seul, ...). Les poxvirus sont en général très stables: ils supportent la congélation, la lyophilisation et la réhydratation sans perte importante du pouvoir infectieux. Ceci les rend particulièrement adaptés à la vaccination de masse. Les poxvirus sont en plus facile à administrer: scarification ou voie intradermique suffisent et il est aussi possible dans certains cas d'utiliser la voie orale (Blancou et al., 1986).

#### -c- Limites

Les poxvirus utilisés pour la vaccination sont des virus vivants et de ce fait, ils finissent fatalement par détruire les cellules infectées. Ils ne peuvent donc être utilisés que pour l'expression transitoire d'antigènes. Ceci étant, c'est surtout la pathogénicité résiduelle qui pose problème et particulièrement chez l'homme avec l'utilisation du virus de la vaccine. Ceci est encore plus vrai dans le cas d'utilisation d'un tel vecteur chez des individus

immunodéprimés, infectés par le HIV chez lesquels peuvent se produire d'éventuelles complications post-vaccinales. De plus, avec les campagnes de vaccination anti-varioliques, certaines populations peuvent développer une réaction immunitaire contre le vecteur et de ce fait affaiblir la capacité vaccinale du virus recombiné.

# 2. Sites d'insertion d'ADN étranger

Les sites d'insertion de séquences d'ADN d'intérêt jouent aussi un rôle important dans la stratégie vaccinale fondée sur les vecteurs poxviraux. Ainsi, différents choix s'offrent: l'insertion intergénique, l'insertion dans un gène ou un locus non essentiel, l'insertion dans un gène essentiel ou encore la fusion avec une protéine virale.

# -a- insertion intergénique

Une des stratégies d'insertion de transgènes consiste à intégrer le ou les gènes d'intérêt au niveau d'une zone intergénique. Ainsi, les caractéristiques initiales du virus vecteur ne sont pas modifiées. Cette stratégie n'est pas facilement envisageable dans le cas de construction d'un virus myxomateux recombinant puisque le virus ne possède que très peu de régions non codantes et non régulatrices. Ces régions contiennent notamment les promoteurs ou les terminateurs de transcription (Cameron et al., 1999).

-b- insertion dans un gène ou un locus non essentiel

L'insertion d'ADN étranger dans un site non essentiel à la réplication virale est la stratégie la plus couramment employée. Une grande variété de sites d'insertion a été mise en évidence et se localisent, pour la majorité, proche des terminaisons génomiques, principalement parce que les gènes qui y sont situés sont non essentiels au cycle viral (Smith and Mackett, 1992). Au total, ce sont près de 55 ORFs du génome du virus de la vaccine qui ont été délétées sans perte d'infectiosité (Perkus et al., 1991).

Il est important de noter que cette insertion n'est pas essentielle pour la réplication virale *in vitro* mais qu'en revanche, elle peut influer sur la pathogénicité *in vivo* et renforcer l'innocuité

du vecteur viral. Même si la virulence peut être largement atténuée, l'immunogénicité quand à elle reste souvent presque identique (Lee et al., 1992; Smith & Mackett, 1992). Deux sites d'insertion sont les plus couramment utilisés pour le MYXV: les gènes de la

#### La thymidine kinase (TK)

thymidine kinase (TK) et MGF/M11L.

Le locus TK du virus de la vaccine fut initialement choisi parce que ce gène est non essentiel au cycle viral. Ce gène présente aussi un intérêt majeur puisqu'un système de sélection basé sur l'absence d'expression de la TK a été développé (Mackett et al., 1982, Mackett et al., 1984). Nous l'avons évoqué précedemment dans le paragraphe 1-a-. Des études sur le virus de la vaccine TK- ont montré une atténuation du pouvoir pathogène lors d'infection de souris Balb/CByJ (Buller et al., 1985). Cela suggère que la TK doit jouer un rôle majeur lors d'infection *in vivo*. Le gène de la TK est un gène conservé parmi les poxvirus. En ce qui concerne la TK du virus myxomateux, l'influence de la délétion sur l'expression du pouvoir pathogène *in vivo* n'a pas encore été étudiée de façon précise.

#### Le locus MGF/M11L

Ce locus du génome du MYXV est constitué de deux ORFs chevauchantes: M10L (MGF pour Myxoma Growth Factor) et M11L. Les deux produits de ces gènes sont non essentiels à la réplication virale, en revanche la délétion de l'un des deux gènes, et à fortiori des deux à la fois, provoque une diminution importante de la virulence (Opgenorth et al., 1992). Nous ne reviendrons pas sur les caractéristiques moléculaires de la protéine M11L et son rôle dans le contrôle de l'apoptose, déjà présenté dans la section « contournement de l'apoptose » de l'introduction bibliographique. Concernant MGF, cette protéine est l'homologue de l'EGF cellulaire (Epidermal Growth Factor). Ce facteur est responsable de la régulation de la prolifération et de la différentiation (Laurence & Gusterson, 1990). Des homologues poxviraux ont été identifiés : le VGF chez le VACV, le VaGF pour le virus de la variole, le SFGF pour le virus du fibrome de Shope et bien sûr le MGF chez le MYXV (Brown et al., 1985, Chang et al., 1987, Upton et al., 1987).

#### -c- insertion dans un gène essentiel

Insérer de l'ADN étranger dans un gène essentiel conduit à la génération d'un vecteur nonréplicatif strict. Cela implique obligatoirement un défaut de production virale même *in vitro*. Pour compenser cela, la transcomplémentation est nécessaire et impose la génération d'une lignée cellulaire produisant la protéine déficitaire. Les difficultés techniques et les caractéristiques de tropisme et de spectre d'hôte de certains poxvirus expliquent que cette stratégie n'a jamais été utilisée en vaccination fondée sur les vecteurs poxviraux.

## -d- fusion avec une protéine virale

La majorité des vaccins fondés sur des vecteurs poxviraux produit des antigènes cytoplasmiques, sécrétés ou encore exprimés à la surface des cellules infectées. De nouvelles approches pour augmenter le niveau de la réponse immunitaire sont toujours recherchées et récemment une nouvelle stratégie fondée sur l'incorporation d'antigène étranger au niveau de la particule poxvirale a été envisagée (Katz & Moss, 1997; Barchichat & Katz, 2002). L'augmentation du niveau de la réponse immunitaire par l'expression d'antigènes étrangers directement sur la particule virale a déjà été démontré dans d'autres systèmes (Allsopp et al., 1996; Evans et al., 1988; Mandl et al., 1998; Ulrich et al., 1998; Kusov et al., 2007). Par exemple, un virus de l'hépatite B portant des antigènes étrangers induit une immunité protectrice, à la fois humorale et cellulaire contre les antigènes insérés (Ulrich et al., 1998). En ce qui concerne les poxvirus, les seules études réalisées à ce jour concernent des virus de la vaccine recombinés exprimant des antigènes du HIV-1 fusionnés à la protéine B5R des virions EEV. Il a ainsi été montré qu'une meilleure réponse immunitaire spécifique du produit du transgène, à la fois humorale et cellulaire CD4+, s'instaurait (Katz & Moss, 1997; Kwak et al., 2004). Cette stratégie a permis de conférer une protection partielle contre une épreuve hétérologue sur un modèle souris (Kwak et al., 2004).

## 3. Exemples des vecteurs poxviraux

# -a- virus de la vaccine et dérivés

Le virus de la vaccine est le prototype de la famille des *Poxviridae*. Il a notamment été utilisé pour l'éradication de la variole (WHO, 1980). Ce virus est le plus attrayant de part sa facilité de production: cycle réplicatif relativement court entre 8 et 12h permettant d'obtenir des stocks importants de virus rapidement, il peut être purifié plus facilement que la plupart des autres poxvirus. Il permet le développement d'une immunité humorale et cellulaire contre l'antigène d'intérêt. Cependant, il a été la cause de nombreux accidents post-vaccinaux avec notamment des troubles neurologiques importants et même des décès.

Certains poxvirus possèdent des spectres d'hôtes très étroit *in vitro* et *in vivo*. C'est notamment le cas d'une souche non réplicative du virus de la vaccine, le MVA (Modified VACV strain Ankara). Ce virus a été obtenu par atténuation suite à des passages successifs sur cellules d'embryons de poulet. Elle est délétée pour une vingtaine de gènes, d'autres sont incomplets et certains sont modifiés par des mutations ponctuelles, tant est si bien que le virus est non réplicatif dans quasiment toutes les lignées cellulaires, à l'exception de la lignée BHK-21 (une lignée de cellules de reins de hamster) et une lignée de cellules de singes MA104. De façon tout à fait intéressante, elle n'est pas pathogène pour les animaux immunodéprimés comme peut l'être le virus de la vaccine. Ainsi, ce virus est particulièrement adapté à une stratégie vaccinale fondée sur l'emploi d'un vecteur non réplicatif. Cependant, il n'est pas forcément le poxvirus de choix, puisqu'il n'est pas capable de réaliser certaines glycosylations importantes qui ont lieu dans les cellules infectées avec une souche classique du virus de la vaccine (Sanger et al., 2001). De plus, une immunité résiduelle peut être présente chez certains individus, notamment toute la population humaine vaccinée avec le virus de la vaccine, posant le problème d'interférence de vaccination.

Une autre souche atténuée dérivée du virus de la vaccine a été mise au point. Il s'agit de la souche NYVAC obtenue par délétion ciblée de 18 gènes non essentiels à la culture *in vitro*. Les produits de ces gènes sont connus pour être impliqués dans le pouvoir pathogène (thymidine kinase, ribonucléotide réductase) ou encore le spectre d'hôte (K1L, C7L). Cette

souche est capable de se multiplier sur cellules Vero mais pas sur cellules humaines et présente une forte atténuation lors d'essai *in vivo*.

Il existe une autre souche dérivée du virus de la vaccine pour laquelle seul le gène D4R est absent. Cette souche a été obtenue grâce à une lignée cellulaire transcomplémentant la protéine virale D4R. Le gène D4R code pour une uracile ADN glycosylase, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN. Cette activité n'est pas essentielle au cycle viral, et la nécessité d'utiliser une lignée transcomplémentante indique que cette protéine possède une ou plusieurs autres fonctions encore inconnues qui elles sont nécessaires au cycle viral. Malgré son caractère déficient attractif, cette souche présente des propriétés similaires au MVA pour la vaccination (Ober et al., 2002).

## -b- Avipoxvirus

Les *Avipoxvirus*, Canarypox virus ou fowlpox virus, sont des virus spécifiques d'oiseaux et peuvent être utilisés, en plus de leurs indications usuelles chez les espèces aviaires (vaccination contre les varioles aviaires ou vecteurs vaccinaux réplicatifs), en tant que vecteurs vaccinaux non réplicatifs chez les mammifères.

Ainsi, un *Canarypox virus* recombinant exprimant les protéines codées par les régions GAG-ENV du virus de la leucose féline est actuellement sur le marché pour la vaccination des chats. Un autre exprimant la protéine HA est utilisé pour vacciner les chevaux contre la grippe. Des essais de vaccination des ovins avec un Canarypox virus co-exprimant les protéines VP2 et VP5 de la capside externe du virus de la fièvre catharrale ovine ou Bluetongue ont pu montrer une bonne efficacité de protection face à une épreuve virulente (Boone et al., 2007).

## -c- Capripox virus

Le l*umpy skin disease virus*, un capripox virus restreint aux ruminants, a initialement été employé chez les ruminants comme vecteur vaccinal réplicatif (Diallo et al., 2002). Il a été testé avec succès pour la vaccination d'autres espèces animales (Aspden et al., 2003). En effet, un virus recombiné exprimant la glycoprotéine du virus de la rage a été inoculé à des lapins et des souris. Les souris vaccinées sont protégées d'une épreuve virulente (Aspden et al., 2003).

-d- le virus de la myxomatose

En ce qui concerne le virus de la myxomatose, un virus atténué recombinant exprimant la protéine de capside VP60 du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV) a été testé avec succès pour la double protection à la fois contre la myxomatose et la RHD (Bertagnoli et al., 1996). De plus, un essai concluant de vaccination a été réalisé chez le chat contre la calicivirose féline en utilisant un virus myxomateux atténué exprimant la protéine de capside du virus de la calicivirose féline (McCabe et al., 2002; McCabe & Spibey, 2005).

# Résultats

Jusqu'à présent, la plupart des vaccins destinés aux ruminants utilisent des souches atténuées d'agents pathogènes. Cela pose deux problèmes. Tout d'abord, la différenciation sérologique entre animaux vaccinés et infectés ne peut être réalisée. Deuxièmement, l'utilisation de vaccins à agents vivants atténués peut être considérée comme peu sûre d'emploi. En effet, la souche vaccinale peut conserver un pouvoir pathogène résiduel limitant son emploi, ou encore une réversion plus ou moins complète du pouvoir pathogène ne peut être exclue.

Le développement de vaccins recombinés non réplicatifs chez les ruminants pourrait ainsi être utile à la mise en place des stratégies DIVA (Differentiated between Infected and Vaccinated Animals) et à l'optimisation de la sécurité d'emploi. Dans ce cadre, l'utilisation des poxvirus comme base de ces nouveaux vaccins recombinés est bien connue avec notamment les différentes souches modifiée du virus de la vaccine (MVA, NYVAC), ou encore les Avipoxvirus (Fowlpox virus et Canarypox virus). La volonté d'améliorer les protocoles vaccinaux, en particulier en alternant les vecteurs, a abouti à la recherche de nouveaux poxvirus vecteurs pouvant être une alternative aux précédents. Parmi ces poxvirus, se trouve le virus de la myxomatose. Des souches atténuées du MYXV recombinées se sont révélées efficaces pour la vaccination des lapins, hôtes naturels, à la fois contre la myxomatose, mais aussi contre la maladie hémorragique virale du lapin (Bertagnoli et al., 1996; Barcena et al., 2000). De plus, récemment, le MYXV a été utilisé avec succès pour la vaccination d'espèce non-hôte, en l'occurrence le chat, et ce contre la calicivirose féline (McCabe et al., 2002; McCabe & Spibey, 2005) Considérant l'efficacité du vecteur myxomateux dans le cadre d'une vaccination/protection chez une espèce non-hôte, nous nous sommes fixés comme objectif de développer des vaccins fondés sur des virus de la myxomatose recombinés chez les ruminants et en premier lieu en application à la vaccination contre la fièvre catarrhale ovine (FCO) ou Bluetongue.

Les résultats présentés vont se décliner en quatre parties : une première partie concernant l'étude de l'interaction entre le MYXV et les cellules de ruminants et les premiers éléments *in vivo*, une seconde partie consacrée aux résultats obtenus lors d'études *in vivo* de vaccination-
protection contre la Bluetongue chez les ovins, une troisième partie décrivant les résultats obtenus lors de l'étude de l'infection de cellules dendritiques ovines par le MYXV et pour finir une quatrième partie traitant de l'amélioration du virus myxomateux en tant que vecteur vaccinal.

## A. Interactions MYXV-ruminants

## 1. Introduction

Quelque soit le vecteur viral utilisé dans le cadre d'une stratégie vaccinale, il est nécessaire de vérifier sa sécurité d'emploi, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les systèmes virus-cellules *in vitro* sont d'excellents modèles pour l'étude des interactions cellulaires et moléculaires mais apportent peu d'éléments pour la compréhension des réponses immunitaires induites et pour l'anticipation des effets secondaires. Sachant que le principal objectif des programmes de vaccination est le développement de vaccins combinant l'innocuité et l'efficacité, ces systèmes doivent être complétés par des études *in vivo*.

L'utilisation du MYXV en tant que vecteur vaccinal sûr et compétent chez une espèce nonhôte nécessite une évaluation de cette restriction d'hôte et de sa capacité à générer une réponse immune. Même si le spectre d'hôte du MYXV est restreint aux *Leporidae in vivo* (Fenner, 1994), le virus est capable de se répliquer *in vitro* dans certaines lignées cellulaires d'espèce non-hôte telles que les cellules de singes (BGMK) ou encore certaines cellules cancéreuses humaines (Sypula et al., 2004). Aucune information n'est disponible dans la littérature concernant l'interaction entre le MYXV et des cellules de bovins et d'ovins, ce qui a motivé notre étude.

## 2. Résultats

#### -a- Tropisme chez les bovins

L'étude présentée s'est attachée à caractériser l'infection de lignées cellulaires (cellules KOP-R, BT, et MDBK) ou de leucocytes de bovins (PBMC) par deux souches du MYXV (la souche sauvage T1 et la souche vaccinale SG33). Nous avons montré que le MYXV est non-réplicatif dans les trois lignées cellulaires testées. En effet, les deux souches du MYXV sont incapables de se propager au cours de passages successifs. Un marquage  $\beta$ -Galactosidase après infection des cellules KOP-R, BT et MDBK par des virus recombinés T1-TK::LacZ ou SG33-LacZ, exprimant le gène *lacZ* sous contrôle du promoteur tardif P11 du virus de la vaccine, nous montre que les cellules KOP-R et BT permettent la production de gènes viraux tardifs alors que ce n'est pas le cas pour les cellules MDBK infectées (aucun marquage n'est observé). Dans tous les cas, nous avons détecté la production de gènes viraux précoces.

Les cellules marquées sont des cellules isolées que ce soit à une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 0,1 ou 1 et ce 24 h post infection (p.i.). Combinés aux résultats obtenus avec l'expérience de propagation virale sur plusieurs passages, nous confirmons que les souches T1 et SG33 du MYXV ne sont pas capables de se répliquer dans ces cellules bovines.

Nous avons caractérisé l'infection des cellules BT en microscopie électronique. Nous avons observé que la pénétration virale est moins efficace que dans les cellules de lapins, puisque de nombreux virions adsorbés à la membrane cellulaire sont toujours présents même au bout de 24 h p.i. et peu de cellules sont infectées. Nous avons observé très peu d'évènement de déshabillage viral. De larges zones dépourvues d'organites et contenant des particules denses aux électrons sont présentes dans les cellules BT infectées et sont observées 5 h p.i.. Les virions immatures sont observés 12 h p.i. soit 4 h plus tard que dans les cellules permissives RK13, et ces virions de types IEV sont très rarement observés. Quant aux IMV et au relarguage des virions CEV et EEV, nous n'en avons pas détecté.

Nous avons ensuite comparé l'infection de cellules périphériques mononuclées du sang (PBMC) de bovins, activées ou non, par des virus recombinés T1 ou SG33 exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP). Les cellules activées sont plus « infectables » que les cellules non activées. En effet, le pourcentage de cellules GFP positives est plus important après activation (2,4 % et 5,1 % pour le T1-Serp2-GFP et le SG33-GFP respectivement) que sans activation (1,2 % et 0,8 % pour le T1-Serp2-GFP et le SG33-GFP respectivement). Enfin, l'étude de la cinétique de réplication indique que les deux souches virales (T1 et SG33) ne se répliquent pas, que les cellules soient activées ou non.

## ARTICLE # 1

<u>Béatrice Pignolet</u>, Jean-Luc Duteyrat, Aude Allemandou, J. Gelfi, Gilles Foucras, and Stéphane Bertagnoli<sup>1</sup>

# In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains

## Short report

**Open Access** 

## In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains

Béatrice Pignolet<sup>1</sup>, Jean-Luc Duteyrat<sup>1,3</sup>, Aude Allemandou<sup>1,3</sup>, Jacqueline Gelfi<sup>1</sup>, Gilles Foucras<sup>2</sup> and Stéphane Bertagnoli<sup>\*1</sup>

Address: <sup>1</sup>Laboratory « Interactions Hôtes-Virus et Vaccinologie », UMR 1225 INRA-ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des capelles, Toulouse F-31076, France, <sup>2</sup>laboratory « Résistome des ruminants », UMR 1225 INRA-ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des capelles, Toulouse F-31076, France and <sup>3</sup>Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie, Faculté de Médecine de Rangueil, 133 route de Narbonne, Toulouse, F-31062, France

Email: Béatrice Pignolet - b.pignolet@envt.fr; Jean-Luc Duteyrat - jlucduteyrat@yahoo.fr; Aude Allemandou - aude.allemandou@wanadoo.fr; Jacqueline Gelfi - j.gelfi@envt.fr; Gilles Foucras - g.foucras@envt.fr; Stéphane Bertagnoli\* - s.bertagnoli@envt.fr \* Corresponding author

> Received: 7 August 2007 Accepted: 27 September 2007

Published: 27 September 2007

Virology Journal 2007, 4:94 doi:10.1186/1743-422X-4-94

This article is available from: http://www.virologyj.com/content/4/1/94

© 2007 Pignolet et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<u>http://creativecommons.org/licenses/by/2.0</u>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### Abstract

Myxoma virus (MYXV), a leporide-specific poxvirus, represents an attractive candidate for the generation of safe, non-replicative vaccine vector for non-host species. However, there is very little information concerning infection of non-laboratory animals species cells with MYXV. In this study, we investigated interactions between bovine cells and respectively a wild type strain (T1) and a vaccinal strain (SG33) of MYXV. We showed that bovine KOP-R, BT and MDBK cell lines do not support MYXV production. Electron microscopy observations of BT-infected cells revealed the low efficiency of viral entry and the production of defective virions. In addition, infection of bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) occurred at a very low level, even following non-specific activation, and was always abortive. We did not observe significant differences between the wild type strain and the vaccinal strain of MYXV, indicating that SG33 could be used for new bovine vaccination strategies.

#### Background

Until now, most of the ruminant vaccines use attenuated strains of pathogens, and for that reason, naturally infected and vaccinated animals cannot easily be differentiated. Development of recombinant vaccines for ruminant species would help to implement vaccine policies. The development of poxviruses as vectors for producing recombinant vaccines is well documented [1-6]. Although vaccinia virus was the first and most extensively developed poxvirus vector, concerns over its use in immunocompromised persons and its broad host-range specificity [7] had led to search for alternative poxviruses which might prove more suitable vectors. Myxoma virus (MYXV), a leporipoxvirus causing myxomatosis, a highly lethal disease of European rabbit, could be an interesting tool for animals vectored vaccination. MYXV attenuated strains were shown to be efficient vaccine vector to vaccinate its natural host against both myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease [8,9]. Recently, MYXV was successfully developed as a non replicative vector to vaccinate cats against feline calicivirus [10,11]. However, for each target species, evaluation of host restriction is of importance for the development of safe and potent vaccine vectors. MYXV is reported to be restricted to rabbits *in vivo* [12] and to replicate *in vitro* in some non natural host cell lines such as simian BGMK and some cancer cells [13]. No information concerning interactions between MYXV and bovine cells is available yet. In this study, we characterized the infection of bovine cell lines and bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with MYXV. By comparing two different MYXV strains (a wild-type strain (T1) and a cell-cultured attenuated vaccinal strain (SG33) [14]) we verified the stability of the viral tropism *in vitro*.

#### **Findings**

Three bovine cell lines were tested for MYXV permissivity: KOP-R cells (RIE 244, CCLV Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals, Island Riems), BT cells (ATCC CRL-1390) and MDBK cells (ATCC CCL-22). Each cell line was infected at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 1 and cultured for 72 h. Then, infected cells were lysed by three freeze/thaw cycles. One fifth of each cell lysate was inoculated to new cells and further incubated for 72 h. Virus productions were determined by serial dilutiontitration of each cell lysate on permissive rabbit RK13 cells (ATCC CCL-37) (Figure 1A).

In RK13 cells, used as positive control, we observed a high virus titer maintained over the three passages for both MYXV strains (Figure 1A). In contrast, in the bovine cell lines, viral titers decreased during the three passages for both T1 and SG33 (Figure 1A). After three passages we measured a low virus titer for KOP-R, BT and MDBK indicating that both strains are not able to spread over serial passages.

To confirm these results, we infected the bovine cell lines or RK13 cells with T1 or SG33 recombinant viruses expressing the LacZ reporter gene driven by the late poxviral P11 promoter. Figure 1B shows the results obtained with the T1 recombinant virus. In bovine KOP-R and BT cell lines, at m.o.i. 0.1 or 1, only sparse infected cells were observed ( $\beta$ -galactosidase positive cells), whereas in



#### Figure I

**Permissivity of bovine cell lines for myxoma virus.** Bovine cells were maintained in DMEM (KOP-R and BT) or MEM (MDBK) supplemented with 10 % foetal calf serum (FCS). **A.** Virus production in different bovine cell lines over three passages. Cells were first inoculated with either T1 (top) or SG33 (bottom) MYXV strain at a m.o.i. of 1, washed, cultured in DMEM, 5 % FCS for 3 days and frozen (P1). In subsequent infections, 1/5 of the material from the previous frozen culture was used for infection (P2 and P3). Titers were determined by serial dilution-titration on RK13 cells. The values correspond to a mean of at least two independent experiments. Error bars correspond to the standard error of the mean. **B.** Rabbit and bovine cells were infected with the T1-TK::LacZ (m.o.i. of 0.1 and 1). Twenty-four hours p.i., they were fixed with 2.5 % glutaraldehyde for 15 minutes at room temperature and stained with 2 mg/ml X-Gal in 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in PBS for 4–10 hours and observed by microscopy. Microscope: Leica; Magnification: 100.

MDBK cells, no  $\beta$ -galactosidase labelled cell was present, indicating no expression of late viral protein. However, early viral proteins could be detected (data not shown). Similar results were observed using SG33 (data not shown).

We next performed an electron microscopy study in MYXV infected BT cells (Figure 2). BT cell monolayers were infected with T1 at a m.o.i. of 8. Five, 8, 12 and 24 hours following infection, cells were fixed and processed for electron microscopy as previously described [15]. We observed a lot of virions adsorbed on the cell surface, throughout the kinetic (Figure 2A, and not shown). Viral penetration appeared to be less efficient than with permissive cells [15]. Five hours post-infection (p.i.), we could observe very rare uncoating figures in the cytoplasm and large areas free from organites, containing electron-dense particles (Figure 2B). The first immature virions (IV) could be observed from 12 h p.i. only, 4 hours later than in permissive cells [15]. Most of these IV had an atypical electron-dense aspect characterized by an irregular and not well-defined membrane (Figure 2C). Intracellular enveloped virions (IEV) (Figure 2D) could rarely be observed and no intracellular mature virion (IMV) was detected. Enveloped mature virions (CEV, EEV) release was not detected. These results suggest that in addition to poor penetration efficiency, the late steps of viral maturation are impaired in BT cells.



#### Figure 2

Electron microscopy observations of MYXV BT

infected cells. A. Numerous virions are still adsorbed on the cell surface 8 h p.i.. **B.** Large cytoplasmic area without organite containing dense particles (5 h p.i.). **C.** Atypical Immature Virion (IV) (12 h p.i.). **D.** Intracellular Enveloped Virion (IEV) (12 h p.i.). Microscope: Hitachi UI12A, Magnifications, **A**: 35000; **B**: 15000; **C** and **D**: 90000. To evaluate MYXV infection in blood primary bovine cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were infected. Bovine blood was collected in EDTA tubes, diluted (1:2), loaded on a density gradient (FicollPaque Plus, Amersham) and centrifugated at 900 g for 20 minutes. PBMC were then harvested, washed in PBS, recovered by centrifugation at 870 g for 10 minutes and cultured. To detect infected cells by flow cytometry, we used a recombinant SG33 virus expressing the enhanced green fluorescent protein (GFP) under the control of strong early/late vaccinia virus P7.5 promoter. The GFP encoded gene was inserted into the M11L/MGF locus. We also used the T1-Serp2-GFP recombinant virus which expresses the fused protein Serp2-GFP.

Resting PBMC were infected with T1-Serp2-GFP or SG33-GFP at a m.o.i. of 1 (Figure 3A). Cells were collected 16 h p.i., and infection levels were determined by counting living GFP-positive cells (Figure 3A). We observed that only a small fraction of bovine PBMC was susceptible to MYXV infection. An average of 1.2 % and 0.8 % of GFP-positive resting cells was detected for T1-Serp2-GFP and SG33-GFP respectively (Figure 3B). As activation may be required to allow infection by poxviruses [16], chemically-activated bovine PBMC were also infected at the same m.o.i.. The percentage of GFP-positive cells remained low following activation, as only 2.4 % and 5.1 % for T1-Serp2-GFP and SG33-GFP of positive cells were detected respectively (Figure 3B). The infection level remained below 5 % with an m.o.i. up to 10 (data not shown). In contrast to the infection level in activated rabbit PBMC (about 50 % of infected cells) (data not shown), activation have very low effect on bovine leukocytes infection with MYXV.

In activated bovine PBMC, T1 or SG33 production was analyzed by infection at a m.o.i. of 1, and virus titration on RK13 cells (Figure 3C). No significant increase of viral titers between 0 h and 72 h p.i. was noticed indicating that activated bovine PBMC are not permissive to MYXV infection.

### Conclusion

In this study, we investigated the interactions between bovine cells (cell lines and PBMC) and MYXV wild type (T1) strain or vaccinal (SG33) strain. In bovine cell lines, serial viral passages analysis and infection with both T1 and SG33 expressing LacZ gene showed that these cells failed to support spread of either MYXV strain. Electron microscopy study of BT-infected cells enabled us to identify at least two blocking events, the first one involving virus entry. Indeed, we observed many viral particles adsorbed on the cell surface throughout the experiment but very few infected cells. This result indicates that MYXV can bind to the cell surface, but enters the cells with low efficiency. The second blocking event involves the final



#### Figure 3

**Infection of bovine PBMC**. PBMC were isolated from bovine (Holstein Breed) whole blood on Ficoll density gradient and cultured with RPMIc containing RPMI 1640 with Glutamax, 25 mM Hepes (Gibco-BRL) supplemented with 10 % FCS, 1 % sodium pyruvate, 1 % non essential amino acids, 1 % β-mercapto-ethanol, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. When indicated, cells were activated 4 h before infection, using 125 ng/ml of phorbol myristate acetate and 50 ng/ml of ionomycine. To determine cell viability, propidium iodide (BD Biosciences Pharmingen) was added at 1 µg/ml just before acquisition. Acquisition was performed using a FACScalibur (Becton Dickinson). Dead cells and debris were excluded by appropriate gating and 30000 events were collected. Analysis was performed using CellQuestPro and Flowjo Software. **A.** Cells were infected at m.o.i. of 1 (T1-Serp2-GFP or SG33-GFP) and collected 16 h p.i.. Results shown are representative of three experiments. **B.** Cells were infected at m.o.i. of 1 (T1-Serp2-GFP or SG33-GFP), collected 16 h p.i and analyzed for GFP expression by flow cytometry. The percentages indicated represent an average of at least 3 independent experiments. Errors bars correspond to the standard error of the mean. **C.** PBMC were inoculated with T1 or SG33 (m.o.i. = 1), adsorption occurring 90 min at 4°C. Cells were washed twice and cultured. Virus productions at 0 h or 72 h post-infection were determined by serial dilution-titration on RK13 cells. The experiment was repeated three times. Error bars correspond to the standard error of the mean.

steps of virus maturation, as numerous electron dense particles, similar to those already described in non-permissive cells infected with MVA [17-20] were present. In addition, very few IEV particles and no mature virions could be observed. As already suggested, these dense particles are more likely the products of defective virions morphogenesis [20]. The very low level and abortive infection of bovine PBMC make it impossible for MYXV to disseminate via leukocytes in these animal species. Taken together, these results are compatible with the potential use of the SG33 MYXV strain as a safe non replicative vector for bovine vaccination.

#### **Competing interests**

The author(s) declare that they have no competing interests.

#### **Authors' contributions**

BP conducted all the experiments, except electron microscopy analyses. JLD, AA and JG performed electron microscopy studies. GF contributed to PBMC infection studies. GF and SB coordinated the research. BP and SB wrote the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

#### **Acknowledgements**

BP was supported by a grant from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), the Agence Française de la Sécurité Sanitaire Alimentaire (AFSSA) and ANR Génanimal 2006 "VacGenDC project".

The authors are especially grateful to Martine Deplanche, Martine Moulignié, Brigitte Peralta and Josyane Loupias for excellent technical assistance, Jean-Philippe Nougareyde for critical reading of the manuscript.

#### References

- Kieny MP, Lathe P, Drillien R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, Wiktor T, koprowski H, Lecocq JP: Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature 1984, 312:163-166.
- Taylor J, Paoletti E: Fowlpox virus as a vector in non-avian species. Vaccine 1988, 6:466-8.
- Taylor J, Weinberg R, Languet B, Desmettre P, Paoletti E: Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in nonavian species. Vaccine 1988, 6:497-503.
- Tartaglia J, Jarrett O, Neil JC, Desmettre P, Paoletti E: Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. J Virol 1993, 67:2370-2375.
- Moss B, Carroll MW, Wyatt LS, Bennink JR, Hirsch VM, Goldstein S, Elkins WR, Fuerst TR, Lifson JD, Piatak M, Restifo NP, Overwijk W, Chamberlain R, Rosenberg SA, Sutter G: Host range restricted, non replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. Adv Exp Med Biol 1996, 397:7-13.
- Aspen K, Passmore J, Tiedt F, Williamson A: Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-defecient vaccine vector. J Gen Virol 2003, 84:1985-1996.
- Redfield RR, Wright DC, James WD, Jones TS, Brown C, Burke DC: Disseminated vaccinia in military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. N Engl J Med 1987, 316:673-676.
- Bertagnoli S, Gelfi J, Le Gall G, Boilletot E, Vautherot J, Rasschaert D, Laurent S, Petit F, Boucraut-Baralon C, Milon A: Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with

recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. J Virol 1996, 70:5061-5066.

