

# ANALYSE MOLECULAIRE DE LA SOUCHE ATTENUÉE VACCINALE SG33 DU VIRUS MYXOMATEUX

## A LA RECHERCHE DES GENES PERDUS

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Jean-Luc GUERIN**  
Né le 8 janvier 1973 à Nice (Alpes Maritimes)

---

**Directeur de thèse : Madame le Docteur Frédérique MESSUD-PETIT**

---

**JURY**

**PRESIDENT :**  
**Mme PUEL**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

**ASSESEURS**  
**Mme Frédérique MESSUD-PETIT**  
**M. Stéphane BERTAGNOLI**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par intérim	: M.	<b>G. BONNES</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>R. LAUTIE</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAU</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CAZIEUX André, (sur nombre)** *Pathologie chirurgicale*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GRIESS Daniel**, *Alimentation*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **HAY Magali**, *Zootechne*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
M. **MARENDI Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

***A notre président de thèse***

**Madame le professeur PUEL,**  
Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommage respectueux.

***A notre jury de thèse,***

**Madame le docteur MESSUD-PETIT**  
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie infectieuse

Ainsi que

**Monsieur le Docteur BERTAGNOLI**  
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Virologie – Maladies virales

Qui ont accepté de participer à ce jury

Qu'ils trouvent ici la marque de notre reconnaissance et de notre estime



## REMERCIEMENTS

Aux joyeux virologistes et immunologiste, Frédérique Messud-Petit, Stéphane Bertagnoli, Christelle Camus, Séverine Boullier et Jacqueline Gelfi, un grand merci pour votre soutien et votre indulgence,

Brigitte Peralta, Josyane Loupias, Sylvie Oudanne, Robert Py et Jeanine Costes, pour votre aide au quotidien, et l'ambiance que vous mettez au laboratoire,

A toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie,

A mes collègues de l'Unité Productions Animales-Zootechne-(cyto)génétique-Economie-Ethologie-Pathologie Porcine, etc... et tout particulièrement à son inspirateur, Roland Darré, qui a déterminé mon engagement professionnel,

A mes parents et ma famille, niçoise ou sepxoise, pour votre soutien sans faille,

A mes amis,

*Que vous soyez à Nice, à Sepx, à Paris, en Haute-Loire, dans le Nord,... ou à l'ENVT, votre présence et votre chaleur m'entourent.*

A mes étudiants en thèse : à vous maintenant !

*Aux lapins qui ont apporté avec enthousiasme leur concours à ce travail*



**SOMMAIRE**

	<b>PAGE</b>
Table des illustrations	3
AVANT-PROPOS	5
1 <sup>ERE</sup> PARTIE : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. CARACTERES GENERAUX DES POXVIRUS	8
1.1. Classification	8
1.2. Structure des poxvirus	11
1.3. Le cycle viral	16
1.4. Les effets de l'infection sur le métabolisme de la cellule hôte	22
1.5. La régulation du spectre d'hôte	22
II. LE POUVOIR PATHOGENE DES POXVIRUS : L'EXEMPLE DE LA MYXOMATOSE	24
2.1. La myxomatose du lapin européen : généralités	24
2.2. Signes cliniques	24
2.3. Histopathologie	27
2.4. Une tentative d'éclaircissement de la pathogénie	29
2.5. Epidémiologie	29
2.6. La réponse immunitaire post-infectieuse	31
2.7. Prophylaxie médicale et sanitaire	32
III. LES FACTEURS DE PATHOGENICITE CODES PAR LES POXVIRUS	34
3.1. Les potentialisateurs de la multiplication virale	34
3.2. Les modulateurs de la réponse inflammatoire	36
3.3. L'inhibition de l'activation du complément	37
3.4. La synthèse de leurres de cytokines et chémokines	38

3.3. La régulation de l'apoptose	42
3.6. La diminution de l'expression de protéines membranaires	46
3.7. L'inventaire n'est pas –encore- terminé...	46
2 <sup>EME</sup> PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	49
INTRODUCTION	50
I- MATERIEL ET METHODES	51
II- RESULTATS	60
1. Cartographie de la zone de délétion sur la souche SG33	60
1.1. Profils de restriction	60
1.2. Hybridation en Southern-blot	60
1.3. Premier bilan de l'étude cartographique	62
2. Sous-clonage de la région délétée	64
3. Analyse des séquences	66
3.1. Mise en évidence de cadre de lecture ouverts	66
3.2. Analyse informatique des ORF	66
4. Etude des protéines à motifs ankyrine ( <i>Myxoma Host Range</i> )	68
5. Etude de Serp3	70
5.1. Analyse de la séquence et modélisation de Serp3	70
5.2. Analyse de l'expression dans la cellule infectée	77
6. Etude de MV-LAP	78
6.1. Analyse de la séquence de MV-LAP	78
6.2. Expression de MV-LAP : localisation dans la cellule cible	84
6.3. Expression des molécules du CMH 1 à la surface des cellules transfectées	86
III- DISCUSSION GENERALE	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	94

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

	PAGE
Figure 1. Représentation schématique de la structure des poxvirus	12
Figure 2. Virus myxomateux en microscopie électronique	12
Figure 3. Organisation générale du génome des poxvirus	15
Figure 4. Cycle répliatif des poxvirus (Moss, 1996)	17
Figure 5. Stades de la maturation des virions	21
Figure 6. Formes cliniques classiques de myxomatose	25
Figure 7. Forme amyxomateuse (« respiratoire ») de myxomatose	25
Figure 8. Histopathologie des lésions myxomateuses	29
Figure 9. Cycle épidémiologique de la myxomatose (Arthur et Louzis, 1988)	30
Figure 10. Les facteurs de pathogénicité du VM	35
Figure 11. Les voies d'induction de l'apoptose	45
Figure 12. Profils de restriction <i>Hind</i> III des souches T1 et SG33	61
Figure 13. Profils <i>Pvu</i> II des souches T1 et SG33 en électrophorèse classique	61
Figure 14. Carte des restriction du génome du VM (Russel et Robbins, 1989)	61
Figure 15. Profils <i>Eco</i> RI des souches T1 et SG33	63
Figure 16. Hybridation de la sonde J- <i>Eco</i> RI sur les profils <i>Hind</i> III et <i>Eco</i> RI	63
Figure 17. Hybridation de la sonde T2 sur des profils <i>Pvu</i> II de T1 et SG33	65
Figure 18. Stratégie de sous-clonage de la zone délétée sur le SG33	65
Figure 19. Représentation schématique des gènes codés en amont de la RIT droite	68
Figure 20. Nomenclature des résidus constituant le site actif d'une serpine et de sa protéase substrat	71
Figure 21. Alignement de la région C-terminale de Serp3 et plusieurs serpinines cellulaires ou virales	71
Figure 22. Topographie et changement de conformation d'une serpine	73
Figure 23. Modélisation de Serp3	76
Figure 24. Architecture des facteurs LAP codés par les poxvirus et les $\gamma$ -herpesvirus	78

Figure 25. Alignements des motifs C4HC3 et architecture des facteurs LAP viraux	79
Figure 26. Structure des principales classes de motifs en doigts de zinc.	81
Figure 27. Localisation intracellulaire de MV-LAP	85
Figure 28. Dérégulation de l'expression de surface des molécules de classe I du CMH et de FAS-CD95	87
Tableau 1. Classification des <i>Chordopoxvirinae</i>	9
Tableau 2. Les membres du genre <i>Leporipoxvirus</i> et leur spectre d'hôte	10
Tableau 3. Critères de définition des grades de virulence du VM	26
Tableau 4. Les serpines caractérisées chez les poxvirus	74

## AVANT-PROPOS

Il serait difficile d'introduire un travail sur la myxomatose sans s'attarder un peu sur l'histoire de cette maladie, faite de rencontres plus ou moins heureuses entre un animal et un virus. Le virus myxomateux (VM) circule certainement depuis des temps reculés dans les populations de lapins américains du genre *Sylvilagus*. L'introduction du lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) en Amérique du sud a révélé à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle l'existence de ce virus. Dès lors, au delà de la curiosité scientifique portée au virus myxomateux, on a rapidement vu en lui un moyen d'éradiquer le lapin en tant que nuisible ou une menace pour le lapin en tant qu'animal d'élevage ou gibier.

Quelques années après la découverte du virus myxomateux par Sanarelli en 1898, Aragão informe les autorités australiennes de la possibilité d'utiliser le VM comme une arme biologique contre un animal qui commence alors à pulluler dangereusement en Australie. Les premières expériences d'infections volontaires de lapins en Australie s'avèrent infructueuses et il faudra attendre 1951 pour que des résultats spectaculaires soient atteints. Les échos de ces succès arrivent rapidement jusqu'en Europe. Le Docteur Armand Delille, médecin dans la région parisienne, prend l'initiative de faire venir du virus myxomateux de la collection de Lausanne pour se débarrasser des lapins qui infestent sa propriété. Les résultats vont largement dépasser ses espérances, puisque quelques semaines après cette expérimentation hasardeuse, la maladie diffuse dans toute la France, puis dans l'Europe entière. L'impact est considérable à l'époque, notamment en France, où la production et la chasse du lapin sont très développées.

Depuis cette époque, la myxomatose, considérée « maladie légalement réputée contagieuse » jusqu'en 1995, continue de sévir et constitue une menace sur les élevages et dépeuple régulièrement les garennes. Les efforts de recherche vont s'organiser pour faire face à l'arrivée soudaine de cette maladie exotique. Si des vaccins hétérologue ou homologue sont rapidement proposés, il apparaît bien vite que le contrôle à long terme de cette maladie suppose un travail de fond sur le virus. Le laboratoire de maladies contagieuses de l'ENV Toulouse va ainsi s'engager dans

ce travail...dont nous sommes maintenant les héritiers au sein de l'UMR INRA 960 de Microbiologie Moléculaire. Le travail sur le modèle porte désormais sur la mise au point de nouveaux vaccins, l'étude des facteurs de pathogénicité, et plus récemment des modalités d'entrée et du spectre d'hôte du virus. Sur le plan international, la recherche sur le virus myxomateux implique, outre le laboratoire de Toulouse, le groupe de Grant McFadden (Université d'Ontario, Canada), qui a joué un rôle majeur dans l'étude de cette maladie en tant que modèle d'interactions hôte-virus, et des chercheurs australiens du CSIRO (*Center for Scientific and Industrial Research for Australia*), qui prennent le parti du virus contre le lapin et font exprimer au virus myxomateux l'hémagglutinine du virus Influenza pour en augmenter la virulence (Kerr et Jackson, 1995), ou des protéines de la zone pellucide de la lapine à des fins de contraception (Robinson *et al.*, 1997), etc...on perçoit là l'ambiguïté du statut du lapin, à la fois gibier, nuisible, élevé pour sa viande, sa fourrure ou son poil, animal de laboratoire et animal de compagnie !

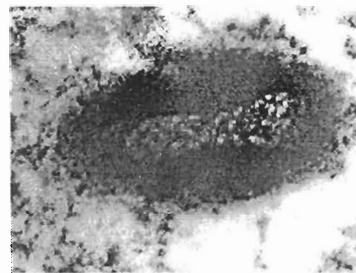
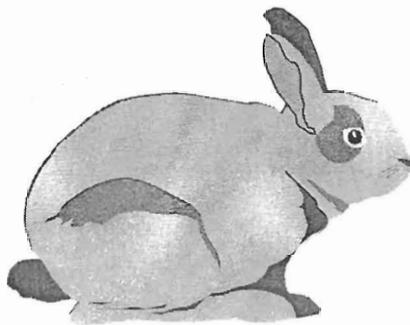
L'analyse fine des facteurs de pathogénicité codés par les poxvirus est un passage obligé pour mieux appréhender la complexité de l'arsenal auquel l'hôte infecté est confronté. Cette étape est incontournable afin de sécuriser l'usage des poxvirus en tant que vecteurs de gènes étrangers, notamment à des fins vaccinales. Au delà du champ de la virologie, l'attention portée aux poxvirus est riche d'enseignements pour approcher certains mécanismes cellulaires : beaucoup de facteurs codés par les grands virus à ADN, poxvirus et herpesvirus, sont en fait des homologues de gènes cellulaires, vraisemblablement « capturés » au fil de millénaires de co-évolution. La poxvirologie permettra peut-être de faire des avancées en biologie cellulaire.

Après avoir présenté une introduction bibliographique consacrée aux poxvirus et à leurs interactions avec leurs hôtes, au travers de l'exemple du virus myxomateux, nous présenterons successivement la cartographie de la délétion observée sur le virus SG33, l'identification des gènes localisés dans cette région et la caractérisation particulière de deux d'entre eux, codant pour des facteurs de pathogénicité, Serp3 et MV-LAP. Une discussion générale proposera une synthèse des résultats et les mettra en perspective.

## **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

**Un modèle d'interactions hôte-poxvirus :**

*la myxomatose*



Nous présentons ici une synthèse consacrée aux interactions entre les poxvirus et leur(s) hôte(s). Nous aborderons successivement les caractères généraux des poxvirus, leur capacité à contourner et, souvent, anéantir la réponse de l'hôte. Au cours de cette introduction, nous focaliserons notre attention sur les relations entre le virus myxomateux (VM) et son hôte « illégitime », le lapin européen *Oryctolagus cuniculus*, relations qui se traduisent cliniquement par la myxomatose.

## **I- Caractères généraux des *Poxviridae***

### **1.1 Classification**

La classification des poxvirus a considérablement évolué avec le temps : elle a d'abord été fondée sur les tableaux anatomo-cliniques associés à chacun d'entre eux, quitte à associer le virus variolique et l'agent de la varicelle ! Les virus ont ensuite été regroupés d'après leur morphologie et leurs propriétés physico-chimiques, leurs croisements sérologiques, et enfin leurs relations nucléotidiques. De fait, la subdivision actuelle en genres repose sur des protections croisées chez l'animal, des neutralisations croisées en culture cellulaire, puis des hybridations croisées de leur génomes. Par ailleurs, tous les poxvirus partagent la nucléoprotéine ou antigène NP, spécifique de ce groupe, préparé par traitement à 56°C en NaOH 0.04M de suspensions virales (Woodroffe et Fenner, 1962). Caractéristique aussi, la capacité de réactiver n'importe quel membre de ce groupe, après inactivation par la chaleur ; on parle alors de « réactivation non-génétique » (Fenner et Woodroffe, 1960).

Actuellement, les *Poxviridae* sont classés en deux sous-familles infectant pour l'une les Vertébrés (*Chordopoxvirinae*) et pour l'autre les Invertébrés (*Entomopoxvirinae*). Les *Chordopoxvirinae* sont eux-mêmes subdivisés en 8 genres (Tableau 1) (van Regenmortel *et al.*, 2000). Le virus prototype de la famille est le virus de la vaccine (VV), chef de file des *Orthopoxvirus*. Il a été longtemps utilisé pour la vaccination contre la variole, causée par un autre poxvirus, jusqu'à l'éradication de cette maladie en 1980 (Fenner *et al.*, 1988; Fenner, 1992; Kempe, 1960).

Genre	Espèce type	Principales autres espèces
Orthopoxvirus	Virus de la vaccine	mousepox (ectromélie) cowpox - v. de la variole du buffle virus de la variole du chameau v. de la variole du singe - rabbitpox virus de la variole humaine
Parapoxvirus	Orf virus	virus de l'ecthyma contagieux virus de la stomatite papuleuse pseudocowpox
Avipoxvirus	Virus de la variole aviaire (fowlpox)	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
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 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 de la tumeur Yaba du singe

Tableau 1. Classification des *Chordopoxvirinae*

Le virus myxomateux appartient au genre *Leporipoxvirus*, comme le virus du fibrome de Shope, agent d'une hyperplasie fibromateuse chez le lapin américain du genre *Sylvilagus* (Shope, 1932). Ce dernier virus est d'ailleurs utilisé pour la vaccination hétérologue contre la myxomatose (Shope, 1938). Les virus du fibrome du lièvre (*Hare fibroma virus*) et de l'écureuil (*Squirrel fibroma virus*) sont nettement moins bien étudiés et ne seront plus évoqués dans cette synthèse. L'ensemble des membres du genre *Leporipoxvirus* et leurs hôtes respectifs sont rassemblés dans le tableau 2.

En 1983, un virus « émergent » est apparu dans une animalerie de lapins à San Diego (Etats Unis), à l'occasion d'une épizootie ressemblant en tous points à la myxomatose : un nouveau virus, recombinant entre le virus myxomateux et le virus du fibrome de Shope, était à l'origine de ce syndrome (Strayer *et al.*, 1983). Ce virus, baptisé MRV (pour Malignant Rabbit Virus), reste un modèle intéressant, notamment pour l'étude de la tumorigénèse viro-induite (Block *et al.*, 1985 ; Upton et McFadden, 1986). Il n'a -heureusement- jamais été décrit en dehors du laboratoire et n'est donc pas véritablement considéré comme une entité pathologique à part entière, mais comme un avatar de la recherche virologique...

Virus	Pathologie chez l'hôte naturel	Pathologie chez le lapin européen
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 sf lapereau nouveau-né
Virus du Fibrome malin du lapin	<i>Oryctolagus cuniculus</i> : idem myxomatose	
Virus du Fibrome de l'écureuil	<i>Sciurus</i> sp: fibromes multiples	Nodules dermiques
Virus du Fibrome du Lièvre	<i>Lepus</i> sp: lésions cutanées localisées	Fibrome bénin localisé

Tableau 2. Les membres du genre *Leporipoxvirus* et leur spectre d'hôte (Woodroffe et Fenner, 1965).