- Barcena J, Morales M, Vazquez B, Boga JA, Parra F, Lucientes J, Pages-Mante A, Sanchez-Vizcaino JM, Blasco R, Torres JM: Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. J Virol 2000, 74(3):1114-23.
- McCabe VJ, Tarpey I, Spibey N: Vaccination of cats with an attenuated myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. Vaccine 2002, 20:2454-2462.
- McCabe VJ, Spibey N: Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. Vaccine 2005, 23(46-47):5380-5388.
- Fenner F, Ross J: Myxomatosis. In The European Rabbit, the History and Biology of a Successful Colonizer Edited by: Thompson GV, king CM. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1994:205-239.
- 13. Sypula J, Wang F, Ma Y, Bell J, Mcfadden G: Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Ther Mol Biol* 2004, 8:103-114.
- Saurat P, Gilbert Y, Ganière JP: Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. Rev Med Vet 1978, 129:415-451. (In French)
- Duteyrat JL, Gelfi J, Bertagnoli S: Ultrastructure study of myxoma virus morphogenesis. Arch Virol 2006, 151(11):2161-2180.
- Chahroudi A, Chavan R, Koyz N, Waller EK, Silvestri G, Feinberg NB: Vaccinia virus tropism for hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. J Virol 2005, 79(16):10397-10407.
- 17. Carroll MW, Moss B: Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. Virology 1997, 238:198-211.
- Gallego-Gomez JC, Risco C, Rodriguez D, Cabezas P, Guerra S, Carrascosa JL, Esteban M: Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected cells. J Virol 2003, 77(19):10606-10622.
- Meiser A, Sancho C, Krijnse-Locker J: Plasma membrane budding as an alternative release mechanism of the extracellular enveloped form of vaccinia virus from Hela cells. J Virol 2003, 77:9931-9942.
- Okeke MI, Nilssen O, Traavik T: Modified vaccinia virus-Ankara multiplies in rat IEC-6 cell and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines. J Gen Virol 2006, 87:21-27.



#### -b- Etude chez les ovins

L'étude présentée s'est attachée à évaluer la sécurité d'emploi ainsi que l'immunogénicité du virus de la myxomatose en tant que nouveau vecteur chez les ovins.

Dans un premier temps nous avons caractérisé l'infection de fibroblastes primaires issus du derme de moutons. L'infection par les virus T1-TK::LacZ et SG33-LacZ révèle que les fibroblastes sont infectables par les deux virus et nous avons observé la production de gènes viraux tardifs. La cinétique d'infection nous montre que les cellules infectées sont isolées et ce même après 48 h d'infection. Pour confirmer que les fibroblastes primaires d'ovin sont non permissifs à l'infection par le MYXV, nous avons réalisé une quantification de la production virale au cours du temps. Le fait que le titre viral n'augmente pas au cours du temps indique que l'infection est abortive.

Nous avons aussi caractérisé l'infection de PBMC d'origine ovine et montré que, tout comme ce que nous avions pu observer pour les PBMC de bovin, les cellules activées sont plus infectables que les cellules non activées. Disposant au laboratoire d'anticorps spécifiques des sous populations leucocytaires, nous avons montré d'une part que toutes les sous populations contenues dans les PBMC sont infectables et d'autre part que l'activation augmente le taux d'infection dans toutes les populations. Les cellules majoritairement infectées sont les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les PBMC, activées ou non, sont non permissives à l'infection par le MYXV puisque aucune augmentation du titre viral n'a été détectée au cours d'une période de 48 h.

Une étude *in vivo* d'inoculation intradermique de MYXV recombiné exprimant la protéine VP60 (protéine de capside du virus du RVHD) à des moutons, nous a montré que les cellules du derme sont bien infectables. L'observation de cellules infectées individualisées au cours du temps indique que le virus ne se réplique pas localement. De façon tout à fait intéressante, les cellules infectées ont une morphologie de type macrophage et parfois de type dendritique. Un infiltrat majoritairement composé de cellules monocucléées est observé par examen histologique à partir de 48 h, indiquant le développement d'une réponse inflammatoire localisée. Aucun effet secondaire post-injection n'a pu être décelé, et le virus n'a pas été détecté par PCR réalisée sur de l'ADN issu de PBMC de ces animaux, singifiant une absence de virémie.

La présence d'anticorps anti-VP60 et anti-MYXV a pu être détectée grâce à des tests ELISA spécifiques, indiquant que nous sommes parvenus à générer une réponse humorale à la fois contre la protéine d'intérêt et contre le vecteur. De plus, un test de séroneutralisation contre le MYXV indique la présence d'anticorps neutralisant dont les titres sont proportionels aux titres mesurés en ELISA.

L'intégralité des résultats obtenus lors de cette étude est présentée dans l'article #2.

## ARTICLE # 2

<u>Béatrice Pignolet</u>, Séverine Boullier, Jacqueline Gelfi, Marjorie Bozzetti, Pierre Russo, Eliane Foulon, Gilles Meyer, Maxence Delverdier, Gilles Foucras, and Stéphane Bertagnoli

## Safety and immunogenicity of Myxoma Virus as a new viral vector for small ruminants

Accepté pour publication dans Journal of General Virology

# Safety and immunogenicity of Myxoma Virus as a new viral vector for small ruminants

Béatrice Pignolet<sup>1,2</sup>, Séverine Boullier<sup>1,2</sup>, Jacqueline Gelfi<sup>1,2</sup>, Marjorie Bozzetti<sup>1,2</sup>, Pierre Russo<sup>3</sup>, Eliane Foulon<sup>1,2</sup>, Gilles Meyer<sup>1,2</sup>, Maxence Delverdier<sup>1,2</sup>, Gilles Foucras<sup>1,2</sup>, and Stéphane Bertagnoli<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR 1225, F-31076 Toulouse, France

<sup>2</sup> Université de Toulouse ; ENVT ; UMR 1225 ; F-31076 Toulouse, France

<sup>3</sup> AFSSA LERPRA les templiers, 105 route des Chappes, Sophia Antipolis F-06902, France

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory « Interactions Hôtes-Virus et Vaccinologie », INRA-ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des capelles, Toulouse F-31076, France. Phone: (33) 561-19-38-78. Fax: (33) 561-19-39-74, e-mail: s.bertagnoli@envt.fr

Total number of words in the summary: 144 Total number of words in the text: 4915 Figures: 6

## ABSTRACT

Myxoma virus (MYXV), a Leporide-specific poxvirus, represents an attractive candidate for the generation of safe and non-replicative vaccine vectors for other species. With the aim to develop new recombinant vaccines for ruminants, we evaluated the safety and the immunogenicity of recombinant MYXV in sheep. *In vitro* studies indicated that ovine primary fibroblasts were not permissive for MYXV and infection of ovine peripheral blood mononuclear cells occurred at low rate. Although non-specific activation significantly improved susceptibility of lymphocytes, MYXV infection remains abortive. Histological and immunohistochemical examinations at the inoculation sites revealed the development of an inflammatory process and allowed the detection of sparse infected cells in the dermis. In addition, inoculated sheep developed an antibody response directed against MYXV and the product of the transgene. All together, these results provide the first line of evidence on the potential of MYXV as viral vector for ruminants.

**Keywords:** poxvirus, myxoma virus, immunization, ovine, primary cells, non replicative vector

### INTRODUCTION

As most of the ruminant vaccines use attenuated strains of pathogens, naturally infected and vaccinated animals cannot easily be differentiated. Development of recombinant vaccines for ruminant species will help to implement vaccine policies. *Poxviridae*, a family of large DNA viruses, represent attractive tools for vaccine vector development against a broad spectrum of diseases. This is particularly due to their ability to combine safety and immunogenicity. Their large genome size and their ability for homologous recombination allow for as much as 25 kb of foreign DNA to be inserted. This enables the expression of genes and/or gene clusters inducing a strong immunity against these target antigens (Moss *et al.*, 1996). Moreover, they replicate exclusively in the cytoplasm of infected host cells (Moss, 2001).

The prototype poxvirus, *Vaccinia virus* (VACV), has been extensively used for its welldefined molecular characteristics (Moss, 2001) and its success in the vaccine programme to eradicate smallpox (WHO, 1980). Nevertheless, this vector is not considered to be safe enough since virus replication is not host-restricted and allows dissemination (Redfield *et al.*, 1987). Because host-restricted vaccine vectors are assumed to be safer, the VACV MVA strain or avipoxviruses (*Fowlpox* and *Canarypox viruses*) have been extensively studied, leading to the development of non-replicative vectors in different species (Taylor and Paoletti, 1988; Sutter and Moss, 1992; Boyle and Coupar, 1988; Taylor *et al.*, 1988, Tartaglia *et al.*, 1993; Carroll and Moss, 1997). New host-restricted poxviruses are also attractive. For instance, *Lumpy skin disease virus*, a capripoxvirus with a host range limited to ruminants, was successfully evaluated as a non-replicative vaccine vector for non-ruminant species (Aspen *et al.*, 2003). Among poxviruses, *Myxoma virus* (MYXV) is another attractive candidate for vaccine development. This virus specifically infects *Leporidae* and causes a lethal disease called myxomatosis in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) (Fenner and Ross, 1994). Recombinant attenuated strains of MYXV were shown to be efficient for rabbit vaccination against both myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease (Bertagnoli *et al.*, 1996; Barcena *et al.*, 2000). Its potential for acting as a vaccine vector in non-leporide species was also demonstrated by vaccination of cats against feline calicivirus (McCabe *et al.*, 2002; McCabe and Spibey, 2005).

Considering the emergence of ovine infectious diseases in Europe, as new outbreaks of Bluetongue in 2006 and 2007, we have examined the vaccine potential of recombinant MYXV for small ruminants. With that aim, we studied MYXV tropism in ovine cells, since very few information is available for ruminant species (Pignolet *et al.*, 2007), although different studies previously indicated that MYXV tropism *in vitro* is not restricted to rabbit cells (Lalani et al., 1999; Sypula et al. 2004; Johnston et al., 2005; Wang et al., 2006). In this work, we investigated the multiplication of MYXV, both wild type strain T1 and cell-cultured attenuated vaccine strain SG33 (Saurat *et al.*, 1978; Bertagnoli *et al.*, 1996), in ovine primary fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The subsets of ovine PBMC preferentially infected by MYXV were also identified. Finally, *in vivo* analysis using recombinant virus were also performed to evaluate its safety and its immunogenicity in sheep. Together, our overall results provide the first indications of the safety and the immunogenicity of recombinant MYXV for ovine, indicating that MYXV could be used as a non replicative viral vector for small ruminants.

## **METHODS**

### Cells culture and media

Rabbit kidney cells (RK13, ATCC CCL-37) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco-BRL) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS). Culture medium was supplemented with 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin.

Primary ovine dermal fibroblast cells were isolated from the skin of a sheep. Briefly, skin tissue fragments were softly scraped and incubated for 15 minutes with trypsin (3 g.l<sup>-1</sup>) at 37 °C and then diluted in 20 % FCS and DMEM. The solution was filtered on a 100  $\mu$ m cell strainer (Falcon) and centrifuged for 10 minutes at 300 g. Cells were then harvested and cultured in DMEM supplemented with 10 % FCS, 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin.

Ovine (Lacaune breed) and rabbit (New Zealand) blood was collected on EDTA tubes. For the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), PBS-diluted blood (1:2) was loaded on a density gradient (FicollPaque Plus, Amersham) and centrifugated at 800 g for 20 minutes. PBMC were then harvested, washed in PBS and recovered by centrifugation at 870 g for 10 minutes. Culture of PBMC was performed at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, in RPMI 1640 Glutamax, 25 mM Hepes (Gibco-BRL) supplemented with 10 % FCS, 1 % sodium pyruvate (Gibco-BRL), 1 % non essential amino acids (Gibco-BRL), 1% β-mercapto-ethanol (Gibco-BRL), 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin. When indicated, cells were activated using 125 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA) and 50 ng/ml of ionomycine.

## Viruses

All recombinant viruses were derived from the wild type Toulouse 1 (T1) and the vaccine attenuated SG33 (Saurat *et al.*, 1978) strains and modified in the laboratory. The T1-serp2-GFP recombinant virus was constructed by cloning the *gfp* gene fused to the 3' end of the serp2 gene. The T1-TK::lacZ recombinant virus contains the *Escherichia coli lacZ* gene driven by the vaccinia virus P11 late promoter inserted into MYXV thymidine kinase (TK) gene. The SG33-VP60 recombinant virus contains the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) capsid encoding gene (VP60) under control of the strong early/late vaccinia virus P7.5 promoter inserted into the M11L-MGF locus (Bertagnoli *et al.*, 1996). The SG33-GFP recombinant virus expresses the enhanced green fluorescent protein (eGFP) driven by the P7.5 promoter. The P7.5 GFP cassette and the *E. coli* guanyl-xanthine phosphoribosyl transferase (ecogpt) gene (Boyle and Coupar, 1988) under control of P7.5 promoter were inserted instead of the M11L-MGF locus.

#### Infection and virus growth curves

For growth analysis, 10<sup>6</sup> cells per P6 wells (95-100 % confluence) or PBMC (2x10<sup>6</sup> cells per P24 wells) were infected at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 1. The inoculum was allowed to adsorb for 90 minutes. Virus was then removed and each well was washed three times with culture medium and incubated with their medium supplemented with 5 % FCS at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. At each time of interest (mentioned in figures) cells were frozen. To release virus from infected cells, each collected sample was subjected to three freeze-thaw cycles. Single step analysis was performed by infecting cells at a m.o.i. of 5. Adsorption was performed at 4°C with the inoculum containing 25 mM Hepes. After 90 minutes, inoculum was removed and cells were washed three times and incubated at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. For multistep experiments, cells were infected at a m.o.i. of 0.01. After 90 minutes of adsorption at 37°C, inoculum was

removed and cells were washed two times before further incubation (T0). Cells were then collected and subjected to three successive freeze-thaw cycles before virus titration.

For titration, dilutions of lysate were added to RK13 cells and adsorbed for 90 minutes. Inoculum was removed and fresh RK13 medium, supplemented with 5 % FCS, was added. After 48 h, medium was removed and replaced by solid medium containing MEME medium supplemented with 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 % FCS, 25 mM hepes, 0.2 % NaHCO<sub>3</sub>, 1 % LMP agarose (Invitrogen). After 2 days, lysis plaques were counted by macroscopic examinations.

## X-Gal staining and analysis

Rabbit and ovine cells (90-95 % confluency) were infected with the T1-TK::LacZ (m.o.i. of 0.1 and 1). From twelve hours p.i., they were fixed with 2.5 % glutaraldehyde for 15 minutes at room temperature and stained with 2 mg/ml X-gal in 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM  $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ , 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$  in PBS for 4-10 hours and observed in microscopy.

#### Flow cytometry analysis

Resting or activated PBMC were infected with SG33-GFP (m.o.i.: 0.5-10) or mock-infected. Cells were harvested and washed in PBS/0.5% BSA, 2.5 mM EDTA, in 96-well plates. Cells were then incubated for 20 min at 4°C with appropriate dilutions of A647-labelled anti-CD2, anti-CD5, PE-labelled anti-CD4, -CD8, -DR/DQ, WC1 biotin-conjugated, or isotype control (Serotec). PE-conjugated streptavidine was added for anti-WC1 labelling. Cell viability was determined by addition of propidium iodide (BD Biosciences Pharmingen) at 1  $\mu$ g/ml just before acquisition. Acquisition was performed using a FACScalibur (Becton Dickinson). Dead cells and debris were excluded by appropriate gating and 30000 events were collected. Analysis was performed using Flowjo or CellQuestPro softwares.

#### Intradermal inoculation of sheep and in situ examination

Two adult sheep were inoculated on the flank with three doses  $(10^5; 10^6; 10^7 \text{ pfu})$  of SG33-VP60 recombinant virus by 6 points of intradermal injection (i.d.) for each dose (around 7 cm between each injection points). Inoculation sites were sampled using biopsy punches, at 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h and 72 h p.i. for each tested dose. As control, cell culture medium was also injected and sampled at each time of the kinetic. Animals were cared for following EU recommendations for animal welfare. After fixation in 10 % neutral formaline, tissues were processed routinely into paraffin-blocks sectioned at a thickness of 4 µm and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination. Histologic lesions were assessed and graded as follow: +, minimal; ++, light; +++, moderate; ++++, marked; +++++, severe (according to AFIP recommendations). Sections were also treated with 0.1 % trypsin in PBS (pH 7.6) for 30 min at 37 °C and viral antigens were detected as described elsewhere (Guérin et al., 2001) using a rabbit polyclonal anti-MYXV serum as primary antibody and a secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit IgG (Dako)). Horseradish peroxidase-streptavidin complex was added and revealed by DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). Nuclei were counterstained with Mayer's haematoxylin. Negative controls comprised sections incubated either without specific primary antibody or with pre-immune serum in place of the specific primary antibody. A third negative control was the cell-culture medium injected samples processed with the same procedure as inoculated samples. No immunohistochemical staining was detected in the controls.

## Immunization of sheep with SG33-VP60 recombinant virus

Ten sheep were injected i.d. twice with 0.1 ml of virus  $(2x10^6 \text{ pfu})$  by sheep at 21 days interval. Animals were monitored daily for temperature and clinical signs. Blood samples

were taken on days 0, 21, 35 and 42 after the first immunization. The serological responses against MYXV and RHDV VP60 protein were evaluated using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (recombinant purified VP60 and semipurified MYXV as antigens) (Bertagnoli *et al.*, 1996). Briefly, ELISA plate wells (Falcon) were coated with 1  $\mu$ g of recombinant baculovirus-purified VP60 or 1  $\mu$ g of semipurified MYXV over night at 4°C. Binding of the RHDV or MYXV antibodies was visualized by incubation with donkey antisheep IgG serum conjugated to Horse Raddish Peroxidase (Serotec). Twenty minutes after the addition of substrate solution (tetramethylbenzidine at 2.4 mg/ml) (Sigma), the reaction was stopped with sulphuric acid (1N). The A<sub>450nm</sub> of each sample was then measured.

### Seroneutralisation titration

Sera were serial diluted in duplicates in Opti-MEM medium (Invitrogen) in 50  $\mu$ l final/well (P96 wells). 50  $\mu$ l of T1-TK::LacZ recombinant virus was added at 50 pfu/well. Plaque was incubated 1 h at 37 °C and then over night at 4 °C. 5x10<sup>4</sup> freshly prepared RK13 cells in Opti-MEM supplemented with 15 % SVF were added. Plaques were incubated 48 h at 37 °C at 5 % CO<sub>2</sub>. 50  $\mu$ l of X-Gal (160  $\mu$ g/ml) in Opti-MEM were then added. Reading was performed visually after about 12 h of incubation, neutralisation titres corresponding to the last dilution without blue color.

## RESULTS

### Ovine primary fibroblasts are not permissive to MYXV infection

MYXV is reported to be restricted to rabbits *in vivo* and to replicate *in vitro* in some nonleporide cells and some human cancer cells (Lalani *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 2005; Sypula *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), but no information concerning interactions between MYXV and ovine cells is available yet. In an intradermal route of infection, fibroblasts might be among the main cell type initially infected by the virus at the primary site of inoculation before it possibly disseminates to other peripheral tissues. Thus, we investigated the infection of primary ovine dermal fibroblasts.

We infected both RK13 and ovine primary fibroblasts with recombinant T1-TK::lacZ virus expressing *lacZ* gene under the control of late P11 promoter. These cells promote expression of *lacZ* gene when infected, with the two m.o.i. tested (0.1 and 1) (Fig. 1A) suggesting that they supported virus entry and late gene expression. However, MYXV can not replicate and spread within the fibroblast monolayer since only sparse labelled cells were observed over time whatever the m.o.i. used and no diffusion to neighbouring cells was observed even after 48 h p.i., contrary to what could be observed for RK13 infection (Fig. 1A).

We confirmed the non replication of MYXV in ovine primary fibroblasts by a single step growth analysis. Cells were infected with T1 or SG33 virus strains at a m.o.i. of 5 and viral production was determined by viral titration over a 72 h period (Fig. 1B). At all time points, samples were titrated on RK13 cells. Control infection of RK13 cells showed growth curves closely resembling a classical poxvirus replication curve, with a minimum reached 4 hours p.i., followed by a continuous increase until 48 h p.i. (Fig. 1B). No marked difference was observed between the two virus strains. By contrast, no viral production after T1 or SG33 infection of ovine fibroblasts was observed (Fig. 1B).

Taken together, these results indicated that the ovine primary fibroblasts are not permissive for MYXV infection, whatever the virus strain used.

#### Activated ovine leukocytes can be infected by MYXV

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are part of the key cells implied in virus dissemination and the generation of an immune response. To evaluate MYXV infection of these cells, infected ovine and rabbit PBMC were compared. Cells were infected with two recombinant MYXV, the T1-Serp2-GFP which expressed the Serp2 protein fused to the enhanced green fluorescent protein (GFP) and SG33-GFP virus expressing the GFP under the control of the strong early/late vaccinia virus P7.5 promoter, and were analyzed by flow cytometry. The fusion between Serp2 and the GFP genes does not alter the virulence of the T1 strain (data not shown).

Infections by T1-Serp2-GFP and SG33-GFP viruses were tested at a m.o.i. of 1 on nonactivated PBMC. Cells were collected 16 h p.i., and infection levels were determined by gating living GFP-positive cells. We observed that 45.5 % of rabbit cells expressed GFP when infected with T1-Serp2-GFP and 16.1 % after SG33-GFP infection (Fig. 2A). By contrast, only a small fraction of ovine PBMC was susceptible to MYXV infection. Around 0.4 % and 2 % of GFP-positive ovine cells were detected after infection with T1-Serp2-GFP or SG33-GFP respectively (Fig. 2A).

As activation may be required to allow poxvirus infection (Chahroudi *et al.*, 2005), PMA/ionomycine activated rabbit and ovine PBMC were then infected at the same m.o.i. (Fig. 2A). In activated rabbit PBMC infection levels rose to 54 % and 37.6 % for T1-Serp2-GFP and SG33-GFP respectively. Only 5.51 % and 20.3 % of activated ovine PBMC were GFP positive when infected with T1-Serp2-GFP and with SG33-GFP respectively. We observed a mean of 8 % of GFP-positive cells after infection with recombinant T1-Serp2-GFP ranging from 2.6 % to 14.2 %, and a mean of 25 % of GFP-positive cells after infection with SG33-GFP, ranging from 9.1 % to 39.3 % (Fig. 2D). These results showed that activation of PBMC significantly increases the rate of infection in ovine PBMC.

As we planed to use MYXV as a vaccine vector, we next decided to focus on the attenuated SG33 strain.

To examine whether higher m.o.i. increase the infection levels, various m.o.i. from 0.5 to 10 were tested with SG33-GFP virus (Fig. 2B). In activated ovine PBMC, the infection rate increases proportionally to the m.o.i. but quickly reaches a plateau. Figure 2B presents a representative experiment: 2.67 % cells were GFP-positive at an m.o.i. of 0.1 compared to 18 % at an m.o.i. of 10. This maximal infection level was reached at a m.o.i comprised between 1 and 2, depending on the experiments.

Finally, we analyzed the GFP expression during time of infection on resting and activated ovine PBMC after infection with SG33-GFP at an m.o.i of 1. The highest percentage of GFP-positive cells was 16.4 % and was detected around 16 hours after infection. Then, a slow decrease of GFP-positive cells frequency, down to 11.7 % at 32 h p.i was observed (Fig. 2C). Resting cells contained a maximum of 3.5 % GFP-positive cells at 8 hours p.i. (Fig. 2C).

### Both B and T-cells are the targets of MYXV in ovine PBMC

To determine the cellular targets of MYXV among ovine PBMC, peripheral leukocytes were infected with the SG33-GFP recombinant virus and stained with monoclonal antibodies (mAbs) specific to different leukocyte subsets. Thus, T lymphocytes were recognized with anti-ovine CD2, anti-ovine CD5 and WC1 ( $\gamma\delta$  subset) mAbs. Subsets of CD2+ T-cells were stained with anti-CD4 and -CD8 mAbs. Anti-CD5 mAbs stained both T and B-cells and MHC-II mAbs stained activated T-cells and CD5- CD21+ B-cells.

After 16 h of infection at a m.o.i. of 2, infection rate was 3 % in resting cells (data not shown) and around 31 % in activated cells (average of the GFP positive cells of panels) (Fig. 3A). PMA/ionomycine activation enhanced the infection rate in every target cells. In activated culture, more than a third of GFP-positive cells are composed of T-cells since 31 % are CD2+

73

and 8 % are  $\gamma\delta$  T-cells (Fig. 3A and 3B). Both CD4+ and CD8+ T cells are infected and their proportions are 24 % and 3 % of the GFP-positive cells respectively (Fig. 3A and 3B). The remaining GFP-positive cells are B cells since we detected 45 % of MHC-II+ and 46 % of CD5+ among the GFP positive cells (Fig. 3A).

We next investigated the susceptibility of each PBMC subset for MYXV infection. The frequency of GFP-positive cells widely differed among cell types. For example, 18 % of CD2+ cells, 15% of CD4+ cells, 27 % of CD8+, 33 % of  $\gamma\delta$  cells, 66 % of MHC-II+ cells and 23 % of CD5+ cells are GFP-positive (Fig. 3B).

Infection of PBMC from at least three different animals showed a high variability in distribution of infected cells, particularly in the CD2+ population. Indeed, an average 35.6 % of infected cells, ranging from 7.1 % to 67.2 %, were CD2+ (Fig. 3C). By contrast, the variability of infected CD5+ cells was much less visible, ranging from 45 % to 56.5 % of the GFP-positive cells (Fig. 3C).

These results show that all tested subsets are susceptible to SG33 infection, although the distribution of infected cells is quite variable among animals.

#### MYXV infection of ovine PBMCs is abortive

As we have previously shown that activated ovine PBMC can be infected by MYXV, we studied viral multiplication in resting and activated ovine PBMC over a 48 h period. Rabbit and ovine cells were infected with SG33-GFP at a m.o.i. of 1, which is a compromise between infection rate and cell viability. Viral production was determined by virus titration on RK13 cells at 0, 4, 12, 24 and 48 h p.i. (Fig. 4). We observed a viral production in rabbit PBMC since an increase of virus titre was measured over a 48 h period (Fig. 4). By contrast, no increase of the viral titre could be detected in either resting or activated ovine PBMC (Fig. 4).

These data suggest that activation did not influence ovine PBMC permissivity to MYXV SG33 strain.

## Recombinant myxoma virus induces inflammatory and immune responses after intradermal injection in sheep

In order to evaluate the safety and immunogenicity of MYXV based vaccines in small ruminants, two groups of sheep were inoculated with a recombinant SG33-VP60 virus by intradermal route (i.d.). This recombinant virus allows the production of the major capsid protein (VP60) of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), and its efficacy to simultaneously protect rabbits against both myxomatosis and RHD has previously been reported (Bertagnoli *et al.*, 1996). The VP60 gene is inserted in the same locus as the GFP in the recombinant SG33-GFP.

Two sheep were inoculated intradermally with various doses ( $10^5$  to  $10^7$  pfu) of virus in multiple sites. Then, skin biopsies were taken at the injection sites from 0 to 72 h p.i.. After fixation in 10 % neutral formaline, samples were prepared for histological examination. We observed, as soon as 6 h p.i., a perivascular dermatitis, whatever the virus dose, with an inflammatory infiltrate predominantly made of neutrophils (Fig. 5A). From 48 h p.i., the inflammatory infiltrate appeared mostly composed of mononuclear cells indicating the development of a local progressing inflammatory response. Intensity of the inflammatory response seems proportional to the viral dose inoculated. Indeed, for  $10^5$  pfu, lesional intensity was most often light to moderate, whereas for  $10^7$  pfu, it scored often marked grading (Fig. 5B).

In order to study the outcome of the infection *in situ*, immunostaining for MYXV was also carried out. Expression of viral proteins was especially detected from 6 h p.i. in cells closely

75

resembling to macrophages, based on the infected-cell morphology (Fig. 5C). This expression appeared stable during the kinetics (Fig. 5C).

To assess the immunogenicity of recombinant MYXV in small ruminants, a group of sheep (n=10) was injected twice intradermally with 2x10<sup>6</sup> pfu of SG33-VP60 virus. Intradermal injections did not result in any swelling or any lesion at the injection sites or at distal sites and all sheep remained healthy. In addition, nested PCR failed to detect MYXV in blood samples taken 1, 2, 3, 4 and 7 days after each injection (data not shown). Serum samples were taken at day 0, day 21, day 35 and day 42 from each animal. Seroconversion to MYXV was observed after the booster injection (Fig. 6A) and an immune response to VP60 could be detected for eight of the ten vaccinated sheep by ELISA test (Fig. 6B). In order to assess the biological relevance of the antibodies detected, a seroneutralisation assay against MYXV was performed on the four strongest serum samples previously determined by ELISA (Fig. 6C). Neutralising antibodies were detected in each serum, with titres ranging from 1/20 to 1/60, proportional to ELISA titres and comparable to titre measured for an equivalent control rabbit serum (Fig. 6C).

### DISCUSSION

We demonstrated in this study that MYXV, a poxvirus commonly reported to be rabbit specific, can be used as a non replicative and safe viral vector to generate specific immune responses in ovine species.

After using two strains of MYXV, we focused on the attenuated SG33 vaccine strain. This strain, obtained after numerous passages on rabbit and embryonic chicken fibroblasts at 33°C

(Saurat *et al.*, 1978), is the only MYXV strain used to vaccinate rabbits against myxomatosis in France (Chantal and Bertagnoli, 2004).

As we aimed to develop MYXV as vector for vaccination of sheep by intradermal route, we investigated MYXV infection of ovine primary fibroblasts generated from the dermis. We demonstrated that ovine primary fibroblasts can be infected by both wild-type T1 strain and vaccine SG33 strain of MYXV, and that infection was abortive. It has been previously shown that MYXV can productively infect non-host primary fibroblasts *in vitro* depending on cellular IFN production (Wang *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2005). In our work, primary fibroblasts were generated from adult ovine skin and even though they were cultured only over 3 passages, they should produce IFN-I. Low-passage fibroblasts from neonatal explants are permissive to MYXV infection whereas high-passage human primary fibroblasts fail to support MYXV replication (Johnston *et al.*, 2005). Moreover, when type I interferon responses are ablated, MYXV species barrier can be broken in primary murine fibroblasts and these cells can become fully permissive to infection (Wang *et al.*, 2004). These findings show that cell permissivity for MYXV was dependent on signal-transduction pathways control, particularly those conducting to the interferon responses.

Knowing that the ability to grow in lymphocytes is crucial to the pathogenicity and dissemination of MYXV in rabbits, the safety of MYXV as a vaccine vector for ovine species was investigated by characterizing the infection of ovine PBMC. We first showed that both T1 and SG33 MYXV strains infect with a higher rate activated ovine PBMC. As the difference between resting and activated cells could be observed as early as 6 hours p.i., the restricted infection of resting cells might be due to an early event deficiency, and could be linked to the expression of cellular factors induced upon activation. This finding could be correlated to a recent observation indicating that activation of human T-cells allows the

production of a *de novo* receptor, enabling both susceptibility and permissivity of these cells for VacV (Chahroudi *et al.*, 2005). However, in our experiments, we could not determine whether low infectivity in resting ovine cells comes from deficiency of a binding and/or a post-binding event.

Since PBMC are composed of different cell subsets, mainly composed of B- and T-cells, we then investigated the tropism of MYXV for ovine PBMC subsets. We only studied the interaction between a recombinant SG33 virus and PBMC, because as a vaccine strain, SG33 is the most suitable candidate for generation of MYXV-based vaccine. Moreover, this virus is deleted for several virulence factors among which the scrapine MV-Lap responsible for the down regulation of cellular markers such as CD4, MHC-I or CD95 (Guérin *et al.*, 2002; Mansouri *et al.*, 2003; Collin *et al.*, 2005), which might improve immune response. We showed that B- and T-cells can be infected by MYXV. Moreover, in our experimental conditions, B-cells are the mainly infected cells. This finding is interesting since B-cells belong to antigen-presenting cells and during infection they could present antigens, allowing the development of a specific immune response. Non-specific activation increased infection rates in both B- and T cells (CD2+, CD4+, CD8+,  $\gamma\delta$ ), indicating that activation allows the expression of non-subset specific *de novo* factor(s) present in both B- and T-cells.