## **1.2. Structure des poxvirus**

Les poxvirus sont parmi les plus gros virus animaux connus : ils sont de forme parallélépipédique ovale, de 300 à 400 nm de long ( Regenmortel *et al.*, 2000). Le virus myxomateux mesure 290 x 230 x 75 nm. Plus d'une centaine de polypeptides entrent dans la composition du virion, constitué de plusieurs structures : le core, la membrane et l'enveloppe (figures 1 et 2) (Vilagines et Vilagines, 1985). Très classiquement, on distinguait au sein du virion des « corps latéraux », se logeant dans les concavités du core (Vilagines et Vilagines, 1985, Moss, 1992). En fait, il semble désormais admis que ces « corps latéraux » sont des artefacts de microscopie électronique et ne correspondent pas à une structure virale en tant que telle (van Regenmortel *et al.*, 2000).

**La membrane** est constituée de phospholipides et de protéines dont certaines sont la cible d'anticorps produits au cours de l'infection virale. Sa composition est différente de celle de la cellule hôte ; elle contient au moins 12 polypeptides dont 6 sont exposés à la surface externe.

On prend chaque jour davantage conscience de la complexité de la structure membranaire des poxvirus. Là encore, c'est le virus de la vaccine qui a fait l'objet des travaux précurseurs.

Il est maintenant établi que le virus de la vaccine se retrouve sous deux formes infectieuses distinctes : les virions intracellulaires matures (IMV) et les virions extracellulaires enveloppés (EEV) (Smith, 1993). Les formes IMV représentent la très grande majorité de la progénie virale et restent séquestrées dans le cytoplasme jusqu'à la lyse de la cellule hôte. Une petite fraction des IMV va acquérir une double membrane supplémentaire dérivée du Golgi (Schmelz *et al.*, 1994), ou des endosomes (Tooze *et al.*, 1993), pour aboutir à des formes dites IEV (*Intracellular Envelopped Virus*). Ces IEV peuvent migrer vers la surface de la cellule, propulsées par des filaments d'actine polymérisée (Cudmore *et al.*, 1995). Lorsque les IEV fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule hôte, les EEV sont relarguées.

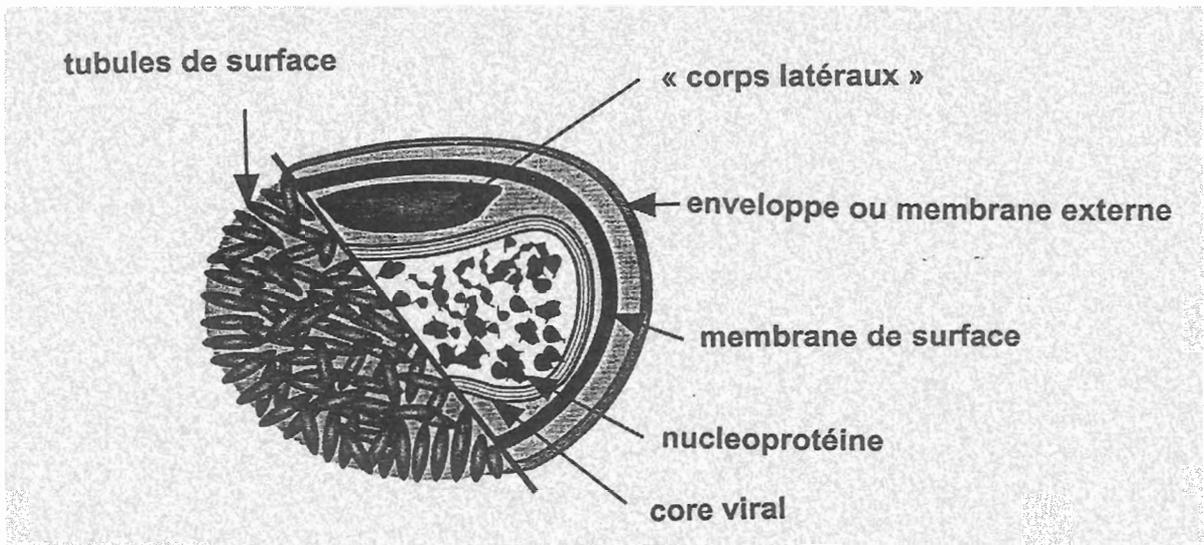
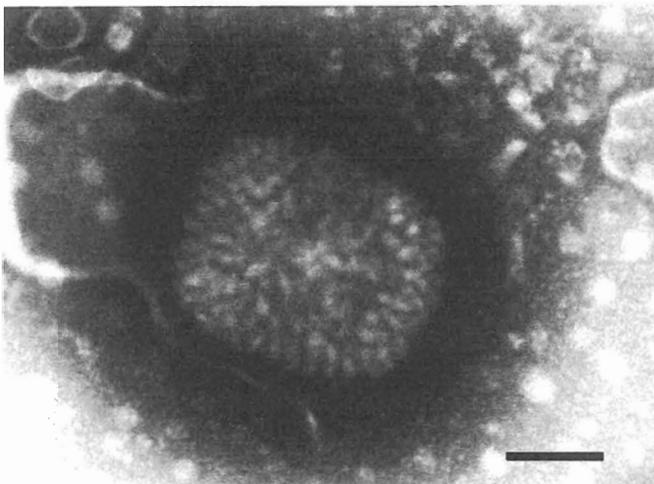
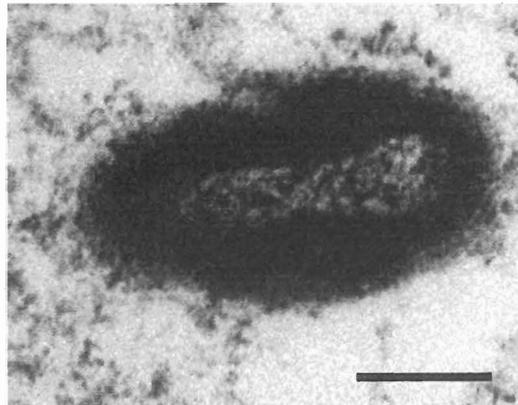


Figure 1. Représentation schématique d'un orthopoxvirus (van Regenmortel, 2000)

2A. Coupe de virus myxomateux intracellulaire en microscopie électronique. (échelle : 100 nm)



2B. Virion myxomateux purifié sur gradient de saccharose et coloré à l'acide phosphotungstique (échelle : 100 nm)

Figure 2. Virus myxomateux en microscopie électronique (Clichés : C. Boucraut-Baralon, avec sa permission).

Ces formes EEV, ultra-minoritaires au sein de la progénie virale ( $\pm 1\%$ ), sont donc structurellement caractérisées par l'existence d'une enveloppe supplémentaire, qui leur confère des propriétés singulières, en terme de reconnaissance des cellules cibles et de protection contre les effecteurs du système immunitaire. Les EEV constitueraient donc des formes de dissémination du virus, *in vitro* comme *in vivo*. Chez le virus de la vaccine, les EEV ont au moins 10 protéines spécifiques associées à la membrane externe ; 6 gènes codant pour des protéines propres aux EEV ont été identifiés (Smith et Vanderplasschen, 1998). Les formes EEV tirent leurs propriétés de leur membrane externe, qui est pourtant extrêmement fragile ; ceci pose d'importants problèmes méthodologiques de purification, la rupture de la membrane externe transformant les EEV en « IMV-like ». Les EEV sont résistantes à la neutralisation médiée par les anticorps (Ichihashi, 1996) et à la lyse par le complément. Cette dernière propriété semble liée à l'enchâssement dans l'enveloppe externe de molécules régulatrices de l'activation du complément (RCA), dérivée de la membrane de cellules de l'hôte (Vanderplasschen *et al.*, 1998). Il semblerait que cette distinction entre formes virales soit également valable pour le VM (Bertagnoli et Gelfi, données non publiées), même si le travail sur cet aspect de la biologie du virus myxomateux en est encore à ses balbutiements. Plusieurs gènes du virus de la vaccine codant pour des protéines spécifiques aux EEV ont des homologues sur le génome du VM (Cameron *et al.*, 1999). La similitude de fonctions de ces protéines reste cependant à démontrer.

**Le core** abrite le **génomme viral**, constitué d'une molécule unique d'ADN linéaire double-brin, riche en A-T (60 à 70%), dont les extrémités sont constituées de boucles covalentes en épingles à cheveux (van Regenmortel, 2000). La taille de l'ADN varie de 130 à 375 Kbpp dans l'ensemble de la famille (Moss, 1996; van Regenmortel *et al.*, 2000). Elle est de 162 kbp pour le virus myxomateux (Cameron *et al.*, 1999). La structure du génome du virus myxomateux a d'abord été appréciée par Russell et Robbins, au travers d'une étude des profils de restriction de 3 souches virales (Russell et Robbins, 1989). Un séquençage fragmentaire de certaines zones d'intérêt du génome a fait place à un séquençage complet de la souche Lausanne du virus myxomateux (Cameron *et al.*, 1999), en même temps que celui du virus du fibrome de Shope (Willer *et al.*, 1999). La séquence complète des autres poxvirus

majeurs est également disponible : le virus de la vaccine (Goebel *et al.*, 1990; Antoine *et al.*, 1998), le virus de la variole (Massung *et al.*, 1994), le *Molluscum contagiosum* (Senkevich *et al.*, 1997), le *Melanoplus sanguinipes* Entomopoxvirus (Alfonso *et al.*, 1999), le fowlpox (Afonso *et al.*, 2000) et tout récemment le *Yaba-like disease virus* (Lee *et al.*, 2001) ont successivement livré toute leur information génétique. Les séquences complètes du swinepox et du *Lumpy skin disease virus* (Tulman *et al.*, 2001) sont également sur le point d'être publiées.

L'organisation générale du génome est commune à tous les poxvirus : on distingue une région centrale très conservée au sein d'un genre où l'on retrouve les gènes essentiels pour le cycle viral, et des régions terminales répétées inversées (RIT) de 10 à 15 kbp, codant essentiellement pour des facteurs de pathogénicité (Moss, 1996) (figure 3).

La rareté des séquences non-codantes (excepté pour les régions proches des extrémités), associée à l'absence d'introns, à l'existence de nombreuses ORF de petite taille et de séquences promotrices courtes, contribue à l'intégration d'environ 150 à 200 gènes dans le génome des poxvirus.

L'existence de gènes non-essentiels près des extrémités du génome et la capacité à intégrer jusqu'à 25 kbp d'ADN étranger font par ailleurs des poxvirus d'excellents vecteurs viraux (Smith et Moss, 1983 ; Messud-Petit et Bertagnoli, 2001).

En analysant la séquence du virus myxomateux, on dénombre 159 cadres de lecture ouverts, dont 12 sont présents en double copie dans les répétitions inversées terminales (RIT). 120 kbp correspondent aux gènes structuraux largement conservés parmi les poxvirus, alors que 40 kbp (15 à gauche et 25 à droite) codent pour des gènes non-essentiels et, souvent, plus spécifiques des *Leporipoxvirus*. Les RIT du virus myxomateux se distinguent de celles des autres poxvirus par l'absence de séquences non-codantes entre les cadres de lecture (Cameron *et al.*, 1999).

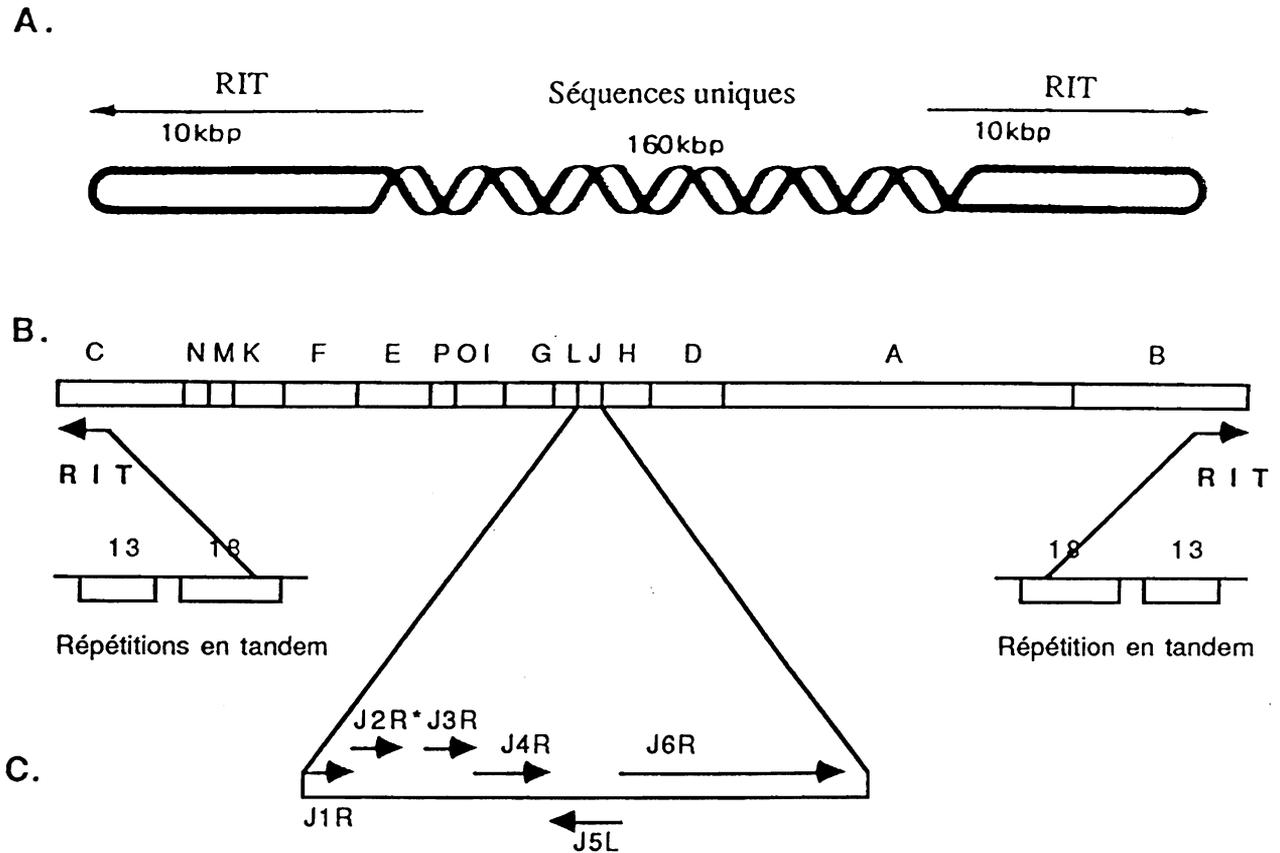


Figure 3. Organisation du génome des *Poxviridae*.

- A. Représentation schématique du génome viral ( modèle : virus de la vaccine).
- B. Carte *Hind*III du génome du virus de la vaccine(Souche Copenhagen).
- C. Exemple de nomenclature des gènes (exemple : fragment J-*Hind*III).

### 1.3. Le cycle viral

Le cycle de réplication a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte et sa durée est variable (12 à 24 h pour le virus de la Vaccine). On peut distinguer six phases au cours de ce cycle (figure 4) : l'entrée du virus dans la cellule et son déshabillage, l'expression des gènes précoces, la réplication, l'expression des gènes intermédiaires puis tardifs et enfin l'assemblage et le relargage des virions néoformés (Moss, 1996).

#### L'entrée du virus dans la cellule

Deux mécanismes d'entrée semblent impliqués : l'endocytose (Dales et Kajjoka, 1964) et la fusion membranaire (Chang et Metz, 1976). Ces deux mécanismes complexes ne sont pas mutuellement exclusifs. Les mécanismes d'interaction entre les formes virales et les cellules cibles sont évidemment très dépendants des formes virales concernées (Cf. § 1.2.) (Ichihashi, 1996) : schématiquement, les formes IMV pénétreraient par des mécanismes d'endocytose impliquant des récepteurs ubiquitaires qui n'ont pas été complètement caractérisés à ce jour, alors que la pénétration des EEV se ferait *via* des interactions avec des récepteurs cellulaires plus spécifiques non identifiés (Vanderplasschen *et al.*, 1998). La recherche des récepteurs des poxvirus fait l'objet de multiples travaux. Il est vraisemblable que des interactions peu spécifiques, *via* des heparane sulfates notamment, interviennent dans les contacts précoces entre le virus et la cellule cible. Ainsi, il a été montré que la protéine A27L du virus de la vaccine est le support d'une interaction avec les glycosaminoglycanes et en particulier les heparane sulfates (Chung *et al.*, 1998). La protéine D8L a un rôle similaire vis à vis des chondroïtine sulfates (Hsiao *et al.*, 1999). Ce type de liaison est également décrit chez le virus cowpox, le virus rabbitpox, le virus du fibrome de Shope et le virus myxomateux (Chung *et al.*, 1998). L'utilisation des récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4 par le virus myxomateux a été récemment évoquée (Lalani *et al.*, 1999), mais ce parallèle séduisant entre le VM et le VIH reste à vérifier...il est vraisemblable que l'entrée des poxvirus dans la cellule cible fait intervenir plusieurs mécanismes complexes, dont l'importance relative dépend du type cellulaire concerné.