Infection level in activated ovine leukocytes is variable between animals and in the population of infected subsets. This variability could be explained by the initial cell activation and maturation levels. Moreover, even if stimulation of ovine PBMC greatly enhanced infection levels, we demonstrated that it did not allow cellular permissivity since no increase in virus titre was detected 48h p.i.. This is different from what is known about infection of rabbit leukocytes with MYXV. Indeed, in stimulated rabbit lymphocytes, MYXV replicates about 10-fold more than in resting cells (Opgenorth *et al.*, 1992). However, previous study of RL5 infection with MYXV-M11L- showed that virus yield is significantly reduced in comparison to the wild-type MYXV (Macen *et al.*, 1996). This is consistent with infection of rabbit PBMC with SG33-GFP, deleted for both M11L/MGF genes. Indeed, our results revealed that this recombinant virus replicates with no significant difference between resting and activated cells and the increase of virus production 48 h p.i. in each case is about 10 fold.

To go further in our study, MYXV-based vector in small ruminants was evaluated by in vivo experiments. Intradermal injections were performed and did not induce side effect, neither local nor general. Histological analysis revealed a progressing inflammatory response at the inoculation site. Moreover, expression of viral antigens was mostly observed in cells with macrophage cell morphology. We failed to specifically characterize these infected cells with specific mABs labelling, because of their low labelling efficiency. Nevertheless, our first observations of dermal infected cells indicate that antigen presentation to immune system could be efficient. The observation that the number of infected cells *in situ* was stable and that only sparse infected cells were detected during the kinetics suggest that there is no local replication and correlated with the lack of viremia. Intradermal inoculation of SG33-VP60 recombinant virus induced the development of a humoral response against the product of the transgene (i.e. VP60 of RHDV). Nevertheless, an important variability between animals was observed. Specific anti-VP60 antibodies could not be detected for two of ten animals, two of ten produced a good response, whereas six of ten developed a moderate response against VP60. The antibodies titres decreased 21 days after the boost, indicating that a strong antibody response was not maintained. The same variability and kinetics were observed for anti-MYXV antibody response. As we could not test the ability of the produced anti-VP60 antibodies to neutralise RHDV, we performed a neutralisation assay against MYXV, even if MYXV is not a pathogen to small ruminants. Comparison with a control rabbit's serum revealed that the antibody response in sheep was as efficient as rabbit serum to neutralise MYXV *in vitro*. To go further in the characterization of vaccine response in sheep, studies on the influence of the vaccination protocol on ovine humoral and cellular responses are currently in progress. It should be noted that the doses used in our study are far lower than those reported for ovine vaccination with a recombinant *Canarypox virus* (two injections of more than  $10^8$  pfu per animal) (Boone *et al.*, 2007).

In this study, we showed that ovine primary fibroblasts can be infected by MYXV even though these cells are not permissive for MYXV infection. The abortive infection of small ruminant PBMC makes it impossible for MYXV to disseminate via leukocytes in these animal species. Our study also shows for the first time that MYXV could be a safe viral vector inducing humoral immune responses with biological relevance in small ruminants. Nevertheless, further investigations are needed to improve our knowledge of the immune response induced upon MYXV-based vector vaccination. To that aim, current studies are in process in our laboratory to investigate the antigenic presentation, in particular the capacity of MYXV to infect ovine dendritic cells.

## ACKNOWLEGDEMENTS

The authors are especially grateful to Simon Bonlieu for generous help in blood sampling and to Brigitte Peralta, Cécile Caubet and Josyane Loupias for excellent technical assistance. B.P. was supported by a grants from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), and from ANR Génanimal 2006 « VacGenDC project ».

#### REFERENCES

Aspen, K., van Dijk, A. A., Bingham, J., Cox, D., Passmore, J. & Williamson A. (2002). Immunogenicity of a recombinant lumpy skin disease virus (Neethling vaccine strain) expressing the rabies virus glycoprotein in cattle . *Vaccine* **20**, 2693-2701.

Aspen, K., Passmore, J., Tiedt, F. & Williamson A. (2003). Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-defecient vaccine vector. *J Gen Virol* 84, 1985-1996.

Barcena, J., Morales, M., Vazquez, B., Boga, J.A., Parra, F., Lucientes, J., Pages-Mante, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., Blasco R. & Torres, J.M. (2000). Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J Virol* 74, 1114-23.

Bertagnoli, S., Gelfi, J., Le Gall, G., Boilletot, E., Vautherot, J., Rasschaert, D., Laurent, S., Petit, F., Boucraut-Baralon, C. & Milon, A. (1996). Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* **70**, 5061-5066.

Boone, J.D., Balasuriya, U.B., Karaca, K., Audonnet, J.C., Yao, J., He, L., Nordgren, R., Monaco, F., Savini, G., & other authors. (2007). Recombinant canarypox virus vaccine coexpressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* 25(4):672-8.

Boyle, D. B. & Coupar, B. E. H. (1988). A dominant selectable marker for construction of recombinant poxviruses. *Gene* 65, 123-128.

Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J.X., Macaulay, C., Willer,
D., Evans, D. & McFadden, G. (1999). The complete DNA sequence of myxoma virus.
Virology 264, 298-318.

Camus-Bouclainville, C., Fiette, L., Bouchiha, S., Pignolet, B., Counor, D., Filipe, C., Gelfi, J. & Messud-Petit, F. (2004). A virulence factor of myxoma virus colocalizes with NF-kappaB in the nucleus and interferes with inflammation. *J Virol* 78, 2510-2516.

**Carroll, M. W. & Moss, B. (1997).** Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology* **238**, 198-211.

Chahroudi, A., Chavan, R., Koyzr, N., Waller, E. K., Silvestri, G. & Feinberg, N. B. (2005). Vaccinia virus tropism for hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *J Virol* **79**(16), 10397-10407.

**Chantal, J. & Bertagnoli, S. (2004).** Myxomatosis *in* Manuel of diagnostic test and vaccine for terrestrial animals, Volume II, Fifth edition, OIE.

Collin, N., Guérin, J.L., Drexler, I., Blanié, S., Gelfi, J., Boullier, S., Foucras, G., Sutter,
G. & Messud-Petit, F. (2005). The poxviral scrapin MV-LAP requires a myxoma viral infection context to efficiently downregulate MHC-I molecules. *Virology* 343(2), 171-178.

**Fenner, F. & Ross, J. (1994).** Myxomatosis. In: GV Thompson, and C.M. King (ed.), The European Rabbit, the History and Biology of a Successful Colonizer, pp.205-239. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.

Guérin, J.L., Gelfi, J., Camus, C., Delverdier, M., Whisstock, J.C., Amardeidhl, M.F., Py, R., Bertagnoli, S. & Messud-Petit, F. (2001). Characterization and functional analysis of Serp3: a novel myxoma virus-encodes serpin involved in virulence. *J Gen Virol* 82, 1407-1417.

Guérin, J.L., Gelfi, J., Boullier, S., Delverdier, M., Bellanger, F.A., Bertagnoli, S., Drexler, I., Sutter, G. & Messud-Petit, F., (2002). Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *J Virol* **76**(6), 2912-23.

Johnston, J. B., Nazarian, S. H., Natale, R. & McFadden, G. (2005). Myxoma virus infection of primary human fibroblasts varies with cellular age and is regulated by host interferon responses. *Virology* **332**, 235-248.

Lalani, A.S., Masters, J., Zeng, W., Barrett, J., Pannu, R., Everett, H., Arendt, C.W. & McFadden, G. (1999). Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science* 286(5446), 1968-71.

Lun, X., Yang, W., Alain, T., Shi, Z.Q., Muzik, H., Barrett, J.W., McFadden, G., Bell, J., Hamilton, M.G., & other authors. (2005). Myxoma virus is a novel oncolytic virus with significant antitumor activity against experimental human gliomas. *Cancer Res* 65, 9982-9990.

Macen, J.L., Graham, K.A., Lee, S.F., Schreiber, M., Boshkov, L.K. & McFadden, G. (1996). Expression of the Myxoma Virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. *Virology* 218, 232-237.

Mansouri, M., Bartee, E., Gouveia, K., Hovey Nerenberg, B.T., Barrett, J., Thomas, L., Thomas, G., McFadden, G. & Fruh, K., (2003). The PHD/LAP-domain protein M153R of myxoma virus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J. Virol.* **77**(2), 1427-40.

McCabe, V. J., Tarpey, I. & Spibey, N. (2002). Vaccination of cats with an attenuated myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. *Vaccine* 20, 2454-2462.
McCabe, V. J. & Spibey, N. (2005). Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. *Vaccine* 23(46-47), 5380-5388.

**Moss, B. (2001).** *Poxviridae*: the viruses and their replication. In Virology, 4<sup>th</sup> edn, pp. 2849-2883. Edited by D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Moss, B., Carroll, M. W., Wyatt, L. S., Bennink, J. R., Hirsch, V. M., Goldstein, S., Elkins, W. R., Fuerst, T. R., Lifson, J. D., & other authors. (1996). Host range restricted, non replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* 397, 7-13.

Mossman, K., Lee, S.F., Barry, M., Boshkov, L. & Mcfadden, G. (1996). Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *J Virol.* **70**(7):4394-410.

**Opgenorth, A., Graham, K., Nation, N., Strayer, D. & McFadden, G. (1992).** Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and myxoma virus growth factor. *J Virol* **66**(8): 4720-4731.

Petit, F., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Fassy, F., Boucraut-Baralon, C. & Milon, A. (1996). Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Virol* **70**(9), 5860-5866. Pignolet, B., Duteyrat, JL., Allemandou, A., Gelfi, J., Foucras, G. & Bertagnoli, S.(2007). In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains.*Virol J* 

Redfield, R. R., Wright, D. C., James, W. D., Jones, T. S., Brown, C. & Burke, D. C. (1987). Disseminated vaccinia in military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N Engl J Med* 316, 673-676.

Saurat, P., Gilbert, Y. & Ganière, J.-P. (1978). Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev Med Vet 129*, 415-451. (In French).

Sutter, G. & Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci* U S A. **89**(22):10847-51.

Stanford, M.M., Verden, S.J. & McFadden, G. (2007). Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet Res.* **38**(2):299-318.

Sypula, J., Wang, F., Ma, Y., Bell, J. & McFadden, G., 2004. Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Ther Mol Biol* 8, 103-114.

**Tartaglia, J., Jarrett, O., Neil, J. C., Desmettre, P. & Paoletti, E.( 1993).** Protection of cats against feline leukemia virus by vaccination with a canarypox virus recombinant, ALVAC-FL. *J Virol* **67**, 2370-2375.

Taylor, J. & Paoletti, E. (1988). Fowlpox virus as a vector in non-avian species. *Vaccine* 6, 466-8.

**Taylor , J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre, P. & Paoletti, E. (1988).** Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine* **6**, 497-503.

Wang, F., Ma, Y., Barrett, J.W., Gao, X., Loh, J., Barton, E., Virgin, H.W. & McFadden, G. (2004). Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol* 5(12), 1266-74.

Wang, G., Barrett, J. W., Stanford, M., Werden, S. J., Johnston, J. B., Gao, X., Sun, M,
Cheng, J. Q. & McFadden, G. (2006). Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor. *P.N.A.S.*103, 4640-4645.

**WHO** (World Health Organization). (1980). The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication. History of international public health, no. 4. Geneva: world health organization.

#### **FIGURES LEGENDS**

**Fig. 1.** MYXV infection of ovine primary dermal fibroblasts. **A**. RK13 (**left panel**) and onepassaged ovine fibroblasts (**right panel**) were infected at m.o.i 0.1, 1 or mock infected with T1-TK::lacZ and assessed for late gene expression by  $\beta$ -galactosidase staining at 12, 24 and 48 h p.i.. **B**. Single step growth curves of MYXV (T1, **full line** and SG33, **broken line**) infection of RK13 (**left panel**) and ovine primary fibroblasts (**right panel**). Cells were infected at a m.o.i. of 5 and infectious virus progeny produced over 48 h or 72 h p.i. was determined by titration on RK13 cells. Error bars correspond to the standard error of the mean.

Fig. 2. MYXV infection in rabbit and ovine PBMC. GFP expression was detected in resting or activated PBMC from both species, infected with either recombinant T1-Serp2-GFP or SG33-GFP at a m.o.i. of 1 for 16 h. Cells were activated 4 h before infection. Cells were then recovered and analyzed by flow cytometry. T1-Serp2-GFP infected ovine PBMC were labelled with anti-GFP antibodies. Percentages indicated GFP positive living cells. A. This panel represents an individual experiment. The histograms display the number of living cells counted with various intensities of fluorescence. Grey line corresponds to non-infected cells, black curves corresponds to infected cells. B. Efficiency of myxoma virus infection in activated ovine PBMC. Cells were activated for 4 h and then infected with SG33-GFP virus at various m.o.i.. 16 h p.i., viable cells were analyzed for GFP expression. C. Analysis of GFP expression during time of infection. Cells were infected at a m.o.i. of 1 with the SG33-GFP virus. Full line represents activated cells whereas broken line represents resting cells. Error bars correspond to the standard error of the mean. **D.** Variability of GFP expression in infected resting (white bars) or activated (grey bars) PBMC from 10 animals. The percentages indicated represent an average of at least 10 independent experiments. Errors bars correspond to the standard error of the mean.

**Fig. 3.** MYXV cell subset targets in ovine PBMC. **A.** Activated cells were infected with SG33-GFP at a m.o.i. of 2 and analyzed 16 h p.i. for GFP expression on gated live cells. Numbers in quadrants indicate the percentage of cells. This panel represents an individual experiment. **B.** Distribution of infected cells. **White**: cell type among infected cells; **grey**: infected cells among cell type. This graph represents an individual experiment. **C.** Variability among infected cells was measured by the mean of at least 10 independent samplings in three independent infection experiments. Errors bars correspond to the standard error of the mean.

**Fig. 4.** Permissivity of ovine PBMC for MYXV infection. Rabbit ( $\blacksquare$ ) and ovine ( $\blacktriangle$ ) PBMC were infected at a m.o.i. of 1 with SG33-GFP 4 hours after stimulation with PMA and ionomycine (**full black line**) or not (**broken grey line**). At different time p.i., cultures were frozen and virus yield was determined. Each curve point was determined by the mean of four different experiments titrated in duplicates. Error bars correspond to the standard error of the mean.

**Fig. 5.** Immunohistological analysis of the inoculation site. **A.** Histological analysis. (Hematoxylin and eosin stained skin cut 6 hours post-inoculation): a perivascular dermatitis is present, with a mixed inflammatory infiltrate (predominantly neutrophils and a few lymphocytes and macrophages).**1.** magnification: x40, **2.** magnification: x400. **B. 1.** Inflammatory infiltration with a moderate intensity ( $10^5$  pfu, 24 h p.i.). **2.** Inflammatory infiltration with a marked intensity ( $10^7$  pfu, 24 h p.i.). **1.** and **2.**: magnification: x400. **C.** Immunohistological analysis (MYXV antigens labelling, for protocol see Materials and Methods), magnification: x1000 **1.** Negative control without primary specific antibody. **2.** 6 hours post-inoculation, a viral expression is seen in macrophages. The inflammatory infiltrate is

predominantly composed of neutrophils. **4.** 48 hours post-inoculation, a viral expression is specially seen in macrophages. The inflammatory infiltrate is predominantly composed of mononuclear cells (lymphocytes, macrophages).

**Fig. 6.** Immune reponses against MYXV and VP60. Anti-MYXV (**A**) and anti-VP60 (**B**) antibody responses (ELISA) of 10 ovines injected twice (day 0 and day 21, arrows) i.d. with recombinant SG33-VP60. The serological responses were evaluated at 0, 21, 35 and 42 days after the first immunization. Titres were determined by comparison with an hyperimmun serum as reference. The higher point range was arbitrarily defined as 1000 units. **Grey curves** correspond to titres mean. **C**. Comparison of anti-MYXV antibody titres obtained by ELISA (**grey**) and seroneutralisation (**black**) tests. **Rabbit:** -, negative standard rabbit serum; **R1**, hyperimmune standard rabbit serum; **R2**, rabbit serum with an anti-MYXV titre of 1000 measured by ELISA. **Ovine:** -, preimmune serum (day 0) of sheep number 4; **1 to 4**, the four strongest ovine serum samples previously determined by ELISA test.



В



Figure 1, Pignolet et al., 2007



Figure 2, Pignolet et al., 2007



Figure 3, Pignolet et al., 2007

92



Figure 4, Pignolet et al., 2007



Figure 5, Pignolet et al., 2007



Figure 6, Pignolet et al., 2007

#### 3. Discussion

## Interactions MYXV/cellules de ruminants in vitro:

La conception de vecteurs viraux destinés à la vaccination chez une espèce non hôte, comme les ruminants, nécessite de vérifier la capacité de nos virus recombinés à infecter ces cellules, à exprimer des transgènes d'intérêt, et à se répliquer ou non dans différents types cellulaires.

Nous avons montré que les virus T1 (souche sauvage) ou SG33 (souche vaccinale) recombinés sont capables d'infecter des cellules de lignées ou des leucocytes de bovin lorsque ceux-ci sont activés. Cependant, les deux souches virales sont incapables de se répliquer dans tous les types cellulaires testés. Nous avons obtenus les mêmes résultats lors de l'infection de fibroblastes primaires et de PBMC de mouton. Les leucocytes des deux espèces sont plus sensibles lorsque ceux-ci sont activés. Ceci est cohérent avec l'observation que les lymphocytes T humains activés sont infectables par le VACV alors que les LT non activés ne le sont pas (Chahroudi et al., 2005). Cette équipe a montré que ce défaut d'infection des LT non activés serait du à l'absence d'un (ou des) récepteur(s) à la surface du LT cible, récepteur(s) qui serait(ent) synthétisé(s) de novo lors de l'activation. Cependant, dans notre étude, nous ne pouvons pas affirmer que le faible taux d'infection de PBMC non activées est du à la déficience d'évènements de liaison et/ou de post-liaison. Une analyse plus poussée est nécessaire pour déterminer si le défaut d'expression de la GFP observé dans les leucocytes non activés provient d'un problème de synthèse de la protéine, de pénétration du virus ou réellement de l'absence d'un ou de récepteur(s) spécifique(s) nécessaire(s) à l'infection par le MYXV

La caractérisation des sous-populations de PBMC ovines cibles du SG33-GFP nous a permis de mettre en évidence que les LT et les LB, et plus particulièrement les LB, sont les cellules préférentiellement infectées dans nos conditions expérimentales. L'infection des LB par le MYXV pourrait faciliter le développement d'une réponse immune contre des antigènes spécifiques produits par le virus, puisque les LB font partie des cellules présentatrices d'antigènes. Nous n'avons pu faire cette étude des sous populations de leucocytes bovins à cause du manque d'outil, et notamment les anticorps spécifiques de sous populations leucocytaires dont nous ne disposions pas au laboratoire.

Quelles que soient les cellules de ruminants testées aucune production virale n'a été détectée, même pour les leucocytes activés, indiquant que ces cellules sont non permissives au MYXV. De plus, sachant que la capacité du MYXV à se répliquer dans les lymphocytes est une des clés de sa dissémination et de sa pathogénicité chez son hôte naturel, nos résultats garantissent son innocuité notamment dans le cadre de son utilisation vaccinale chez les ruminants.

### Etude in vivo de l'inoculation du MYXV chez les ovins:

Une des voies privilégiées d'inoculation de vaccins fondés sur les poxvirus est la voie intradermique. Nous avons donc exploré grâce à des biopsies de derme et une analyse histologique et immunohistologique la réaction inflammatoire et l'expression de protéines virales par de possibles cellules cibles. Nous avons observé la mise en place d'une réponse inflammatoire progressive au niveau du site d'inoculation proportionnelle à la dose virale injectée par voie intradermique. De plus, l'expression des antigènes viraux est détectée dans des cellules de type macrophagique et dendritique dans une moindre mesure. Nous n'avons pas pu caractériser ces cellules à cause du manque de spécificité des anticorps monoclonaux à notre disposition. De plus, nous n'avons détecté que des cellules infectées isolées tout au long de l'expérience (72 h post inoculation) indiquant que le virus est incapable de se répliquer localement.

L'inoculation du virus SG33-VP60 a permis la mise en place d'une réponse humorale spécifique de l'antigène témoin (VP60). Cependant, nous avons constaté une grande variabilité entre les animaux puisque huit animaux sur dix se sont séroconvertis avec des titres en anticorps contre la VP60 variables au cours du temps. Des améliorations du protocole de vaccination sont donc à envisager.



**Figure 12: Structure du virus de la Bluetongue.** Le virus est non enveloppé. Son génome est constitué de 10 molécules d'ARN double brin. La capside interne est constituée des protéines VP3 et VP7. VP2 et VP5 forment la capside externe du virus. Au cours du cycle viral, les protéines NS1, NS2 et NS3 sont produites dans le cytoplasme des cellules infectées.

# B. Application à la vaccination contre la fièvre catarrhale ovine

Les données que nous avons présentées dans la partie I des résultats sont en faveur du développement de vaccins fondés sur l'utilisation du virus de la myxomatose chez les ovins. Nous avons donc utilisé le MYXV dans un premier essai de vaccination-protection contre le virus de la Fièvre Catharrale Ovine (FCO) chez les moutons.

#### **1. Introduction**

La fièvre catarrhale ovine (FCO) ou encore Bluetongue est une maladie qui touche les ruminants et tout particulièrement les petits ruminants. Il s'agit d'une arbovirose transmissible via la piqûre d'un petit insecte hématophage de la famille des *Culicoides*. Le virus de la FCO ou encore virus de la Bluetongue (BTV), est l'agent étiologique de cette maladie. Ce virus appartient à la famille des *Reoviridae*, virus non-enveloppés à ARN bicaténaire segmenté. Le virion est composé d'une capside externe constituée des protéines VP2 et VP5, ainsi que d'une capside interne formée par les protéines VP3 et VP7. Il possède en plus trois protéines mineures de la capside interne : une ARN-polymérase ARN-dépendante (VP1) ainsi qu'une guanyltransférase (VP4) et une hélicase (VP6) (**Figure 12**). Au cours de son cycle viral, le BTV produit quatre protéines non structurales (NS1, NS2, NS3 et NS3A). Le virus se présente sous 24 sérotypes différents déterminés par les épitopes de la protéine hautement variable VP2.

La maladie est classiquement présente entre les parallèles 40°-50° Nord et 20°-30 ° Sud (Lefèvre, 2003), ainsi qu'en Europe et notamment en France où elle est présente en Corse depuis 2000 avec une première incursion du sérotype 2. Depuis, les sérotypes 4 et 16 y ont circulé. En août 2006, le BTV est apparu dans des pays d'Europe du Nord (successivement Pays-Bas, Allemagne, Belgique et Nord-Est de la France (OIE, 2006)), indemnes de la maladie jusqu'alors. Le sérotype incriminé est le 8 (Toussaint et al., 2007). Une des caractéristiques de cette épizootie est la pathologie sévère observée chez les bovins (Thiry et al., 2006). Depuis, la maladie s'est étendue et on retrouve le BTV-8 jusqu'au centre de la France et même en Angleterre, Danemark et Suisse.

Des vaccins à base de souches atténuées sont disponibles, mais produits par peu de laboratoires : en Afrique du Sud (OBP-Onderstepoort Biological products), en Italie (IZS-Instituto Zooprofilattico Sperimentale) et au Maroc (Biopharma). Ces vaccins sont actuellement les plus utilisés pour lutter contre la maladie. Cependant, il s'agit de vaccins à virus vivants, ce qui pose toujours le problème de la sécurité d'emploi. Ainsi lors d'une campagne de vaccination contre le sérotype 16 du BTV en Corse et en Europe en 2007, l'atténuation insuffisante du vaccin atténué a entraîné l'apparition de signes cliniques résiduels (Savini et al., 2007). Il faut aussi noter que ces vaccins sont « sérotype-spécifique » et protègent donc uniquement contre des infections de sérotypes homologues. Des vaccins à virus inactivés ont aussi prouvé leur efficacité sur le terrain (Stott et al., 1985; Di Eminio et al., 2004), cependant seuls la société Mérial et l'IZS ont réussi pour le moment à virus atténués ou inactivés, posent toujours la question de la différentiation entre des animaux vaccinés et infectés.

De nouvelles stratégies vaccinales doivent être développées pour lutter plus efficacement contre cette maladie. Pour les raisons évoquées précédemment, les poxvirus sont des outils de choix pour la vaccination, en tant que vecteurs viraux. Ainsi, un virus recombiné Capripox virus-VP7 a été testé pour la vaccination des moutons (Wade-Evans et al., 1996). Des tests ELISA ont révélé la présence d'anticorps anti-VP7, en revanche la protection n'était que partielle face à une épreuve virulente de sérotype homologue. Récemment, un *Canarypox virus* recombiné capable de co-exprimer à la fois les deux protéines de capside externe, VP2 et VP5, a été développé pour la protection contre une souche virulente américaine de sérotype 17 (Boone et al., 2007). Ainsi, les moutons vaccinés avec ce vecteur viral non adjuvé ont développé un fort titre en anticorps neutralisants, et ces animaux ont résisté à l'épreuve virulente effectuée avec la souche de terrain BTV-17.

Lorsque notre projet a débuté, seul le sérotype 2 du virus de la Bluetongue circulait en Corse. Nous nous sommes donc tout naturellement intéressés à la vaccination contre le sérotype 2 du virus de la Bluetongue. Nous avons donc réalisé un test de protection contre ce sérotype en utilisant un vaccin fondé sur des virus myxomateux recombinés exprimant différents antigènes du BTV-2 souche Corse.

#### 2. Construction des virus recombinés

#### -a- Construction des plasmides de transfert

Nous avons dans un premier temps cloné chacun des ADNc NS1, NS2, NS3, VP2 et VP7 du BTV souche Corse de sérotype 2 (fournis par l'AFSSA), sous contrôle du promoteur fort précoce-tardif poxviral P7.5. La cassette P7.5-transgène est ensuite insérée entre les gènes M9L et M12L de la souche SG33 du MYXV. Ces gènes encadrent le locus M11L/MGF, site choisi pour l'insertion des transgènes. Une cassette contenant le gène *gpt* d'*E. coli* sous contrôle du P7.5 est aussi insérée dans ce même locus, permettant la sélection des virus recombinés.

#### -b- Obtention et analyse des virus recombinés

Les virus recombinés sont obtenus après recombinaison homologue entre le plasmide de transfert et le génome du virus SG33. Les virus recombinés sont sélectionnés grâce à la présence de la cassette *E. coli gpt* théoriquement insérée lors de la recombinaison. Un second criblage par PCR nous a permis d'isoler des plages virales dont le génome est alors M11L/MGF -, transgène +, *E. coli gpt* +. Nous avons ainsi obtenu cinq virus recombinés: SG33-NS1, SG33-NS2, SG33-NS3, SG33-VP7 et SG33-VP2.

#### -c- Contrôle de l'expression des protéines d'intérêt

Nous avons produit au laboratoire un sérum polyclonal de lapin spécifique de la protéine VP7 du BVT-2 (anti-VP7). Cette protéine nous a été fournie par l'AFSSA. Afin de vérifier la production de la VP7 lors d'infection avec le virus recombiné SG33-VP7, nous avons infecté des cellules de lapin (RK13) ou cellules ovines (Mm) avec ce même virus. Nous avons ensuite réalisé un immunomarquage à l'aide des anticorps anti-VP7, révélé par un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé au FITC. Nous observons un marquage à la fois dans les cellules de lapins et les cellules ovines (**Figure 13**). Ceci indique que nous avons production de la protéine d'intérêt, et ce dans les deux contextes.



**Figure 13:** Contrôle de l'expression et de la production d'ARNm des virus SG33 recombinés. **A.** Des cellules de lapins (RK13) et de moutons (Mm) ont été infectées avec le virus SG33-VP7. La production de protéine VP7 est contrôlée par immunofluorescence grâce à des anticorps de lapin anti-VP7. **B.** Des cellules RK13 ont été infectées avec du virus SG33-VP7 ou du virus SG33-NS1. Après extraction d'ARN, une RT-PCR avec des amorces spécifiques de chacun des transgènes a été réalisée. PM : marqueur de poids moléculaire. **1.** témoin négatif de PCR. **2.** témoin négatif de PCR en utilisant comme matrice les ARN extraits et traités à la DNase I. **3.** témoin positif de PCR. **4.** PCR sur les ADNc produits après traitement à la DNAse I.

Nous avons tenté de produire des anticorps anti-NS1 et anti-NS3 sans succès. Les protéines NS2 et VP2, quant à elles, n'étaient pas disponibles pour produire des anticorps spécifiques. Pour contourner ces problèmes, nous avons testé un sérum polyclonal de mouton immunisé avec la souche vaccinale atténuée BTV-2. Cependant l'important bruit de fond observé en immunofluorescence nous a empêché d'analyser correctement les résultats. Pour palier ces difficultés techniques, nous avons réalisé des RT-PCR pour vérifier au moins la production d'ARNm spécifiques de nos transgènes. Nous avons ainsi pu détecter les ARNm correspondant à VP7 (témoin), NS1 (**Figure 13**) et NS3 (données non montrées). Les résultats obtenus avec les gènes NS2 et VP2 sont, quant à eux, douteux (voir discussion).

#### 3. Test de protection contre la Bluetongue souche Corse BTV-2

#### -a- Protocole de vaccination

Afin de vérifier la capacité de nos virus myxomateux recombinés à protéger des moutons contre une souche virulente de sérotype homologue du virus de la Bluetongue, nous avons inoculé un groupe de 11 animaux avec un cocktail des cinq virus (SG33-NS1, SG33-NS2, SG33-NS3, SG33-VP7 et SG33-VP2).  $2x10^6$  à  $10^7$  pfu/virus/animal ont été inoculés par voie intradermique en deux injections à 21 jours d'intervalles (groupe « animaux vaccinés ») (**Figure 14**). Parallèlement nous avons inoculé dix animaux avec le virus recombiné SG33-VP60 ( $2x10^6$  pfu/animal) (groupe « témoins négatifs »). Quarante-deux jours après la première inoculation, les animaux ont été éprouvés avec la souche BTV-2 Corse fournie par Mérial ( $10^4$  TCID<sub>50</sub> par voie sous-cutanée) sous confinement A3 (unités expérimentales de l'AFSSA à Sophia Antipolis). A l'issu de l'expérimentation, les animaux ont été euthanasiés et incinérés (J75).

#### -b- Suivi clinique des animaux

Une surveillance clinique a été réalisée de J0 à J7, puis de J21 à J28, soit pendant 7 jours postinoculation des candidats vaccins, afin de surveiller l'apparition d'éventuels symptômes



**Figure 14: Protocole expérimental de vaccination contre une épreuve virulente Bluetongue.** Dix animaux ont été inoculés à J0 avec un cocktail vaccinal de 2x107 pfu de chaque virus recombinant (SG33-NS1, SG33-NS2, SG33-NS3, SG33-VP7 et SG33-VP2) par voie intradermique et reboostés 21jours après avec ce même mélange et par voie intradermique à nouveau. A J42 post première injection, les animaux ont été challengés avec la souche Corse BTV-2 virulente fournie par la laobratoire Mérial. J75, constitue la fin de l'expérimentation tous les animaux encore vivants ont été authanasiés.

locaux ou généraux et donc d'effets secondaires post-vaccination. Après l'épreuve virulente, un suivi clinique a été effectué tous les jours. Ce suivi clinique comprend une prise de température, une observation soigneuse des points d'injection et une notation des signes cliniques selon un système de « scoring » mis au point par Mérial en 2003 lors d'un essai de vaccination contre la Bluetongue (voir Annexes).

#### Suivi de la température

La température rectale physiologique d'un mouton se situe entre 38,5 et 40°C, au-delà nous considérons que l'animal est en hyperthermie. La **Figure 15** présente la moyenne des températures des dix animaux pour le groupe « témoins négatifs » et des onze animaux du groupe « animaux vaccinés ». Le profil de la moyenne des températures pour les deux groupes est similaire. Avant l'épreuve virulente, les températures se situaient toutes dans un intervalle de 38,5 à 40°C, ce qui indique que les animaux ne réagissent pas à l'inoculation de notre cocktail vaccinal. En revanche, trois jours après l'inoculation de la souche virulente BTV-2, nous avons observé un pic thermique, dont le maximum est atteint huit jours post-épreuve (J50) avec des températures dépassant les 41°C et ce pour les deux groupes. Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes.

#### « Scoring » clinique

Après épreuve virulente, 3 moutons sur 10 sont morts dans le groupe « témoins négatifs » (taux de mortalité de 30 %) et 5 animaux sur 11 dans le groupe « animaux vaccinés » (taux de mortalité de 45 %).