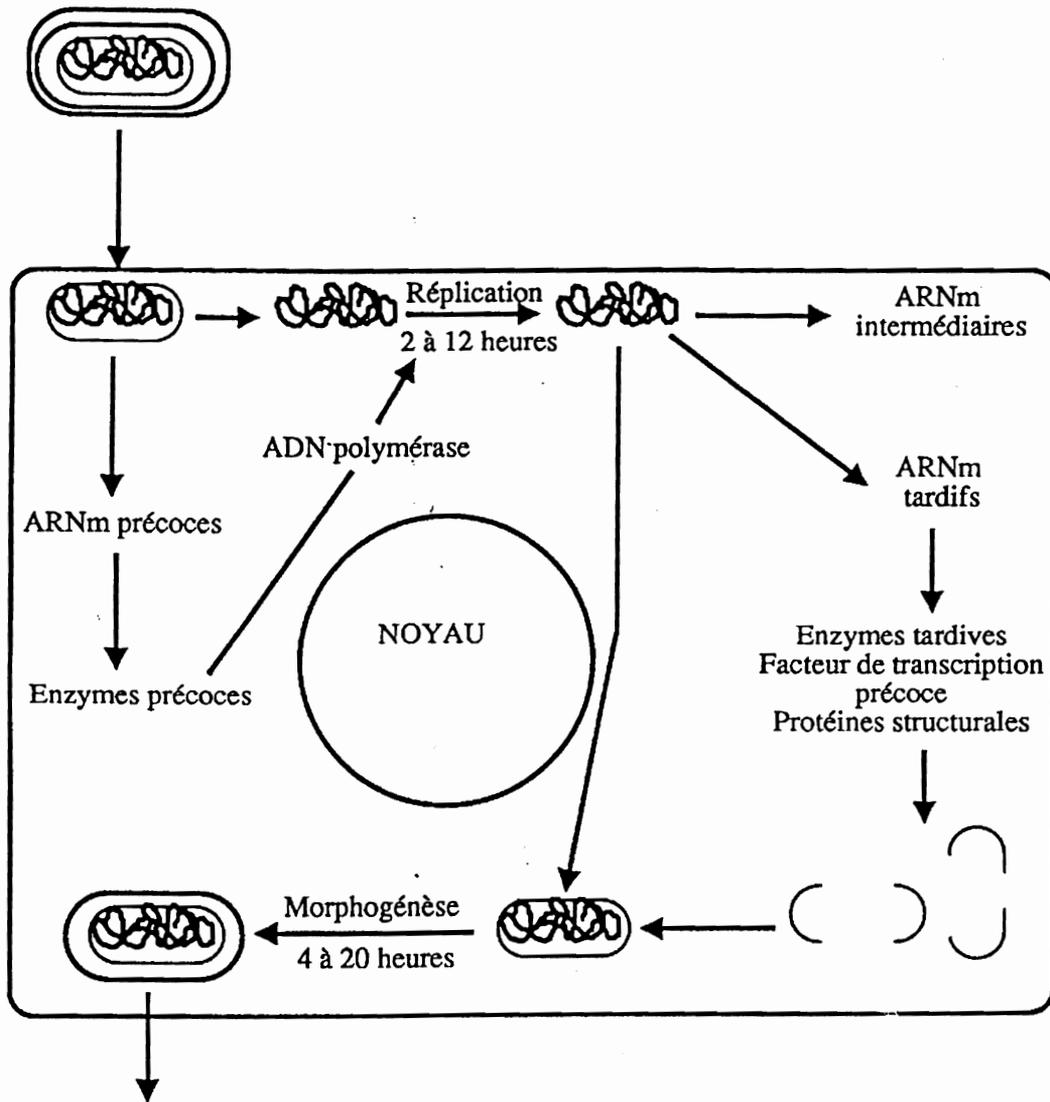


Figure 4. Cycle répliatif des poxvirus (modèle : virus de la vaccine). D'après Moss, 1996.

Lorsqu'il est entré dans la cellule, le virus perd ses enveloppes en deux temps :

- perte des phospholipides et d'une partie des protéines du virus: le génome est toujours protégé des nucléases par le *core*.
- désintégration du *core*, l'ADN devenant alors accessible aux DNases.

### **L'expression des gènes viraux et sa régulation**

Les *Poxviridae* sont, avec le virus de la peste porcine africaine, les seuls virus animaux à ADN connus qui synthétisent leur ARNm dans le cytoplasme de la cellule infectée. Cette propriété implique une capacité à coder pour leurs propres enzymes et facteurs de transcription ainsi que la présence d'un système complet de transcription des gènes précoces. Il existe donc une activation séquentielle de gènes précoces (ou préréplicatifs), intermédiaires et tardifs.

#### *Expression des gènes précoces*

Presque immédiatement après l'entrée du virus dans la cellule, l'activation de la machinerie transcriptionnelle permet la synthèse d'ARNm viraux précoces, coiffés et polyadénylés, représentant environ 50 % du génome (Buller et Palumbo, 1991). La synthèse des premiers transcrits se fait au sein du *core*, à l'aide d'enzymes virales, présentes dans le virion. Les transcrits sont extraits du *core* et traduits *via* les ribosomes cellulaires .

Les promoteurs précoces ont une taille de 30 pb environ et contiennent une région essentielle de 15 pb riche en A (séquence consensus: 5'-AAAAAATGAAAAA/TA-3'): une substitution d'un seul nucléotide dans cette séquence a un effet majeur sur l'expression du gène (Moss, 1994). Les séquences régulatrices semblent conservées, puisque des promoteurs d'*Avipoxvirus* peuvent fonctionner chez le virus de la vaccine et vice versa. Ceci est également valable pour les *Leporipoxvirus* (Jackson et Bults, 1992). La transcription s'initie en général 15 à 30 bases en aval du promoteur (Cameron *et al.*, 1999).

Un mécanisme de terminaison permet la formation des extrémités 3' des ARNm précoces. Le signal de terminaison est représenté par la séquence TTTTNT (Yuen et Moss, 1987). Cette séquence a été retrouvée à la fin de certains gènes

d'*Avipoxvirus*, de *Capripoxvirus* et de *Leporipoxvirus*, ce qui suggère un emploi général chez les poxvirus.

Les enzymes impliquées dans cette phase sont une ARN polymérase, un facteur de transcription précoce, une polyA polymérase, ainsi que des enzymes de coiffe et de méthylation. Parmi les gènes exprimés précocement, on trouve ceux codant pour les facteurs de transcription des gènes intermédiaires.

#### *Expression des gènes intermédiaires et tardifs*

Les ARNm intermédiaires et tardifs sont en général plus longs que les ARNm précoces et possèdent une séquence leader polyA en 5' d'environ 30 nucléotides non codés par le génome (Baldick et Moss, 1993). Les promoteurs intermédiaires contiennent une séquence consensus TAA<sub>3-6</sub>T semblable à celle des promoteurs tardifs, mais cette séquence est précédée d'un motif AAANAA environ 12 à 15 nucléotides en amont du TAAA (Cameron *et al.*, 1999 ; Hirshman *et al.*, 1990).

Quant aux promoteurs tardifs, ils sont caractérisés par une séquence amont d'environ 20 pb riche en AT, séparée par 6 pb d'un bloc TAAATG/A où la transcription s'initie (Davison et Moss, 1989 ; Rosel *et al.* 1986). Une régulation en cascade permet donc d'assurer d'abord la transcription des gènes précoces présents dans le core du virion, puis, après la transcription des gènes intermédiaires et la réplication du génome, a lieu l'expression des gènes tardifs qui permet la synthèse des protéines structurales du virion. Il est à noter que la RNA polymérase permet la transcription de toutes les catégories d'ARNm.

#### *Réplication du génome*

Après la pénétration du virus dans la cellule, le déshabillage effectué en deux étapes, et l'expression des gènes précoces, le génome du virus se réplique de façon autonome dans le cytoplasme de la cellule infectée. La grande majorité des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN viral et à l'expression des gènes est codée par le génome viral (Beaud, 1995). À un stade précoce du cycle, la boucle présente dans chaque télomère de l'ADN viral est rompue, vraisemblablement par une endonucléase spécifique qui est peut-être l'enzyme de " coupure-fermeture " présente dans le core viral. On définit le télomère poxviral, par analogie avec les chromosomes eucaryotes, comme des séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités de la molécule linéaire de l'ADN viral. La réplication de l'ADN débute

alors, et ceci en des sites précis du cytoplasme nommés virosomes. Elle est, selon toute évidence, initiée et terminée dans les télomères (Delange et McFadden, 1990). Néanmoins, il ne semble pas exister d'origine de réplication spécifique (Delange et McFadden, 1986). 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. Cette structure palindromique du télomère viral traduit la jonction d'unités génomiques linéaires, formant ainsi des concatémères de haut poids moléculaire, considérés comme des intermédiaires de réplication. Différents modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer la formation de ces concatémères. Les concatémères sont ensuite transformés en molécules d'ADN matures qui seront incorporées dans les particules virales, en fin de processus infectieux.

### **L'assemblage et la maturation des virions**

Des sites cellulaires où les membranes virales se forment ont été identifiés par microscopie électronique. Ces structures, appelées virosomes, apparaissent 4 à 5 heures post-infection : on note une accumulation des membranes virales lipidiques, formées par modification des membranes du compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Sodeik *et al.*, 1993). Puis les particules s'entourent d'une enveloppe supplémentaire dérivée du Golgi, migrent vers la surface et sont relarguées par fusion avec la membrane plasmique. Ces mouvements vers la surface font appel à une polymérisation de filaments d'actine et de tubuline, constituant chez les orthopoxvirus des « comètes » dont l'observation est tout à fait spectaculaires (Smith et Vanderplasschen, 1998). La figure 5 résume les différentes phases de la maturation des virions (Buller et Palumbo, 1991).

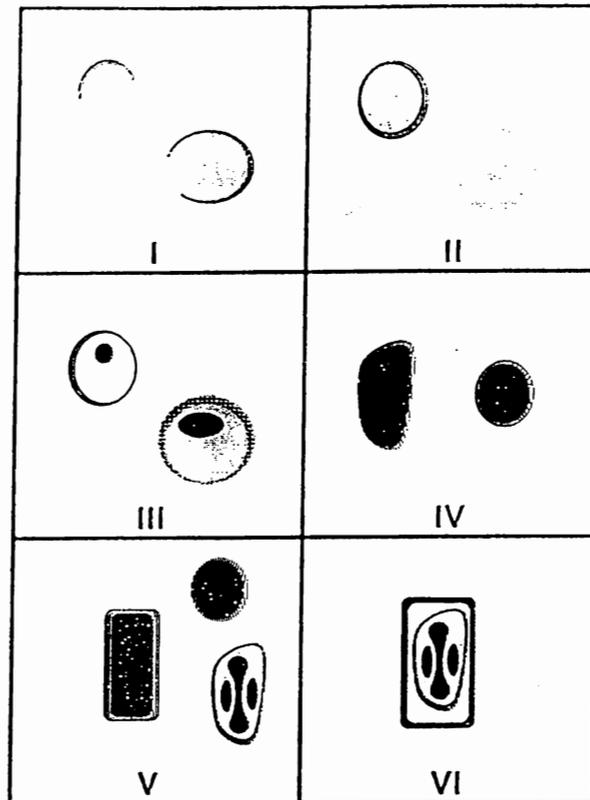


Figure 5. Stades de maturation des virions (Buller et Palumbo, 1991).

I : croissant membranaire

II : particule immature close

III : particule immature close contenant un nucleoïde

IV : formation précoce du core dans la membrane

V : virion mature (forme IMV)

VI : virion mature enveloppé (forme EEV).

#### **1.4 Les effets de l'infection sur le métabolisme de la cellule hôte**

L'infection s'accompagne de nombreux effets sur le fonctionnement cellulaire :

##### *Synthèse d'ADN :*

Une endonucléase virale pourrait hydrolyser l'ADN néosynthétisé par l'hôte. De fait, la synthèse d'ADN nucléaire est inhibée quelques heures post-infection (Buller et Palumbo, 1991).

##### *Synthèse d'ARN :*

L'inhibition de la synthèse des ARN cellulaires, qui intervient rapidement après le début de l'infection, serait liée à une diminution de l'activité de l'ARN polymérase II et de la stabilité des messagers (Oda et Joklik, 1967).

##### *Synthèses protéiques :*

De petits ARN polyAdénylés (POLADS), produits précocement, inhibent la traduction des ARNm et contribuent activement à l'extinction des synthèses protéiques de l'hôte (Cacoulos et Bablanian, 1991). Si cette inhibition est générale, certaines protéines de surface - comme les molécules du CMH de classe I - sont encore plus affectées: ceci constitue vraisemblablement un mécanisme de contournement de la réponse immunitaire (Cf. §3.6.).

#### **1.5. La régulation du spectre d'hôte**

L'infection d'un hôte donné suppose évidemment que le virus puisse pénétrer et se multiplier efficacement dans ses cellules cibles. A l'exception notable du virus de la vaccine, les poxvirus ont un spectre d'hôte très étroit (McFadden, 1994; Woodrooffe et Fenner, 1965) : le tableau 2 illustre le cas des *Leporipoxvirus*. En dépit de nombreux travaux consacrés à ce sujet, la nature exacte des interactions virus-cellules contrôlant la capacité de réplication dans les différents types cellulaires est peu connue. Plusieurs gènes localisés dans les extrémités du génome sont responsables du spectre d'hôte chez les poxvirus : trois d'entre eux ont été identifiés chez certains *Orthopoxvirus* : les gènes K1L, C7L sur le virus de la vaccine et CP77kDa sur le virus cowpox permettent ainsi la réplication sur cellules humaines (Drillien *et al.*, 1981; Perkus *et al.*, 1990).

Cette notion de spectre d'hôte prend une ampleur toute particulière lorsque l'on considère l'importance des poxvirus comme vecteurs de gènes étrangers. Elle déterminera en grande partie le cadre de leur utilisation et sera un argument de poids dans le développement d'un candidat vaccin. La spécificité très étroite du VM pour le lapin européen repose probablement sur un ensemble de facteurs, contrôlant l'entrée du virus dans les différents types cellulaires et l'utilisation de la machinerie cellulaire pour la réplication et la maturation virales. Parmi les protéines potentiellement impliquées dans ces phénomènes, on peut citer un groupe de facteurs identifiés dans le cadre de notre DEA et qui font depuis l'objet d'un travail de caractérisation au laboratoire (Camus *et al.*, données non publiées). Ces protéines, désignées collectivement sous le terme de MHR pour *Myxoma host range*, ont en commun des séquences répétées particulières, ou motifs ankyrines. Les protéines possédant des motifs ankyrines, telles que le produit du gène K1L de la vaccine, sont connues pour leur rôle dans la capacité des virus à se répliquer sur certaines lignées cellulaires. Les trois gènes MHR1, MHR2 et MHR3 présents sur le génome du VM, interviennent de façon prépondérante dans l'expression du pouvoir pathogène, ainsi que l'atteste le phénotype des mutants délétés de l'un ou l'autre gène (Camus *et al.*, données non publiées). Le type de cellules permissives vis-à-vis de l'infection par le VM est encore l'objet de spéculations.

## **II- Le pouvoir pathogène des poxvirus : l'exemple de la myxomatose**

De nombreux poxvirus infectent les Vertébrés : ils peuvent occasionner des infections localisées à la porte d'entrée du virus ou au contraire des infections généralisées, comme c'est le cas pour le virus myxomateux. Les caractéristiques majeures de cette affection sont présentées ici à titre d'illustration du pouvoir pathogène d'un poxvirus.

### **2.1 La myxomatose du lapin européen : généralités**

Le virus myxomateux est responsable d'une affection souvent fatale chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) alors qu'il n'occasionne que des troubles mineurs chez le lapin américain du genre *Sylvilagus*. De fait, l'hôte réservoir du virus semble être le *Sylvilagus brasiliensis*, chez qui la myxomatose se résume à un myxome primaire discret, sans développement de lésions secondaires ni de signes généraux. Ce spectre d'hôte très étroit est une caractéristique remarquable de cet agent pathogène. Il a été montré très tôt par Aragão qui a essayé en vain d'infecter plusieurs espèces d'oiseaux et de mammifères (Aragão, 1927). De même, l'introduction du virus en Australie a été précédée d'expériences d'inoculations sur des espèces autochtones et ...sur l'homme (Jackson *et al.*, 1966). Cette restriction d'hôte explique ainsi son utilisation dans la lutte biologique contre le lapin considéré comme nuisible (Fenner, 1965; Fenner et Fantini, 1999).

### **2.2. Signes cliniques**

La myxomatose se manifeste sous sa forme classique par des pseudotumeurs sous-cutanées diffuses ou « myxomes » primaires apparaissant au niveau du point d'inoculation (figure 6) (Joubert, 1972). Quelques jours plus tard apparaissent des myxomes secondaires au niveau céphalique (en particulier sur les paupières), dans les régions dorsolombaire et anogénitale (figure 6). Ces myxomes secondaires signent la dissémination du virus, vraisemblablement par voie lymphatique.

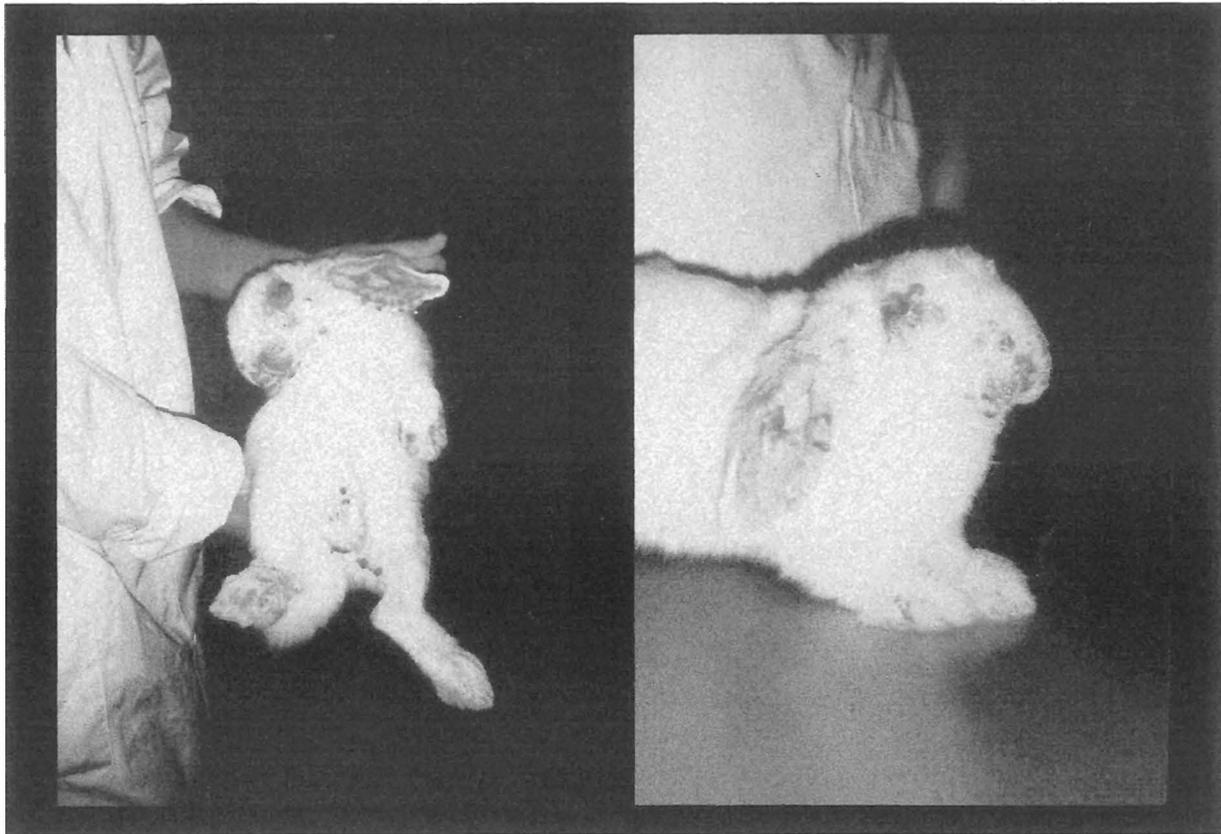


Figure 6 : Formes cliniques classiques de myxomatose (lapin à J+10 post-inoculation par la souche virale MV-T1) : pseudo-tumeurs cutanées ou myxomes primaires au point d'inoculation du virus, suivis quelques jours plus tard par des myxomes secondaires en région céphalique (au niveau des paupières, des yeux, du nez et de la bouche), et par une blépharoconjonctivite et une inflammation en région anogénitale (associée à un œdème régional). Noter également la dissémination des myxomes secondaires sur les membres postérieurs.



Figure 7. Forme amyxomateuse (« respiratoire ») de myxomatose.

Elle est associée à une immunodépression qui se traduit par des surinfections bactériennes (essentiellement à *Pasteurella multocida* et *Bordetella bronchiseptica*). Pour les souches virulentes, la mort survient au bout d'une dizaine de jours, suite aux destructions tissulaires, au dépérissement et à la malnutrition.

Ce tableau « classique » correspond aux souches de référence, telle que la souche Lausanne, introduite en Europe en 1952 par Armand Delille, qui est d'origine brésilienne (Brasil/Campinas/1949) (Fenner et Marshall, 1957), et la souche introduite en Australie (souche Moses) ; la souche de référence Toulouse 1 (ou « T1 »), utilisée au laboratoire, est certainement dérivée de la souche Lausanne. Très vite, les expériences de relargage volontaire du virus à des fins de lutte biologique ont donné lieu à l'émergence de souches dont le niveau de pathogénicité était très variable : les lapins infectés avec ces souches présentaient des myxomes plus discrets et les taux de létalité pouvaient être de l'ordre de 50-60%, *versus* quasiment 100% pour les souches virulentes de référence. Des grades de virulence ont donc été définis, afin de classer ces souches selon leur pouvoir pathogène. On distingue classiquement 5 grades de virulence, en fonction du temps moyen de survie et du taux de létalité entraîné par l'infection (tableau 3). Les souches de grade I, les plus virulentes, constituent les souches de référence. Elles provoquent les premiers signes cliniques au bout de 3 jours post-inoculation et entraînent la mort de plus de 99% des lapins en moins de 13 jours.

Grade de virulence	Temps de survie moyen	Taux de létalité (%)
I	≤ 13 jours	≥ 99
II	14-16 jours	95-99
III	17-28 jours	70-95
IIIA	17-22 jours	90-95
IIIB	23-28 jours	70-90
IV	29-50 jours	50-70
V	Non applicable	≤ 50

**Tableau 3.** Critères de définition des grades de virulence de souches de VM (Adapté de Fenner et Marshall, 1957).

Cette évaluation de la virulence, fondée essentiellement sur le temps moyen de survie, est contestée : elle donnerait une idée peu fidèle de la virulence des souches par rapport au taux de mortalité (Parer, 1995).

Les souches atténuées occasionnent des formes bénignes : les lésions sont plus localisées et peu exsudatives. A ces formes classiques, il faut ajouter depuis la fin des années 70 des formes caractérisées par l'absence de tropisme cutané, avec des myxomes extrêmement discrets (Brun, 1981). Les signes cliniques concernent essentiellement les yeux (conjonctivite mucopurulente), les organes génitaux, entraînant souvent la stérilité à long terme des animaux; les symptômes respiratoires sont prépondérants, d'où la dénomination de « formes respiratoires » : il est en fait préférable de parler de formes amyxomateuses (figure 7).

Chez le lapin Angora, élevé pour son poil, la myxomatose peut se traduire par une « maladie des boutons rouges » : des myxomes, souvent de petite taille, se développent sur les surfaces dépilées, sans localisation céphalique ni ano-génitale (Kerr et Best, 1998).

### **2.3 Histopathologie**

L'étude des lésions associées à la myxomatose présente un grand intérêt, car elle met en valeur...notre ignorance sur le sujet ! Paradoxalement, alors que nous connaissons la séquence intégrale du génome viral, nous ne savons pas clairement ce qu'est un myxome. Classiquement, le myxome, qu'il s'agisse de la lésion primaire au point d'inoculation, ou des lésions secondaires cutanées ou viscérales, est décrit comme une prolifération de cellules mésenchymateuses non différenciées, appelées «cellules myxomateuses ». Elles prennent l'apparence de fibroblastes étoilés et présentent de nombreuses déformations nucléaires. Les cellules endothéliales peuvent aussi proliférer, au point d'obstruer le capillaire et provoquer la nécrose du territoire infecté. Les cellules infectées présentent fréquemment des corps d'inclusions intracytoplasmiques basophiles, appelés « corps de Splendore » (Joubert, 1972).

Les plans cutanés subissent une métaplasie squameuse, évoluant vers la kératinisation et la destruction de l'architecture ciliaire. L'infiltration par les cellules inflammatoires intervient à des degrés divers. Au cours de l'infection on observe

souvent au niveau des myxomes (i) une persistance anormalement longue d'hétérophiles (dénomination des neutrophiles chez le lapin), (ii) une forte infiltration par des histiocytes (forme différenciée de cellules de la lignée myéloïde) et surtout (iii) une sécrétion abondante de mucine (d'où le préfixe « myxo-»). Les types cellulaires recrutés ne sont pas encore identifiés. Les mécanismes cellulaires sous-jacents sont également largement obscurs...

#### **2.4. Une tentative d'éclaircissement de la pathogénie**

Après une inoculation intradermique, la réplication du virus intervient au niveau du point d'inoculation. Dans les 2 jours qui suivent, le virus est retrouvé dans le nœud lymphatique drainant. Des titres viraux très élevés y sont constatés 3 à 4 jours après infection. La dissémination du virus se fait *via* les leucocytes, alors que l'on ne retrouve pas de virus sous forme libre dans le sérum (Kerr et Best, 1998). Le virus peut ainsi être détecté dans les nœuds lymphatiques, la rate, les poumons, les testicules et les muqueuses oculaires (Best *et al.*, 2000). A ce stade, les signes cliniques majeurs sont une inflammation au point d'inoculation et une blépharoconjonctivite. Les myxomes secondaires signent une généralisation de la dissémination virale, alors que l'affaiblissement du système immunitaire explique les surinfections bactériennes. Les causes de la mort restent obscure. Il semble difficile d'attribuer la mort à telle ou telle lésion (Kerr et Best, 1998). Le rôle de la composante bactérienne est sans doute important, mais ne saurait être exclusif, quand on sait que les souches hypervirulentes entraînent la mort très rapidement, sans signes apparents de surinfection. C'est particulièrement vrai pour les souches californiennes (Kerr et Best, 1998).

#### **2.5. Epidémiologie**

La transmission du virus se fait essentiellement par voie cutanée, l'inoculation étant souvent le fait d'arthropodes vecteurs, puces ou moustiques. Très tôt, les chercheurs ont montré que le virus était transmis mécaniquement par les moustiques des genres *Aedes* et *Anopheles*, sans que l'on observe de réplication chez ces intermédiaires (Fenner et Ratcliffe, 1965). Une charge virale élevée chez le lapin conditionne la présence de virions dans les pièces buccales du moustique (Fenner *et al.*, 1956). Les puces, notamment la puce spécifique du lapin, *Spilopsyllus cuniculi*, jouerait également un rôle majeur dans la transmission du virus en zone tempérée, en pérennisant la présence du virus au sein d'un terrier au cours de l'hiver, alors que les moustiques sont en diapause (figure 9). Dans des environnements confinés, dans un terrier ou ...dans un élevage de type rationnel, le virus peut également se transmettre par aérosols. Cela explique notamment l'épidémiologie totalement originale de la myxomatose « respiratoire » ou amyxomateuse dans les élevages.

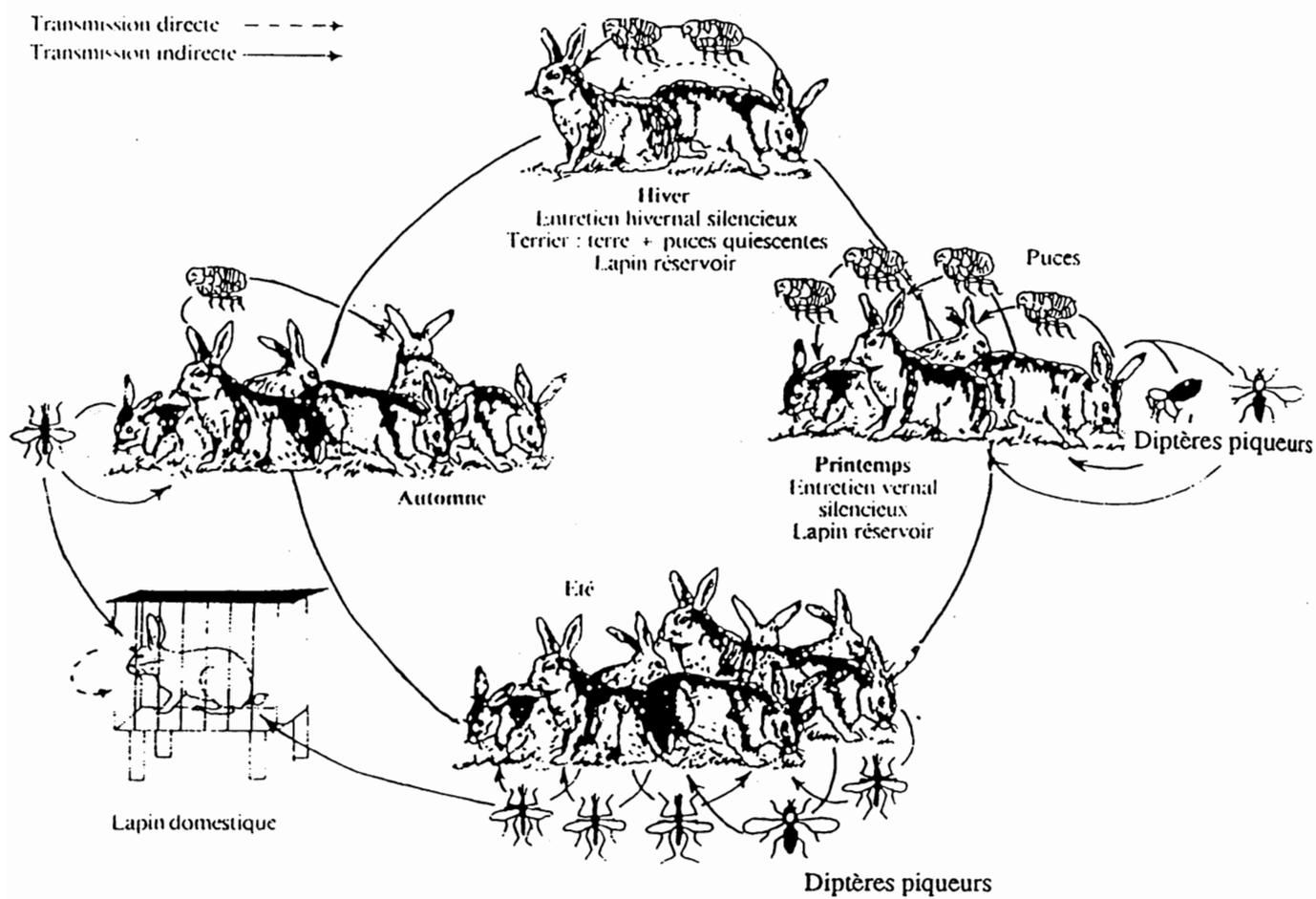


Figure 9. Schéma épidémiologique de la myxomatose.

Enfin, notons que le virus myxomateux peut aussi se transmettre par voie séminale : un lapin mâle excrète le virus dans son sperme dès la phase pré-symptomatique et jusqu'à 15 jours après guérison chez les animaux survivants (Kerr et Best, 1998). L'insémination artificielle qui se développe beaucoup en production rationnelle peut ainsi concourir à la propagation du virus.

### **2.6. La réponse immunitaire post-infectieuse**

Trois phases peuvent être identifiées : l'immunité constitutive et immédiate; une phase inductible précoce non spécifique de l'antigène puis une phase inductible dépendante de lymphocytes, spécifique de l'antigène, support d'une réponse effectrice et d'une mémoire immunologique.

Les premières cellules à pénétrer le site primaire d'infection sont les cellules inflammatoires : d'abord les granulocytes neutrophiles, puis les cellules de la lignée monocyttaire (monocytes-macrophages). Les cellules inflammatoires limitent potentiellement la multiplication virale, en détruisant notamment les poxvirus en présence d'anticorps. Cependant les cellules phagocytaires pourraient aussi favoriser la dissémination virale en l'absence de virolyse (Fenner, 1948). L'inflammation seule ne semble pas pouvoir éliminer les poxvirus mais permet de contenir l'infection en synergie avec la réponse lymphocytaire (Tsuru *et al.*, 1993 ; Kitching et Hammond, 1998).

#### **a. La réponse à médiation humorale**

L'infection par un poxvirus est associée à la présentation de nombreuses protéines qui suscitent la synthèse d'une grande variété d'anticorps ; ceux-ci sont classiquement classés en trois catégories : les anticorps neutralisants, dirigés contre les virions enveloppés ou non; les anticorps qui lysent les cellules infectées en association avec le complément et les anticorps qui se combinent aux antigènes circulants pour former des complexes immuns. La réponse à médiation humorale ne semble pas être suffisante pour conférer une protection contre une primo-infection poxvirale : du sérum hyperimmun administré à des patients atteints de complications vaccinales (dans le cadre de la vaccination anti-variologique) s'est avéré le plus

souvent inefficace (Kempe, 1960). De même, une administration passive d'anticorps neutralisants à des lapins infectés par un *Leporipoxvirus* ne fait pas régresser les signes cliniques (Allison, 1966). Cependant l'immunité post-infection ou après vaccination avec un virus vivant atténué est généralement de longue durée et semble partiellement médiée par les anticorps (Kitching et Hammond, 1998). L'activité des anticorps serait liée à la nature de l'immunogène - les virus vivants étant à cet égard beaucoup plus efficaces que les antigènes inertes - la voie d'inoculation et la teneur plasmatique en complément. Les anticorps semblent donc jouer un rôle mineur dans la réponse antipoxvirale, notamment lors d'une primo-infection (Kitching et Hammond, 1998).

#### **b. La réponse à médiation cellulaire**

Il est clairement établi que les lymphocytes T (LT) jouent un rôle déterminant dans la réponse anti-poxvirale, d'une part en régulant la production des anticorps (essentiellement LT CD4+) mais aussi et surtout en exerçant une activité cytotoxique directe à l'égard des cellules infectées (LT CD8+). Les LT spécifiques du virus mousepox sont détectables dès 2 jours post-infection (Kitching et Hammond, 1998). Des souris *nude* (CD4 -; CD8-), incapables de développer une réponse cellulaire, ne peuvent juguler une infection par le virus mousepox et ce, même à des doses sublétales (Buller *et al.*, 1987). L'infection des animaux déplétés dans l'une ou l'autre des deux sous-populations de LT montre l'importance prépondérante de l'activité cytotoxique des lymphocytes CD8+ (O'Neill et Brenan, 1987). Lors d'une infection par un poxvirus, on observe un dysfonctionnement de la réponse des lymphocytes aux mitogènes. Ceci peut être associé en partie à une perturbation de l'expression de certaines molécules de présentation des antigènes telles que celles du CMH de classe I ou le CD4 (Boshkov *et al.*, 1992, Barry *et al.*, 1995).

### **2.7. Prophylaxie médicale et sanitaire**

Les mesures de protection sanitaire fondées sur la lutte contre les insectes ne suffisent pas à se prémunir contre cette infection : le recours à la vaccination est donc généralisé et fait appel à deux types de vaccins à virus vivants :

- Le virus du fibrome de Shope, membre lui aussi du genre *Leporipoxvirus*, permet de protéger les lapins et présente une parfaite innocuité, mais son efficacité est limitée à 3 mois, ce qui suppose des rappels fréquents (Shope, 1938).
- La souche vaccinale SG33 est une souche homologue atténuée par passages en série sur cellules de rein de lapin et fibroblastes d'embryon de poulet à 33°C. Sa mise au point a été effectuée à l'ENV de Toulouse par Saurat et Gilbert (Saurat *et al.*, 1978), d'où la dénomination SG33. Cette souche présente un excellent compromis entre innocuité et immunogénicité. Cependant quelques accidents post-vaccinaux, dans le contexte d'élevages dont le statut sanitaire est très hétérogène, ont suggéré la persistance d'un pouvoir immunodépresseur résiduel (Brun, 1981). Ces « accidents » n'ont cependant jamais pu être reproduits (Bertagnoli, communication personnelle).