Pour chaque animal, la moyenne des scores cliniques journaliers a été calculée à partir de J42 (jour de l'inoculation du BTV-2 souche virulente) jusqu'à J75 (fin de l'expérience et euthanasie des animaux encore vivants).

L'analyse des courbes de « scoring » clinique révèle un profil identique pour les deux groupes d'animaux caractérisé par une augmentation des scores cliniques à partir de J49, soit 7 jours après l'inoculation de la souche d'épreuve (**Figure 15**).



Figure 15: Suivi clinique des moutons lors de l'essai de vaccination protection contre la Bluetongue. Les courbes grises correspondent au groupe « témoin négatif ». Les courbes noires correspondent au groupe d'animaux vaccinés avec le cocktail de MYXV recombinés. A. Courbes des moyennes journalières des températures. B. Courbes des moyennes des scores cliniques.

-c- Test sérologique: réponse contre les protéines VP7, NS1 et NS3

Des tests ELISA permettant de détecter les anticorps anti-VP7, anti-NS1 et anti-NS3 ont été développés par l'AFSSA et les analyses sérologiques ont été effectuées par l'AFSSA. Aucune réponse significative contre la VP7, NS1 ou encore NS3 n'a été détectée chez les animaux vaccinés avec le cocktail de SG33 recombinés avant l'épreuve virulente (données non montrées).

#### 4. Discussion

Développer un vaccin alliant à la fois innocuité et efficacité vis-à-vis de la FCO reste à l'heure actuelle un objectif majeur en santé animale. Cette nécessité s'est accrue d'une part avec l'émergence de la maladie en Europe du Nord mais aussi par le fait que les bovins jusqu'alors considérés comme réservoirs asymptomatiques, manifestent désormais des signes cliniques non négligeables lors d'infection par le BTV-8. L'impact économique de la maladie sur les cheptels ovins et bovins est donc très important. Il existe à l'heure actuelle des vaccins à virus atténués « sérotype-spécifiques », mais se pose toujours la question de la bonne atténuation et de la pathogénicité résiduelle de tels vaccins. De plus, les 24 sérotypes du BTV n'induisant pas de protection croisée, la problématique d'un vaccin à large spectre de protection reste un enjeu de taille.

C'est donc dans cette optique-là que nous avons travaillé à l'élaboration d'une nouvelle stratégie vaccinale fondée sur l'utilisation de virus myxomateux recombinés.

En se basant sur les données encourageantes obtenues *in vitro* et *in vivo* avec un transgène témoin (VP60) (chapitre I des résultats), nous avons construit une batterie de virus SG33 (souche vaccinale du MYVX) recombinés: le SG33-VP7 exprimant la protéine VP7, antigène spécifique du groupe, les SG33-NS1, SG33-NS2 et SG33-NS3 produisant les protéines non structurales du BTV-2, protéines les plus conservées entre tous les sérotypes du BTV, et enfin le SG33-VP2 qui produit la protéine immunodominante déterminant le sérotype du BTV et inductrice d'anticorps séroneutralisant le virus BTV. Voulant obtenir à terme un large spectre de protection contre la Bluetongue, nous avons vacciné des moutons avec un cocktail contenant nos cinq virus recombinés. La protéine VP2 devrait générer des anticorps anti-VP2 neutralisants mais spécifiques du sérotype (Huismans & Erasmus, 1981; Jeggo et al., 1984;

Huismans et al., 1987; Mertens et al., 1987; Pierce et al., 1995). Les protéines NS1, NS2 et NS3, les plus conservées parmi tous les sérotypes du BTV, pourraient aider à une certaine protection croisée. Il a été montré que NS1 serait impliquée dans la génération d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. De même pour NS2, la vaccination de souris avec la protéine seule permet le développement d'une réponse cellulaire contre la NS2 et une protection partielle contre un virus de la vaccine recombiné exprimant la NS2 (Jones et al., 1997). La protéine VP7 de la capside interne serait elle aussi impliquée dans la génération d'une réponse cellulaire contre le virus (Wade-Evans et al., 1996). Ces protéines NS1, NS2 et VP7 s'accumulent en grande quantité pendant la réplication du virus et génèrent des LT cytotoxiques à la fois chez le mouton et la souris (Jeggo & Wardley, 1982a; Jeggo & Wardley, 1982b; Jeggo & Wardley, 1982c; Jeggo et al., 1993; Jeggo et al., 1985; Jeggo & Wardley, 1985; Andrew et al., 1995; Jones et al., 1997). La protéine NS3 s'accumule elle aussi en grande quantité dans les cellules infectées, mais aucune information n'est connue quant à son implication das l'induction de la réponse immunitaire.

Grâce à la génération au laboratoire d'anticorps de lapins spécifiques de la protéine VP7, nous avons montré que le virus recombiné SG33-VP7 produit la protéine VP7. Avec les protéines NS1 et NS3 fournies par l'AFSSA de Maisons-Alfort, nous avons tenté d'immuniser des lapins pour obtenir le même type d'outils. Cependant, aucune production d'anticorps spécifiques de ces deux protéines n'a été obtenue, sans doute parce que ces protéines non-structurales sont faiblement immunogènes et peut être particulièrement dans une espèce non-hôte du BTV comme le lapin. En ce qui concerne les protéines NS2 et VP2, elles ne sont pas encore disponibles car le clonage de leur ADNc reste encore difficile. C'est plus particulièrement le cas pour le gène de la VP2 qui est un long fragment d'environ 3000 pb très riche en A-T, posant des problèmes lors des étapes d'amplification par PCR. Pour compenser dans une certaine mesure ce manque d'outils nous avons réalisé des RT-PCR après infection de cellules par nos différents virus recombinés ce qui nous a permis de visualiser la production d'ARNm spécifiques des gènes NS1 et NS3. Les résultats des RT-PCR spécifiques des ARNm pour NS2 et VP2 sont douteux.

L'inoculation des virus myxomateux recombinés a été réalisée par voie intradermique, une des voies préférentiellement utilisées lors de la vaccination fondée sur l'emploi des vecteurs poxviraux. De plus, nous avons montré précédemment que les fibroblastes du derme de mouton, ainsi que des cellules présentatrices d'antigènes sont infectables et capables de

produire des antigènes viraux *in situ* (Chapitre I de la partie résultat, article #2). Ces données cumulées sont donc en faveur de cette voie d'inoculation. L'inoculation de notre cocktail de virus SG33 recombinés s'avère incapable de protéger les moutons contre une épreuve virulente du virus de la Bluetongue et ceci malgré le fait que le système d'expression adopté ait montré son efficacité avec un antigène témoin (VP60). Certains points sont donc encore à étudier et à améliorer dont la qualité de l'expression, la présentation des antigènes et leur prise en charge par les cellules présentatrices d'antigènes.

# C. Interactions entre le MYXV et les cellules dendritiques ovines

Comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre II de la section « Résultats », les essais de vaccination et l'évaluation de la protection contre une souche virulente du virus de la Bluetongue de sérotype homologue n'ont pas été concluants. Afin de comprendre les mécanismes qui initient une réponse immune induite par la vaccination chez le mouton avec un MYXV recombiné, nous avons étudié l'interaction entre le virus SG33 et les cellules dendritiques ovines générées *in vitro*.

#### 1. Introduction

Les cellules dendritiques (DC) sont les principales cellules présentatrices d'antigène (APC) capables d'activer les cellules T naïves. Elles sont notamment présentes au sein de la peau, site classiquement utilisé pour l'injection de vaccin par voie sous-cutanée ou intradermique.

Le principal obstacle à l'étude de ces cellules est leur très faible proportion dans l'organisme. Aussi, la purification de ces cellules à partir du sang, des noeuds lymphatiques ou encore des tissus ne permet pas l'obtention d'un grand nombre de cellules, posant ainsi un problème majeur pour leur étude. La mise au point de protocole pour la génération *in vitro* de cellules dendritiques permet d'étudier l'interaction des DC avec des agents pathogènes. Ces DC peuvent être générées à partir de différents précurseurs: à partir de monocytes sanguins (Mo-DC) ou encore de cellules de la moelle osseuse (BM-DC). Au laboratoire, l'équipe de G. Foucras a mis au point un protocole de différentiation de DC à partir de précurseurs de la moelle osseuse d'ovin en présence de GM-CSF recombinant ovin (Foulon et al., en soumission). L'analyse des populations de DC obtenues a révélé la présence de deux populations de DCs que l'on peut notamment distinguer par l'expression des marqueurs CD11b, CMH-II et CD207 (langerine). En outre, leur morphologie est différente après examen en microscopie électronique à transmission. Ce protocole de différentiation permet l'obtention de cellules de type Langerhans (CD11b<sup>dull</sup>, CMH-II<sup>high</sup>, CD207+) et de cellules de types Mo-DC (CD11b<sup>int/high</sup>, CMH-II<sup>low</sup>, CD207-) (Foulon et al., en soumission).

#### 2. Résultats

Pour ces études d'interactions virus MYXV/DC, nous avons utilisé le virus SG33-GFP, exprimant un transgène témoin la GFP, comme modèle dans le cadre d'une vaccination. Nous avons montré que le virus recombiné SG33-GFP est capable d'infecter les cellules dendritiques ovines avec environ 20 % des cellules exprimant la GFP après infection à une m.o.i. de 1 pendant 16h. Nous avons aussi montré que des BM-DC de lapins, générées en présence de GM-CSF humain, sont infectées à 59 % à m.o.i de 1.

Les BM-DC ovines ne sont pas permissives à l'infection puisque le titre viral n'augmente pas au cours du temps (cinétique sur 72 h p.i.), contrairement à ce que l'on observe avec les BM-DC de lapin. L'infection des BM-DC ovines par un MYXV recombinant exprimant le gène rapporteur LacZ sous contrôle du promoteur tardif P11 du VacV révèle que les gènes viraux tardifs ne sont pas exprimés dans ce type cellulaire. Par ailleurs nous avons mis en évidence que les différents types de cellules dendritiques générées *in vitro* ne sont pas sensibles de façon identique au MYXV, les cellules de type Langherans (LC) (CD11b<sup>dull</sup>, CMH-II<sup>high</sup>) étant préférentiellement infectées.

Lorsque la m.o.i. augmente, nous avons observé une diminution de la proportion des cellules de type LC après infection et collecte pour l'analyse en cytométrie. Un marquage avec l'Annexine V, marqueur spécifique des cellules qui entrent en apoptose, nous a permis de montrer qu'une partie des DC ovines infectées, et plus particulièrement les cellules de type Langerhans infectées, entre en apoptose dans les heures qui suivent l'infection. Nous avons aussi remarqué que des cellules non infectées (GFP négatives) entrent elles aussi en apoptose. Ceci indique que les cellules infectées émettent des signaux de mort dans la culture qui se propagent aux cellules non infectées.

L'infection des DC par le MYXV n'induit pas la surexpression des molécules de costimulation telles que CD40, CD80 ou encore CD86, ni la surexpression des molécules CMH-II à la surface des cellules. Un test de lymphoprolifération allogénique, qui permet d'évaluer la capacité des DC infectées à présenter des antigènes étrangers aux lymphocytes CD4+, a montré une diminution des capacités de présentation des cultures de DC infectées.

Dans un premier essai, l'ajout d'IFN $\alpha$  semble restaurer la capacité de présentation des DC infectées aux cellules.

# ARTICLE # 3

Eliane Foulon\*, <u>Béatrice Pignolet</u>\* and Gilles Foucras

# Efficient transduction of non-host species mature bone-marrow derived dendritic cells

by myxoma virus

En préparation

# Efficient transduction of non-host species mature bone-marrow derived dendritic cells by myxoma virus

Eliane Foulon\*, Béatrice Pignolet\* and Gilles Foucras

Unité Mixte de Recherches Institut National de la Recherche Agronomique/Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 1225, Interactions Hôtes-Agents Pathogènes, 23, chemin des Capelles, BP87614, 31076 TOULOUSE CEDEX 03

\* Both authors contributed equally to this work

Correponding author: Gilles Foucras, e-mail address: g.foucras@envt.fr

Number of words in the abstract: 210

Total length:

#### ABSTRACT

Recombinant MYXV can easily be developed, and their narrow host restriction makes them good vector candidates, although information on their interaction with professional antigenpresenting cells is lacking. When bone marrow-derived dendritic cells (BM-DC) were infected with the SG33 vaccine strain, rabbit cells are highly permissive. Interestingly, infection of ovine BM-DCs was also possible, albeit at lower frequency, but virus cycle was abortive. In vitro-generated Langerhans cell-like DCs were the preferential targets of MYXV and became infected at low MOIs. However, these cells died by apoptosis following an increasing MOI. Expression of costimulatory and MHC class II molecules was poorly modified after MYXV infection in ovine cells, suggesting that MYXV has a poor capacity to induce DC activation. However, ovine BM-DCs remained equally susceptible to MYXV after cell maturation had proceeded. When stimulatory capacity of infected DCs was assayed in mixed allogeneic reaction, proliferation of CD4 T cells was significantly diminished, probably as a consequence of DC apoptosis. We have shown here that MYXV is able to infect dendritic cells from host and non-host species, indicating that DC transduction can be carried out with low modifications of their maturation state. Inasmuch, the fact that mature DCs remained receptive and delayed apoptosis might further increase the immunogenicity of MYXV vectored vaccines.

Keywords : bone marrow-derived dendritic cells, myxoma virus, transduction, sheep, vaccine

#### **INTRODUCTION**

Recombinant poxvirus vectors are considered as vaccine candidates for a variety of infectious diseases. Poxviruses are renowned for their ability to induce strong immunity against their own, but also heterologous proteins when genes of interest are introduced in their genome (Moss et al., 1996). Numerous studies involving recombinant viruses have shown that poxvirus infection can induce both T- and B-cell dependent immune responses, despite several strategies developed by these viruses to escape host immunity (Seet et al., 2003). Both MVA and NYVAC viruses are potent activators of T cell-specific immune responses to recombinant antigens, indicating efficient antigen delivery in APC and activation of immune T cells, possibly due to virus infection of activated DC (Guerra et al., 2007). Indeed, several poxvirus vector systems are already under clinical evaluation for vaccine development against infectious diseases and cancer in humans. However, recent findings showed that Vaccinia virus infection of human DCs interrupts cell maturation and leads to apoptosis (Engelmayer et al., 1999). Further studies on these aspects should help improving vaccine efficacy.

For domestic animals, avipox and myxoma (MYXV) viruses have been shown efficient vectors to induce protective immune responses, notably in rabbits (Barcena et al., 2000, Bertagnoli et al., 1996), cats (McCabe & Spibey, 2005, McCabe et al., 2002). However, to our knowledge, no platform has been described for ruminants. Until now, most of the ruminant vaccines used attenuated strains of pathogens, and for that reason, naturally infected and vaccinated animals cannot easily be differentiated. Development of recombinant vaccines for ruminant species would help to implement vaccine policies and achieve this aim.

MYXV has already been used as a vaccine vector and is among the best candidates for vaccine development in ruminants. Attenuated and host-restricted MYXV SG33 has a number

of desirable features as a vaccine candidate including promising safety profiles, and the ability to incorporate substantial genetic material for the expression of foreign gene products. We have recently shown that recombinant MYXV is able to infect ovine primary and immortalized cells (Pignolet, 2007), and that the infection was not productive in that species. Moreover, ovine cells support expression of heterologous proteins (ie GFP,  $\beta$ -galactosidase). In addition, preliminary results demonstrated that sheep inoculated with SG33-VP60 mount a specific antibody response against the product of the transgene.

To extend the knowledge about this vector in the perspective of its use in ruminant species, we evaluated the effect of myxoma virus infection on ovine dendritic cells. For that purpose, ovine bone marrow-derived dendritic cells have been generated in a protocol recently described and infected with the MYXV vaccine SG33 strain.

In that paper, we showed that MYXV infects both immature and mature dendritic cells from sheep and that MYXV preferentially targets Langerhans-like DCs. However MYXV infection does not induce infected DC maturation, and infected cells die by delayed apoptosis after 12 hours. Although infection of BM-DCs altered T cell proliferation in mixed allogeneic culture, DC apoptosis may further enhance the immunogenicity of MYXV-vectored vaccines.

#### RESULTS

SG33 MYXV infects rabbit and ovine dendritic cells, but fails to replicate in non-host BM-DCs. Previously published histopathological data indicated that MYXV is able to infect dendritic cells after inoculation to rabbits (Best & Kerr, 2000), suggesting that these cells could be among the primary targets of MYXV in vivo. Moreover, we have recently noted that cells corresponding to macrophages and/or dendritic cells were infected after intradermal injection of a MYXV vaccine strain in sheep (Pignolet et al., 2007). To further investigate the capacity of MYXV to infect dendritic cells, rabbit and ovine DCs were produced by culturing bone marrow cells in the presence of human or ovine recombinant GM-CSF respectively. Day7 bone marrow-derived DCs were infected with a recombinant MYXV, where eGFP was driven by the early/late P7.5 promoter. We observed a strong GFP expression in 59 % of the rabbit cells at MOI 1, indicating that DCs from the natural host species are highly susceptible to MYXV infection. More importantly, GFP was detected by flow cytometry in 18 % of the ovine BM-DCs at the same MOI, albeit at lower levels than what was observed in rabbit cells (Fig 1). Cell infection developed specifically in some of the CD11c-positive cells, and GFP fluorescence was never observed in progenitor cells. Thus, MYXV can infect DC from both host and non host species.

We determined MYXV replication in rabbit and ovine BM-DCs, and screened permissivity for MYXV SG33 strain infection in that cell type. Growth curve analysis were performed in BM-DCs of both origins, and compared (Fig.1A). At MOI 0.01, infection of rabbit BM-DCs underwent several rounds of replication since we observed a progressive increase of MYXV titres over time (Fig. 1A, left panel). On the contrary, MYXV titre did not change in ovine BM-DCs. Cells were then infected with SG33 at a MOI 1., and infection of rabbit BM-DCs produced growth curves closely resembling a classical poxvirus replication curve, with a continuous increase of MYXV titres, whereas no increase could be observed in infected ovine BM-DCs. We concluded that MYXV infection in ovine BM-DCs is abortive.

The incompleteness of the viral cycle is due to the absent expression of late genes, as LacZ gene was under the control of the late p11 promoter and  $\beta$ -Gal activity was never detected in ovine cells (Fig 2B). Conversely, expression was detected in cells of rabbit origin. Default of late gene expression might jeopardize particle formation in ovine BM-DCs, leading to an abortive virus cycle.

Infection of ovine BM-DCs was dependent on the number of SG33-GFP pfu added to the culture. The proportion of GFP-positive cells varies from 5% (MOI 0.3) to 40% at MOI 5 (Fig. 3A). However, cell viability decreased with higher MOI. In conclusion, MYXV infects ovine BM-DCs in a virus multiplicity dependent manner, wherein replication is defective.

*Epidermal DC-like subset is more receptive to MYXV infection.* We have previously shown that the culture of ovine BM progenitors with GM-CSF give rise to several subsets of DCs, that can be distinguished after CD11b and MHC class II staining (Foulon, 2007). When ovine BM-DCs were infected with increasing pfu per cell of the SG33-GFP MYXV, we observed that the proportion of CD11b<sup>int</sup> MHC II<sup>hi</sup> DCs progressively diminished as the number of added pfu to the culture increased. The same phenomenon was observed with SG33 MYXV, excluding a role of the antiapoptotic M11L gene that was deleted after insertion of the GFP gene. To definitively assess the cell responsiveness to MYXV infection and avoid possible effects of infected cells on other cell types, Mo-DC-like (CD11bhi MHC IIIo) and LC-like (CD11bho MHC IIhi) cells were separated as previously described (Foulon, 2007). As shown in Fig 1, fluorescent background was determined on SG33 infected cells. Comparison of GFP expression in both BM-DC subtypes showed that GFP expression was detected at lower MOI

in CD11b<sup>int</sup> cells, and signal over background was always stronger in that cell type. However, their proportion was significantly diminished after incubation, suggesting that the virus induced cell death or maturation-linked adhesion to the dish, avoiding these cells from further analysis.

Induction of apoptosis in DCs has been reported for other poxviruses like vaccinia virus (). To determine whether BM-DCs infected with MYXV were dying by apoptosis, we stained BM-DCs with PE-labelled Annexin V, which binds to phosphatidylserine on the surface of cells undergoing early apoptosis. Propidium iodide was combined to detected necrotic cells. Annexin V was detected at the surface of GFP-positive BM-DCs, showing that these cells underwent apoptosis after 16 hour-infection (Fig 4A). However, overexpression of Annexin V was also detected on GFP-negative cells, indicating that bystander effects on non-infected cells were present. The number of cells undergoing secondary necrosis was increased in GFP-positive cells (Fig 4B). These data combined with the loss of epidermal DC-like cells during culture and cell analysis, definitively assessed that infection is leading to LC-like DCs apoptosis, suggesting that MYXV preferentially infects and lyses this DC subset.

*MYXV* infection is not maturation-dependent and does not induce significant BM-DC maturation. As LC-like cells express higher levels of MHC class II at their surface, we tested the hypothesis that mature cells are more susceptible to MYXV infection, by upregulating receptor-mediated endocytosis, although that process is generally diminished as cells were more mature. BM-DCs were induced to mature by the addition of heat-killed *S aureus* cells. After 18 hour incubation, upregulation of MHC class II and costimulation markers was evident (data not shown) as a proof for effective maturation. BM-DCs were then infected at MOI 1. Following infection and overnight culture, similar proportions of GFP-positive cells were detected in both immature and mature cultures. These data indicated that maturation
poorly modified BM-DC susceptibility to MYXV infection. Thus, maturation does not abrogate MYXV infection, although LCs remained equally susceptible to infection-induced cytopathic effects of MYXV.

We then tested if MYXV infection promotes BM-DC maturation. For that purpose, BM-DC cultures were infected with different amounts of SG33-GFP pfu. As described above, GFP-positive cells increased with the number of pfu added to the culture. Costimulatory molecules were analyzed as a function of cell maturation after overnight incubation. Unexpectedly, the levels of CD40, CD80 and CD86 markers were not modified, whether their expression was analyzed on the surface of GFP-positive or GFP-negative cells. It was highly comparable with that measured in uninfected cultures. Moreover, no MHC class II upregulation was noticed in any of the above conditions. In conclusion, BM-DC maturation does not affect the capacity of MYXV to infect that cell type, and MYXV infection does not induce BM-DC maturation per se.

Whether MYXV could interfere with DC maturation, as it has been described for MVA (Drillien et al., 2004) has remains to be investigated.

Diminished T cell priming is observed after BM-DC infection by MYXV, but it can be overcome by maturation signals. Since apoptosis was observed in BM-DC culture after MYXV infection and some costimulatory molecules were not upregulated in infected living cells, we next evaluated how that could affect T cell priming. For that purpose, purified CD4 T cells were co-cultured with BM-DCs that had been infected or not with MYXV. As presented in Fig 6, MYXV infection leads to a diminished allogeneic cell proliferation, since LC-like cells have been shown as the most potent inductors of T cell divisions. Whatever the pfu dose used to infect BM-DCs, cell proliferation was significantly altered. However, when BM-DC maturation was induced by addition of IFN $\alpha$  or LPS (not shown), CFSE dilution and cell survival was higher than in the absence of DC maturation, with or without MYXV infection.

### DISCUSSION

In this report, we investigated the capacity of MYXV to infect dendritic cells in sheep, as a model for ruminants, and the effects of such infection on the cell capacity to undergo maturation.

Interestingly, we showed for the first time that MYXV efficiently replicates in rabbit BM-DCs. Conversely, viral cycle was abortive in ovine DCs, reinforcing the safety of such a platform for vaccination in ruminants. As early genes were the only well detected genes after MYXV infection of BM-DCs, recombinant genes should preferentially be driven by early promoters. For that reason, the well known synthetic P7.5 promoter is appropriate (Bronte et al., 1997) as it drives GFP expression early after cell infection, and before cells become apoptotic.

It has been previously described that vaccinia virus interfere with the maturation of immature human DCs as indicated by inhibition of the expression of many proteins known to be induced during DC maturation (Engelmayer et al., 1999). By contrast, infection of immature monocyte-derived dendritic cells by recombinant canarypox-HIV vector induced maturation that was mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$  (Marovich et al., 2002). Of importance, infected DCs remained functional and induced IFN $\gamma$  production by CD8 T cells isolated from HIVinfected individuals. In our conditions, we demonstrated that MYXV-infected BM-DCs did not undergo maturation as CD80/86 and CD40 molecules were not upregulated in MYXV- infected BM-DCs. The same observation has been recently reported with VacV-infected BMDCs in mouse (Yates & Alexander-Miller, 2007). As a consequence, the VacV-infected DCs were not capable of activating naïve CD8 T cells. The finding that VacV infection of DCs generates APC that were unable of initiating T cell response is surprising given the previously reported role for direct presentation in the generation of anti-VacV CD8 T cell responses in mice (Shen et al., 2002). Poxvirus vectors are able to deliver antigens to the cytosol that can then be processed and presented in association with MHC Class I molecules to naïve CD8 T cells, leading to a protective cellular immunity. Although costimulation requirement is lower for CD8 than CD4 T cells, it's well known that secondary signals are necessary for establishment of a strong memory response. However, persistence of a memory CD8 response after poxvirus-vectored immunisation has never been evaluated to our knowledge.

UV-treated VacV induced stronger costimulatory molecule expression than did VacV itself on mouse BM-DCs, indicating the presence of active mechanisms inhibiting the maturation process (Yates & Alexander-Miller, 2007). In addition to the production of cytokines (e.g. IL-10) that is known to block DC maturation by ORFV (Chan et al., 2006, Lateef et al., 2003), the way used by poxviruses to inhibit that process is poorly understood.

When mature BM-DCs were infected with MYXV, they were as susceptible as immature DCs, giving a possibility to overcome some of the limitations described above. Addition of adjuvant molecules to promote recruitment and maturation of DC may help to increase the efficiency of MYXV vector recombinant vaccines, as described (Chavan et al., 2006), (Reali et al., 2005).

However, it has been shown that despite rVacV interference with immature DC maturation, a single targeting vector can deliver Ags to mature DC for the effective simultaneous

123

stimulation of both CD4+ and CD8+ T cells (Bonini et al., 2001). Further work is currently done to evaluate these approaches in our current model.

We have shown that epidermal DC-like cells die by delayed apoptosis after MYXV infection. The role of apoptosis in the immune response is still unclear, but antigens produced by apoptotic cells are reported to increase antigen immunogenicity, and are likely to be more effective in cross-priming. Indeed, antigens released from dying cells can be taken up by endocytosis, and guided to that alternative pathway of presentation. The delayed apoptosis in DCs may be due to the production of apoptosis inhibitors, e.g. SERP2 (Petit et al., 1996), M11L that are both lacking in the SG33-GFP genome. However, deletion of M11L gene in the recombinant SG33 viruses was not associated with enhanced apoptosis, although its role in the apoptosis of MYXV-infected RL-5 rabbit T cells has been previously described. (Macen et al., 1996).

The fact that a small number of DCs are still alive 16 hours after MYXV infection may be sufficient for T cell priming, since migration of the DCs to the lymph node was evident 12 hours after induction of local inflammatory conditions. In the lymph node, resident DCs may ingest MYXV-infected apoptotic cells and present viral epitopes to T cells.

Taken together, these results provide new insights on the interaction between MYXV and professional APCs in a ruminant species, to further improve MYXV-driven immunisation strategies.

### **MATERIALS AND METHODS**

# **Cell lines**

Rabbit kidney cells (RK13, ATCC CCL-17) were grown in Dulbecco's Eagle medium (DMEM, Gibco-BRL) and rabbit T lymphocytes (RL5) were grown in RPMI 1640-Glutamax, 25 mM Hepes (Gibco-BRL). All cell culture media were supplemented with 10 % foetal calf serum (FCS), 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 25 mM Hepes, 1 % non essential amino acids, and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol.

# Generation and culture of bone marrow-derived dendritic cells (BM-DC)

All animals were maintained in conventional conditions and were euthanized in accordance with local regulations. Protocols for in vitro bone marrow-derived dendritic cells (BM-DC) generation have been described elsewhere for rabbit (Cody et al., 2005), and ovine species (Foulon, 2007). In brief, bone marrow cells were harvested from the tibia in rabbit and the sternum in sheep. BM cells were obtained by scraping, and released by crumbling the marrow with a syringe piston in a Petri dish filled with HBSS buffer. Cells were passed through a 100 µm nylon mesh to remove small pieces of bone and debris, and red blood cells were lysed by incubation in ACK lysis buffer. Cells were cultured in bacteriological dishes at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 7-8 days. Culture medium was complete RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 20 ng/ml recombinant ovine GM-CSF for ovine, and human GM-CSF (Abcys) for rabbit BM cells respectively. Fresh medium supplemented with cytokine was added every 3 days.

### Viruses

All viruses used in this study were derived from the vaccinal attenuated strain SG33 of MYXV (Saurat et al., 1978) and modified in our laboratory. The recombinant SG33-GFP

(Pignolet et al., 2007), SG33-VP60 {Bertagnoli, 1996 #5} respectively contains the eGFP gene or rabbit hemorrhagic fever capsid encoding gene VP60 under the control of strong early/late vaccinia virus p7.5 promoter inserted into the M11L-MGF locus. Moreover, the SG33-VP60 contains the *lacZ* gene under control of the poxviral late P11 promoter inserted in the same locus.

Viruses were purified by saccharose gradient sedimentation and titers determined by serial dilutions and plaque assays.

# Infection and growth curves

For growth analysis, virus was added at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 (multi step) or 1 (single step) to  $1.5 \times 10^6$  cells in 500 µl. The virus was allowed to adsorb for 90 minutes at 4°C. Virus was then removed and cells were washed twice and recovered by centrifugation. Infected cells were cultured at  $0.3 \times 10^6$  cells per 100 µl/P96 well in their own medium supplemented with 10 % of FCS. At each time of interest (as indicated in the figure legends), cells were collected. To release virus from infected cells, each collected sample was subjected to three freeze-thaw cycles.

For titration, serial dilutions of cell lysis supernatant were added to RK13 cells and adsorbed for 90 minutes. Inoculum was removed and fresh medium, supplemented with 5 % FCS, was added. After 48 h of incubation at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, medium was removed and replaced by solid medium containing MEME (Invitrogen) medium supplemented with 100 units/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 % FCS, 25 mM Hepes, 0.2 % NaHCO<sub>3</sub>, 1 % LMP agarose (Invitrogen). After 2 days, lysis plaques were counted under macroscopic examination.

# **X-Gal staining and analysis**

Rabbit and ovine cells were infected with the SG33-VP60 (MOI 0.1 and 1). Twenty-for hours post-infection, they were fixed with 2.5 % glutaraldehyde for 15 minutes at room temperature and stained with 2 mg/ml X-gal, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O, 5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in PBS for 4-10 hours and observed by microscopy.

# Cell analysis by flow cytometry and separation

Ovine BM-DC surface phenotype was analyzed by flow cytometry after incubation with CD11c (OM1b hybridoma supernatant), anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86, and anti-mouse IgG-RPE or anti-mouse IgG1-FITC (BD Biosciences), PE-labeled anti-MHC class II DQ/DR (VPM37), A647-labelled anti-CD11b (CC126) antibodies in FACS buffer (PBS, BSA 0.5%, 2.5 mM EDTA). All except unstained antibodies were purchased from Serotec. Dead cells were gated out using FSC-SSC profiles and propidium iodide (1 µg/ml) staining. Background and auto-fluorescence were determined on control isotype antibody staining. Acquisition was performed on 10, 000 events using a FACScalibur cytometer (BD Biosciences) and CellQuestPro software.

For separation, BM-DCs were harvested after 7 days of differentiation, and incubated with 1  $\mu$ g/ml anti-CD11b mAb (clone CC126, Serotec). After two washes, cells were incubated with anti-mouse IgG microbeads (Miltenyi Biotec), and separated on MS columns following manufacturer's recommandations. Purity of the enriched fractions was assessed by flow cytometry after A647-labelled anti-CD11b staining, on at least 10,000 events.

# Apoptosis analysis

 $0.5 \times 10^6$  cells (P48-well) were infected at various MOI, cells were harvested 16 h p.i., labelled for cellular markers and washed in PBS. Cellular concentration was then adjusted to  $10^6$ 

cells/ml in AnnexinV-binding buffer 1X containing 10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>. 0.1  $\mu$ l of AnnexinV-PE labelled (Alexis) was added to 100  $\mu$ l of cells (10<sup>5</sup> cells) and incubated at room temperature for 15 minutes. The reaction was stopped by adding 400  $\mu$ l of AnnexinV-binding buffer 1X, and quickly analyzed by flow cytometry.

# CFSE-labeling and CD4 T cell proliferation assay

CD4 T cells were purified from PBMCs obtained after Ficoll-paque gradient using anti-CD4 (clone 44.38, Serotec), and anti-IgG microbeads (Miltenyi biotec). Purity was above 95% as assessed by FACS in all the experiments.