### **III. Les facteurs de pathogénicité codés par les poxvirus**

Les poxvirus ont développé des stratégies complexes pour survivre en conditions défavorables et en particulier contourner les défenses mises en œuvre par leur hôte : ces outils visent à optimiser la multiplication du virus et surtout à moduler la réponse immunitaire. La figure 11 résume l'intervention de ces différents facteurs, dont le rôle va maintenant être détaillé, en insistant tout particulièrement sur les facteurs codés par le virus myxomateux.

#### **3.1. Les potentialisateurs de la multiplication virale**

Le facteur de croissance EGF (pour *Epidermal Growth factor*) est responsable de la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires (Laurence et Gusterson, 1990 ; Carpentier et Wahl, 1991 ; Hackel *et al.*, 1999). Plusieurs protéines rattachées à cette famille ont été identifiées chez des poxvirus : le VGF (*Vaccinia Growth Factor*) chez le virus de la vaccine, le VAGF (chez le virus de la variole), le SFGF et le MGF, chez le virus du fibrome de Shope et le virus myxomateux respectivement (Upton *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 1987). Tous les homologues poxviraux de l'EGF ont des structures secondaires et tertiaires similaires à celles de l'EGF, ainsi que le prédit la conservation des six résidus cystéine qui forment des ponts disulfure.

Le MGF est codé par un gène en copie unique près de l'extrémité inversée terminale gauche du génome (Opgenorth *et al.*, 1992 a,b). Les virus mutants n'exprimant plus le MGF provoquent les symptômes caractéristiques de la maladie, mais leur virulence est très diminuée. Ceci est à mettre en relation avec la nette diminution de l'hyperplasie des épithéliums, notamment aux niveaux conjonctival et nasal : les surinfections bactériennes sont nettement plus modérées qu'avec le virus sauvage (Opgenorth *et al.*, 1992b). Par ailleurs, des souris transgéniques exprimant le MGF développent une prolifération et une arborisation des acini mammaires, ainsi qu'une hyperplasie de leur épithélium gastrique (Strayer *et al.*, 1993), indiquant ainsi que MGF agit comme un ligand biologiquement actif.

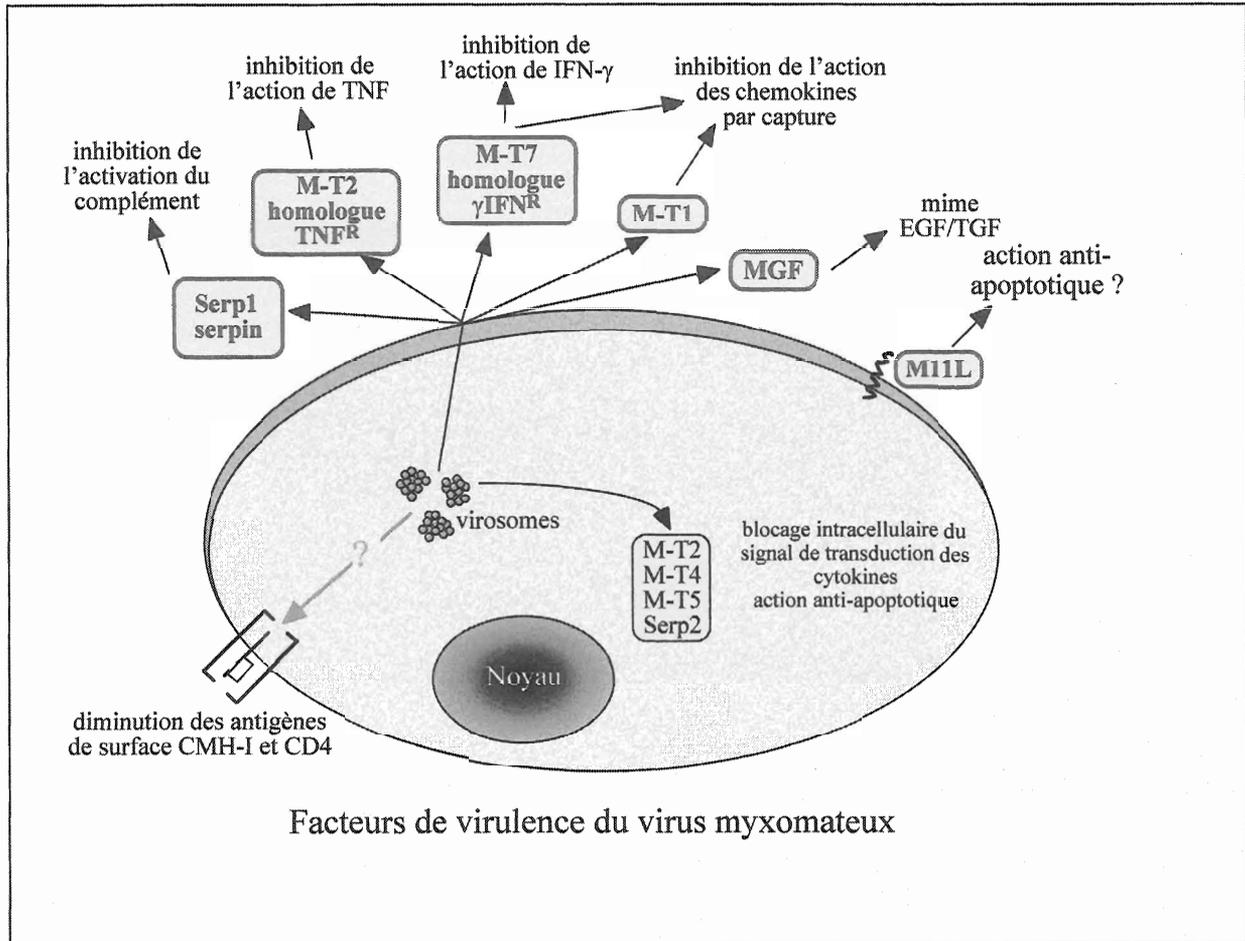


Figure 10 . Les facteurs de pathogénicité codés par le virus myxomateux (Messud-Petit et Bertagnoli, 2000).

Parmi les hypothèses avancées pour expliquer la signification biologique de cette virokinine, on considère que MGF stimule le métabolisme des cellules, infectées ou non, fournissant ainsi un environnement plus favorable à la réplication virale.

De même, la Thymidine Kinase (TK) est une protéine impliquée dans la capacité de réplication virale. Les mutants TK- du virus de la vaccine ont un pouvoir pathogène nettement diminué par rapport au virus sauvage (Thouless et Wildy, 1975). L'intérêt porté au gène *tk* tient essentiellement à son utilisation comme site d'insertion de gènes étrangers, à des fins vaccinales, chez le virus de la vaccine pour l'essentiel (Blancou *et al.*, 1986 ; Moss, 1996; Smith et Mackett, 1992), mais aussi chez le virus myxomateux (Jackson et Bults, 1992b; Bertagnoli *et al.*, 1996).

### **3.2. Les modulateurs de la réponse inflammatoire**

Deux protéines identifiées chez les *Leporipoxvirus* interviennent dans l'inhibition des processus inflammatoires :

**M11L**, protéine de 15 kDa exprimée précocement dans les cellules infectées, est codée par un gène dont l'extrémité 3' chevauche l'extrémité 5' du gène du MGF. Elle possède une hélice transmembranaire dans sa partie C-terminale, et un domaine extracellulaire N-terminal. Une délétion de la partie C-terminale réduit le taux d'expression de la protéine à 45% du niveau de base, et empêche son transport dans les mitochondries des cellules infectées. Les virus mutants qui n'expriment plus la partie C-terminale de M11L ont un pouvoir pathogène réduit (Opgenorth *et al.*, 1992). Par rapport à ce qui est observé avec la souche sauvage, les myxomes sont à la fois plus larges, plus oedémateux et plus nécrotiques; les signes respiratoires sont réduits et la guérison survient en moyenne en 30 jours. Les myxomes sont davantage infiltrés par des macrophages et des cellules polynucléées, signant une réponse inflammatoire plus importante qu'avec la souche sauvage. L'hypothèse fonctionnelle est que M11L serait un ligand capable de fixer un effecteur normal de l'inflammation. Cet effecteur, en étant piégé par M11L, serait alors faiblement fixé au récepteur cellulaire normal, seul capable d'amplifier le processus inflammatoire.

**SERP-1** (ou SPI-4 en nomenclature « normalisée ») est une serpine excrétée par le virus de la myxomatose, codée dans les répétitions inversées terminales. Il est désormais admis que les serpines (inhibiteurs de protéases à sérine) extracellulaires sont des virokines, puisqu'elles interfèrent avec la signalisation intercellulaire. Les serpines sont un groupe de protéines qui régulent de nombreux processus physiologiques: remodelage de la matrice extracellulaire, modulation de la réponse inflammatoire, fibrinolyse, activation du complément et coagulation sanguine. SERP-1 est active en tant que serpine vis à vis de l'activateur du plaminogène, de la plasmine, de la thrombine et du facteur Xa. SERP-1 présente effectivement des propriétés anti-inflammatoires (Nash *et al.*, 1997, Nash *et al.*, 1998); en outre, l'inactivation du gène codant pour SERP-1 entraîne une diminution de la pathogénicité et une résolution inflammatoire plus rapide et efficace (Macen *et al.*, 1993).

L'ORF MST3 du VM code pour une  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase, dont la délétion induit une faible atténuation de la pathogénicité (Jackson *et al.*, 1999).

Il a récemment été montré que SERP-1 subit une modification post-traductionnelle via l' $\alpha$ 2,3-sialyltransferase (Nash *et al.*, 2000). Cette glycosyltransferase, sans influencer sur l'activité de la serpine, modifierait sa présentation et pourrait ainsi la protéger des effecteurs de la réponse immunitaire ou modifier son affinité pour des cibles. On ne sait pas si SERP-1 est la seule protéine virale modifiée par le produit du gène MST3 (Nash *et al.*, 2000).

### **3.3. L'inhibition de l'activation du complément**

Le complément est un système précoce de défense contre les micro-organismes, constitué d'un ensemble de 25 protéines. Son activation déclenche une cascade d'événements qui aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire, créant des pores de 10 nm de diamètre entraînant la lyse osmotique de la cellule cible.

Le complément peut être activé par 2 voies :

**La voie classique**, déclenchée par la création d'un complexe Ag-Ac qui se lie à la protéine C1 : après une cascade d'activations, C3 est clivé en C3a et C3b, ce dernier se fixant de façon irréversible à la surface cellulaire.

**La voie alterne**, activée en l'absence d'anticorps, aboutit directement au clivage de C3 (Rother et Till, 1988).

L'intervention du complément dans l'infection par le virus de la vaccine a été décrite (Leddy *et al.*, 1977), les cellules pouvant être lysées *in vitro* par l'une ou l'autre des voies d'activation (Wakamiya *et al.*, 1989).

Une protéine de 35kDa du virus de la vaccine, baptisée VCP (pour *Vaccinia Complement control Protein*) est capable de se lier au fragment C4b du complément. Elle bloque ainsi l'activation de la voie classique du complément, ce qui explique peut-être la relative inefficacité des anticorps pour juguler les poxviroses (Kotwal, 2000).

Il semble que le virus myxomateux ne présente pas de gène codant pour un homologue du facteur VCP.

Rappelons ici (Cf §1.2.) qu'un autre mécanisme de résistance à l'action du complément consiste en la présence de molécules *RCA* (*Regulators of complement activation*) dans l'enveloppe externe des formes virales EEV (Vanderplasschen *et al.*, 1998), qui régulent l'activation des voies classique et alterne du complément. Ce mécanisme n'a pas encore été envisagé chez le VM.

### **3.4. La synthèse de leurres de cytokines et de chimiokines**

Trois gènes codant pour des virocepteurs ont été identifiés à ce jour chez le VM; ils sont situés dans les extrémités terminales du génome, et sont de ce fait désignés **M-T1**, **M-T2** et **M-T7**, le numéro faisant référence à la position du gène par rapport à la boucle terminale (Cameron *et al.*, 1999).

#### **a. Inhibition de CC-chimiokines**

La protéine M-T1 est sécrétée dans le milieu de culture des cellules infectées, dès 2 à 4 heures post-infection, et cette sécrétion persiste en phase tardive de l'infection. M-T1 appartient à un groupe de protéines poxvirales désignées collectivement sous le terme de T1/35kDa inhibiteurs solubles de CC-chimiokines (Graham *et al.*, 1997). Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G. Des études *in vitro* montrent une forte affinité entre M-T1 et certaines CC-chimiokines, telles que MIP-1 $\alpha$ .

(macrophage inflammatory protein) ou MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) , suggérant que M-T1 pourrait empêcher la fixation de ces ligands à leurs récepteurs (Lalani *et al.*, 1998). On notera cependant que les T1/35kDa inhibiteurs solubles de CC-chimiokines n'ont pas d'homologie de séquence notable avec des protéines cellulaires, même parmi les récepteurs aux chimiokines. *In vivo*, on observe un afflux de cellules monocytaires et macrophagiques au site d'inoculation d'un virus mutant n'exprimant plus M-T1, phénomène absent lors d'inoculation avec un virus myxomateux sauvage (Lalani *et al.*, 1999). L'inactivation du gène T1 ne semble cependant pas avoir d'impact significatif sur l'évolution clinique de la maladie.

### **b. Inhibition du TNF (Tumor Necrosis Factor)**

Le facteur de nécrose tumorale ou TNF est une cytokine impliquée dans l'immunité antimicrobienne (Beutler *et al.*, 1992) soit par lyse directe des cellules infectées, soit de façon indirecte en synergie avec les interférons (Wong et Goeddel, 1986). Les deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  du TNF ont des activités biologiques très proches mais reconnaissent des récepteurs différents, respectivement TNFR1 et TNFR2.

Le virus myxomateux et le virus du fibrome de Shope sécrètent précocement une protéine de 325 acides aminés baptisée T2, homologue de la région extracellulaire du récepteur des TNF $\alpha$  et  $\beta$ . T2 se fixe au TNF, le séquestre et l'empêche d'atteindre sa cible ; des mutants T2- s'avèrent très atténués par rapport au virus sauvage (Upton *et al.*, 1991). Les protéines produites précocement se fixent aussi bien au TNF $\alpha$  qu'au TNF $\beta$ , mais on constate une préférence pour la cytokine de l'hôte naturel du virus: M-T2 est capable d'inhiber la lyse cellulaire induite par le TNF de lapin, et non le TNF d'origine murine ou humaine. La capacité de fixation de M-T2 au TNF nécessite des répétitions N-terminales de domaines riches en cystéine, ou CRD (*cysteine rich domains*). Des mutations ou délétions de M-T2 dans les CRD se traduisent par une incapacité de la protéine virale à se fixer au TNF (Schreiber *et al.*, 1996). De fait, sur les 4 domaines CRD de M-T2, les 3 premiers sont nécessaires pour la fonction d'inhibition du TNF, alors que les 2 premiers sont suffisants pour l'action anti-apoptotique (Xu *et al.*, 2000) (Cf.§ 3.5.). Le virus mutant T2<sup>-</sup>, inoculé à des lapins, permet la survie de deux tiers d'entre eux, contre 100% de mortalité avec la souche sauvage de VM (Upton *et al.*, 1991). Des protéines homologues à T2 sont

présentes chez le virus de la vaccine (Goebel *et al.*, 1990), le virus de la variole (Shchelkunov *et al.*, 1993, Massung *et al.*, 1993a) et le virus cowpox (Hu Fang Qi *et al.*, 1994). M-T2 est sécrétée sous forme de monomère ou de dimère, mais la forme dimérique est un meilleur inhibiteur de la lyse TNF-dépendante que le monomère (Schreiber *et al.*, 1996). Le dimère est probablement plus apte que le monomère à empêcher l'oligomérisation du récepteur, qui fait normalement suite à son interaction avec des trimères de TNF.

### **c. Inhibition de l'action des interférons**

Enfin, les poxvirus peuvent inhiber l'action des interférons (IFN) en empêchant soit leur fixation au récepteur, soit la transduction du signal qui résulte de la liaison récepteur-ligand.

Comme les autres cytokines, les interférons (IFN) sont pléiotropes : leurs nombreux effets s'exercent contre les infections, les tumeurs ainsi que dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires.

On distingue 3 classes d'IFN :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Pestka *et al.*, 1981). Les IFN $\alpha$  et  $\beta$  sont synthétisés par n'importe quelle cellule somatique et augmentent la capacité de résistance à l'infection virale (Boehm *et al.*, 1997; Lengyel, 1982; Smith *et al.*, 1998). L'IFN $\gamma$  n'est produit que par les lymphocytes T activés et les cellules tueuses NK (*natural killer*). Les IFN agissent par couplage à 2 récepteurs : les récepteurs de type 1 fixent les IFN $\alpha$  et  $\beta$ , alors que les récepteurs de type 2 fixent l'IFN $\gamma$ .

L'IFN $\gamma$  est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire (Farrar et Schneiber, 1993). Son rôle dans la lutte contre l'infection poxvirale a été montré : ainsi des souris infectées par le virus de la vaccine éliminent l'agent pathogène sauf si on leur administre des anticorps dirigés contre l'IFN $\gamma$  (Ruby et Ramshaw, 1991). Les poxvirus livrent un très bel exemple de dispositif destiné à « interférer avec les interférons », avec pas moins de 4 facteurs synthétisés par différents membres de la famille (Smith *et al.*, 1998). Cette action peut consister en la diminution de la production d'IFN par la cellule infectée, la synthèse de leurres viraux qui intercepteront l'IFN avant qu'il n'atteigne sa cible cellulaire, l'inhibition de la transcription du signal après l'interaction IFN-récepteur, ou le blocage de l'action des protéines antivirales résultant de cette transcription du signal (Smith *et al.*, 1998).

Ainsi, l'analyse de la séquence N-terminale d'une protéine majoritaire sécrétée dans le milieu de culture de cellules infectées par le MV a révélé une homologie avec le récepteur de l'IFN $\alpha$  (Upton *et al.*, 1992). Cette protéine de 37kDa est codée par le gène T7 situé dans les TIR du génome. Une protéine similaire est codée par le virus du fibrome de Shope (Upton et McFadden, 1986). L'homologie entre le produit de T7 et les récepteurs de l'IFN $\alpha$  de mammifères est la plus forte dans le domaine d'interaction avec le ligand. Ce leurre empêche l'IFN d'atteindre sa cible cellulaire et d'exercer ses activités anti-virales, comme cela a été vérifié en culture cellulaire (Upton *et al.*, 1992). La réalité de l'inhibition a été vérifiée expérimentalement par délétion du gène T7. Comme pour M-T2, la spécificité de M-T7 pour la cytokine produite par son hôte naturel est forte : l'inhibition ne s'exerce que vis-à-vis de l'IFN $\alpha$  de lapin, mais pas à l'égard de l'IFN $\alpha$  d'origine murine ou humaine. La spécificité d'inhibition participe probablement à l'étroitesse du spectre d'hôtes du virus myxomateux. Beaucoup de poxvirus, tels que le virus de la vaccine, le virus rabbitpox, le virus cowpox, le virus de l'ectromélie, le swinepox (Massung *et al.*, 1993) et le camelpox produisent aussi un homologue de l'IFN $\gamma$ -R. L'analyse des tissus dermiques autour du site d'infection montre qu'en l'absence de M-T7 l'infiltration leucocytaire est plus importante qu'avec le virus sauvage, ce qui suggère un rôle de M-T7 dans le contrôle de l'afflux leucocytaire (Mossman *et al.*, 1996). Des études *in vitro* indiquent que M-T7 peut interagir avec des CXC-, des CC- et des C-chimiokines, dont l'IL-8, RANTES et la lymphotactine (Lalani *et al.*, 1997). M-T7 peut se fixer par cross-linking au domaine C-terminal de certaines chimiokines. Cette région, connue comme le domaine de fixation de l'héparine ou des glycosaminoglycans, interagit avec des molécules de la matrice extracellulaire afin de créer un gradient d'attraction des leucocytes. La signification biologique réelle de M-T7 comme inhibiteur de chimiokines nécessite cependant d'être confirmée.

La modulation de l'activité des IFN peut aussi se faire en empêchant la transduction du signal : le virus de la vaccine produit deux protéines, codées par les gènes *E3L* (Watson *et al.*, 1991, Chang *et al.*, 1992) et *K3L* (Beattie *et al.*, 1991) qui interfèrent avec la cascade de phosphorylation, bloquant ainsi l'action des IFN dans les cellules infectées (Sharp *et al.*, 1998). De fait, les virus mutants *E3L-* (Beattie *et al.*, 1991) et *K3L-* (Beattie *et al.*, 1991) montrent une sensibilité exacerbée à l'action des IFN.

#### d. Inhibition de l'Interleukine-1 $\beta$

L'Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) est une cytokine impliquée dans la régulation des processus inflammatoires et de la réponse immunitaire (Dinarello *et al.*, 1991). Les deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'interleukine-1 ont la même activité biologique par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires présents sur les cellules T et les fibroblastes (IL-1R de type 1) ou sur les cellules T activées, les cellules B, les monocytes et les neutrophiles (IL-1R de type 2).

Les poxvirus mettent en œuvre deux mécanismes pour bloquer la production ou la fonction de l'IL-1. Des serpinines intracellulaires ont montré une activité anti-ICE (pour *Interleukin1 $\beta$  Converting Enzyme*) ce qui aboutit à l'inhibition de la maturation de l'IL-1 $\beta$  en sa forme active: CrmA a été identifié chez le virus cowpox (Ray *et al.*, 1992), SPI-2 chez le virus de la vaccine (Kotwal et Moss, 1989) et Serp2 chez le virus myxomateux (Petit *et al.*, 1996). Son importance fonctionnelle réside vraisemblablement autant dans son action anti-apoptotique que dans un rôle anti-inflammatoire.

Le gène *B15R* du virus de la vaccine code pour une glycoprotéine de 50-60 kDa homologue de l'IL-1 R de type 1 et capable de se lier fortement à l'IL-1 $\beta$  mais pas à l'IL-1 $\alpha$  (Spriggs *et al.*, 1992). Les résultats de l'inactivation du gène B15R sont contradictoires (Spriggs *et al.*, 1992, Alcamì et Smith, 1992) mais laissent cependant supposer que l'IL-1R viral permettrait au virus de la vaccine d'échapper à une défense non spécifique dangereuse pour sa survie.

### 3.5. La régulation de l'apoptose

En réponse à une variété de stimuli, une cellule peut s'engager dans un processus d'apoptose, correspondant à une mort « programmée », qui se traduit morphologiquement par un clivage de l'ADN avec altération de la chromatine, et margination de l'enveloppe nucléaire, suivie par une déliquescence de la cellule en corps apoptotiques. Ce processus est en général non-inflammatoire. Le déclenchement de l'apoptose peut faciliter la libération et la dissémination de

certain virus, lorsqu'ils ont achevé leur cycle répliatif, mais c'est d'abord un moyen pour l'organisme d'éliminer des cellules qui recèlent et répliquent l'intrus. En fonction du contexte cellulaire, la régulation de l'apoptose par les virus pourra passer par son exacerbation ou plus souvent, par son inhibition (McFadden et Barry, 1998). Les voies d'activation de l'apoptose sont excessivement complexes et leur description exhaustive dépasserait la vocation de cette introduction. Nous nous contenterons ici d'évoquer les inhibiteurs de l'apoptose identifiés chez le VM, sans pouvoir toujours donner les éléments mécanistiques sous-jacents.

- **Les inhibiteurs de caspase (CrmA/SPI-2) : Serp2.** Indépendamment de son rôle anti-inflammatoire, l'inhibition de ICE (Interleukine-1- $\beta$  converting enzyme / caspase 1) bloque une voie majeure d'activation de l'apoptose par la voie de FAS ou du TNF-R. Il est établi que CrmA chez le Cowpox, ou ses nombreux homologues dans la famille, inhibent ainsi puissamment l'apoptose induite par les lymphocytes T cytotoxiques (LCT). CrmA/SPI-2 a vraisemblablement d'autres cibles parmi les protéinases à cystéine impliquées dans les voies d'activation de l'apoptose (McFadden et Barry, 1998). Il inhibe également le granzyme B, mais avec une efficacité moindre (Quan *et al.*, 1995). Serp2, codée par le virus myxomateux, présente également une activité anti-apoptotique, puisque l'infection avec le virus mutant Serp2<sup>-</sup> occasionne une apoptose exacerbée *in vivo* (Messud-Petit *et al.*, 1998). Lorsque des lapins sont infectés par un mutant MV-Serp2<sup>-</sup>, la maladie s'exprime sous une forme très atténuée. Les symptômes respiratoires sont moins marqués, les myxomes secondaires très petits ou absents, et le taux de mortalité considérablement diminué. Dans les nœuds lymphatiques drainant le site d'inoculation du virus mutant, les lymphocytes présentent un taux très élevé d'apoptose, indiquant que Serp2 a réellement une action anti-apoptotique *in vivo*.

- **M11L.** Son action anti-inflammatoire a été évoquée précédemment (§ 3.1.) L'action anti-apoptotique de M11L a été montrée sur cellules lymphocytaires CD4<sup>+</sup> (lignée RL5), puis sur cultures de splénocytes de lapin (Opgenorth *et al.*, 1992), sans pour autant connaître la voie dans laquelle ce facteur interviendrait. Il a été récemment montré que M11L a une localisation mitochondriale grâce à un motif C-terminal, ce qui lui permet de bloquer la perméabilisation de la mitochondrie. L'inhibition de l'apoptose concerne de manière prépondérante les

macrophages/monocytes, qui jouent un rôle critique dans la pathogénie de la maladie (Everett *et al.*, 2000). Une autre piste est fondée sur l'homologie de M11L avec la famille des facteurs Bcl-2, qui constituent un groupe de régulateurs intracellulaires de l'apoptose, homologue de CED-9 identifié chez *Caenorhabditis elegans*. Les homologues viraux sont trouvés essentiellement chez les  $\gamma$ -herpesvirus (virus Epstein-Barr, Herpesvirus saimiri, Herpesvirus-68 murin, HHV-8) et chez les Adenovirus. Le virus de la peste porcine africaine, très proche des Poxvirus, code aussi un homologue de Bcl-2, dénommé LMW5-HL (Neilan *et al.*, 1993).

- **Les inhibiteurs de la voie FAS/TNF-R : M-T2.** L'inhibition de l'action du TNF bloque une voie majeure d'induction de l'apoptose : on comprend donc que le virocepteur codé par le gène T2 des leporipoxvirus participe à la régulation de l'apoptose, en bloquant la liaison de TNF avec son récepteur (Cf §3.4.). Cette activité de T2 sur la régulation de l'apoptose, bien réelle, est cependant plus complexe puisque des formes tronquées de la protéine qui ne peuvent ni se lier au TNF, ni même être sécrétées, conservent leurs propriétés anti-apoptotique (Macen *et al.*, 1996; Schreiber *et al.*, 1997; Sedger et McFadden, 1996). Rappelons ici que sur les 4 domaines CRD (*Cysteine rich domain*) de M-T2, les 3 premiers sont nécessaires pour la fonction d'inhibition du TNF, alors que les 2 premiers sont suffisants pour l'action anti-apoptotique (Xu *et al.*, 2000).

- **Les protéines de spectre d'hôte : M-T5.** La protéine M-T5 appartient à la superfamille des "protéines de spectre d'hôte" caractérisée par des motifs ankyrines répétés. L'analyse de sa séquence indique qu'elle est probablement intracytoplasmique (Mossman *et al.*, 1996). Lors d'infection de cellules RL5 par un virus mutant M-T5<sup>-</sup>, l'arrêt des synthèses protéiques cellulaires et virales provoque la mort par apoptose de ces cellules (Mossman *et al.*, 1996).

Lors d'infection de lapins européens par le virus mutant, la maladie est nettement atténuée, et les lapins ne présentent ni myxomes secondaires ni surinfections de la sphère respiratoire. Le taux de survie après infection par le virus M-T5<sup>-</sup> est de 100%.

- **La protéine M-T4,** codée par le VM est retenue dans le reticulum endoplasmique (Barry *et al.*, 1997). Cette protéine possède une séquence RDEL associée à une localisation dans le reticulum endoplasmique et n'a pas d'homologue cellulaire

connu. Des travaux récents montrent que le motif RDEL ne semble pas nécessaire à la localisation réticulaire de M-T4, mais lui confère sa stabilité (Hnatiuk *et al.*, 1999). En l'absence de M-T4, des lymphocytes de lapin (lignée RL5 ou lymphocytes périphériques *ex vivo*) infectés meurent par apoptose. La relation entre le rôle inhibiteur d'apoptose de M-T4 et sa localisation réticulaire n'est pas connue.

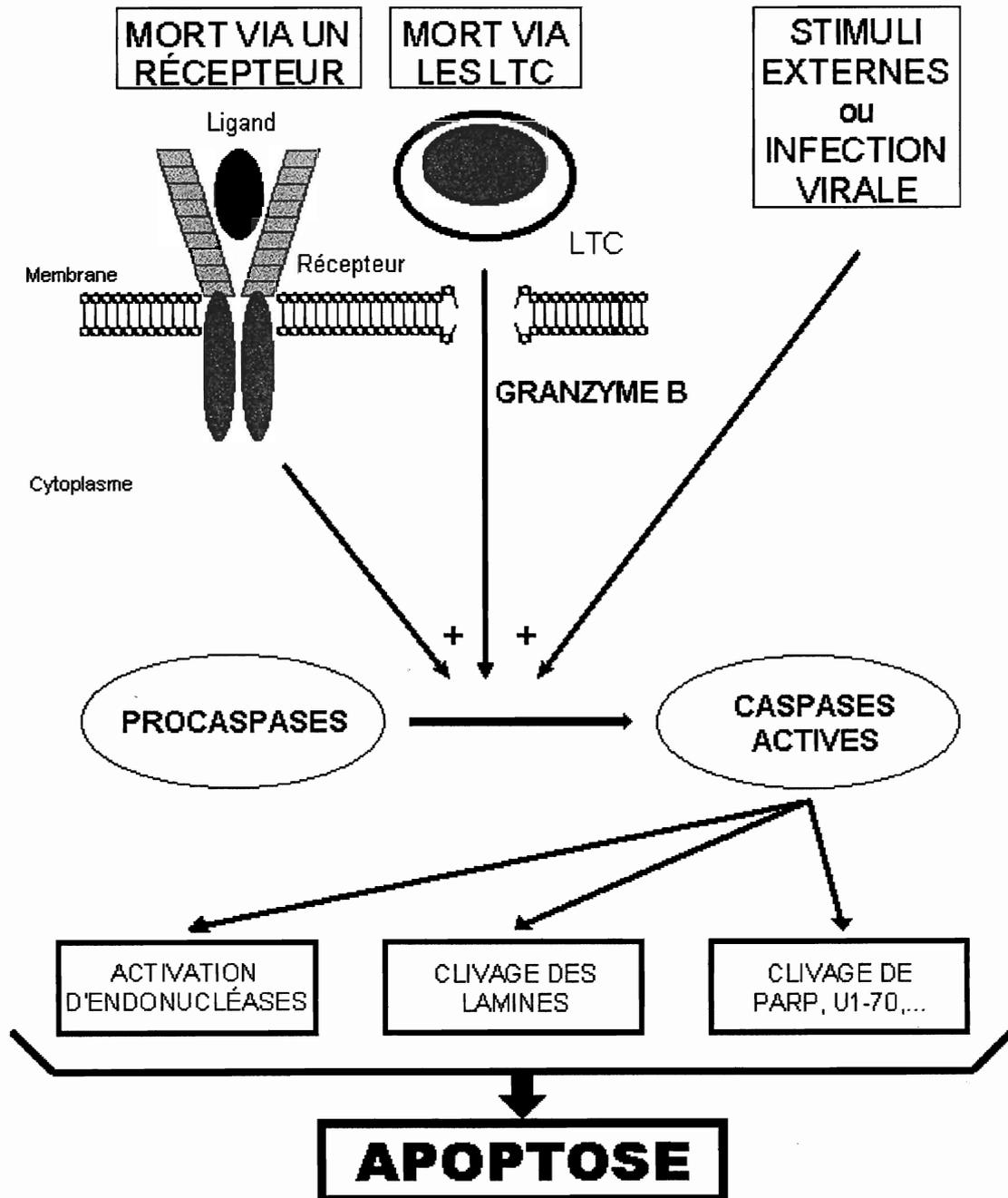


Figure 11. Les voies d'induction de l'apoptose.

### **3.6. La diminution de l'expression de protéines membranaires par la cellule hôte**

Certaines protéines membranaires nécessaires à la réponse immunitaire peuvent voir leur expression inhibée par les poxvirus. L'expression de molécules de classe I du CMH à la surface de cellules de singe (lignée BGMK) est fortement diminuée après infection par le virus myxomateux (Boshkov *et al.*, 1992; Zuñiga *et al.*, 1999). Cette diminution de l'expression à la surface de la cellule infectée serait en fait liée à une exacerbation de l'endocytose des molécules, matérialisée par l'accumulation et leur dégradation dans les endolysosomes. Un mécanisme concurrent de dégradation précoce dans le réticulum des complexes non assemblés est également envisagé, mais reste à valider. Cette dérégulation fait intervenir un ou plusieurs facteurs viraux, exprimés précocement au cours du cycle viral (Zuñiga *et al.*, 1999). Cette dérégulation ne signe pas forcément une interaction directe des protéines virales avec les molécules de classe I du CMH. Elle constitue en tous cas un moyen d'inhiber la présentation des antigènes viraux aux effecteurs cytotoxiques. De même, l'infection de lymphocytes CD4<sup>+</sup> de lapins (lignée RL5) par le VM est suivie d'une chute rapide du nombre de molécules CD4 à la surface des cellules (Barry *et al.*, 1995). Au cours de l'infection virale, les CD4 seraient internalisés et dégradés dans les vésicules lysosomiales. Une dissociation de la tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> et de la molécule CD4 précède la dégradation. Un tel mécanisme pourrait ainsi participer au déficit de la réponse immunitaire et à l'immunodépression observée lors de myxomatose (Barry *et al.*, 1995), mais ceci reste à confirmer...

### **3.7. L'inventaire n'est pas encore terminé...**

L'analyse exhaustive du génome des différents poxvirus devrait permettre à court ou moyen terme de disposer d'un inventaire précis et « définitif » de l'ensemble de leurs facteurs de contournement de la réponse de l'hôte. Certains virus ont mis en œuvre des stratégies originales pour leur permettre de faire face à des contraintes particulières.

A l'occasion du séquençage complet du génome du MV, une ORF (M141R) a été identifiée, qui présente une homologie significative avec la famille des protéines

membranaires OX-2. Comme ses homologues cellulaires, la protéine M141R comporte des domaines d'immunoglobuline et présente un peptide signal et un domaine membranaire C-terminal. Il est possible que ce facteur, exposé à la surface de la cellule infectée, induise une tolérance immunitaire, via une anergie lymphocytaire T. M141R participerait ainsi à un privilège immunitaire assuré aux cellules infectées (Cameron *et al.*, 1999). Ceci relève encore des analyses de séquences et nécessite donc une confirmation expérimentale, mais illustre les retombées de l'analyse des génomes. Il apparaît de plus en plus clairement que chaque virus a « intégré » un répertoire de gènes d'origine cellulaire adaptés à ses contraintes : le meilleur exemple nous est sans doute fourni par le *Molluscum contagiosum*, qui se réplique essentiellement dans les couches suprabasales de l'épiderme de l'homme, et est donc exposé à l'attaque par les peroxydes des phagocytes du derme, et surtout au stress oxydatif causé par les rayons ultraviolets. Le gène MC066L code pour une protéine homologue de la glutathion peroxydase, qui, en association avec le sélénium, est un puissant inhibiteur du stress oxydatif provoqué par les radicaux libres. Ce gène, mis en évidence à l'occasion du séquençage complet du génome du MCV (Senkevich *et al.*, 1996) n'a pas d'homologue connu chez les autres poxvirus. On peut donc imaginer (même si la confirmation expérimentale est beaucoup moins aisée dans ce modèle que pour le virus myxomateux...) qu'il s'agit là d'un mécanisme spécifique de protection adapté à un biotope particulier : la peau nue (McFadden, 1998; Shisler *et al.*, 1998).