CFSE labeling was undertaken as previously described (Lyons & Parish, 1994). CD4-positive cells were incubated with 5  $\mu$ M CFSE (Invitrogen) during 10 min at room temperature. Then, the labeling was quenched by adding an equal volume of FCS to the samples. After 3 min, the CFSE-labeled cells were washed twice, and counted. Responder cells were plated at 10<sup>5</sup> cells/well in 96-well culture plates with BM-DC (from 0.03 to 0.3 10<sup>5</sup> cells/well), and incubated for 5 days. Dead cells were excluded from analysis based on staining with PI, and histograms were used to track the divisions of CFSE-labeled cells.

# ACKNOWLEDGMENTS

EF and BP were supported by grants from MRNT and INRA/AFSSA respectively, and ANR Génanimal 2006 "VacGenDC project"

#### REFERENCES

 Barcena, J., M. Morales, B. Vazquez, J. A. Boga, F. Parra, J. Lucientes, A. Pages-Mante, J. M. Sanchez-Vizcaino, R. Blasco, and J. M. Torres. 2000. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. J Virol 74:1114-23.

- 2. Bertagnoli, S., J. Gelfi, G. Le Gall, E. Boilletot, J. F. Vautherot, D. Rasschaert, S. Laurent, F. Petit, C. Boucraut-Baralon, and A. Milon. 1996. Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. J Virol **70**:5061-6.
- 3. **Best, S. M., and P. J. Kerr.** 2000. Coevolution of host and virus: the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. Virology **267:**36-48.
- 4. **Bonini, C., S. P. Lee, S. R. Riddell, and P. D. Greenberg.** 2001. Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. J Immunol **166:**5250-7.
- 5. Bronte, V., M. W. Carroll, T. J. Goletz, M. Wang, W. W. Overwijk, F. Marincola, S. A. Rosenberg, B. Moss, and N. P. Restifo. 1997. Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. Proc Natl Acad Sci U S A 94:3183-8.
- 6. **Chan, A., M. Baird, A. A. Mercer, and S. B. Fleming.** 2006. Maturation and function of human dendritic cells are inhibited by orf virus-encoded interleukin-10. J Gen Virol **87:**3177-81.
- 7. Chavan, R., K. A. Marfatia, I. C. An, D. A. Garber, and M. B. Feinberg. 2006. Expression of CCL20 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not Flt3-L, from modified vaccinia virus ankara enhances antiviral cellular and humoral immune responses. J Virol **80**:7676-87.
- 8. Cody, V., H. Shen, M. Shlyankevich, R. E. Tigelaar, J. L. Brandsma, and D. J. Hanlon. 2005. Generation of dendritic cells from rabbit bone marrow mononuclear cell cultures supplemented with hGM-CSF and hIL-4. Vet Immunol Immunopathol 103:163-72.
- 9. **Drillien, R., D. Spehner, and D. Hanau.** 2004. Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. J Gen Virol **85:**2167-75.
- 10. Engelmayer, J., M. Larsson, M. Subklewe, A. Chahroudi, W. I. Cox, R. M. Steinman, and N. Bhardwaj. 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. J Immunol 163:6762-8.
- Guerra, S., J. L. Najera, J. M. Gonzalez, L. A. Lopez-Fernandez, N. Climent, J. M. Gatell, T. Gallart, and M. Esteban. 2007. Distinct Gene Expression Profiling after Infection of Immature Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by the Attenuated Poxvirus Vectors MVA and NYVAC. J Virol 81:8707-21.
- 12. Lateef, Z., S. Fleming, G. Halliday, L. Faulkner, A. Mercer, and M. Baird. 2003. Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells. J Gen Virol 84:1101-9.
- 13. Lyons, A. B., and C. R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 171:131-7.
- 14. Macen, J. L., K. A. Graham, S. F. Lee, M. Schreiber, L. K. Boshkov, and G. McFadden. 1996. Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. Virology 218:232-7.
- 15. Marovich, M. A., J. R. Mascola, M. A. Eller, M. K. Louder, P. A. Caudrelier, R. El-Habib, S. Ratto-Kim, J. H. Cox, J. R. Currier, B. L. Levine, C. H. June, W. B. Bernstein, M. L. Robb, B. Schuler-Thurner, R. M. Steinman, D. L. Birx, and S. Schlesinger-Frankel. 2002. Preparation of clinical-grade recombinant canarypox-human immunodeficiency virus vaccine-loaded human dendritic cells. J Infect Dis 186:1242-52.

- 16. **McCabe, V. J., and N. Spibey.** 2005. Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. Vaccine **23**:5380-8.
- 17. **McCabe, V. J., I. Tarpey, and N. Spibey.** 2002. Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. Vaccine **20:**2454-62.
- 18. Moss, B., M. W. Carroll, L. S. Wyatt, J. R. Bennink, V. M. Hirsch, S. Goldstein, W. R. Elkins, T. R. Fuerst, J. D. Lifson, M. Piatak, N. P. Restifo, W. Overwijk, R. Chamberlain, S. A. Rosenberg, and G. Sutter. 1996. Host range restricted, nonreplicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. Adv Exp Med Biol 397:7-13.
- 19. **Petit, F., S. Bertagnoli, J. Gelfi, F. Fassy, C. Boucraut-Baralon, and A. Milon.** 1996. Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. J Virol **70:**5860-6.
- 20. **Reali, E., D. Canter, H. Zeytin, J. Schlom, and J. W. Greiner.** 2005. Comparative studies of Avipox-GM-CSF versus recombinant GM-CSF protein as immune adjuvants with different vaccine platforms. Vaccine **23:**2909-21.
- 21. Seet, B. T., J. B. Johnston, C. R. Brunetti, J. W. Barrett, H. Everett, C. Cameron, J. Sypula, S. H. Nazarian, A. Lucas, and G. McFadden. 2003. Poxviruses and immune evasion. Annu Rev Immunol 21:377-423.
- 22. Shen, X., S. B. Wong, C. B. Buck, J. Zhang, and R. F. Siliciano. 2002. Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes. J Immunol 169:4222-9.
- 23. **Yates, N. L., and M. A. Alexander-Miller.** 2007. Vaccinia virus infection of mature dendritic cells results in activation of virus-specific naive CD8+ T cells: a potential mechanism for direct presentation. Virology **359**:349-61.

### **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** *MYXV infects bone marrow-derived dendritic cells*. Bone marrow derived dendritic cells from rabbit and sheep were differentiated *in vitro* as described in the Material and Methods section. After one week of culture, BM-DCs were infected with SG33-GFP MYXV at MOI 1. After 16 hour-infection, cells were collected and GFP-positive cells were detected by flow cytometry in rabbit and ovine DCs (A). GFP was only detected in cells coexpressing CD11c marker (**B**). Data are representative of 2 similar experiments.

**Figure 2:** *Ov BM-DCs are not permissive to MYXV infection.* (**A**) BM-DCs from both species were generated as indicated above. Cells were infected with SG33 MYXV at MOI 0.01 (left panel) or MOI 1 (right panel). The samples were harvested for infectious virus at 0, 24, 48 and 72 h p.i., and then titrated on RK13 cells. MYXV replication was analysed with multi step (left panel) and single step (right panel) growth curves in rabbit (black line) and ovine (dotted line) BM-DCs. At each time of interest, lysates from three different experiments were titrated on RK13 for viral production. (**B**). Late viral genes are not expressed in ovine BM-DCs. RL5 and Ov BM-DCs were infected with recombinant SG33-VP60-LacZ virus and 24 h p.i., late viral protein expression was tested by labelling with X-Gal.

**Figure 3:** *Loss of Langerhans-like cells that are preferentially infected by MYXV.* Ovine BM-DCs were infected with SG33-GFP or SG33 MYXV as described in Fig. 1. Variable MOI of SG33-GFP or SG33 were used to infected BM-DCs. GFP fluorescence was analyzed the next day to quantify infected cells (A). In parallel, the phenotype of recovered cells was analyzed with anti-CD11b and anti-MHC class II antibodies by flow cytometry. The proportion of CD11bint MHC IIhi cells was diminished as the MOI increased (**B**).

**Figure 4:** *Langerhans cells undergo apoptosis after MYXV infection*. Ovine BM-DCs were infected with SG33, or VP60 or GFP expressing-SG33 MYXV at low (0.5) or high MOI (5). After overnight infection, cells were stained with PE-labelled Annexin V and propidium iodide before FACS analysis. GFP-positive cells expressed high levels Annexin V compared to uninfected or GFP-negative cells (A). PI+ Annexin V+ cells were more abundant in the GFP-positive cells indicating that secondary necrosis developed after MYXV infection (**B**)

**Figure 5:** *Maturation does not abrogate MYXV infection in BM-DCs.* BM-DCs were incubated the day before infection with Pansorbin, an heat-killed *Staphylococcus* extract (20  $\mu$ g/ml) to induce maturation, as verified by MHC class II upregulation. As indicated above, immature or mature (Sac-treated) BM-DCs were infected with SG33-GFP MYXV at MOI 1. The frequency of GFP-positive cells was assessed after 16 hour incubation and was highly comparable between immature and mature BM-DCs.

**Figure 6:** *MYXV infection does not induce BM-DC maturation*. After infection with titrated amouts of SG33-GFP MYXV (from MOI 0.3 to 3), MHC class II DQ/DR expression and CD40, CD80, and CD86 costimulatory molecule expression was determined by flow cytometry on GFP-positive and GFP-negative BM-DCs. Expression did not differ between the two populations, nor it did with uninfected culture, indicating that MYXV induces poor maturation in BM-DCs.

**Figure 7:** *MYXV infection of BM-DCs strongly inhibits their stimulatory capacity, that is partially reversed by addition of maturational signals.* MYXV infected BM-DCs were used as antigen presenting cells in mixed allogeneic culture. CFSE dilution was significantly

diminished as compared with that induced by uninfected BM-DCs. When BM-DCs were treated with IFN $\alpha$  (10, 000 AU), a strong T cell proliferation was restored.



Foulon, Pignolet et al.-Fig. 1

134



в



Foulon, Pignolet et al.-Fig. 2



В

Α



3.2%

Foulon, Pignolet et al.-Fig. 3



Foulon, Pignolet et al.-Fig. 4



Foulon, Pignolet et al.-Fig. 5



Foulon, Pignolet et al.-Fig. 6



В

# Cell proliferation



Foulon, Pignolet, et al.-Fig. 7

140

# **3. Discussion**

Nous avons montré grâce à ce travail que les cellules dendritiques ovines générées *in vitro* par différentiation de précurseurs de la moelle osseuse en présence de GM-CSF ovin peuvent être infectées par le MYXV. En effet, après 16 heures d'infection, jusqu'à 40 % de cellules sont infectées à une m.o.i. de 5 et expriment la GFP. Ces cellules sont sensibles mais non permissives au MYXV. L'analyse de la mortalité cellulaire nous montre que les DC infectées entrent en apoptose. Nous avons par ailleurs montré que la souche vaccinale SG33 non recombinante induit aussi l'apoptose des DC dans la culture, la GFP ayant été introduite dans le génome du SG33 à la place du locus M11L/MGF. Il a été montré que le produit du gène M11L est impliqué dans le contrôle de l'apoptose en tant qu'agent anti-apoptotique (Macen et al., 1996). La mort cellulaire par apoptose lors d'infection de cellules dendritiques humaines a déjà été décrite en particulier dans le cas de l'infection avec le virus de la vaccine (Engelmayer et al., 1999) mais aussi avec un *Canarypox virus* (Ignatius et al., 2000), indiquant que ce pourrait être un mécanisme général lié à cette interaction.

L'étude de l'impact de l'infection par le MYXV sur la capacité de maturation des DC nous montre d'une part que les cellules vivantes infectées ne semblent pas maturer, et d'autre part que l'apoptose d'une partie des cellules infectées ne provoque pas la maturation des autres cellules en culture. Ces résultats sont en contradiction avec ce qui a été précédemment observé dans le cas de l'infection de cellules dendritiques humaines par un *Canarypox virus* (Motta et al., 2001). En effet, nous n'avons pas observé de surexpression significative des molécules de costimulation ou de celles du CMH-II. Deux hypothèses peuvent être envisagées, soit la présence elle-même du virus inhibe l'activation des cellules dendritiques environnantes, soit les cellules dendritiques infectées produisent des cytokines ou d'autres facteurs qui ont un effet négatif sur la maturation. On peut citer notamment le rôle de l'IL-10 qui est capable d'inhiber l'activation/maturation des cellules dendritiques (McBride et al., 2002). Pour définitivement répondre à cette question, l'expérience suivante peut être envisagée: des cellules dendritiques seront infectées et la maturation sera induite à l'aide de produits microbiens (ligands de TLR, bactéries tuées par la chaleur), ou de milieu conditionné de monocytes activés (MCM) (Reddy et al., 1997). Des cellules dendritiques humaines infectées par le virus de la vaccine ne surexpriment pas les molécules de costimulation ni du CMH-II, même suite à la culture en milieu conditionné contenant du TNF $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et de l'IFNa (Engelmayer et al., 1999). Ce n'est pas le cas des cellules non infectées.

Nous avons également montré que les cellules dendritiques ovines infectées par le MYXV possèdent une capacité réduite à initier l'activation de lymphocytes T allogéniques, par rapport aux cellules dendritiques non infectées. Le virus semble donc inhiber des mécanismes impliqués dans la maturation des cellules dendritiques et donc la présentation d'antigènes étrangers aux cellules T. De façon tout à fait intéressante, nous sommes parvenus à rétablir la prolifération des lymphocytes T par ajout d'IFN $\alpha$  et donc à restaurer la capacité d'induire la maturation des cellules dendritiques.

Les voies préférentielles d'inoculation de vaccins recombinés vectorisés par les poxvirus sont les voies sous-cutanées et intradermiques. En effet, la biologie de tels virus et notamment du virus de la myxomatose transmis par piqûre de moustiques, montre que les premières cibles lors de l'infection naturelle sont les cellules de la peau dont font partie les cellules de Langerhans. En ce qui concerne les ovins, les marquages immunohistochimiques, montrent que lors d'inoculation intradermique les MYXV peut infecter *in vivo* des cellules dont la morphologie évoque celle de cellules dendritiques et de macrophages (Chapitre I de la section « résultats », article #2).

Le virus provoquant la mort des cellules infectées par apoptose, l'activation directe des lymphocytes par les cellules dendritiques circulantes est difficilement envisageable, bien que possible. Cependant, la capacité de cellules dendritiques non infectées à phagocyter et à présenter à leur surface les antigènes viraux libérés après la mort par apoptose des cellules infectées a été montré *in vitro* (Motta et al., 2001). Parallèlement, le fait que nous observions deux types de cellules dendritiques ovines infectées au bout de 16 heures, certaines apoptotiques et d'autres encore vivantes, suggère que les cellules infectées pourraient avoir le temps de migrer jusqu'au nœud lymphatique drainant, cette durée ayant été évaluée à environ douze heures. Une fois arrivées dans ces noeuds lymphatiques, les cellules infectées vont entrer en apoptose. Les cellules dendritiques résidentes auraient alors la capacité de prendre en charge les antigènes viraux libérés après apoptose des DC circulantes infectées. Elles pourraient alors présenter les épitopes du produit du transgène d'intérêt entraînant l'activation des lymphocytes T et initiant ainsi la réponse adaptative. Des travaux *in vivo* complémentaires sont nécessaires pour étayer ces hypothèses et élucider ces mécanismes.

# D. Amélioration du vecteur MYXV

# **1. Introduction**

Les poxvirus recombinants ont montré leur efficacité en tant que vecteur de vaccination par leur capacité à produire une réponse immunitaire contre des antigènes étrangers. Leur cycle réplicatif entièrement cytoplasmique permet d'éviter les complications éventuelles d'intégrations d'ADN dans le génome de la cellule infectée. Ils sont capables d'intégrer de grandes quantités d'ADN étranger (plus de 25 kpb) par recombinaison homologue. Ils sont en plus capables d'exprimer correctement les protéines d'intérêts et d'induire une bonne réponse immunitaire. Le MYXV possède de plus un spectre d'hôtes étroit in vivo ce qui lui confère une sécurité d'emploi non négligeable. Il est non réplicatif in vitro dans certains types cellulaires (bovins, ovins, félins), permettant néanmoins l'expression de transgènes. Il est donc un candidat de choix en tant que vecteur de vaccination. Au laboratoire une souche virale atténuée a été isolée: la souche SG33. Elle a déjà été utilisée pour la vaccination des lapins contre la myxomatose. De plus, un virus recombinant SG33-VP60 capable d'exprimer la protéine de capside VP60 du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (RHDV) est efficace pour la vaccination simultanément contre la myxomatose et la RHD chez le lapin (Bertagnoli et al., 1996), (brevet INRA-ENVT n°FR2736358 déposé le 5-07-1995). Plus récemment, l'utilisation de virus myxomateux atténués recombinés capables de produire la protéine de capside du virus de la calicivirose féline a montré une bonne efficacité vaccinale chez le chat, espèce non-cible du MYXV (McCabe et al., 2002; McCabe & Spibey, 2005). Classiquement chez les poxvirus, les transgènes sont insérés dans des zones intergéniques ou dans des zones contenant un ou des gènes non essentiels à la réplication virale (TK, MGF, M11L ...), leur expression induit généralement une forte réponse immunitaire contre les protéines produites. Cependant, la réponse n'est pas toujours suffisante et adaptée pour protéger un individu contre un agent pathogène donné.

Dans le cadre de l'amélioration du virus de la myxomatose (MYXV) en tant que vecteur vaccinal, nous avons développé une stratégie originale visant à utiliser les protéines structurales du MYXV comme molécules présentatrices d'antigène. Notre approche a été la



В



**Figure 16:** Localisation de la protéine GFP-M022L. Des cellules RK13 sont transfectées avec le plasmide pGFP-M022L et observées en microscopie à fluorescence. **A.** La protéine GFP-M022L se localise de façon ponctiforme et polarisée dans le cytoplasme des cellules transfectées. **B.** Colocalisation de la protéine M022L et de certains marqueurs de compartiments cellulaires: anti-calnexin pour le réticulum endoplasmique, anti-EEA1 pou les endosomes précoces. Les flèches indiquent les zones de colocalisation (jaune) entre GFP-M022L (vert) et les compartiments marqués par du TRITC (rouge)

suivante: utiliser les protéines des formes virales extracellulaires enveloppées (EEV) et les fusionner avec un antigène d'intérêt.

Nous nous sommes tout particulièrement intéressé à la protéine M022L du MYXV. En effet, il s'agit de la protéine majoritairement présente sur l'enveloppe des formes virales EEV. Homologue à la protéine F13L du virus de la vaccine, il s'agit d'une protéine de 371 acides aminés qui présente une masse moléculaire théorique d'environ 41,5 kDa.

Afin de tester l'immunogénicité induite contre le transgène par ce nouveau type de vecteur, nous avons construit deux virus recombiné capables de produire la protéine M022L fusionnée soit avec la GFP (Green Fluorescent Protein), soit avec l'ectodomaine de la protéine M2 du virus influenza aviaire, dans sa partie amino-terminale (GFP-M022L ou M2-M022L). Ces virus recombinés ont été injectés à des lapins ou à des souris. Les sérums prélevés ont été testés et la présence d'anticorps spécifiques vérifiée. Des tests de lymphoprolifération chez les ovins inoculés avec le virus recombiné T1-N-gfp-M022L, ont aussi révélé la mise en place d'une réponse cellulaire contre la GFP.

# 2. Résultats

-a- M022L possède certains caractères originaux par rapport à son homologue F13L

Dans un premier temps, nous avons vérifié qu'une fusion transcriptionnelle n'altérait pas la production et la stabilité de la protéine M022L. Nous avons transfecté des cellules RK13 avec le plasmide pGFP-M022L, contenant la GFP en fusion amino-terminale, ou le plasmide pM022L-GFP avec la GFP fusionnée en extrémité carboxy-terminale. Les gènes fusionnés se trouvent sous contrôle du promoteur fort eucaryote CMV. Nous n'avons pas détecté de cellules exprimant la GFP lors de la transfection avec le plasmide pM022L-GFP. La transfection du plasmide pGFP-M022L révèle que la localisation de la protéine GFP-M022L est cytoplasmique ponctiforme et polarisée (**Figure 16A**). Une étude plus fine de la localisation intracellulaire de la protéine GFP-M022L a été menée par immunomarquages de différents compartiments cellulaires. Ainsi, cette protéine colocalise partiellement avec l'appareil de Golgi, les endosomes précoces, ainsi qu'avec le réticulum endoplasmique (**Figure 16B**). Cette localisation intracellulaire de la protéine de la protéine GFP-M022L semble être

Α

Séquence co	onsensus	HXKXXXXD
hPLD 919	895	VHSKLLIADDNTVIIGSANINDRSM
F13L 335	311	NNTKLLIVDDEYVHITSANFDGTHY
M022L 334	308	NNTKLMIVDDEFAHITPANFDGTHY
M022L muté	9	A A A

В



Figure 17: M022L possède un site PLD-Like impliqué dans le trafic intracellulaire de la protéine. A. Alignement mettant en évidence les homologies entre le site catalytique phospholipase D humaine (hPLD), le site PLD atypique de F13L du VACV et celui de la protéine M022L du MYXV, ainsi que les mutations générées sur M022L. B. Localisation de la protéine GFP-M022L mutée dans son site catalytique PLD atypique après transfection. 1. Observation en microscopie confocale. 2. Superposition de l'observation avec un filtre Nomarski et en fluorescence.

similaire à celle de son orthologue F13L du virus de la vaccine en condition de transfection (Husain & Moss, 2003).

L'analyse de la séquence codante de M022L nous a permis d'identifier un site catalytique atypique faisant partie de la famille des phospholipase D (**Figure 17A**). Ce site catalytique est homologue à celui retrouvé dans la séquence de F13L du virus de la vaccine. Ces sites présentent une asparagine à la place d'une histidine classiquement retrouvée dans la séquence consensus des phospholipases D. Nous avons voulu tester l'influence du site catalytique de M022L sur la localisation de la protéine, sachant que pour son homologue vaccine F13L altérer son site catalytique modifie son trafic intracellulaire.

Dans un premier temps, nous avons muté les trois acides aminés caractéristiques : l'asparagine (AAT) en glutamine (CAA), la lysine (AAA) en arginine (AGA) et l'acide aspartique (GGA) en acide glutamique (GAG) par PCR de fusion.

Nous avons ensuite transfecté des cellules RK13 avec le plasmide pGFP-M022L-PLDmuté et observé une fluorescence diffuse dans le cytoplasme (**Figure 17B**). Ces résultats indiquent que l'intégrité du site catalytique PLD-like est indispensable pour le trafic intracellulaire correct de M022L et sont en accord avec ce qui a été précédemment montré pour F13L.

Nous avons ensuite analysé le comportement de M022L fusionnée en conditions d'infection. Nous n'avons pas pu construire le virus recombiné exprimant la GFP en fusion carboxy– terminale avec M022L. Ainsi, contrairement à ce qui a été observé pour F13L, cette fusion semble létale, signalant une fonction essentielle présente dans le domaine carboxy-terminal de M022L. Notre impossibilité à produire un virus mutant délété pour M022L conforte cette hypothèse.

L'observation de plages de lyse obtenues après infection par le virus T1-N-gfp-M022L au microscope à fluorescence, nous montre que nous avons bien production de la protéine fusionnée (**Figure 18**). La localisation de la protéine d'intérêt est cytoplasmique de type ponctiforme (**Figure 18**), comme ce que nous avons observé en transfection. Ces résultats semblent être en accord avec ce qui a été précédemment observé pour la protéine F13L, dans un contexte infectieux (Husain & Moss, 2003).

Nous avons ensuite construit et isolé le virus myxomateux recombiné portant le gène codant l'ectodomaine de la protéine M2 des virus influenza aviaires en fusion avec l'extrémité amino-terminale de M022L. Le virus produit forme, en cellules RK13, des plages de lyse

comparables au virus sauvage T1. Cela signifie que cette construction n'altère ni la viabilité ni la prolifération virale *in vitro*. La production de la protéine M2e a été vérifiée par western-blot (« shift » de bande) grâce à un sérum immun anti-MYXV (non montré).





**Figure 18: Infection de cellules RK13 par le virus recombiné T1-N-gfp-M022L.** Les plages de lyse (**A** : grossissement x 100, **B** : grossissement x 1000) sont observées 40 h post-infection au microscope à fluorescence.



**Figure 19: Détection de la GFP par le sérum du lapin 40541 prélevé à J30 postinfection**. Les cellules RK13 ont été transfectées avec du plasmide pEGFP-F (observation des cellules transfectées **A**, **C** et **E**). La détection de la GFP a été réalisée à l'aide de différents sérums : le sérum polyclonal anti-virus myxomateux (**B**), le sérum du lapin 40451 prélevé à J30 post-infection dilué au 1/100 (**D**), et ce même sérum dilué au 1/300 (**F**). -b- Etude in vivo des virus T1-N-gfp-M022L et T1-M2e-M022L:

# Suivi clinique

Nous avons infecté des lots de quatre lapins avec le virus parental T1 ou chacun des virus recombinés. Nous avons observé une évolution normale de la maladie avec une mort dans les dix-quinze jours dans le cas de l'infection avec le virus sauvage. En revanche, les lapins infectés avec les virus recombinés ont montré une absence de lésions caractéristiques de la myxomatose. Les lapins ont présenté une légère inflammation localisée au niveau du point d'inoculation. Puis nous avons observé la présence d'une ulcération cutanée localisée au niveau du point d'inoculation qui évolue en cicatrisation sous crustacée. Tous les lapins ont présenté un très bon état général. Quelques myxomes secondaires de petite taille sur les paupières ont parfois été observés, mais aucune surinfection bactérienne respiratoire n'a été constatée. L'évolution clinique est très favorable et ce dans les 20 jours post-infection.

Concernant les espèces non-cibles (souris et ovins) aucun signe clinique ni local ni général n'a été observé.

L'ensemble de ces données est très largement en faveur de l'innocuité des virus recombinés construits.

De plus, il est intéressant de noter que les lapins ainsi inoculés sont tous résistants à une épreuve virulente.

### Le MYXV recombiné induit des anticorps contre le produit du transgène

# Chez l'espèce cible :

Les sérums de lapins infectés avec le virus T1-N-gfp-M022L ont été prélevés à J0, J10, J20 et J30 post-infection. La présence d'anticorps anti-GFP a été testée en immunofluorescence sur des cellules transfectées avec le plasmide pEGFP-F permettant une expression transitoire de la protéine GFP en cellules eucaryotes. La GFP émettant dans le vert, la détection a été réalisée grâce à un fluorochrome rouge, le TRITC.

Nous avons pu vérifier la présence d'anticorps anti-GFP par colocalisation de la fluorescence naturelle de la GFP et de l'immunomarquage de couleur rouge (**Figure 19**).



**Figure 20: Détection de la protéine M2 par les sérums de lapins.** Les cellules RK13 infectées avec du virus influenza H1N1 et ont été fixées 8h p.i. L'expression de la protéine M2 a été révélée par du sérum de lapins infectés par le virus T1-N-M2e-M022L à J0 et à J30.

Nous avons observé une augmentation de l'intensité du signal pour une dilution donnée au cours du temps.

De même, la présence d'anticorps anti-M2e a été vérifiée pour les sérums des lapins infectés avec le virus T1-N-M2e-M022L prélevés à J0 et J30. Pour cela des cellules RK13 préalablement infectées par un virus influenza (H1N1) ont été soumises à un test d'immunofluorescence. La fluorescence spécifique observée avec les sérums récoltés à J30 signale la production d'anticorps contre le produit du transgène fusionné par les lapins infectés (**Figure 20**).

### Chez une espèce non-cible :

Afin de vérifier si nos virus recombinants sont capables d'induire une réponse sérologique contre le produit du transgène chez une espèce non-cible, nous avons immunisé des souris avec le virus exprimant M2e en fusion. Les sérums ont été prélevés 42 jours après inoculation et testés par immunofluorescence (même protocole que pour les sérums de lapins). Là encore nous avons observé une fluorescence spécifique avec les sérums des souris inoculées avec le virus T1-N-M2e-M022L, signalant la production d'anticorps anti-M2e (**Figure 21**).

# Le virus T1-N-gfp-M022L induit une réponse cellulaire contre le produit du transgène chez les ovins

Voulant vérifier si une réponse immunitaire spécifique à médiation cellulaire pouvait être induite contre le produit d'un transgène fusionné à une protéine d'enveloppe du MYXV, et plus particulièrement M022L, nous avons procédé à une expérience de stimulation-marquage de PBMC de moutons. Nous avons travaillé avec le modèle non hôte mouton dans le cadre de l'exploration de la réponse à médiation cellulaire car il nous était plus aisé de récolter et d'obtenir un grand nombre de cellules à partir du sang de moutons qu'a partir de souris.

La prolifération des PBMC des moutons inoculés avec le virus T1-N-gfp-M022L a été mesurée par cytométrie de flux après restimulation avec différentes quantités de protéine commerciale GFP et marquage des sous-populations de lymphocytes T (CD2+ et CD4+).



**Figure 21: Détection de la protéine M2 par les sérums de souris.** Les cellules RK13 ont été infectées avec du virus H7N1 et ont été fixées 8h p.i. L'expression de la protéine M2 a été révélée par différents sérums: sérum de souris non infectées (J0) et infectées par le virus T1-N-M2e-M022L (J42 post-infection).



**Figure 22:** Réponse cellulaire contre un antigène témoin, la GFP, chez le mouton inoculé avec le virus T1-N-gfp-M022L. L'axe des abscisses mesure l'intensité de la fluorescence verte (CFSE) et l'axe des ordonnées l'intensité de la fluorescence rouge (marquage CD4). Dans le coin de chaque cadran est indiqué le pourcentage de cellules de ce cadran vis-à-vis de la population totale CD2+ (ensemble des lymphocytes T) vivante (PI négatives). **A**. Un mouton témoin non inoculé. Les cellules ont été restimulées avec du milieu de culture ou 3 μg de GFP. **B**. Un mouton inoculé avec le virus T1-N-gfp-M022L. Les cellules ont été restimulées avec du milieu de culture, avec 1, 3 et 10 μg GFP ou du SG33 (m.o.i. de 1).

La **Figure 22** illustre les résultats obtenus pour une brebis témoin (panel A) et une brebis inoculée (panel B). Nous pouvons observer qu'aucune dilution de fluorescence pour la population de lymphocytes T du témoin n'a lieu après stimulations (maximum d'intensité de fluorescence en 1 et 2). En revanche, la fluorescence décroît significativement lorsque les lymphocytes T de la brebis inoculée sont stimulés par la GFP et ceci quelle que soit la dose appliquée (panel B, 1, 2 et 3). Ceci est plus marqué pour les lymphocytes CD4+ (cadrans supérieurs) que pour les lymphocytes CD8+ (cadrans inférieurs). Cette décroissance de fluorescence après stimulation par la GFP signale une lymphoprolifération témoin d'une réponse cellulaire contre la protéine d'intérêt chez les animaux inoculés.

# 3. Conclusion

Nous avons développé une stratégie vaccinale originale chez le MYXV, fondée sur l'insertion de protéine d'intérêt en fusion avec une protéine de membrane de particules EEV (protéine M022L). Nous avons montré que nous pouvons générer à la fois une réponse humorale contre nos antigènes d'intérêt (la GFP ou M2 du virus influenza aviaire) chez l'espèce cible du MYXV et chez une espèce non hôte (souris), mais aussi une réponse de type cellulaire chez une espèce non hôte (mouton).

Ces travaux font l'objet d'un brevet en cours de dépôt.
## Discussion générale et perspectives

L'utilisation du virus de la vaccine pour la vaccination contre la variole permit l'éradication de cette maladie (WHO, 1980). En marge de ce succès unique, les caractéristiques moléculaires des poxvirus, avec leur cycle réplicatif entièrement cytoplasmique, leur capacité à intégrer de grands fragments d'ADN étranger et à exprimer des antigènes d'intérêt, à générer une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire contre un antigène donné, en font des outils de vaccination tout à fait remarquables. Les enjeux actuels en vaccinologie sont de combiner à la fois efficacité et innocuité des nouveaux vecteurs vaccinaux. Des améliorations sont donc toujours recherchées pour répondre à ces deux points.