## **Conclusion**

La *myxomatose* résulte d'un ensemble d'interactions complexes entre un virus dont l'équipement en facteurs de pathogénicité varie en fonction des souches, et un animal dont la réponse immunitaire dépend également de facteurs de milieu, d'infections intercurrentes, voire du fond génétique. Ce dernier aspect a notamment fait l'objet d'attention de la part des scientifiques australiens, inquiets de voir apparaître des animaux génétiquement résistants à la myxomatose. Les moyens d'adaptation des poxvirus aux modifications de leur environnement sont très nombreux et témoignent d'une co-évolution étroite avec leur(s) hôte(s). A ce propos, il ne faut pas oublier qu'en ce qui concerne le VM, cette longue co-évolution s'est

## *Introduction bibliographique*

---

faite avec son VRAI hôte naturel, *Sylvilagus brasiliensis*, et non avec le lapin européen, qui n'est en contact avec le virus que depuis un siècle.

Dans le cadre du laboratoire, nous nous attachons à mieux caractériser ces facteurs de pathogénicité codés par le virus myxomateux. C'est notamment l'objet de notre travail expérimental.

## **2<sup>EME</sup> PARTIE :**

# **ETUDE EXPERIMENTALE**

## Introduction

La souche atténuée vaccinale SG33 a été mise au point en 1978 par Saurat et Gilbert au laboratoire de Maladies Contagieuses de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse par passages répétés du virus sur culture cellulaire à température suboptimale (Saurat *et al.*, 1978). Couramment utilisée en France, la souche SG33 n'est cependant pas entièrement satisfaisante : on lui reproche la faible durée de l'immunité qu'elle induit (quelques mois) ainsi qu'un effet « immunodépresseur » qui est cependant très mal documenté : le SG33 prédisposerait à l'émergence de surinfections bactériennes lorsqu'il est utilisé dans des élevage de mauvais statut sanitaire.

Le laboratoire a engagé des travaux de caractérisation moléculaire de cette souche afin de mieux cerner le support moléculaire de son phénotype : les travaux préliminaires effectués au laboratoire avaient montré que les profils d'ADN en champs pulsés de la souche SG33 étaient très modifiés par rapport à une souche sauvage et qu'une délétion majeure concernait l'extrémité droite du génome de ce virus.

Cette région de génome n'avait jusqu'alors jamais fait l'objet d'aucune investigation, à l'exception des séquences inversées terminales présentes aux deux extrémités du génome, qui ont été largement étudiées (Macen *et al.*, 1993 ; Mossman *et al.*, 1996 ; Upton *et al.*, 1991 ; Upton *et al.*, 1992) et de *serp2*, qui venait d'être identifié dans notre groupe (Petit *et al.*, 1996). Un travail d'analyse fine de la délétion du SG33 répondait à un double objectif : caractériser la souche et mettre en évidence de nouveaux gènes viraux, éventuellement impliqués dans le pouvoir pathogène du virus myxomateux. Notre démarche a consisté en plusieurs étapes :

- Localiser de la manière la plus précise possible la région délétée sur le SG33, en réalisant d'abord des profils de restriction en électrophorèse classique ou en champs pulsés, puis des hybridations en Southern-blots.
- Sous-cloner et séquencer les fragments d'ADN (de la souche sauvage T1) correspondant à la délétion du SG33.
- Identifier les cadres de lecture ouverts correspondants et caractériser les produits de ces gènes (i) en analysant la séquence, (ii) en étudiant l'expression de la protéine dans la cellule infectée, (iii) en construisant des virus mutants délétés, permettant d'évaluer l'implication de chaque gène dans la pathogénicité du virus myxomateux.

## I- MATERIEL ET METHODES

### 1. Virus et cellules

Les souches Toulouse 1 (T1) et SG33 de virus myxomateux (VM) sont cultivées sur cellules de rein de lapin (RK13), en milieu minimum de Eagle modifié selon Dubelcco, supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, sous atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont multipliées tous les 3-4 jours: elles sont trypsinées pendant quelques minutes, puis décollées du support et centrifugées; elles sont ensuite réparties dans de nouvelles boîtes.

En vue de la production de la protéine Serp3 en système baculovirus-cellules d'insectes, le baculovirus sauvage AcNMPV et le virus recombinant BakSerp3 sont cultivés sur les cellules d'ovaires d'insectes Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Ces cellules étaient entretenues en milieu Sf 900 II (Gibco BRL) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal.

En vue des analyses en cytométrie de flux, les cellules BGMK (*Baby Green Monkey Kidney*) sont cultivées en milieu minimum de Dulbecco supplémenté avec 2% de sérum de veau foetal.

### 2. Production d'ADN viral

La production d'ADN viral purifié est effectuée par électrophorèse en champs pulsés.

Une boîte de cellules RK13 est infectée avec 0.1 à 0.5 pfu/cellule. Le virus est récolté lorsque l'effet cytopathique est très marqué (24 à 48 h post-infection) en raclant les cellules.

Les cellules sont centrifugées et rincées dans du PBS+40mM d'EDTA. Le culot est repris dans 2 ml de PBS-EDTA, puis mélangé à 2ml d'agarose à bas point de fusion (LMA Pharmacia) à 1.5% maintenu en surfusion à 42°C. Le mélange est coulé dans des moules à inserts. Les inserts ainsi obtenus sont ensuite incubés une nuit dans du tampon de lyse (1% Sarkosyl, 100µg/ml de Protéinase K, 10mM TrisCl pH7.5, 200mM EDTA). Les inserts sont rincés deux fois dans un mélange de TE +20µM PMSF puis dans du TBE 0.5X. Les inserts sont prêts pour l'électrophorèse en champs pulsés (voir § 4.2). Après migration, l'ADN viral est nettement séparé du génome cellulaire et de l'ADN mitochondrial. Il est récupéré par électroélution.

### 3. Electrophorèse d'ADN classique

Les gels d'électrophorèse classique sont préparés avec 0,5 à 1,5 % d'agarose et 0,5 % de bromure d'éthidium en solution de TBE (Tris Borate EDTA). Après fusion, la solution est coulée sur support plastique.

Les échantillons sont préparés en ajoutant 1/ 10 du volume de tampon d'échantillon 10 X: 200 mM EDTA, 50% glycérol, 0,2 % de bleu de bromophénol. Charger les échantillons dans les puits du gel en incluant un marqueur de poids moléculaire (marqueur 1 Kb Gibco BRL). La migration de l'ADN se fait sous une tension de 20 à 100 volts, après quoi le gel est observé et éventuellement photographié sur une table à U.V.

#### **4. Electrophorèse d'ADN en champs pulsés**

Le recours à l'électrophorèse en champs pulsés est très précieux lorsque l'on doit séparer de gros fragments d'ADN : il est largement utilisé pour l'analyse génétique du virus myxomateux (ref Fred et al.).

##### 4.1. Préparation des inserts

Une boîte de 175 cm<sup>2</sup> est infectée avec 0,1 pfu par cellule de virus myxomateux de souches T1 ou SG33. 36 à 48 h après infection, les cellules sont récoltées par raclage et centrifugées : le culot cellulaire est repris dans 1 ml de tampon TE et broyé à l'aide d'un homogénéisateur de Dounce. Après centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes, le surnageant est mélangé à un volume égal d'agarose à bas point de fusion (LMA) à 1,5 % maintenu en surfusion à 56 °C. La préparation est coulée dans des moules à inserts.

Un 1/2 insert est découpé et placé dans un tube eppendorf. Il est mis à incuber 15 minutes avec 1 ml de tampon de l'enzyme utilisée pour la digestion. On retire 850 µl de tampon et l'on rajoute 25 unités d'enzyme : l'ensemble est mis à incuber 16 heures à température adéquate (le plus souvent 37°C). L'insert peut ensuite être utilisé pour l'électrophorèse.

##### 4.2. Préparation du gel et migration

Le gel est constitué d'un mélange de 130 ml d'agarose 1% dans du tampon TBE 0,5X. Le gel est coulé à 56°C : les inserts peuvent être placés dans les puits. La migration est effectuée à 10°C pendant 11 heures dans du tampon TBE 0,5 X à 275 volts : les champs électriques alternent toutes les 12,5 secondes. Après migration, le gel est coloré 20 minutes au BET (10µg/ml) et décoloré 20 minutes dans de l'eau : il peut ensuite être observé et photographié sur une table à U.V.

## **5. Hybridations en Southern-blot ou en dot-blot**

### 5.1. Transfert d'un gel d'ADN sur membrane de nylon

Les gels d'ADN sont transférés passivement par capillarité:

Le gel est d'abord soumis à un traitement visant à dénaturer l'ADN. Il est soumis à trois bains:

- ☞ dépurination (HCl 250 mM) pendant 15 minutes.
- ☞ dénaturation (NaOH 0,5M, NaCl 1,5 M) pendant 30 minutes.
- ☞ neutralisation (Tris NaCl pH7,5 0,5 M, NaCl 3 M) pendant 30 minutes.

Un montage de transfert est ensuite réalisé : il permet la remontée par capillarité du tampon 20X SSC, ce qui entraîne le transfert de l'ADN du gel à la membrane. Après le transfert qui s'effectue sur une nuit, la membrane est fixée en l'exposant 3 minutes aux U.V, puis elle peut être séchée avant d'être utilisée.

### 5.2. Marquage de la sonde d'hybridation

Nos sondes ont été préparées par random priming ou au cours d'une amplification par PCR en utilisant des nucléotides marqués à la digoxygénine.

#### Marquage froid à la digoxygénine par random priming (kit Boehringer)

On dénature 100 ng à 2 µg d'ADN dans un volume de 15 µl par ébullition pendant 10 minutes. On ajoute rapidement 2 µl du mélange d'hexanucléotides, 2 µl de tampon de réaction 10X et 2 µl d'un mélange de dNTP (1mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65mM dTTP, 0,35 mM dig-dUTP). On ajoute 1 µl (5 unités) d'ADN polymérase de Klenow. L'ensemble est mis à incuber pendant une nuit.

#### Marquage radioactif

On dénature 200 ng d'ADN et 75 ng d'amorces aléatoires (random primers). On ajoute 4 µl de tampon HEPES pH 6,6, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dithiothréitol, puis 1µl de solutions 5mM de dGTP, dCTP, dTTP, et 3 µl d'ATP marqué au <sup>32</sup>P (10 µCi/ml) et 1 µl (5 u) d'ADN polymérase de Klenow. On laisse incuber sur la nuit.

### 5.3. Hybridation de l'ADN

On préhybride la membrane avec du tampon d'hybridation (formamide 50%, 5X SSC, solution de blocage 2X (Boehringer), 0,01 % N-laurylsarcosine et 0,02 % SDS), à 42 °C pendant 2 heures ou plus.

50 à 200 ng de sonde préalablement dénaturée par ébullition est mélangée à un petit volume de tampon d'hybridation (2,5 ml pour 100 cm<sup>2</sup> de membrane) : ce mélange remplace la solution de préhybridation et est laissé en incubation avec la membrane pendant au moins 6 heures (le plus souvent sur la nuit).

#### 5.4. Révélation de la sonde marquée

Après hybridation, la membrane est lavée deux fois dans du tampon 2X SSC dans 0.1% SDS. si le marquage est radioactif, la membrane est mise à exposer avec un écran renforçateur. Si la sonde est marquée à la digoxygénine, on procède à une détection chemoluminescente (protocole Boehringer):

La membrane est lavée dans du tampon de lavage : 0.3% tween dans du tampon 1 (0.1M Ac.maléique, 0.15M NaCl,pH7.5). Incuber 30 minutes dans du tampon 2 (10% de solution de blocage 10X dans le tampon 1). Diluer les

fractions Fab anti-Dig-AP (Boehringer) au 1/10000<sup>e</sup> : 2 µl dans 20 ml de tampon 2 : incuber 30 minutes. Laver 2 fois dans 100 ml de tampon de lavage. Equilibrer 5 minutes dans du tampon 3 (Tris Cl 0.1M pH9.5, NaCl 0.1M, MgCl<sub>2</sub>

50mM). Incuber 5mn dans du CDP star® dilué au 1/100<sup>e</sup>. Appliquer sur un papier Whatman 3MM et sceller dans un sac à hybridation : exposer au moins 30 minutes à un film ECL (Amersham).

## 6. Amplification par polymérisation en chaîne (PCR)

Les amorces que nous avons utilisées ont été synthétisées à façon par les sociétés Eurobio et Genosys. Le tableau X indique les noms, les localisations et les séquences des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

Préparation du mix de réaction :

Pour 100 µl de réaction:

Tampon de réaction 10X : 10µl

Mélange de dNTP 10X: 10µl

6 UI de Taq polymérase: 1,5µl

Amorces 5' et 3' à 10mM: 2,5µl de chaque  
compléter à 100µl d'eau nanopure

Le mix est réparti dans les tubes de réaction dans lesquels on rajoute l'ADN cible (20 ng), puis une goutte d'huile minérale. Les cycles d'amplification sont réalisés dans un thermocycleur Perkin-Elmer: une étape de dénaturation à 94°C

puis 25 cycles d'amplification sont réalisés

1 minute à 94°C

1 minute d'hybridation au  $T_m - 5^\circ\text{C}$

2 minutes d'élongation à 72°C

NB: le  $T_m$  est calculé :  $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$

5  $\mu\text{l}$  de chaque réaction est déposé sur gel d'agarose à 0.7%.

Pour réaliser un marquage à la digoxygénine pendant la PCR, utiliser des dNTP marqués.

## **7. Préparation d'ADN plasmidique**

Deux techniques sont utilisées: la minipréparation (miniprep) et la préparation en grand volume par la méthode Qiagen®.

### **7.1 préparation d'ADN par Miniprep**

une culture bactérienne est effectuée sous un volume de 3 ml sur la nuit.

Le milieu de culture est centrifugé à 5000 rpm pendant 5mn.

Le culot est repris dans 100  $\mu\text{l}$  de TE (10mM Tris Cl pH7.5 , 0.1mM EDTA). Ajouter 200  $\mu\text{l}$  de solution S: 0.2 M NaOH, 1% SDS, 10mM EDTA). Laisser incuber quelques minutes. Ajouter 50  $\mu\text{l}$  de 3M KAc pH4.8. Laisser 5mn dans la glace. Centrifuger à 10.000 rpm pendant 15mn. Récupérer le surnageant et rajouter 450  $\mu\text{l}$  de LiCl 5M. Laisser 30 mn à  $-20^\circ\text{C}$ . Centrifuger à 10.000 rpm pendant 30 mn et précipiter le surnageant avec un volume égal d'isopropanol froid. Le culot est repris dans 200  $\mu\text{l}$  d'eau. Après un traitement au phénol et au chloroforme, une précipitation est effectuée avec 20  $\mu\text{l}$  de NaAc 3M et 1ml d'éthanol froid, à  $-20^\circ\text{C}$  . Centrifuger à 10.000 rpm pendant 20mn, rincer le culot avec de l'éthanol 70%. Le culot est finalement repris dans 50  $\mu\text{l}$  d'eau ou de TE.

### **7.2. Préparation d'ADN sur colonnes Qiagen®**

Nous nous conformons aux indications du fabricant. La culture est réalisée sous un volume de 100 ml. Le culot bactérien est d'abord repris dans 4ml de tampon P1 (50mM TrisCl pH8, 10mM EDTA) additionné de RNase. On ajoute 4ml de tampon P2 (200mMNaOH, 1% SDS) puis après une courte incubation à température ambiante, 4ml de tampon P3 (3M KAc). Incuber 15mn dans la glace. Centrifuger à 10.000 rpm pendant 30 mn. Le surnageant est passé sur une colonne préalablement équilibrée avec 10 ml de tampon d'équilibration (750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% éthanol, 0.15% Triton). La colonne est ensuite lavée puis l'élution est effectuée avec 5 ml de tampon d'élution (1.25M NaCl, 50mM TrisCl, 15% éthanol). L'ADN est ensuite précipité avec un volume

égal d'isopropanol. Centrifuger 30 mn à 10.000 rpm puis reprendre le culot dans 10 µl d'eau ou de TE.

### **8. Digestion d'ADN plasmidique ou viral**

Digérer l'ADN avec une unité d'enzyme par µg d'ADN, et le tampon 1X compatible avec l'enzyme. Si l'on réalise plusieurs digestions, elles peuvent être faites en même temps si les tampons sont compatibles, ou l'une après l'autre, en commençant par l'enzyme dont le tampon a la plus faible molarité. Les digestions peuvent se faire sur une durée de une heure à toute une nuit. Une digestion partielle peut être réalisée pour cartographier un fragment d'ADN : la solution la plus efficace consiste à ramener le temps de digestion à quelques minutes, puis à inactiver l'enzyme avec de l'EDTA.

### **9. Préparation de bactéries compétentes**

Une culture d'*Escherichia coli* (souche DH5-α) est réalisée sur la nuit dans 3 ml de milieu LB. On ensemence 50 ml de milieu LB avec 0.5 ml de cette pré-culture. On pousse la culture pendant 2 heures environ.