Ainsi, en plus des souches modifiées du virus de la vaccine (MVA, NYVAC), voit-on émerger l'utilisation d'autres poxvirus, tels que des virus des genres *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus* ou encore le virus de la myxomatose, dans la vaccination d'espèces non hôtes naturels. Contrairement au virus de la vaccine, ces poxvirus possèdent un spectre d'hôte étroit *in vivo*, faisant de ces virus des vecteurs vaccinaux sûrs d'emploi. Leur efficacité a été prouvée, en particulier pour le *Canarypox virus*, dont, par exemple, une souche recombinante exprimant les protéines codées par les régions GAG-ENV du virus de la leucose féline est actuellement sur le marché pour la vaccination des chats. De même, l'efficacité d'un *Canarypox virus* recombinant exprimant les protéines VP2 et VP5 du virus de la Bluetongue a été récemment montré (Boone et al., 2007). Concernant plus spécifiquement le MYXV, son efficacité vectorielle a aussi été prouvée chez une espèce non hôte avec des essais concluants de protection contre la calicivirose féline (Macaulay et al., 1989; McCabe et al., 2002; McCabe & Spibey, 2005).

C'est dans ce contexte que s'inscrivent mes travaux de thèse qui ont consisté à développer le virus de la myxomatose en tant que nouveau vecteur de vaccination chez les ruminants. Chez ces derniers, l'opportunité de disposer de plusieurs vecteurs poxviraux permettrait d'envisager des stratégies vaccinales diverses (doses et voies d'administration adaptées, contournement d'une immunité préalable, stratégie du « prime-boost »,...). N'ayant aucune donnée concernant l'interaction entre le MYXV et les ruminants, nous avons étudié dans un premier temps la capacité du MYXV à infecter des cellules de ruminants (à la fois d'origine bovine et ovine).

## MYXV et cellules de bovins

Le MYXV est capable d'infecter les cellules de bovins et d'exprimer des gènes viraux tardifs sauf dans le cas des cellules MDBK où seule l'expression des gènes précoces a pu être détectée. Il avait déjà été montré que le VACV (Hruby, 1990), ainsi que le Swinepoxvirus (Barcena et al., 1998), sont capables d'infecter ces cellules mais l'expression des gènes viraux n'est pas détectée. L'étude de l'infection de cellules dérivées du sang nous montre que l'activation de ces cellules par la PMA-Iono augmente le taux d'infection. Néanmoins, ces cellules, activées ou non, sont non permissives à l'infection par le MYXV, ce qui est en faveur de l'innocuité du MYXV chez les bovins. En effet, une des clés de la pathogénicité du MYXV chez le lapin est sa capacité à se répliquer et à disséminer dans tout l'organisme via les leucocytes. Chez les bovins, le MYXV pourrait exprimer des transgènes étrangers après inoculation sans provoquer de virémie. Ces résultats, bien que préliminaires, sont encourageants pour le développement de vaccins non réplicatifs fondés sur l'utilisation du vecteur MYXV chez les bovins. Cependant des études complémentaires et plus particulièrement l'inoculation du MYXV à des bovins et la mesure des réponses humorale et cellulaire induites nous renseignera quant à sa capacité à générer une réponse immune spécifique. Son efficacité devra être attestée par un test de protection face à une épreuve virulente.

# Evaluation du MYXV chez les ovins

Une des voies préférentielles d'inoculation de vaccins fondés sur les poxvirus étant la voie intradermique, nous avons étudié l'infection par le MYXV de fibroblastes primaires issus du derme de mouton. En effet, lors de telles inoculations, ces cellules font partie des premières cellules rencontrées par le virus. Nous avons montré que ces cellules sont « infectables » par le MYXV, à la fois par la souche sauvage T1 et par la souche vaccinale SG33. Des antigènes tardifs sont exprimés par les deux souches virales, mais les fibroblastes sont non permissifs à l'infection par les deux virus. Ces résultats sont différents de ceux rapportés pour l'infection de fibroblastes primaires humains ou murins, puisque ces cellules peuvent être permissives à l'infection par le MYXV. Il faut cependant noter que dans notre étude nous avons travaillé

avec des cellules primaires issues d'animaux adultes, alors que les fibroblastes humains (Johnston et al., 2005b) et murins (Wang et al., 2004) utilisés dans ces études ont été obtenus à partir de tissus néonataux. La production d'IFN qui augmente avec l'âge des individus et les passages des cellules primaires pourrait être à l'origine de ces différences. L'infection de PBMC ovines montre que, tout comme pour ce qui a été précédemment observé pour les bovins (Pignolet et al., 2007), l'activation permet d'augmenter le niveau d'infection des cellules, tout en conservant le caractère non permissif au MYXV. Ces résultats sont partiellement en accord avec une étude menée sur des LT humains infectés par le VACV, où l'activation permet la liaison du virus aux cellules, le virus pouvant par la suite déclencher son cycle de réplication (Chahroudi et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'activation permet la synthèse de novo d'un ou des récepteur(s) pour le virus et que la permissivité des cellules est intimement liée à la capacité du virus à se lier aux cellules. Même si notre étude ne nous permet pas de montrer que le faible taux d'infection initial serait dû à l'absence d'un ou des récepteur(s) spécifique(s), il semble évident qu'il est lié à la déficience d'un mécanisme très précoce, puisque la protéine témoin, la GFP, que nous avons mis sous contrôle du promoteur précoce-tardif P7.5, n'est produite que par un nombre très faible de cellules. Or il est admis que la transcription des gènes précoces est autonome puisque les facteurs de transcription nécessaires sont encapsidés dans le virion et la machinerie cellulaire de traduction est ubiquitaire dans les cellules de mammifères. Dans notre étude nous avons montré qu'en absence d'activation, toutes les sous-populations de leucocytes ovins sont infectables mais en très faible proportion. Lors de l'activation chimique par la PMA-Iono, stimulateur non spécifique, les taux d'infection augmentent dans toutes les sous-populations cellulaires. Ceci pourrait laisser penser que le taux d'infection des cellules non activées, même faible, pourrait être dû au niveau initial d'activation des cellules dans la culture. De plus, il est communément admis que les récepteurs des poxvirus sont présents de façon ubiquitaires pour les cellules cibles. Les études citées montrent que ce n'est pas toujours le cas et en particulier pour les cellules clés de la dissémination virale et de la réponse immunitaire. Le modèle PBMC de ruminant/MYXV pourrait être intéressant pour l'identification de nouveaux facteurs viraux et cellulaires impliqués dans la liaison et/ou la pénétration virale dans les leucocytes.

Nous avons montré que dans nos conditions expérimentales, les LT, et surtout les LB, sont les principales cibles du MYXV parmi les PBMC ovins. Les LB faisant partie des cellules présentatrices d'antigènes, les LB infectées pourraient favoriser le déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique et éventuellement protectrice.

Nous avons privilégié l'étude de l'inoculation intradermique, et une analyse immunohistologique des coupes réalisées au niveau des sites d'injection montre que les cellules du derme, et particulièrement des cellules avec une morphologie de type macrophage et dans une moindre mesure dendritique, sont infectables *in vivo*. Les cellules infectées sont isolées et nous n'avons pas observé de foyer d'infection au cours du temps, indiquant que le virus ne se réplique pas au niveau du site d'inoculation, en cohérence avec l'absence de virémie. Nous avons de plus observé la mise en place d'une réponse inflammatoire évolutive au cours du temps. L'analyse sérologique des moutons inoculés avec le virus SG33-VP60 (souche vaccinale exprimant un antigène témoin la VP60, protéine de capside du virus de la RHDV) révèle la présence d'anticorps à la fois contre le vecteur et l'antigène VP60. Nous n'avons pas pu explorer la réponse cellulaire pour des raisons techniques: les échantillons de sang reçus étant hémolysés ou en très mauvais état. Des essais de restimulation des lymphocytes pour tester la mise en place d'une réponse cellulaire spécifique étaient inenvisageables.

## Essai de protection

Toutes ces données nous ont permis d'envisager un premier essai *in vivo* de vaccinationprotection contre la Fièvre Catarrhale Ovine ou Bluetongue chez les ovins. Cette maladie touche principalement les ovins. La France n'est pas épargnée puisque en 2000 le BTV-2 sévit en Corse. Depuis, on a assisté à l'émergence du BTV-4 et du BTV-16, toujours en Corse. En 2006, le sérotype 8 du BTV est apparu en Europe du Nord avec des foyers aux Pays-Bas, Belgique, Allemagne et en France (départements du nord frontaliers). Depuis, le sérotype 8 est présent jusqu'au centre de la France. Une des particularités associée à cette épizootie due au BTV-8 est le tableau clinique observé chez les bovins, jusqu'alors considérés comme des réservoirs asymptomatiques. C'est pour cela que nous avons engagé une étude préliminaire pour évaluer l'innocuité du MYXV chez les bovins avec l'idée de faire du MYXV un vecteur de vaccination à la fois chez les ovins et chez les bovins, et ce pour une maladie commune, la Bluetongue.

Pour notre essai de vaccination-protection, nous avons construit cinq virus recombinés fondés sur la souche vaccinale SG33 du MYXV. Ces cinq virus codent chacun une protéine particulièrement intéressante du BTV-2 souche Corse. Les antigènes choisis sont la VP2, la

VP7, et les protéines NS1, NS2 et NS3. Notre choix s'est porté sur ces protéines pour plusieurs raisons. Tout d'abord, recherchant une protection large, nous avons choisi de travailler avec les protéines les plus conservées entre les sérotypes, c'est-à-dire les protéines non structurales NS1, NS2 et NS3 et la protéine structurale VP7. Plusieurs travaux ont montré l'immunogénicité de ces protéines. Un capripoxvirus recombiné exprimant la VP7 a permis de générer une réponse immunitaire partiellement protectrice de type cellulaire contre une épreuve virulente de sérotype homologue (Wade-Evans et al., 1996). Les protéines non structurales NS1 et NS2 semblent elles aussi capables d'induire une immunité à médiation cellulaire (Jeggo & Wardley, 1982a; Jeggo & Wardley, 1982b; Jeggo & Wardley, 1982c; Jeggo et al., 1983; Jeggo et al., 1984; Jeggo et al., 1985; Jeggo & Wardley, 1985; Andrew et al., 1995; Jones et al., 1997). Ces dernières sont produites en grande quantité au cours du cycle viral et génèrent des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) respectivement chez le mouton et la souris dans un modèle de protection hétérologue. Nous avons ajouté dans notre cocktail de vaccination le virus recombiné SG33-VP2. La protéine VP2 est hautement variable entre tous les sérotypes du BTV, mais elle est la cible des anticorps neutralisants. Nous l'avons donc incluse dans notre étude pour augmenter les chances de protection au moins contre un sérotype homologue. Nous avons aussi ajouté un virus SG33 recombiné exprimant la protéine non structurale NS3, ne sachant pas quelles sont ses implications dans le développement de la réponse immunitaire contre le BTV.

Une des limites majeures que nous avons rencontrée est le manque d'outils mis à notre disposition. En effet, la détection des antigènes du BTV-2 produits par les MYXV recombinés pour valider nos constructions a posé un problème. Disposant de la protéine VP7, nous avons inoculé des lapins et obtenu un sérum contre cette protéine. Nous avons pu détecter la VP7 lors d'infection de cellules par le SG33-VP7, validant notre outil. Nous avons tenté de produire des sérums de lapins contre NS1 et NS3, mais aucune séroconversion n'a été détectée pour les deux protéines. Ces protéines sont naturellement peu immunogènes et peut être le sont-elles encore moins chez une espèce non cible du BTV. De plus, la pureté des protéines NS produites en baculovirus étant incertaine, cela a pu avoir une influence sur le protocole d'immunisation. Les protéines NS2 et VP2, quant à elles n'étaient pas à notre disposition (en phase de production à l'AFSSA de Maisons-Alfort). Nous avons utilisé des sérums issus de chèvre ou de mouton inoculés avec la souche atténuée BTV-2 pour détecter les protéines d'intérêt, mais le bruit de fond est tel, à la fois en immunofluorescence et en western-blot, que nous n'avons pas pu interpréter les résultats. Pour contourner ce problème,

nous avons réalisé des RT-PCR spécifiques. Nous avons pu détecter les ARNm spécifiques de VP7, NS1 et NS3. En revanche les résultats obtenus avec NS2 et VP2 sont plus douteux : difficultés à amplifier l'ADNc, bandes d'ADN non spécifiques après PCR ... L'agenda prévu pour l'expérimentation animale en confinement A3 ne nous a pas permis de poursuivre nos investigations sur les virus SG33-NS2 et SG33-VP2, et nous avons décidé de les introduire tout de même dans le cocktail vaccinal.

Nous avons testé la capacité des vaccins SG33 recombinés à générer une réponse immunitaire et à protéger les ovins contre une épreuve virulente de sérotype homologue. Les résultats obtenus indiquent que le cocktail vaccinal utilisé est incapable de protéger les animaux éprouvés avec la souche BTV-2. Aucune séroconversion contre les protéines NS1, NS3 et VP7 n'a été observée. En revanche, nous avons détecté une réponse humorale contre le vecteur. Cette expérimentation a été réalisée en parallèle avec l'équipe « Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes» du CIRAD de Montpellier. Ce cocktail vaccinal était composé de quatre capripoxvirus (souche KS-1) recombinés exprimant soit la VP2, soit la VP7, soit la NS1 ou la NS3. Dans cet essai de vaccination-protection avec les capripoxvirus recombinés, seule une protection partielle a été obtenue (Perrin et al., 2007). Une protection partielle contre une épreuve de sérotype homologue a déjà été décrite lors des travaux de Wade-Evans et al., 1996, avec un vaccin capripoxvirus-VP7. A l'analyse des résultats, plusieurs questions se posent. D'une part lors de la vaccination avec le cocktail de virus recombinés MYXV, nous ne sommes pas sûrs de la production des protéines NS2 et VP2, ce qui a pu jouer un rôle dans la non protection des animaux éprouvés. Cependant, les résultats obtenus avec le cocktail Capripoxvirus recombinés, où n'était pas présente la NS2, et pour lesquels la protection n'était que partielle (Perrin et al., 2007), incitent à se demander si le choix des antigènes du BTV était judicieux. Diverses hypothèses peuvent être avancées: le niveau d'expression des protéines d'intérêt peut être insuffisant, l'association est peut être défaillante (autres protéines nécessaires ?) ou encore la réponse immunitaire est inadaptée. De plus, il se peut qu'exprimés en système MYXV, les antigènes d'intérêt ne soient pas présentés correctement au système immunitaire de l'animal pour générer une réponse suffisante. Ceci étant, rappelons nous que nous avons réussi à séroconvertir des moutons contre l'antigène témoin VP60 au cours d'une expérimentation réalisée dans les mêmes conditions. Des améliorations de notre stratégie vaccinale sont donc à envisager.

#### Niveau d'expression des protéines d'intérêt

Il est possible d'augmenter le niveau d'expression des différentes protéines d'intérêt en jouant sur les promoteurs poxviraux. Bien que nous ayons utilisé le promoteur fort précoce-tardif du virus de vaccine P7.5, qui a fait ses preuves et qui est classiquement utilisé pour la construction de poxvirus recombinés, un nouveau promoteur, pIL1, qui possède une capacité d'expression dix fois plus importante que les autres promoteurs poxviraux a été mis en évidence récemment (Liu et al., 2004). Il serait donc intéressant de le tester et ce travail est actuellement en cours au laboratoire.

#### Optimisation des antigènes du BTV

Concernant le choix des antigènes, une récente étude a montré que l'utilisation d'un *Canarypox virus* recombiné co-exprimant les protéines de la capside externe VP5 et VP2 est capable de protéger les animaux éprouvés avec une souche virulente homologue (Boone et al., 2007). En effet, la reconstitution d'une capside virale par les deux protéines est probablement plus immunogène que les deux protéines seules et produites individuellement, des épitopes conformationnels essentiels à l'induction d'une protection pouvant être révélés lors de la génération de pseudo particules virales. Cependant, l'utilisation de la VP2 et de la VP5 ne permet pas la protection contre une épreuve hétérologue. La génération d'un MYXV co-exprimant les protéines de capside interne VP7 et VP3 peut être envisagée.

## Effet dose et mélange de valences

La dose administrée peut aussi jouer un rôle important. En effet, les animaux vaccinés avec le *Canarypox virus* recombiné exprimant la VP2 et la VP5 ont été inoculés deux fois avec  $6,3x10^8$  pfu (Boone et al., 2007). Tout comme le MYXV, ce virus est non réplicatif chez les ovins, mais dans notre essai nous avons vaccinés les animaux deux fois avec  $2 \, 10^6$  à  $10^7$  pfu pour chaque virus soit environ 60 à 300 fois moins pour chaque inoculation que lors de l'étude citée.

De plus, solliciter en même temps le système immunitaire avec des virus différents pourrait diminuer l'intensité de la réponse immunitaire dirigée contre chaque protéine d'intérêt, et de ce fait accentuer cet effet dose (qui d'ailleurs n'est pas forcément homogène d'une protéine à l'autre).

## Utilisation d'adjuvants

L'utilisation d'adjuvants peut aussi être envisagée. La plupart des protéines seules sont peu ou pas immunogènes. L'utilisation des poxvirus peut en théorie répondre à ce problème car ils sont capables de stimuler efficacement les réponses immunitaires contre les produits des transgènes. Cependant, pour augmenter le niveau de ces réponses, il est possible d'envisager d'insérer dans le génome du MYXV des gènes codant des cytokines, tels que le GM-CSF ou le facteur de croissance hématopoïétique, Flt31, qui pourraient favoriser le recrutement des cellules dendritiques au niveau du site d'inoculation. L'ajout d'IFN $\alpha$  pourrait permettre d'augmenter la capacité de présentation des DC ainsi que la réponse anti-virale. Nous avons réalisé des premiers essais *in vivo*, en inoculant des moutons soit avec un mélange SG33-VP7 plus GM-CSF soit SG33-VP7 plus IFN $\alpha$ , et les analyses sérologiques et cellulaires sont en cours de réalisation.

#### Optimisation des outils d'analyse

Nous avons aussi été confrontés au manque de fiabilité et de disponibilité des outils nous permettant d'analyser les réponses immunitaires. L'ELISA VP7 pourrait être amélioré. En effet, la protéine VP7 utilisée dans ce test est produite en baculovirus et ne dévoile peut être pas certains épitopes présentés par le système SG33-VP7. Pour appuyer cette hypothèse, remarquons la séronégativité de lapins que nous avions inoculés avec ce virus recombiné réplicatif chez cette espèce (et séropositifs contre le virus MYXV).

En ce qui concerne les tests ELISA NS1 et NS3, ils sont en cours d'évolution pour améliorer leur fiabilité et leur sensibilité.

## MYXV et cellules dendritiques ovines

Afin de mieux comprendre la mise en place d'une réponse immunitaire chez les moutons lors de l'inoculation de vaccins fondés sur le virus de la myxomatose, nous avons étudié l'interaction entre des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BM-DC) de mouton et le MYXV. Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes et sont les clés de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. L'étude des interactions entre le MYXV et les cellules dendritiques ovines nous montre que le virus induit la mort cellulaire des cellules de type Langerhans, avec comme conséquence une diminution de l'activation des lymphocytes T. Cependant, nous avons montré que l'ajout d'IFNa était capable de prévenir cet effet en restaurant la capacité des cellules à induire une prolifération cellulaire. Bien que l'infection des BM-DC par le MYXV induise de l'apoptose, nous avons observé que 16 h p.i. des cellules infectées étaient encore vivantes. Sachant que la migration des cellules dendritiques dure d'environ 12 h, des cellules vivantes infectées peuvent parvenir au niveau du nœud lymphatique drainant où elles rentreront à leur tour en apoptose et seront prises en charge par les cellules dendritiques résidentes. Les DC migrantes peuvent être collectées après canulation des voies lymphatiques chez le mouton {Schwartz-Cornil, 2005 #568}. Les premières données obtenues nous montrent que ces cellules peuvent être infectées par le MYXV. Pour poursuivre l'étude de l'interaction entre les DC de la lymphe et le MYXV, nous envisageons d'inoculer avec du virus recombiné SG33-GFP un mouton canulé, de récolter la lymphe et de trier les cellules qui expriment la GFP. Une caractérisation phénotypique nous renseignera sur la population de DC préférentiellement infectée. De plus, les cellules plasmacytoïdes constituent une source abondante d'IFNa à la suite du contact avec certains virus. Nous ne savons pas pour le moment si l'infection par le MYXV provoque l'activation de ces cellules et la production d'IFNa. Le ciblage du virus vers ces cellules pourrait constituer un bon moyen d'amplifier la réponse immunitaire.

Amélioration du vecteur myxomateux : fusion d'un antigène avec une protéine d'enveloppe EEV

Les poxvirus sont considérés comme d'excellents vecteurs vaccinaux grâce à leur capacité d'insertion et d'expression de transgène ainsi que d'induction d'une forte réponse immunitaire contre les antigènes d'intérêts. Néanmoins, cette réponse n'est pas toujours suffisante ou adaptée pour protéger l'individu contre un agent infectieux ou parasitaire donné, comme nous l'avons rencontré lors de nos essais de vaccination-protection chez les moutons.

Perfectionner et cibler l'immunogénicité induite par les vecteurs poxviraux est ainsi un enjeu considérable dans le cadre de la sécurité et de l'efficacité de tels vaccins. Les approches classiques vont de l'expression simultanée de molécules immunomodulatrices et d'antigènes vaccinaux aux stratégies dites de « prime-boost ». Néanmoins, une autre piste, impliquant d'autres vecteurs viraux, a été explorée depuis une quinzaine d'année : l'expression d'antigènes au sein de pseudo-particules virales (VLP) ou de virions. Cette stratégie a été jusqu'ici très peu suivie dans le domaine des vaccins vectorisés poxviraux. En effet, la majorité des vecteurs poxviraux recombinés induit la production des antigènes soit dans le cytoplasme de la cellule infectée, soit dans la membrane plasmique, soit encore sous forme sécrétée. Notre approche pour induire une réponse immunitaire contre un antigène étranger rejoint celle déjà initiée pour d'autres vecteurs viraux, tout en restant originale dans le domaine de la poxvirologie : manipuler des protéines structurales par l'insertion d'un antigène étranger. L'incorporation directe d'un antigène au sein même du virion par fusion avec une protéine d'enveloppe est différent de ce qui a pu être observé avec l'inclusion dans le virion de protéines de l'hôte lors du cycle de morphogenèse virale (Vanderplasschen et al., 1998 ; Gomez & Esteban, 2001; Krauss et al., 2002). Jusqu'ici, seules des expériences de fusion d'antigène étranger avec la protéine B5R (protéine d'EEV) du virus de la vaccine ont été menées (Kwak et al., 2004). Ainsi, des virus recombinés dans lesquels le domaine cytoplasmique de la protéine B5R a été remplacé par la protéine Gag du virus HIV-1 ont été construits. Des essais ont été réalisés en utilisant ce virus recombiné pour protéger des souris contre une souche de *Listeria* exprimant cette même protéine Gag. Une protection partielle a pu être observée. De tels résultats montrent qu'un poxvirus exprimant un antigène étranger incorporé dans les virions EEV pourrait constituer une meilleure stratégie vaccinale que les poxvirus recombinés classiques. Cette stratégie permettrait d'améliorer la réponse immunitaire contre l'antigène étranger comparé au virus de la vaccine recombiné standard. Nous nous sommes intéressés à une protéine représentative des deux formes virales

infectieuses EEV-CEV du MYXV. La protéine M022L est homologue de F13L du virus de la vaccine, protéine la plus représentée dans l'enveloppe la plus externe des EEV (Husain et al.,

2003). Il faut noter que le MYXV ne semble pas coder de protéine homologue à B5R (Cameron et al., 1999).

En fusionnant dans un premier temps la GFP à la région amino-terminale de la protéine d'enveloppe M022L du MYXV, nous avons pu étudier la localisation sub-cellulaire de la protéine ainsi modifiée, vérifiant par la même qu'elle était conforme à la localisation de F13L, et le déroulement de la morphogenèse virale. Nous avons également constaté que, contrairement à son homologue F13L, la fusion en région carboxy-terminale était létale, signalant ainsi une fonction essentielle de cette protéine et plus particulièrement de ce domaine au cours du cycle. Par la suite, nous avons fusionné l'ectodomaine de la protéine M2 des virus influenza aviaire de la même façon à M022L, tout en s'assurant encore une fois du bon déroulement du cycle viral.

Puis nous avons testé la capacité de nos MYXV recombinés à induire chez les lapins infectés une réponse immunitaire contre les protéines d'intérêts. Tous les lapins ont ainsi produits des anticorps anti-GFP ou anti-M2e, détectés par des expériences d'immunofluorescence. Parallèlement, nous avons pu mettre en évidence que les virus recombinés, bien qu'issus de la souche sauvage Toulouse 1, étaient très atténués, sans qu'*in vitro* nous ayons observé de défaut de production virale. Ces résultats semblent indiquer que la fusion amino-terminale avec M022L altère le pouvoir pathogène du MYXV. Ces observations sont plus que prometteuses dans le cadre de l'amélioration du vecteur myxomateux.

Il est de plus particulièrement intéressant de constater que ces mêmes virus sont capables d'induire une réponse immunitaire aussi bien humorale (inoculation de souris) que cellulaire (inoculation d'ovins) contre le produit du transgène fusionné à une protéine d'enveloppe d'EEV chez des espèces non-cibles. Ceci confirme que le virus myxomateux génétiquement modifié par fusion entre protéines d'enveloppes et antigènes d'intérêt constitue un excellent vecteur vaccinal non réplicatif chez des espèces autres que les léporidés. Dans ce cas, nous n'avons observé aucun effet secondaire aux inoculations virales, ce qui en plus conforte l'innocuité de ces nouveaux vecteurs vaccinaux.

Grâce à ce travail, nous avons pu mettre en évidence la capacité d'une protéine d'enveloppe d'EEV (M022L) du MYXV à présenter un antigène étranger d'intérêt de façon efficace au système immunitaire de différentes espèces animales, induisant aussi bien des réponses humorale que cellulaire.

Ces expériences préliminaires concluantes nous ouvrent des perspectives de développement d'une nouvelle stratégie vaccinale par fusion d'un antigène d'intérêt à une protéine d'enveloppe EEV du MYXV applicable à différentes espèces animales, même si nous ignorons à l'heure actuelle les mécanismes de prise en charge des antigènes fusionnés à la protéine M022L.

Nous pouvons envisager de construire un virus recombiné exprimant un antigène du virus de la Bluetongue fusionné à M022L, de tester l'immunogénicité induite contre la protéine d'intérêt et la capacité de ce vecteur de nouvelle génération à protéger les moutons contre une épreuve virulente.

D'autres protéines d'enveloppe du MYXV pourront être testées. Nous avons réalisé au laboratoire des virus recombinés exprimant un antigène d'intérêt fusionné avec la protéine M071L des virions IMV du MYXV. Les résultats que nous avons obtenus, similaires à ceux décrits avec M022L ont été inclus dans un brevet en cours de dépôt.

# ANNEXES

# Matériel et Méthodes

## 1. Général

#### -a- Cellules et virus

Les cellules RK13 et Mm (muscle de mouton) sont maintenues dans du milieu DMEM additionné de pénicilline à 100 UI/ml final et streptomycine à 100  $\mu$ g/ml, supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Les virus myxomateux de souche Toulouse 1 (T1), T1 modifiés, SG33 et SG33 recombinés sont propagés sur cellules RK13 en milieu constitué de DMEM (Dubelcco's Minimal Eagle Medium, Gibco<sup>®</sup>) additionné de pénicilline à 100 UI/ml final et streptomycine à 100  $\mu$ g/ml, supplémenté avec 2 % de SVF. La sélection des virus recombinés gpt+ a été réalisée dans le milieu de sélection MX-HAT constitué de DMEM 5 % SVF supplémenté en acide Mycophénolique 25  $\mu$ g/mL (Sigma<sup>®</sup>), en Xanthine 250  $\mu$ g/mL (Sigma<sup>®</sup>), en Hypoxanthine 15  $\mu$ g/mL, en Aminoptérine 0,176  $\mu$ g/mL et en Thymidine 4  $\mu$ g/mL.

## -b- Obtention des virus recombinés

Les cellules RK13 ont été infectées 48h après mises en culture par du virus T1 à une m.o.i. de 0,05. Après 2 h d'adsorption à 37°C, l'inoculum est retiré et les cellules rincées 3 fois avec de l'OptiMEM. Les cellules ainsi infectées, sont ensuite transfectées grâce au mélange 10  $\mu$ g d'ADN plasmidique (chacun des plasmides de transfert susnommés) et 20  $\mu$ g de lipofectamine (Invitrogen) déposé sur ces cellules pendant 5 h. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois et remises dans du milieu DMEM plus PS, 2 % SVF en culture à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> jusqu'à l'obtention d'un effet cytopathique de l'ordre de 80-90 %. Ces mélanges de recombinaison, constitués du lysat cellulaire contenant du virus sauvage et du virus recombiné subissent trois cycles de congélation/décongélation

-c- Sélection Eco. Gpt

Les cellules RK13 sont prétraitées pendant 5h30 avec le milieu de sélection avant l'application des mélanges de recombinaison, puis les inoculums sont remplacés par un volume adéquat de milieu de sélection, avant l'application du milieu solide (complémenté en MPA, Xanthine et HAT). La purification des virus recombinés est ensuite effectuée par plusieurs passages/isolements en dilution limite : une plage mère de virus recombiné est isolée, subie trois cycles de congélation/décongélation et étalée à différentes dilutions permettant d'isoler une plage fille qui subira à nouveau ce même protocole. Les virus ainsi obtenus sont ensuite amplifiés et titrés.

# 2. Matériel et méthodes spécifiques de la partie « Application à la vaccination contre la fièvre catharrale ovine »

-a- Construction des plasmides de transfert :

#### **Clonage du promoteur P7.5**

Le fragment contenant le promoteur P7.5 est extrait du plasmide pSC11 (disponible au laboratoire), après digestion par les enzymes de restriction XbaI et BamHI et purifié sur gel d'agarose (kit Nucleospin extract II, Macherey-Nagel). Le P7.5 est cloné dans le plasmide pBS-SK préalablement digéré par XbaI et BamH1 par ligation pendant 4 h à température ambiante avec de la T4 DNA ligase (Fermentas). Le plasmide obtenu est nommé pBS-SK-p7.5.

## Plamside pAT-VP60

Le plamside pAT-VP60 est un plasmide de transfert disponible au laboratoire. Initiallement, il permet d'insérer le gène de la VP60 sous contrôle du pormoteur P7.5 à la place du locus M11L-MGF dans le génome du MYXV. Ainsi, il contient de part et d'autres du fragment p7.5-VP60, une séquence du gène M9L et du gène M12L.

## Plasmides de transfert :

-pNS1

L'ADNc NS1, fourni par l'AFSSA, est amplifié par PCR avec les amorces SmaI-NS1 (5') et NS1-KpnI (3'). Le produit PCR obtenu et le plasmide pBS-SK-p7.5 sont digérés par les enzymes SmaI et KpnI et purifiés (kit Nucleospin extract II, Macherey-Nagel). Les deux fragments d'ADN sont ensuite ligués pour obtenir le plamside pBS-SK-p7.5-NS1. Le fragment p7.5-NS1 est amplifié par PCR grâce aux amorces pBS-SK-EcoRI (5') et pBS-SK-NheI (3'). Après digestion par EcoRI et NheI du produit PCR et du pAT-VP60, purification sur gel (disparition de la cassette p7.5-VP60) pour le plasmide pAT-VP60 et ligation, nous obtenons le plasmide pAT-p7.5-NS1. La casstte de sélection *E.co gpt* issue du plasmide pRB-gpt. est inséré dans le site EcoRI du plasmide pAT-p7.5-NS1 pour donner le plasmide de transfert final pNS1.

#### -pNS3:

L'ADNc NS3 est obtenu après double digestion du plasmide pFastBac-NS3 (fourni par l'AFSSA) par les enzymes BamHI et KpnI. NS3 est cloné dans le pBS-SK-p7.5 ouvert par les mêmes enzymes. L'amplification PCR de la cassette p7.5-NS3 est effectuée avec les amorces pBS-SK-EcoRI (5') et pBS-SK-NheI (3'). De la même façon que précédemment, le produit PCR et le plasmide pAT-VP60 sont double digérés par EcoRI et NheI et les deux fragments d'ADN sont ligués pour obtenir le plamside pAT-p7.5-NS3. La cassette *E.co gpt* est insérée dans le site de restriction EcoRI du plasmide pAT-p7.5-NS3. Nous obtenons ainsi le plasmide de transfert pNS3.

## -pVP7 :

Tout comme pour l'ADN NS3, l'ADNc VP7 est obtenu après double digestion du plasmide pFastBac-NS3 (fourni par l'AFSSA) par les enzymes BamHI et KpnI et cloné dans le pBS-SK-p7.5. Le plasmide obtenu, pBS-SK-p7.5-VP7, est ensuite digéré par XbaI et purifié pour obtenir l'insert p7.5-VP7. Parrallèlement, le plasmide pAT-VP60 a été ouvert par les enzyme NdeI et HpaI et purifié sur gel. Le vecteur ouvert est traité avec le fragment de Klenow de l'ADN polymerase I (Invitrogen) pendant 30 minutes à 37°C, afin de produire de part et d'autres des extrémités bouts francs. Le plasmide est ensuite ligué sur lui-même. La cassette *Eco gpt* est insérée dans le site EcoRI. Nous obtenon ainsi le plasmide pAT-gpt. Par la suite, ce plasmide est ouvert avec XbaI, puis déphosphorylé par la « Shrimp Alkaline Phosphatase » (Promega). La cassette p7.5-VP7 est alors insérée pour aboutir au plasmide de trasnfert pVP7.

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'	
SmaI-NS1	tcccccgggatggagcgcttt	
NS1-KpnI	cggggtaccctaatactccatc	
pBS-SK-	cggaattetecaccgeggtggeggeege	
EcoRI		
pBS-SK-	ctagctagcgactcactatagggcgaattg	
NheI		
F-NS2-GTW	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctatggagcaaagcaaccgtagatttac	
R-NS2-GTW	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctaaacgccgaccggcaatatgatc	
F-VP2-GTW	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctatggatgaacttggcattccgatttatg	
	g	
R-VP2-GTW	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttcatacattgagtaactttgttagc	

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour construire les plasmides de transfert pNS1, pNS2, pNS3, pVP2 et pVP7.

#### -pNS2 et pVP2 :

Pour construire ces deux plasmides de transfert, nous avons cloné la cassette Gateway frame B (GTW) (Invitrogen) au niveau du site SmaI du pBS-SK-p7.5. L'insert p7.5-GTW est obtenu par double digestion XbaI et EcoRV du plasmide précédent, puis il est traité avec le fragment de Klenow de l'ADN polymerase I (Invitrogen). L'insert est introduit par ligation dans le pAT-gpt ouvert par XbaI, traité au fragment de Klenow et déphosphorylé par la « Shrimp Alkaline Phosphatase ». Nous obtenons ainsi le plasmide pExpressMyxo.

Les ADNc NS2 et VP2, fournis à nouveau par l'AFSSA, sont amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques pour la réaction de recombinaison sites spécifiques imposés par le système Gateway (Invitrogen). Une première réaction de recombinaison nous permet d'obtenir les plasmides pDONR-NS2 et pDONR-VP2. Une seconde réaction entre les plasmides pDONR-NS2 et pDONR-VP2 et le plasmide pExpressMyxo, permet d'obtenir les plasmides de transfert pNS2 et pVP2.

#### -b- Obtention d'anticorps polyclonaux anti-VP7

Des lapins (New Zealand) ont été immunisés deux fois à 21 jours d'interval par voie souscutanée avec 100 à 200 µg de protéine VP7 adjuvée avec de l'adjuvant de Freund (Volume/Volume). La protéine VP7 nous a été fournie par l'AFSSA.

Le sérum des lapins a été récolté 21 jours après la seconde inoculation.

#### -c- Detection de la protéine VP7 par immunofluorescence

Les cellules sont infectées avec le virus SG33-VP7. 24 à 48 h post infection, elles sont perméabilisées avec du Triton X100 0,1 % dans du PBS. Après rinçages, 300 µl du sérum de lapin anti-VP7 dilué au 1/400 dans du PBS Tween sont déposés sur les cellules. Le tout est incubé 1 h à 37°C. Trois rinçages avec du PBS Tween sont effectués. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapins couplé au FITC (Sigma) dilué au 1/200 dans du PBS Tween est déposé dans les cupules et incubé 1 h à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS avant d'être montées entre lame et lamelle avec du PBS-glycérol (50%-50%) pour l'observation.

-d- RT-PCR

Les cellules RK13 ou Mm sont infectés avec les virus recombinés à m.o.i. de 5 pendant 16 h. Les cellules sont collectées et l'ARN total est isolé avec le kit RNA Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). Les RT-PCR sont réalisée avec 1 µg d'ARN total. L'ADNc est synthétisé grâce aux amorces Oligos-dT (Invitrogen) et la Superscript avec RNAseH (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Le mélange de ADNc est amplifié par PCR avec des amorces spécifiques de nos gènes d'intérêt :

- VP7 : F-VP7 : 5'-atggacactactgcggcaa-3' et R-VP7 : 5'-ctacacataagcggcgcg-3'
- NS1 : F-NS1 : 5'-atggagcgctttttgagaa-3' et R-NS1 : 5'-ctaatactccatccacatc-3'
- NS3 : F-NS3 : 5'-atgctatccgggctgatcca-3' et R-NS3 : 5'-ttaggttaatggtaattcgaaacca-3'

-e- Répartition des groupes de moutons du test de vaccination/protection

L'expérience a été réalisée sur 22 moutons répartis en deux groupes distincts d'animaux.

- Le premier groupe (témoin négatif) est constitué de 10 animaux. Ces moutons ont été inoculés par voie intradermique avec 2x10<sup>6</sup> pfu de virus recombiné SG33-VP60.
- Le second groupe est constitué de 11 animaux. Un cocktail de cinq virus recombinés (SG33-NS1, SG33-NS2, SG33-NS3, SG33-VP2 et SG33-VP7) leur a été inoculé par voie intradermique en plusieurs points à raison de 2x10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> pfu/virus/animal.

Les animaux de chaque groupe ont été rappelés 21 jours après la première inoculation de la même façon.

-f- Epreuve virulente BTV-2

Les animaux des deux groupes sont éprouvés à J42 avec la souche BTV-2 fournie par Mérial, à raison de  $10^4$  TCID<sub>50</sub> par animal inoculés par vois souscutanée. Ces essais ont été réalisés sous confinement A3 dans l'animalerie de l'AFSSA à Sophia Antipolis. A l'issu de l'expérimentation, les animaux sont euthanasiés (J75).

# -g- Suivi clinique

Une surveillance clinique post-vaccinale est effectuée de J0 à J7, puis entre J21 et J28. Suite à l'épreuve virulente, la surveillance est réalisée quotidiennement, avec une observation minutieuse des signes cliniques et une prise de température. Un système de « scoring » utilisé pour la validation du vaccin Mérial en 2003, nous a permis de noter les signes cliniques. Le détail des points attribués en fonction des signes cliniques est décrit dans le **Tableau 6**.

Comportement	Apathie		1 point
général			
Signes cliniques	Prostration		2 points
	Décubitus		3 points
	Oedème	Face	1 point
		Nez	1 point
		Lèvres	1 point
		Langue	1 point
	Congestion	Peau ou sabots	4 points
	Troubles de la	Raideur	2 points
	locomotion	Difficultés à rester debout	2 points
	Troubles	Jetage nasal :	
	respiratoires	Léger	1 point
		important	2 points
		Toux	1 point
	Troubles digestifs		1 point
	Autres signes	Conjonctivite	1 point
	cliniques	Ulcères oraux	1 point
		Bêlements plaintifs	1 point
		Hyper salivation	1 point
	Mortalité		20 points

 Tableau 6: Description du système de « scoring ». (Inspiré de Mérial).

#### 3. Matériel et méthodes spécifiques de la partie « Amélioration du vecteur MYXV »

-a- Construction du plasmide pGFP-M022L

Le gène M022L a été amplifié par PCR grâce aux amorces F-GFP-M022L et R-GFP-M022L (**Tableau 1**) et cloné en fusion amino-terminale avec la GFP (Green Fluorescent Protein) dans le plasmide pEGFP-F (clontech) aboutissant au plasmide pGFP-M022L.

-b- Colocalisation de GFP-M022L avec des compartiments cellulaires détectée par immunofluorescence

Les cellules RK13 ont été transfectées avec 2  $\mu$ g de plasmide pGFP-M022L à l'aide de 3  $\mu$ l de Fugen6 (Roche). Après 24 h de mise en culture à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, les cellules sont fixées avec de la paraformaldhèdyde 4 % dans du PBS. Les cellules sont perméabilisées avec du Triton X100 0,1 % dans du PBS. Après rinçages, 300  $\mu$ l d'anticorps spécifiques dilués au 1/100 pour l'anti calnexin (BD Pharmingen) et au 1/200 pour l'anti EEA1 (BD Pharmingen) dans du PBS Tween sont déposés sur les cellules. Le tout est incubé 1 h à 37°C. 3 rinçages avec du PBS Tween sont effectués. L'anticorps secondaire anti-IgG de souris biotinylé (Santa Cruz)) dilué au 1/200 dans du PBS Tween est déposé dans les cupules et incubé 1 h à 37°C. La révélation est effectuée grâce à de l'extravidin couplée au TRITC (Sigma): 300  $\mu$ l d'extravidin couplée au TRITC diluée au 1/200 dans du PBS sont déposés dans chaque cupule et laissé incubé 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS avant d'être montées entre lame et lamelle avec du PBS-glycérol (50%-50%) pour l'observation.

-c- Construction des plasmides de transfert

## Plasmide de transfert pour la fusion N-gfp-M022L :

Le gène M022L se situe au niveau de l'extrémité gauche du génome du VM. Son promoteur contient les séquences caractéristiques des promoteurs tardifs poxviraux: **CATTTAAT** 

**ACATGAAAAGAGCGAGTGATTTATTAAAGAG.** Cette séquence en amont du gène M022L contenant le promoteur naturel de M022L a été amplifiée avec les amorces F-pM022L et R-pM022L (**Tableau 7**) et clonés dans le plasmide pCR2 (Invitrogen) aboutissant au plasmide pCR2-promM022L. Le fragment GFP-M022L a été sorti du pGFP-M022L par double digestion NheI et BamHI, suivi d'un traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymerase I (Invitrogen) afin de produire de part et d'autres des extrémités bouts francs. Parallèlement, le plasmide pCR2-promM022L a été ouvert par EcoRV puis déphosphorylé par la « Shrimp Alkaline Phosphatase » (Promega). Le fragment GFP-M022L a été cloné dans le pCR2-promM022L aboutissant à construction du plasmide pPROM-GFP-M022L (**Figure 23**).

## Plasmide de transfert pour la fusion N-M2e-M022L

Les amorces utilisées sont répertoriées dans le **Tableau 7**. La séquence du gène de sélection *gpt* sous la dépendance du promoteur mixte précoce-tardif P7.5 a été obtenue par PCR avec la Taq Expand High Fidelity (Roche) sur le plasmide pRB-gpt avec les amorces F-gpt-Xho I, R-gpt-EcoR I. Le produit de PCR (≈750 pb) a été inséré directement dans le vecteur commercial pGEM®-T (Promega) pour donner le vecteur pGEMT-gpt.

La boîte de recombinaison gauche a été obtenue par amplification par PCR de la séquence 3' du gène *M022L* ( $\approx$ 500 pb) de la souche T1 du virus myxomateux avec les amorces F-M022L-Nco I et R-M022L-Apa I). La boîte de recombinaison droite a été obtenue par amplification par PCR de la séquence 5' du gène *M023R* ( $\approx$ 400 pb) de la souche T1 du virus myxomateux avec les amorces F-M023R-Xho I et R-M023R-PstI. La séquence correspondant à l'ectodomaine de M2 a été obtenue et amplifiée par PCR ( $\approx$ 120 pb) grâce à deux couples d'amorces : un couple d'amorces longues chevauchantes, T5-prom-M022L et T6-Nco I, et un couple d'amorces correspondant à l'extrémité 5' de chaque amorce longue, P1-promM022L et P2-Nco I. Les produits de PCR digérés par les enzymes de restriction adéquates ont été insérés de manière séquentielle dans le vecteur pGEMT-gpt digéré par les mêmes enzymes (**Figure 24**).

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'
F-GFP-M022L	GGA <u>AGATCT</u> ATGCTATCACTTTTTCT
R-GFP-M022L	TT <u>CTGCAG</u> TAGTAATTGCACTGCGT
F-pM022L	CTAGCTAGCGTGGACAATGTATCATGC
R-pM022L	CTAGCTAGCGCATTTAATACATGAA
F-gpt-Xho I	CC <u>CTCGAG</u> AACCCACCCGCTTTTTATAG
R-gpt-EcoR I	CG <u>GAATTC</u> AGTGCCAGGCGTTGAAAA
F-M022L-Nco I	CAG <u>CCATGG</u> TATCACTTTTTTCTAAGCCACC
F-M023R-Xho I	TA <u>CTCGAG</u> TACCCGTTTTTCTTTCTTCTGGTTCTGG
R-M022L-Apa I	CT <u>GGGCCC</u> GCTAAGGGAGCGTATGTGGA
R-M023R-Pst I	AA <u>CTGCAG</u> TATACACGTGCGAGGACAGG
T6-Nco I	AGACG <u>CCATGG</u> ATCTGTCGGAGGAGTCGTTGCACTTGCATTC
	CCAACCGT <u>TACGAGTCGGAGT</u>
P2-Nco I	AGACG <u>CCATGG</u> ATCTGTCGGAGGAG
T5-prom-	CGGAATTCTTAATAAATCACTCGCTCTTTTTCATGTATTAAATG
M022L	TCCCTGCTGACTGAAGTTGAAACTCCGACTCGTAACG
P1-prom-M022L	CG <u>GAATTC</u> TTAATAAATCACTC

**Tableau 7: Liste des amorces utilisées pour les fusions à M022L.** Les amorces en vert sont celles utilisées pour la fusion GFP-M022L. Le <u>soulignage simple</u> indique les sites de restriction, le <u>soulignage en vague</u> indique la zone d'hybridation des amorces longues entre elles.



**Figure 23: Construction du plasmide de transfert utilisé pour l'obtention du virus recombiné T1-N-gfp-M022L.** Le fragment GFP-M022L du plasmide pGFP-M022L a été cloné en aval du promoteur naturel de M022L (promM022L) dans le plasmide pCR2-promM022l pour former le plasmide de transfert pPROM-GFP-M022L utilisé pour construire le virus T1-N-gfp-M022L.



Figure 24: Construction du plasmide de transfert pour l'obtention du virus recombiné T1-M2e-M022L. Le plasmide a été construit de manière séquentielle grâce aux sites de restriction indiqués.

#### -d- Isolement des virus recombinés

Pour la fusion GFP-M022L, dix BP100 contenant chacune  $9x10^6$  cellules RK13 de 48h sont infectées avec le mélange de recombinaison. Après 48 h, le milieu liquide est remplacé par du milieu solide (MEME + PS, agarose low melting point 1 %, hepès 25 mM final, NaHCO<sub>3</sub> 3 % final, 2 % SVF). Après 48 h à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, les plages de lyse contenant les virus recombinés, sont identifiées après observation en microscopie à fluorescence et isolées. Pour la fusion M2-M022L, le virus, contenant le gène *E.co gpt*, est sélectionné comme indiqué dans le paragraphe 1-c-.

-e- Immunisation et suivi clinique chez l'espèce cible

Des lots de quatre lapins mâles New Zealand de 10 semaines ont été inoculés à l'oreille par voie intradermique avec  $5x10^3$  ufp (unité formant plage) de chacun des virus recombinés dilués dans de l'OptiMEM sans PS ni SVF. Des prises de sang sur tube sec ont été effectuées à J0, J10, J20 et J30 post-infection et les sérums extraits. Un groupe contrôle de quatre animaux a été inoculé de la même façon avec la même dose de virus T1 (virus parental). Un suivi clinique a été effectué par observation régulière des lapins : présence de lésions évocatrices, évaluation de l'état général.

## -f- Immunisation et suivi clinique chez les espèces non-cibles

-Des lots de quatre souris mâles de 8 semaines de type BalbC ont été infectés par voie intrapéritonéale avec 5 10<sup>6</sup> ufp de virus T1-N-M2e-M022L à raison de deux injections à 21 jours d'intervalle. Un lot de deux souris non-infectées a servi de témoin. Les souris ont été surveillées (présence de lésions, évaluation de l'état général) régulièrement jusqu'à 42 jours post-inoculation, puis sacrifiées et saignées pour extraire les sérums.

-Deux brebis adultes ont été inoculées par voie intradermique avec  $5 \times 10^7$  ufp de virus T1-Ngfp-M022L à J0, J8 et J24, puis par voie intramusculaire à J90. Une surveillance clinique a été effectuée par observation régulière (présence de lésions évocatrices, évaluation de l'état général) durant 7 jours après chaque inoculation et des prises de sang ont été réalisées sur tubes EDTA pour extraction des cellules mononuclées périphériques du sang (PBMC) à J0 et J110 post-inoculation.

## -g- Analyse des sérums

-La présence d'anticorps anti-GFP dans les sérums des lapins inoculés avec le virus T1-Ngfp-M022L a été testée par immunofluorescence. Les cellules RK13 ont été transfectées avec 2  $\mu$ g de plasmide pEGFP-F (clontech) à l'aide de 3  $\mu$ l de Fugen6 (Roche). Après 48 h de mise en culture à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, les cellules sont fixées avec de la paraformaldhèdyde 4 % dans du PBS. Une détection de la GFP par immunofluorescence est ensuite réalisée. Les cellules sont perméabilisées avec du Triton X100 0,1 % dans du PBS. Après rinçages, 300  $\mu$ l des sérums différemment dilués (1/100 ; 1/300) dans du PBS Tween sont déposés sur les cellules. Le tout est incubé 1 h à 37°C. 3 rinçages avec du PBS Tween sont effectués. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapins biotinylé (Sigma) dilué au 1/200 dans du PBS Tween est déposé dans les cupules et incubé 1 h à 37°C. La révélation est effectuée grâce à de l'extravidin couplée au TRITC (Sigma) : 300  $\mu$ l d'extravidin couplée au TRITC diluée au 1/200 dans du PBS sont déposés dans chaque cupule et laissé incubé 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS avant d'être montées entre lame et lamelle avec du PBS-glycérol (50%-50%) pour l'observation.

-La présence d'anticorps anti-M2e dans les sérums de lapins et de souris inoculés avec le virus T1-N-M2e-M022L a été testée par immunofluorescence. Les cellules RK13 ont été infectées par du virus influenza de type H7N1 aviaire (m.o.i. de 0,3) ou par du virus influenza de type H1N1 humain (m.o.i. de 0,1) puis fixées 8 h p.i. La détection de la protéine M2 suit le protocole précédemment cité, les sérums de lapins et de souris étant dilués respectivement au 1/200<sup>éme</sup> et 1/100<sup>éme</sup>. Les anticorps secondaires anti-IgG de souris et anti-IgG de lapins couplés FITC ont été utilisés à la dilution 1/200<sup>éme</sup>.

-h- Analyse de la réponse cellulaire chez les ovins

La réponse cellulaire contre le produit du transgène fusionné a été explorée chez les deux ovins inoculés (voir paragraphe 5) avec le virus T1-N-gfp-M022L. Le principe est de mesurer par cytométrie de flux la lymphoprolifération après restimulation par la GFP des PBMC isolés et cultivés en présence d'un fluorochrome (CFSE).

## -Isolement des PBMC

Le sang est collecté sur tube EDTA, puis dilué (1:2) avec du PBS. Le mélange est chargé sur un gradient de densité (FicollPaque plus, Amersham) puis centrifugé à 800g pendant 20 minutes. Les PBMC (cellules mononuclées périphériques du sang) sont collectées, lavées dans du PBS et récupérées par centrifugation à 870 g pendant 10 minutes à 4°C. Les PBMC sont cultivés à 37°C sous atmosphère 5 % CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture RPMIc est constitué de RPMI 1640 Glutamax, 25 mM Hepes (Gibco-BRL), auquel est ajouté 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de pyruvate de sodium (Gibco-BRL), 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco-BRL), 1 % de  $\beta$ -mercapto-éthanol (gibco-BRL), 100 unités/ml de pénicilline ainsi que 100 µg/ml de streptomycine.

## -Test de lymphoprolifération

Après isolement, les PBMC sont marqués au CFSE (Molecular Probes). Les cellules sont reprises dans du PBS à une concentration de  $10^7$  cellules/ml. Une solution 2X (2.5 µM) de CFSE dans du PBS est ajoutée volume à volume aux cellules. Le tout est incubé 10 minutes à l'abri de la lumière. Puis du SVF est ajouté volume à volume pour neutraliser le marquage. Le mélange est mis à incuber pendant 3 minutes. Puis le tube est complété avec du RPMIc et centrifugé à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Le lavage est répété dans un nouveau tube. La concentration cellulaire est ajustée à  $6x10^6$  cellules/ml avec du RPMIc. Les cellules sont mises en culture en plaques P24 à raison de  $3x10^6$  cellules par puits sous 1 ml. Des quantités variables de protéine rGFP (Clonetech) (10 à 0.1 µg) sont ajoutées aux cellules. Les cellules sont ainsi mises en culture à  $37^{\circ}$ C, sous atmosphère 5 % CO<sub>2</sub>. Après 6 jours d'incubation, les cellules sont récoltées, laver dans du tampon FACS (PBS, 2.5 mM EDTA, 0.5 % BSA) et marquées avec des anticorps anti-CD2 couplés au A647 et anti-CD4 couplés à la phycoérytrine (Sérotec). La viabilité est déterminée grâce à l'ajout d'iodure de propidium à 1

μg/ml juste avant l'acquisition (BD Biosciences Pharmingen). L'acquisition est réalisée avec un FACScalibur (Becton Dickinson). L'analyse est réalisée avec le logiciel Flowjo.

# **Références bibliographiques**

- Allsopp, C. E., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R. E., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Layton, G. & Hill, A. V. (1996). Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur J Immunol* 26, 1951-9.
- Andrew, M. E., Whiteley, P., Janardhana, V., Lobato, Z., Gould, A. and Coupar, B. (1995). Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Veterinary immunology and immunopathology* 47, 311-322.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
- Aspden, K., Passmore, J. A., Tiedt, F. & Williamson, A. L. (2003). Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector. J Gen Virol 84, 1985-96.
- Baldick, C. J., Jr., Keck, J. G. & Moss, B. (1992). Mutational analysis of the core, spacer, and initiator regions of vaccinia virus intermediate-class promoters. *J Virol* 66, 4710-9.
- Baldick, C. J., Jr. & Moss, B. (1993). Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *J Virol* 67, 3515-27.
- Barcena, J. & Blasco, R. (1998). Recombinant swinepox virus expressing betagalactosidase: investigation of viral host range and gene expression levels in cell culture. *Virology* 243, 396-405.
- Barcena, J., Morales, M., Vazquez, B., Boga, J. A., Parra, F., Lucientes, J., Pages-Mante, A., Sanchez-Vizcaino, J. M., Blasco, R. & Torres, J. M. (2000). Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. J Virol 74, 1114-23.
- Barchichat, S. & Katz, E. (2002). Immunization of rabbits with a modified vaccinia Ankara recombinant virus bearing the HIV envelope antigen on its outer membrane. *Virus Res* 90, 243-51.
- Barclay, A. N., Wright, G. J., Brooke, G. & Brown, M. H. (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* 23, 285-90.
- Barry, M., Hnatiuk, S., Mossman, K., Lee, S. F., Boshkov, L. & McFadden, G. (1997). The myxoma virus M-T4 gene encodes a novel RDEL-containing protein that is retained within the endoplasmic reticulum and is important for the productive infection of lymphocytes. *Virology* 239, 360-77.

- Beattie, E., Paoletti, E. & Tartaglia, J. (1995). Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology* 210, 254-63.
- Beattie, E., Tartaglia, J. & Paoletti, E. (1991). Vaccinia virus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology* 183, 419-22.
- Bertagnoli, S., Gelfi, J., Le Gall, G., Boilletot, E., Vautherot, J. F., Rasschaert, D., Laurent, S., Petit, F., Boucraut-Baralon, C. & Milon, A. (1996). Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. J Virol 70, 5061-6.
- Best, S. M., Collins, S. V. & Kerr, P. J. (2000). Coevolution of host and virus: cellular localization of virus in myxoma virus infection of resistant and susceptible European rabbits. *Virology* 277, 76-91.
- Best, S. M. & Kerr, P. J. (2000). Coevolution of host and virus: the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. *Virology* 267, 36-48.
- Blancou, J., Kieny, M. P., Lathe, R., Lecocq, J. P., Pastoret, P. P., Soulebot, J. P. & Desmettre, P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* 322, 373-5.
- Bonini, C., Lee, S. P., Riddell, S. R. & Greenberg, P. D. (2001). Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 166, 5250-7.
- Boomker, J. M., Luttikhuizen, D. T., Veninga, H., de Leij, L. F., The, T. H., de Haan, A., van Luyn, M. J. & Harmsen, M. C. (2005). The modulation of angiogenesis in the foreign body response by the poxviral protein M-T7. *Biomaterials* 26, 4874-81.
- Boone, J. D., Balasuriya, U. B., Karaca, K., Audonnet, J. C., Yao, J., He, L., Nordgren, R., Monaco, F., Savini, G., Gardner, I. A. & Maclachlan, N. J. (2007).
   Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* 25, 672-8.
- Brandt, T. A. & Jacobs, B. L. (2001). Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J Virol* 75, 850-6.
- Brick, D. J., Burke, R. D., Minkley, A. A. & Upton, C. (2000). Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *J Gen Virol* 81, 1087-97.
- Brick, D. J., Burke, R. D., Schiff, L. & Upton, C. (1998). Shope fibroma virus RING finger protein N1R binds DNA and inhibits apoptosis. *Virology* 249, 42-51.
- Bronte, V., Carroll, M. W., Goletz, T. J., Wang, M., Overwijk, W. W., Marincola, F., Rosenberg, S. A., Moss, B. & Restifo, N. P. (1997). Antigen expression by dendritic

cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3183-8.

- Brown, J. P., Twardzik, D. R., Marquardt, H. & Todaro, G. J. (1985). Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature* 313, 491-2.
- Broyles, S. S. (2003). Vaccinia virus transcription. J Gen Virol 84, 2293-303.
- Buller, R. M., Smith, G. L., Cremer, K., Notkins, A. L. & Moss, B. (1985). Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature* 317, 813-5.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. & McFadden, G. (1999). The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology* 264, 298-318.
- Cameron, C. M., Barrett, J. W., Liu, L., Lucas, A. R. & McFadden, G. (2005a). Myxoma virus M141R expresses a viral CD200 (vOX-2) that is responsible for down-regulation of macrophage and T-cell activation in vivo. *J Virol* **79**, 6052-67.
- Cameron, C. M., Barrett, J. W., Mann, M., Lucas, A. & McFadden, G. (2005b). Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the downregulation of macrophage activation in vivo. *Virology* **337**, 55-67.
- Camus-Bouclainville, C., Fiette, L., Bouchiha, S., Pignolet, B., Counor, D., Filipe, C., Gelfi, J. & Messud-Petit, F. (2004). A virulence factor of myxoma virus colocalizes with NF-kappaB in the nucleus and interferes with inflammation. *J Virol* 78, 2510-6.
- Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B. & Jagus, R. (1993). Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. *J Biol Chem* 268, 12837-42.
- Carter, G. C., Law, M., Hollishead, M. and Smith G.L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature vivion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 88, 1279-1290.
- Chahroudi, A., Chavan, R., Kozyr, N., Waller, E. K., Silvestri, G. & Feinberg, M. B. (2005). Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *J Virol* **79**, 10397-407.
- Chan, A., Baird, M., Mercer, A. A. & Fleming, S. B. (2006). Maturation and function of human dendritic cells are inhibited by orf virus-encoded interleukin-10. *J Gen Virol* 87, 3177-81.
- Chang, H. W. & Jacobs, B. L. (1993). Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. *Virology* 194, 537-47.

- Chang, H. W., Uribe, L. H. & Jacobs, B. L. (1995). Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L. *J Virol* 69, 6605-8.
- Chang, H. W., Watson, J. C. & Jacobs, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4825-9.
- Chang, W., Upton, C., Hu, S. L., Purchio, A. F. & McFadden, G. (1987). The genome of Shope fibroma virus, a tumorigenic poxvirus, contains a growth factor gene with sequence similarity to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Mol Cell Biol* 7, 535-40.
- Chavan, R., Marfatia, K. A., An, I. C., Garber, D. A. & Feinberg, M. B. (2006). Expression of CCL20 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, but not Flt3-L, from modified vaccinia virus ankara enhances antiviral cellular and humoral immune responses. *J Virol* 80, 7676-87.
- Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S. & Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72, 1577-85.
- Clemens, M. J. & Elia, A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 17, 503-24.
- Cody, V., Shen, H., Shlyankevich, M., Tigelaar, R. E., Brandsma, J. L. & Hanlon, D. J. (2005). Generation of dendritic cells from rabbit bone marrow mononuclear cell cultures supplemented with hGM-CSF and hIL-4. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 163-72.
- Collin, N., Guerin, J. L., Drexler, I., Blanie, S., Gelfi, J., Boullier, S., Foucras, G., Sutter, G. & Messud-Petit, F. (2005). The poxviral scrapin MV-LAP requires a myxoma viral infection context to efficiently downregulate MHC-I molecules. *Virology* 343, 171-8.
- Cory, S., Huang, D.C., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
- Cyrklaff, M., Risco, C., Fernandez, J. J., Jimenez, M. V., Esteban, M., Baumeister, W. & Carrascosa, J. L. (2005). Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2772-7.
- Davies, M. V., Elroy-Stein, O., Jagus, R., Moss, B. & Kaufman, R. J. (1992). The vaccinia virus K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. *J Virol* 66, 1943-50.
- Davison, A. J. & Moss, B. (1989). Structure of vaccinia virus early promoters. *J Mol Biol* 210, 749-769.
- DeLange, A. M. & McFadden, G. (1990). The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 163, 71-92.

- Diallo, A., Minet, C., Berhe, G., LeGoff, C., Black, D.N., Fleming, M., Barrett, T., Grillet, C. & Libeau, C. (2002). Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann NY Acad Sci* 969, 88-9.
- Di Eminio, B., Nicolussi, P., patta, C., Rnchi, G.F., Monaco, F. and Savini, G. (2004). Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine agaisnt bluetongue virus serotype 2. Veterinary Italiana 40, 640-644.
- Drillien, R., Spehner, D. & Hanau, D. (2004). Modified vaccinia virus Ankara induces moderate activation of human dendritic cells. *J Gen Virol* **85**, 2167-75.
- **Dubochet, J., Adrian, M., Richter, K., Garces, J. & Wittek, R. (1994).** Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J Virol* 68, 1935-41.
- Duteyrat, J. L., Gelfi, J. & Bertagnoli, S. (2006). Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Arch Virol* 151, 2161-80.
- Eckert, D., Williams, O., Meseda, C. A. & Merchlinsky, M. (2005). Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J Virol* 79, 15084-90.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W. I., Steinman, R. M.
  & Bhardwaj, N. (1999). Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163, 6762-8.
- Eppstein, D. A., Marsh, Y. V., Schreiber, A. B., Newman, S. R., Todaro, G. J. & Nestor, J. J., Jr. (1985). Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection. *Nature* 318, 663-5.
- Ernst, V., Levin, D. H. & London, I. M. (1979). In situ phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 in reticulocyte lysates inhibited by heme deficiency, double-stranded RNA, oxidized glutathione, or the heme-regulated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2118-22.
- Evans, D. H., Stuart, D. & McFadden, G. (1988). High levels of genetic recombination among cotransfected plasmid DNAs in poxvirus-infected mammalian cells. *J Virol* 62, 367-75.
- Everett, H., Barry, M., Sun, X., Lee, S. F., Frantz, C., Berthiaume, L. G., McFadden, G. & Bleackley, R. C. (2002). The myxoma poxvirus protein, M11L, prevents apoptosis by direct interaction with the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* 196, 1127-39.
- Fauquet, C. M. (2005). Virus taxonomy. In *Eighth report of the international Committee on taxonomy of Viruses.*, pp. 328-347. Edited by C. M. Fauquet, Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger and Ball, L.A.: Elsevier academic press.

- Fenner, F. & Marshall, I. D. (1954). Passive immunity in myxomatosis of the European rabbit (Oryctolagus cuniculus): the protection conferred on kittens born by immune does. J Hyg (Lond) 52, 321-36.
- Fenner, F. & Marshall, I. D. (1957). A comparison of the virulence for European rabbits (Oryctolagus cuniculus) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. J Hyg (Lond) 55, 149-91.
- Fenner, F. & Ratcliffe, F.N. (1965). Myxomatosis. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fenner, F. & Ross, J. (1994). The European Rabbit, the History and Biology of a Successful Colonizer. In *Myxomatosis*, pp. 205-239. Edited by G. T. a. C. M. King. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.
- Fenner, F., Wittek, R. & Dumbell, K.R. (1989). The orthopoxviruses. Academic Press, San Franscisco.
- **Foulon, E. & Foucras, G. (en soumission).** Various CD11c-positive dendritic cells can be generated from ovine bone marrow cells in the presence of GM-CSF. *Journal of Immunological Methods*.
- Garcia, M. A., Guerra, S., Gil, J., Jimenez, V. & Esteban, M. (2002). Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene* 21, 8379-87.
- Gomez, C. E. & Esteban, M. (2001). Recombinant proteins produced by vaccinia virus vectors can be incorporated within the virion (IMV form) into different compartments. *Arch Virol* 146, 875-92.
- Griffiths, G., Wepf, R., Wendt, T., Locker, J. K., Cyrklaff, M. & Roos, N. (2001). Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis. *J Virol* **75**, 11034-55.
- Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-911.
- Grubisha, O. & Traktman, P. (2003). Genetic analysis of the vaccinia virus I6 telomerebinding protein uncovers a key role in genome encapsidation. *J Virol* 77, 10929-42.
- Gubser, C., Hue, S., Kellam, P. & Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85, 105-17.
- Guerin, J. L., Gelfi, J., Boullier, S., Delverdier, M., Bellanger, F. A., Bertagnoli, S., Drexler, I., Sutter, G. & Messud-Petit, F. (2002). Myxoma virus leukemiaassociated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. J Virol 76, 2912-23.
- Guerin, J. L., Gelfi, J., Camus, C., Delverdier, M., Whisstock, J. C., Amardeihl, M. F., Py, R., Bertagnoli, S. & Messud-Petit, F. (2001). Characterization and functional
analysis of Serp3: a novel myxoma virus-encoded serpin involved in virulence. *J Gen Virol* **82**, 1407-17.

- Guerra, S., Najera, J. L., Gonzalez, J. M., Lopez-Fernandez, L. A., Climent, N., Gatell, J. M., Gallart, T. & Esteban, M. (2007). Distinct Gene Expression Profiling after Infection of Immature Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by the Attenuated Poxvirus Vectors MVA and NYVAC. J Virol 81, 8707-21.
- Gunasinghe, S. K., Hubbs, A. E. & Wright, C. F. (1998). A vaccinia virus late transcription factor with biochemical and molecular identity to a human cellular protein. *J Biol Chem* 273, 27524-30.
- Heylbroeck, C., Balachandran, S., Servant, M. J., DeLuca, C., Barber, G. N., Lin, R. & Hiscott, J. (2000). The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. *J Virol* 74, 3781-92.
- Hnatiuk, S., Barry, M., Zeng, W., Liu, L., Lucas, A., Percy, D. & McFadden, G. (1999). Role of the C-terminal RDEL motif of the myxoma virus M-T4 protein in terms of apoptosis regulation and viral pathogenesis. *Virology* 263, 290-306.
- Hollinshead, M., Rodger, G., Van Eijl, H., Law, M., Hollinshead, R., Vaux, D. J. & Smith, G. L. (2001). Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. J Cell Biol 154, 389-402.
- Hooda-Dhingra, U., Thompson, C. L. & Condit, R. C. (1989). Detailed phenotypic characterization of five temperature-sensitive mutants in the 22- and 147-kilodalton subunits of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 63, 714-29.
- Hruby, D. E. (1990). Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin Microbiol Rev* **3**, 153-70.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S. & Chang, W. (1998). Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain. *J Virol* **72**, 8374-9.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S. & Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* 73, 8750-61.
- Huang, D. C. & Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-42.
- Huismans, H. & Erasmus, B. J. (1981). Identification of the serotype-specific and groupspecific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J Vet Res* 48, 51-8.
- Huismans, H., van der Walt, N. T., Cloete, M. & Erasmus, B. J. (1987). Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. *Virology* 157, 172-9.

- Hung, J. J., Chung, C. S. & Chang, W. (2002). Molecular chaperone Hsp90 is important for vaccinia virus growth in cells. *J Virol* 76, 1379-90.
- Husain, M. &. Moss., B. (2003). Intracellular trafficking of a palmitoylated membraneassociated protein component of enveloped vaccinia virus. *J Virol* 77, 9008-9019.
- Ichihashi, Y. (1996). Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology* 217, 478-485.
- Ignatius, R., Marovich, M., Mehlhop, E., Villamide, L., Mahnke, K., Cox, W. I., Isdell, F., Frankel, S. S., Mascola, J. R., Steinman, R. M. & Pope, M. (2000). Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. *J Virol* 74, 11329-38.
- Jacobs, B. L. & Langland, J. O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 219, 339-49.
- Jeggo, M. H., Gumm, I.D. and Taylor, W.P. (1983). Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. *Research in veterinary science* 34, 205-211.
- Jeggo, M. H., Wardley, R. C. & Taylor, W. P. (1984). Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection. *Res Vet Sci* 36, 81-6.
- Jeggo, M. H., Wardley, R.C. & Brownlie, J. (1984). A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer technics. *Immunology* 52, 403-410.
- Jeggo, M. H., Wardley, R.C.& Brownlie, J. (1985). Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Progress in clinical & biological research* 178, 477-487.
- Jeggo, M. H. & Wardley., R.C (1982a). Generation of cross-recative cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus types. *Immunology* 45, 629-635.
- Jeggo, M. H. & Wardley., R.C (1982b). The induction of murine cytotoxic T lymphocytes by bluetongue virus. *Arch Virol* 71, 197-206.
- Jeggo, M. H. & Wardley., R.C (1982c). Production of murine cytotoxic t lymphocytes by bluetongue virus following various immunization procedures. *research in veterinary science* 33, 212-215.
- Jeggo, M. H& Wardley., R.C (1985). Bluetongue vaccine: cells and/or antibodies. *Vaccine* 3, 57-58.
- Johnston, J. B., Barrett, J. W., Chang, W., Chung, C. S., Zeng, W., Masters, J., Mann, M., Wang, F., Cao, J. & McFadden, G. (2003). Role of the serine-threonine kinase PAK-1 in myxoma virus replication. *J Virol* 77, 5877-88.

- Johnston, J. B., Barrett, J. W., Nazarian, S. H., Goodwin, M., Ricciuto, D., Wang, G. & McFadden, G. (2005a). A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity* 23, 587-98.
- Johnston, J. B., Nazarian, S. H., Natale, R. & McFadden, G. (2005b). Myxoma virus infection of primary human fibroblasts varies with cellular age and is regulated by host interferon responses. *Virology* 332, 235-48.
- Johnston, J. B., Wang, G., Barrett, J. W., Nazarian, S. H., Colwill, K., Moran, M. & McFadden, G. (2005c). Myxoma virus M-T5 protects infected cells from the stress of cell cycle arrest through its interaction with host cell cullin-1. *J Virol* **79**, 10750-63.
- Jones, L. D., Williams, T., Bishop, D. & Roy, P. (1997). Baculovirus-expressed nonstructural protein NS2 of bluetongue virus induces cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 4, 297-301.
- Joubert, L., Leftheiothis, E. & Mouchet, J. (1972). La myxomatose spontanée. In *La myxomatose II*, pp. 343-393. Paris: L'expansion scientifique française.
- Katz, E. & Moss, B. (1997). Immunogenicity of recombinant vaccinia viruses that display the HIV type 1 envelope glycoprotein on the surface of infectious virions. *AIDS res Hum Retroviruses* 13, 1497-1500.
- Katze, M. G., He, Y. & Gale, M., Jr. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2, 675-87.
- Kawagishi-Kobayashi, M., Cao, C., Lu, J., Ozato, K. & Dever, T. E. (2000). Pseudosubstrate inhibition of protein kinase PKR by swine pox virus C8L gene product. *Virology* **276**, 424-34.
- Kawagishi-Kobayashi, M., Silverman, J. B., Ung, T. L. & Dever, T. E. (1997). Regulation of the protein kinase PKR by the vaccinia virus pseudosubstrate inhibitor K3L is dependent on residues conserved between the K3L protein and the PKR substrate eIF2alpha. *Mol Cell Biol* 17, 4146-58.
- Kempe, C. H. (1960). Studies smallpox and complications of smallpox vaccination. *pediatrics* 26, 176-189.
- Kerr, P. & McFadden, G. (2002). Immune responses to myxoma virus. *Viral Immunol* 15, 229-46.
- Koromilas, A. E., Roy, S., Barber, G. N., Katze, M. G. & Sonenberg, N. (1992). Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science* 257, 1685-9.

- Krauss, O., Hollinshead, R., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2002). An investigation of incorporation of cellular antigens into vaccinia virus particles. *J Gen Virol* 83, 2347-59.
- Kusov, Y. Y., Zamjatina, N.A., Poleschuk, V.F., Michailov, M.I., Morace, G., Eberle J. & Gauss-Muller, V. (2007). Immunogenicity of a chimeric hepatitis A virus (HAV) carrying the HIV gp41 epitope 2F5. *Antiviral Res* 73, 101-111.
- Kvansakul, M., van Delft, M. F., Lee, E. F., Gulbis, J. M., Fairlie, W. D., Huang, D. C. & Colman, P. M. (2007). A structural viral mimic of prosurvival Bcl-2: a pivotal role for sequestering proapoptotic Bax and Bak. *Mol Cell* 25, 933-42.
- Kwak, H., Mustafa, W., Speirs, K., Abdool, A. J., Paterson, Y. & Isaacs, S. N. (2004). Improved protection conferred by vaccination with a recombinant vaccinia virus that incorporates a foreign antigen into the extracellular enveloped virion. *Virology* 322, 337-48.
- Lalani, A. S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D. & McFadden, G. (1997). The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J Virol* 71, 4356-63.
- Lalani, A. S., Masters, J., Zeng, W., Barrett, J., Pannu, R., Everett, H., Arendt, C. W. & McFadden, G. (1999). Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science* 286, 1968-71.
- Lalani, A. S. & McFadden, G. (1999). Evasion and exploitation of chemokines by viruses. *Cytokine Growth Factor Rev* 10, 219-33.
- Lateef, Z., Fleming, S., Halliday, G., Faulkner, L., Mercer, A. & Baird, M. (2003). Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells. *J Gen Virol* 84, 1101-9.
- Laurence, D. J. & Gusterson, B. A. (1990). The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. *Tumour Biol* 11, 229-61.
- Law, M., Carter, G. C., Roberts, K. L., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2006). Ligandinduced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5989-94.
- Law, M., Hollinshead, M., Lee, H. J. & Smith, G. L. (2004). Yaba-like disease virus protein Y144R, a member of the complement control protein family, is present on enveloped virions that are associated with virus-induced actin tails. *J Gen Virol* 85, 1279-90.
- Lee, S. B. & Esteban, M. (1993). The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase inhibits the replication of vaccinia virus. *Virology* 193, 1037-41.

- Lee, S. B. & Esteban, M. (1994). The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199, 491-6.
- Lefèvre, P. C. (2003). La fièvre catarrhale ovine du mouton. In *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes.*, pp. 667-686. Edited by P. C. Lefèvre, Blancou, J. and Chermette, R.: Eds Tec & doc. Tmoe 1.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
- Li, Y., Yuan, S. & Moyer, R. W. (1998). The non-permissive infection of insect (gypsy moth) LD-652 cells by Vaccinia virus. *Virology* 248, 74-82.
- Lin, C. L., Chung, C. S., Heine, H. G. & Chang, W. (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* 74, 3353-65.
- Liu, X., Kremer, M. & Broyles, S. S. (2004). A natural vaccinia virus promoter with exceptional capacity to direct protein synthesis. *J Virol Methods* 122, 141-5.
- Locker, J. K., Kuehn, A., Schleich, S., Rutter, G., Hohenberg, H., Wepf, R. & Griffiths, G. (2000). Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol Biol Cell* 11, 2497-511.
- Lu, H. T., Yang, D. D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R. J. & Flavell, R. A. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *Embo J* 18, 1845-57.
- Lyons, A. B. & Parish, C. R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171, 131-7.
- Macaulay, C. & McFadden, G. (1989). Tumorigenic poxviruses: characterization of an early promoter from Shope fibroma virus. *Virology* 172, 237-46.
- Macen, J. L., Graham, K. A., Lee, S. F., Schreiber, M., Boshkov, L. K. & McFadden, G. (1996). Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes. *Virology* 218, 232-7.
- Mackett, M., Smith, G. L. & Moss, B. (1982). Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7415-9.
- Mackett, M., Smith, G. L. & Moss, B. (1984). General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 49, 857-64.
- Mallardo, M., Leithe, E., Schleich, S., Roos, N., Doglio, L. & Krijnse Locker, J. (2002). Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. *J Virol* **76**, 5167-83.

- Mandl, S., Sigal, L. J., Rock, K. L. & Andino, R. (1998). Poliovirus vaccine vectors elicit antigen-specific cytotoxic T cells and protect mice against lethal challenge with malignant melanoma cells expressing a model antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8216-21.
- Mansouri, M., Bartee, E., Gouveia, K., Hovey Nerenberg, B. T., Barrett, J., Thomas, L., Thomas, G., McFadden, G. & Fruh, K. (2003). The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J Virol* 77, 1427-40.
- Maran, A., Maitra, R. K., Kumar, A., Dong, B., Xiao, W., Li, G., Williams, B. R., Torrence, P. F. & Silverman, R. H. (1994). Blockage of NF-kappa B signaling by selective ablation of an mRNA target by 2-5A antisense chimeras. *Science* 265, 789-92.
- Marovich, M. A., Mascola, J. R., Eller, M. A., Louder, M. K., Caudrelier, P. A., El-Habib, R., Ratto-Kim, S., Cox, J. H., Currier, J. R., Levine, B. L., June, C. H., Bernstein, W. B., Robb, M. L., Schuler-Thurner, B., Steinman, R. M., Birx, D. L. & Schlesinger-Frankel, S. (2002). Preparation of clinical-grade recombinant canarypox-human immunodeficiency virus vaccine-loaded human dendritic cells. J Infect Dis 186, 1242-52.
- Masters, J., Hinek, A. A., Uddin, S., Platanias, L. C., Zeng, W., McFadden, G. & Fish, E.
  N. (2001). Poxvirus infection rapidly activates tyrosine kinase signal transduction. J Biol Chem 276, 48371-5.
- McCabe, V. J. & Spibey, N. (2005). Potential for broad-spectrum protection against feline calicivirus using an attenuated myxoma virus expressing a chimeric FCV capsid protein. *Vaccine* 23, 5380-8.
- McCabe, V. J., Tarpey, I. & Spibey, N. (2002). Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. *Vaccine* 20, 2454-62.
- Mertens, P. P., Burroughs, J. N. & Anderson, J. (1987). Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology* 157, 375-86.
- Messud-Petit, F., Gelfi, J., Delverdier, M., Amardeilh, M. F., Py, R., Sutter, G. & Bertagnoli, S. (1998). Serp2, an inhibitor of the interleukin-1beta-converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus. *J Virol* 72, 7830-9.
- Moss, B. (1992). Recombinant poxviruses, pp. 45-80. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Moss, B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, pp. 2849-2883. Edited by D. M. K. a. P. M. howley. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Moss, B., Carroll, M. W., Wyatt, L. S., Bennink, J. R., Hirsch, V. M., Goldstein, S., Elkins, W. R., Fuerst, T. R., Lifson, J. D., Piatak, M., Restifo, N. P., Overwijk, W., Chamberlain, R., Rosenberg, S. A. & Sutter, G. (1996). Host range restricted,

non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* **397**, 7-13.

- Mossman, K., Lee, S. F., Barry, M., Boshkov, L. & McFadden, G. (1996a). Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *J Virol* 70, 4394-410.
- Mossman, K., Nation, P., Macen, J., Garbutt, M., Lucas, A. & McFadden, G. (1996b). Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology* **215**, 17-30.
- Mossman, K., Upton, C. & McFadden, G. (1995). The myxoma virus-soluble interferongamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *J Biol Chem* 270, 3031-8.
- Motta, I., Andre, F., Lim, A., Tartaglia, J., Cox, W. I., Zitvogel, L., Angevin, E. & Kourilsky, P. (2001). Cross-presentation by dendritic cells of tumor antigen expressed in apoptotic recombinant canarypox virus-infected dendritic cells. *J Immunol* 167, 1795-802.
- Murphy, F. A., Gibbs, E.P., Horsinek, M.C. & Studdert, M.J. (1999). Veterinary virology. San Diego, California: Academic Press.
- Nathaniel, R., MacNeill, A. L., Wang, Y. X., Turner, P. C. & Moyer, R. W. (2004). Cowpox virus CrmA, Myxoma virus SERP2 and baculovirus P35 are not functionally interchangeable caspase inhibitors in poxvirus infections. *J Gen Virol* **85**, 1267-78.
- Nerenberg, B. T., Taylor, J., Bartee, E., Gouveia, K., Barry, M. & Fruh, K. (2005). The poxviral RING protein p28 is a ubiquitin ligase that targets ubiquitin to viral replication factories. *J Virol* **79**, 597-601.
- Ober, B. T., Bruhl, P., Schmidt, M., Wieser, V., Gritschenberger, W., Coulibaly, S., Savidis-Dacho, H., Gerencer, M. & Falkner, F. G. (2002). Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus lister: comparison with modified vaccinia virus Ankara. J Virol 76, 7713-23.
- Oda, K. I. & Joklik, W. K. (1967). Hybridization and sedimentation studies on "early" and "late" vaccinia messenger RNA. *J Mol Biol* 27, 395-419.
- **Opgenorth, A., Graham, K., Nation, N., Strayer, D. & McFadden, G. (1992).** Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and myxoma growth factor. *J Virol* **66**, 4720-31.
- Panicali, D., Davis, S. W., Mercer, S. R. & Paoletti, E. (1981). Two major DNA variants present in serially propagated stocks of the WR strain of vaccinia virus. *J Virol* 37, 1000-10.

- Parkinson, J. E., Sanderson, C. M. & Smith, G. L. (1995). The vaccinia virus A38L gene product is a 33-kDa integral membrane glycoprotein. *Virology* 214, 177-88.
- Perkus, M. E., Goebel, S. J., Davis, S. W., Johnson, G. P., Norton, E. K. & Paoletti, E. (1991). Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology* 180, 406-10.
- Perrin, A., Albina, E., Breard, E., Sailleau, C., Prome, S., Grillet, C., Kwiatek, O., Russo, P., Thiery, R., Zientara, S. & Cetre-Sossah, C. (2007). Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* 25, 6774-83.
- Petit, F., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Fassy, F., Boucraut-Baralon, C. & Milon, A. (1996). Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Virol* **70**, 5860-6.
- Petryshyn, R., Chen, J. J. & London, I. M. (1984). Growth-related expression of a doublestranded RNA-dependent protein kinase in 3T3 cells. *J Biol Chem* 259, 14736-42.
- Pierce, C. M., Rossitto, P. V. & MacLachlan, N. J. (1995). Homotypic and heterotypic neutralization determinants of bluetongue virus serotype 17. *Virology* 209, 263-7.
- Pignolet, B., Duteyrat, J. L., Allemandou, A., Gelfi, J., Foucras, G. & Bertagnoli, S. (2007). In vitro permissivity of bovine cells for wild-type and vaccinal myxoma virus strains. *Virol J* 4, 94.
- Ploubidou, A., Moreau, V., Ashman, K., Reckmann, I., Gonzalez, C. & Way, M. (2000). Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *Embo J* 19, 3932-44.
- Ramelot, T. A., Cort, J. R., Yee, A. A., Liu, F., Goshe, M. B., Edwards, A. M., Smith, R. D., Arrowsmith, C. H., Dever, T. E. & Kennedy, M. A. (2002). Myxoma virus immunomodulatory protein M156R is a structural mimic of eukaryotic translation initiation factor eIF2alpha. *J Mol Biol* 322, 943-54.
- Reali, E., Canter, D., Zeytin, H., Schlom, J. & Greiner, J. W. (2005). Comparative studies of Avipox-GM-CSF versus recombinant GM-CSF protein as immune adjuvants with different vaccine platforms. *Vaccine* 23, 2909-21.
- **Rebouillat, D. & Hovanessian, A. G. (1999).** The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 295-308.
- Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M. & Bhardwaj, N. (1997). A monocyte conditioned medium is more effective tahn defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* **90**, 3640-3646.
- Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmstrom, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T. & Way, M. (2001). Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol* **3**, 992-1000.

- Rincon, M., Enslen, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M.S., Penix, L.A. & Davis, R.J. (1998). Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J* 17, 2817-2829.
- Rivas, C., Gil, J., Melkova, Z., Esteban, M. & Diaz-Guerra, M. (1998). Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243, 406-14.
- Romano, P. R., Zhang, F., Tan, S. L., Garcia-Barrio, M. T., Katze, M. G., Dever, T. E. & Hinnebusch, A. G. (1998). Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol Cell Biol* 18, 7304-16.
- Rosales, R., Harris, N., Ahn, B. Y. & Moss, B. (1994a). Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit. *J Biol Chem* 269, 14260-7.
- Rosales, R., Sutter, G. & Moss, B. (1994b). A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3794-8.
- Rosel, J. L., Earl, P. L., Weir, J. P. & Moss, B. (1986). Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment. *J Virol* 60, 436-49.
- Rosel, J. L. & Moss, B. (1985). Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b. *J Virol* 56, 830-838.
- Russell, R. J. & Robbins, S.J. (1989). Cloning and molecular characterization of the myxoma virus genome. *virology* 170, 147-159.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778-809, table of contents.
- Sanger, C., Muhlberger, E., Klenk, H. D. & Becker, S. (2001). Adverse effects of MVA-T7 on the transport of Marburg virus glycoprotein. *J Virol Methods* **91**, 29-35.
- Sanz, P. & Moss, B. (1998). A new vaccinia virus intermediate transcription factor. *J Virol* 72, 6880-3.
- Schreiber, M., Sedger, L. & McFadden, G. (1997). Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J Virol* **71**, 2171-81.

- Schwartz-Cornil, I., Epardaud, M., Albert, J. P., Bourgeois, C., Gerard, F., Raoult, I. & Bonneau, M. (2005). Probing leukocyte traffic in lymph from oro-nasal mucosae by cervical catheterization in a sheep model. *J Immunol Methods* 305, 152-61.
- Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A. & McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 21, 377-423.
- Sen, G. C. (2001). Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol 55, 255-81.
- Sen, G. C. & Lengyel, P. (1992). The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. J Biol Chem 267, 5017-20.
- Senkevich, T. G., Koonin, E. V. & Buller, R. M. (1994). A poxvirus protein with a RING zinc finger motif is of crucial importance for virulence. *Virology* 198, 118-28.
- Senkevich, T. G., Ward, B. M. & Moss, B. (2004a). Vaccinia virus A28L gene encodes an essential protein component of the virion membrane with intramolecular disulfide bonds formed by the viral cytoplasmic redox pathway. J Virol 78, 2348-56.
- Senkevich, T. G., Ward, B. M. & Moss, B. (2004b). Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *J Virol* 78, 2357-66.
- Senkevich, T. G., Wolffe, E. J. & Buller, R. M. (1995). Ectromelia virus RING finger protein is localized in virus factories and is required for virus replication in macrophages. *J Virol* 69, 4103-11.
- Sharp, T. V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G. N. & Jagus, R. (1998). The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250, 302-15.
- Sharp, T. V., Witzel, J. E. & Jagus, R. (1997). Homologous regions of the alpha subunit of eukaryotic translational initiation factor 2 (eIF2alpha) and the vaccinia virus K3L gene product interact with the same domain within the dsRNA-activated protein kinase (PKR). *Eur J Biochem* 250, 85-91.
- Shen, X., Wong, S. B., Buck, C. B., Zhang, J. & Siliciano, R. F. (2002). Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes. *J Immunol* 169, 4222-9.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-70.
- Singh, S. M., Yanagawa, H., Hanibuchi, M., Miki, T., Okamura, H. & Sone, S. (2000). Augmentation by interleukin-18 of MHC-nonrestricted killer activity of human peripheral blood mononuclear cells in response to interleukin-12. *Int J Immunopharmacol* 22, 35-43.

- Smith, E. J., Marie, I., Prakash, A., Garcia-Sastre, A. & Levy, D. E. (2001). IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNAdependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. J Biol Chem 276, 8951-7.
- Smith, G. L., Vanderplasschen, A. and Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* 83, 2915-2931.
- Smith, G. L. & Moss, B. (1983). Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Genes Dev* 25, 21-28.
- Sodeik, B., Doms, R. W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C. E., van 't Hof, W., van Meer, G., Moss, B. & Griffiths, G. (1993). Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. J Cell Biol 121, 521-41.
- Sodeik, B. & Krijnse-Locker, J. (2002). Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends Microbiol* 10, 15-24.
- Stanford, M. M., Werden, S. J. & McFadden, G. (2007). Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet Res* 38, 299-318.
- Stott, J. L., Osburn, B. I., Bushnell, R., Loomis, E. C. & Squire, K. R. (1985). Epizootiological study of bluetongue virus infection in California livestock: an overview. *Prog Clin Biol Res* 178, 571-82.
- Su, J., Wang, G., Barrett, J. W., Irvine, T. S., Gao, X. & McFadden, G. (2006). Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. *J Virol* 80, 1140-51.
- Sypula, J., Wang, F., Ma, Y., Bell, J. & MacFadden, G. (2004). Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Therapy and Molecular Biology* 8, 103-114.
- Tan, S. L. & Katze, M. G. (1999). The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? *J Interferon Cytokine Res* 19, 543-54.
- Tewari, M. & Dixit, V.M. (1995). fas and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 270, 3255-3260.
- Thiry, E., Saegerman, C., Guyot, H., Kirten, P., Losson, B.& Rollin, F. (2006). Bluetongue in Northern Europe. *the veterinary record* **159**, 327.
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. Science 281, 1312-6.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 60, 163-78.

- Toussaint, J. F., Sailleau, C., Mast, J., Houdart, P., Czaplicki, G., Demeestere, L., VandenBussche, F., van Dessel, W., Goris, N., Breard, E., Bounaadja, L., Etienne, T., Zientara, S. & De Clercq, K. (2007). Bluetongue in Belgium, 2006. Emerg Infect Dis 13, 614-6.
- Turner, P. C., Sancho, M. C., Thoennes, S. R., Caputo, A., Bleackley, R. C. & Moyer, R. W. (1999). Myxoma virus Serp2 is a weak inhibitor of granzyme B and interleukinlbeta-converting enzyme in vitro and unlike CrmA cannot block apoptosis in cowpox virus-infected cells. *J Virol* 73, 6394-404.
- Ulrich, R., Lundkvist, A., Meisel, H., Koletzki, D., Sjolander, K. B., Gelderblom, H. R., Borisova, G., Schnitzler, P., Darai, G. & Kruger, D. H. (1998). Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine* 16, 272-80.
- Upton, C., DeLange, A. M. & McFadden, G. (1987). Tumorigenic poxviruses: genomic organization and DNA sequence of the telomeric region of the Shope fibroma virus genome. *Virology* 160, 20-30.
- **Upton, C., Schiff, L., Rice, S. A., Dowdeswell, T., Yang, X. & McFadden, G. (1994).** A poxvirus protein with a RING finger motif binds zinc and localizes in virus factories. *J Virol* **68**, 4186-95.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., B., estes, M.K., Lemon, S.M., maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.E. (2000). Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. seventh report of the international comitee on taxonomy of viruses. San Diego, California: Academic Press.
- Vanderplasschen, A., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (1998a). Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J Gen Virol* 79 (Pt 4), 877-87.
- Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R. B. & Smith, G. L. (1998b). Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7544-9.
- Vilagines, P. & Vilagines, R. (1985). les poxviridés: caractères généraux. In *Virologie médicale*, pp. 310-319. Edited by J. Maurin: Flammarion Médecine Sciences.
- Wade-Evans, A. M., Romero, C. H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasagayam, J., Fleming, M. J., Mertens, P. P. & Black, D. N. (1996).
   Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology* 220, 227-31.
- WHO (World health Organization). (1980). The global eradication of smallpox. Final report of the commission for the certification of smallpox eradication. History of international public health, no 4, Geneva: world health organization.

- Wang, F., Ma, Y., Barrett, J. W., Gao, X., Loh, J., Barton, E., Virgin, H. W. & McFadden, G. (2004a). Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol* 5, 1266-74.
- Wang, G., Barrett, J. W., Nazarian, S. H., Everett, H., Gao, X., Bleackley, C., Colwill, K., Moran, M. F. & McFadden, G. (2004b). Myxoma virus M11L prevents apoptosis through constitutive interaction with Bak. J Virol 78, 7097-111.
- Xiang, Y., Latner, D. R., Niles, E. G. & Condit, R. C. (2000). Transcription elongation activity of the vaccinia virus J3 protein in vivo is independent of poly(A) polymerase stimulation. *Virology* **269**, 356-69.
- Xu, X., Nash, P. & McFadden, G. (2000). Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. *Virus Genes* 21, 97-109.
- Yang, Y. L., Reis, L. F., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Schafer, R., Kumar, A., Williams, B. R., Aguet, M. & Weissmann, C. (1995). Deficient signaling in mice devoid of doublestranded RNA-dependent protein kinase. *Embo J* 14, 6095-106.
- Yates, N. L. & Alexander-Miller, M. A. (2007). Vaccinia virus infection of mature dendritic cells results in activation of virus-specific naive CD8+ T cells: a potential mechanism for direct presentation. *Virology* 359, 349-61.
- Young, H. A. (1996). Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16, 563-8.
- Yuen, L., Davison, A. J. & Moss, B. (1987). Early promoter-binding factor from vaccinia virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6069-73.
- Zamanian-Daryoush, M., Mogensen, T. H., DiDonato, J. A. & Williams, B. R. (2000). NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol* 20, 1278-90.
- Zuniga, M. C., Wang, H., Barry, M. & McFadden, G. (1999). Endosomal/lysosomal retention and degradation of major histocompatibility complex class I molecules is induced by myxoma virus. *Virology* 261, 180-92.

# TITRE: Evaluation of Myxoma Virus as a viral vector for ruminants vaccination

## SUMMARY :

Myxoma virus (MYXV) belongs to the *Poxviridae* family. These viruses are attractive tools for replicative or non replicative recombinant vaccines development in different species.

Aiming at developping a vaccine against Bluetongue in ruminants, we first studied bovine and ovine cellular tropism of MYXV. We showed that MYXV can not replicate in ruminant cells attesting of the inocuity of such vaccines. Inoculation of recombinant MYXV in sheep was followed by humoral response against specific antigen.

A vaccination/protection assay against Bluetongue using recombinant MYXV expressing BTV-2 antigens showed no efficient protection against a virulent challenge.

These results promped us to investigate interactions between MYXV and ovine dendritic cells (DC), since these cells are one of the key of immunity. Results showed that Langerhans DC are the main target of MYXV. Infected DC cells become apoptotic at 16 h post-infection. However, the capacity of immune response induction by a cross-presentation mecanism is conceivable.

Moreover, we developped a new strategy of vector design which consists in generating recombinant MYXV expressing a fusion between M022L gene, encoding for a structural protein of the virus membrane, and the transgene. We showed that this virus is dramatically attenuated for rabbits and induces specific humoral and cellular immune responses against the product of the transgene in rabbits and non host animal species.

**KEY-WORDS:** *Myxoma virus*, vaccine, ruminants, Bluetongue, dendritic cells

## **AUTEUR : Béatrice PIGNOLET**

**TITRE : Interactions virus de la myxomatose-cellules hôtes : application à la vaccination chez les ruminants** 

**DIRECTEUR DE THESE :** Dr Maxence DELVERDIER/ Dr Stéphane BERTAGNOLI

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE** : 19 DECEMBRE 2007, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

### **RESUME :**

Les *Poxviridae*, dont fait partie le virus de la myxomatose (MYXV), sont des outils de choix pour la génération de vaccins recombinés réplicatifs ou non réplicatifs chez différentes espèces animales.

Ayant pour but de développer un vaccin contre la Fièvre Catarrhale Ovine, ou Bluetongue (BT), chez les ruminants, nous avons étudié le tropisme cellulaire du vecteur myxomateux chez les bovins et chez les ovins. Les résultats obtenus montrent que le MYXV ne se réplique pas dans les cellules de ruminants et gagent en partie de l'innocuité de tels vaccins. L'inoculation d'ovins par un virus myxomateux recombiné a montré la mise en place d'une réponse humorale contre le produit d'un transgène témoin.

Un essai de vaccination-protection contre le BTV avec des MYXV recombinés exprimant des antigènes du BTV montre que nous n'avons pas de protection efficace.

Ces résultats nous ont conduit à étudier l'interaction entre les cellules dendritiques (DC) ovines, clés de l'immunité, et le MYXV. Parmi les DC, les cellules de Langerhans sont les cibles préférentielles du MYXV. Bien que les DC infectées deviennent apoptotiques après 16h d'infection, la capacité à induire une réponse immunitaire via un mécanisme de cross-présentation est envisageable.

De plus nous avons développé une stratégie originale visant à utiliser la protéine structurale M022L du MYXV comme molécule présentatrice d'antigène pour améliorer ce vecteur. Les virus recombinés sont non pathogènes pour les lapins et capables d'induire une réponse immunitaire aussi bien humorale (inoculation de souris) que cellulaire (inoculation d'ovins) contre le produit du transgène fusionné à M022L chez des espèces non-cibles.

MOTS-CLES: virus myxomateux, vaccin, ruminants, Bluetongue, cellules dendritiques

### **DISCIPLINE :** Microbiologie

**ADRESSE DU LABORATOIRE :** UMR 1225 IHAP INRA/ENVT, 23 chemin des capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 3