Les cellules sont laissées dans la glace 30mn, puis elles sont centrifugées 5 mn à 5000 rpm (à +4°C°). Le surnageant est drainé et le culot est resuspendu dans 10ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM froid : laisser 60mn dans la glace, puis centrifuger 5mn à 5000 rpm à +4°C. Le culot est resuspendu dans 2ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM froid : les bactéries sont prêtes pour la transformation.

### **10. Transformation**

Mélanger l'ADN plasmidique (10 à 500 ng) avec 200 µl de bactéries compétentes. Incuber 30 minutes dans la glace, puis procéder à un choc thermique en incubant 2mn à 42°C. Remettre dans la glace pendant 5mn puis rajouter 800 µl de milieu LB et incuber 1h à 37°C. Etaler 200 µl sur une boîte LB-agar (+100µg d'ampicilline / ml).

### **11. Clonage**

Digérer l'ADN que l'on veut cloner (insert) et le vecteur, avec la ou les enzymes appropriée(s). Vérifier sur gel que les digestions sont totales et purifier les ADN sur gel d'agarose à bas point de fusion en utilisant le kit Jetsorb (société Genomed). Si l'on a digéré le vecteur avec une seule enzyme, traiter à la phosphatase alcaline (CIP Promega) pendant 1h à 37°C : ceci évite que le

vecteur ne se religue sur lui-même. Inactiver la CIP par 15 mn à 70°C, et purifier l'ADN au phénol puis au phénol-chloroforme. Précipiter l'ADN. On mélange le vecteur avec l'insert dans un rapport donné par la formule:

$$\text{quantité d'insert} = \text{quantité de vecteur (ng)} \times \frac{\text{taille de l'insert}}{\text{taille du vecteur}} \times 3$$

La ligation s'effectue à 14°C avec une unité de ligase dans du tampon de ligation 1X (tampon de ligation 10X : 5mM ATP, 300mM TrisCl pH7.8, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT).

Pour faire une ligation bouts francs, utiliser 10 fois plus de ligase.

En cas de clonage d'un produit de PCR, on peut utiliser le vecteur pGEM-T (Promega) : ce vecteur possède au niveau du site de clonage des thymidines terminales, cohésives avec les extrémités Adénylées créées par la plupart des polymérases thermostables. Le clonage est cependant non-orienté.

## **12. Séquençage**

Il est réalisé selon la méthode enzymatique (méthode de SANGER), par la société Génome Express à Grenoble. Les séquences sont réalisées à partir d'amorces "universelles" M13 et M13 reverse que l'on retrouve sur la plupart des vecteurs, puis si l'insert a une taille supérieure à 1 Kb, des amorces sont synthétisées à partir des extrémités de ces premières séquences pour réaliser une deuxième série jusqu'au chevauchement. Dans un premier temps un séquençage simple brin est réalisé, un séquençage double brin étant éventuellement effectué pour confirmation de séquence.

## **13. Analyse informatique des séquences**

Le logiciel DNA-strider® a été largement utilisé pour la mise en évidence des ORF et des principaux caractères de la structure primaire des polypeptides déduits. Il nous a permis de déterminer les profils d'hydrophobicité d'après l'algorithme de Kyte et Doolittle. Les recherches d'homologies avec des séquences protéiques (ou nucléotidiques) connues a été effectué en consultant le logiciel BLAST sur le serveur *Medline* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Les alignements avec les séquences les plus homologues ont été effectués avec les logiciels FASTA et PRETTYBOX. La recherche de motifs structuraux s'est effectuée en consultant le logiciel PROSITE (<http://expasy.hchuge.ch/cgi-bin>) ou le serveur ProDOM (<http://protein.toulouse.inra.fr>). Pour la recherche de

domaines transmembranaires nous avons consulté la base de données TmPred : ce serveur est en effet spécialisé dans la prédiction de domaines transmembranaires et propose l'orientation la plus probable de la protéine.

#### **14. Modélisation de Serp3**

Un modèle moléculaire de serp3 a été construit en utilisant le logiciel MODELLER (Sali and Blundel, 1993) et QUANTA (M.S.I. Inc.). La structure de l' $\alpha$ -antitrypsine a été obtenue d'une banque de données ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) et utilisée comme matrice. Les structures protéiques (figure 14A et 14B) ont été obtenues en utilisant le logiciel Molscript (Kraulis, 1991).

#### **15. Production de Serp3 en système baculovirus-cellules d'insectes**

Le gène serp3 a été cloné dans un vecteur pMBac (Stratagène) permettant le relargage de la protéine dans le surnageant. Les virus recombinants Bakserp3 ont été sélectionnés sur la base de leur phénotype LacZ. Les cellules Sf9 ont été infectées avec le virus BakSerp3 et le surnageant a été récolté 4 jours post-infection. La protéine recombinante a été utilisée sous sa forme native ou sous forme purifiée par chromatographie avant d'être administrée à des lapins dans le cadre de programmes d'immunisation, à raison de 3 à 4 injections de 200 $\mu$ g de protéine par voie intradermique à 3 semaines d'intervalle.

#### **16. Construction de fusions avec la GFP (*green fluorescent protein*)**

Des vecteurs d'expression de fusions ont été construits en sous-clonant le gène *mv-lap* (nucléotides 1 à 621) ou sa région N-terminale (nucléotides 1 à 276) sous la dépendance d'un promoteur CMV. Les produits de PCR ont été digérés par les enzymes *NdeI* et *SmaI* et insérés dans les sites correspondants sur le vecteur pEGFP (Clontech). L'intégrité des gènes en fusion a été vérifiée par séquençage.

#### **17. Transfection de cellules RK13 ou BGMK**

Des cellules subconfluentes ont été transfectées avec les vecteurs pEGFP contenant les fusions GFP. Un mélange de plasmides et de liposomes était déposé sur le tapis cellulaire. 24h post-transfection, le tapis cellulaire était rincé en vue d'une observation en microscopie confocale ou d'une analyse en cytométrie de flux.

#### **18. Observations des cellules transfectées en microscopie confocale**

Des cellules RK13 cultivées sur des lames LabTek (Nunc) ont été fixées 24 h post-transfection à la paraformaldéhyde (PFA) 4%, en tampon PBS. Après rinçage, les lames ont été montées sous lamelle en PBS-glycérol et observées au microscope confocal Zeiss avec un objectif 63X.

#### **19. Analyses des cellules transfectées en cytométrie de flux**

24h post-transfection, les cellules BGMK ont été détachées de leur support en les incubant 15min en tampon PBS EDTA 2mM, puis rincées en tampon PBS-BSA1% et incubées 30min à 4°C avec des anticorps monoclonaux conjugués avec la phycoerythrine (PE) dirigés contre les molécules de classe I du CMH humain (haplotypes A, B et C), Fas-CD95 ou le récepteur de la transferrine (CD71) (PharMingen Becton Dickinson). Après rinçage, les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson).

## II- RESULTATS

### 1- Cartographie de la zone de délétion sur la souche SG33

La localisation de la délétion repose sur la comparaison de profils de restriction en électrophorèse classique ou en champs pulsés, et sur la réalisation de southern-blots permettant d'affiner la carte, notamment dans la région inversée terminale.

#### 1.1. Profils de restriction

Les profils de restriction permettent une cartographie approximative:

La digestion de l'ADN viral par l'enzyme Hind III entraîne la formation de fragments de grande taille: la discrimination des produits de digestion nécessite le recours à l'électrophorèse en champs pulsés: le fragment B-Hind III apparaît délété d'environ 13 Kb sur l'ADN du SG33 par rapport à celui de la souche de référence T1. La délétion concerne donc l'extrémité droite du génome viral (figure 12).

Le profil de digestion par *Pvu* II, réalisé par électrophorèse en gel d'agarose classique, permet de confirmer un polymorphisme important au niveau des fragments D, E et F, tous situés près de l'extrémité droite du génome viral (figure 13): il semble que le fragment D ait disparu et il est en tout cas confirmé que la RIT droite est fortement délétée. La délétion affectant la région inversée terminale droite, nous avons dû trouver un moyen d'analyser cette zone en la distinguant de l'autre extrémité du génome. Parmi les cartes dont nous disposions, seule la digestion par *Pvu* II permettait de faire cette distinction entre les deux régions inversées terminales: nous avons donc largement utilisé le profil *Pvu* II sur lequel nous avons réalisé des hybridations avec différentes sondes. En totalisant les tailles des fragments obtenus sur ce profil, on constate que le génome du SG33 fait environ 148 Kb, ce qui correspond à une délétion totale de 15 Kb.

#### 1.2. Hybridations en Southern-blots

Nous avons affiné la carte du SG33 en utilisant des sondes d'hybridation correspondant soit à des fragments d'ADN viral dont nous disposions au laboratoire, soit à des produits d'amplification de gènes décrits dans cette région.

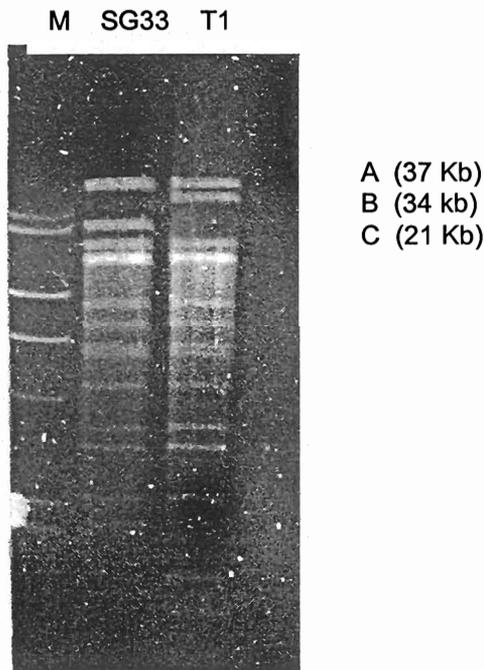


Figure 12. Profils de restriction *Hind*III des souches T1 et SG33 par électrophorèse en champs pulsés. Noter la modification du fragment B.

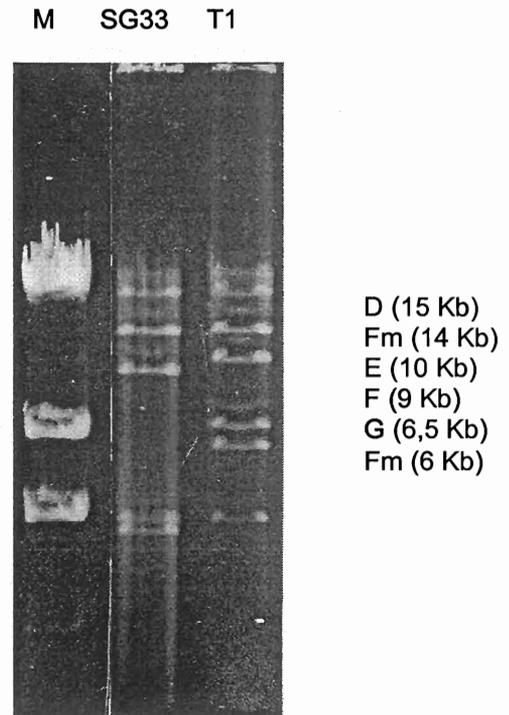


Figure 13. Profils *Pvu*II des souches T1 et SG33 en électrophorèse classique. Les fragments D, E et F sont profondément remaniés. Fm = fragment modifié.

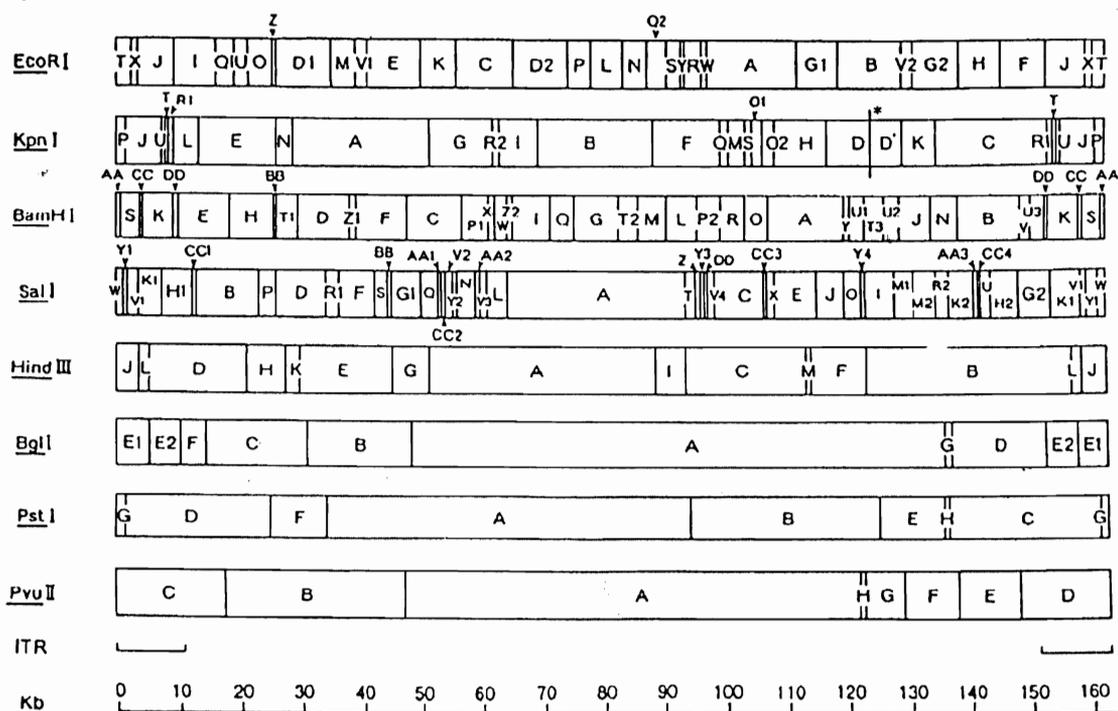


Figure 14. Carte de restriction du génome du virus myxomateux (modifié d'après Russel et Robbins, 1989)

Nous avons pris appui sur la carte de restriction du génome du VM (Russel et Robbins, 1989) (Figure 14).

### ***Détermination de la jonction centrale de la délétion***

#### Hybridation de la sonde B-EcoR I sur profil Hind III et EcoR I

Ce Southern-blot nous montre que la région couverte par la sonde B-EcoR I, à cheval sur les fragments B et F / Hind III, est préservée sur le SG33 : nous avons donc exploré une région plus externe du fragment B-Hind III (résultat non montré).

#### Hybridation de la sonde H-EcoR I sur un profil EcoR I (figure 15)

Ce Southern-blot montre que le fragment H-EcoR I est partiellement délété : sa taille est de 3,5 Kb contre 7,2 Kb sur la souche sauvage : nous considérons donc qu'une jonction de la délétion doit se localiser au niveau de ce fragment. La cartographie de H-EcoR I sera poursuivie dans le cadre de la démarche de clonage.

### ***Détermination de la jonction périphérique de la délétion***

L'hybridation de la sonde J-EcoR I sur les profils EcoR I et Hind III transférés sur membrane de nylon (Figure 16) confirme que le fragment J-EcoR I est totalement délété au niveau de la RIT droite : en effet, sur le profil EcoR I, on note une bien moindre intensité de la bande correspondant au fragment J (6.4 Kb) sur le SG33, ce qui laisse supposer qu'elle n'est qu'en une seule copie sur cette souche; en outre, sur le profil Hind III, cette même sonde hybride sur le T1 avec les fragments B et D, correspondant aux 2 RIT, alors que sur le profil SG33, elle n'hybride qu'avec le fragment B (RIT gauche). L'hybridation de cette même sonde sur un profil *Pvu* II donne un résultat similaire (résultat non montré). Pour aller à l'extrême limite des séquences connues sur le génome du virus myxomateux, nous avons réalisé par amplification (PCR) une sonde correspondant au gène T2 (Upton *et al.*, 1991), marquée à la digoxygénine pendant la PCR : l'hybridation de cette sonde sur un profil *Pvu* II nous donne le même résultat que précédemment (Figure 17) : Il semble donc que la RIT droite soit largement délétée sur la souche SG33.

### **1.3. premier bilan de l'étude cartographique**

Il apparaît que la délétion couvre en fait une zone plus importante que prévu : la RIT droite est largement délétée, ce qui ne pouvait être mis en évidence que par recours à l'hybridation.

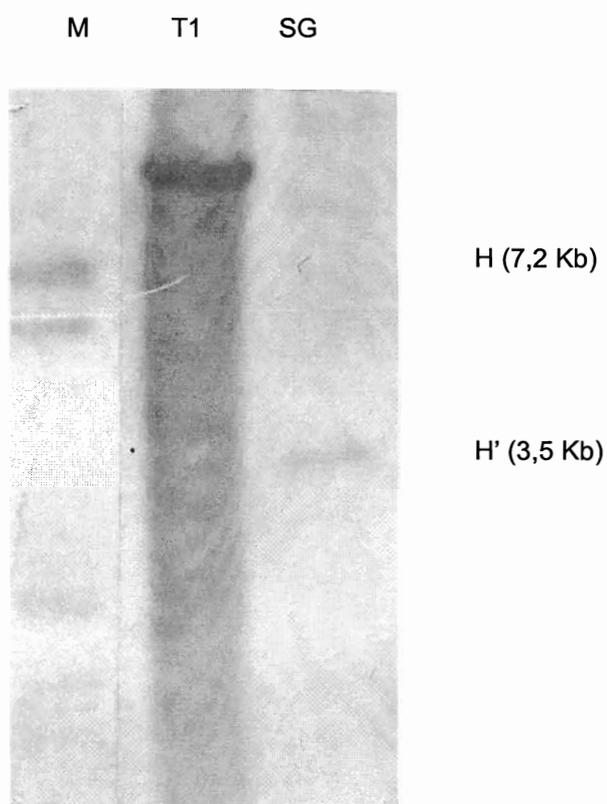


Figure 15b. Hybridation de la sonde H-*EcoR* I sur le profil *EcoR* I transféré sur membrane : le fragment H est modifié sur le SG33.

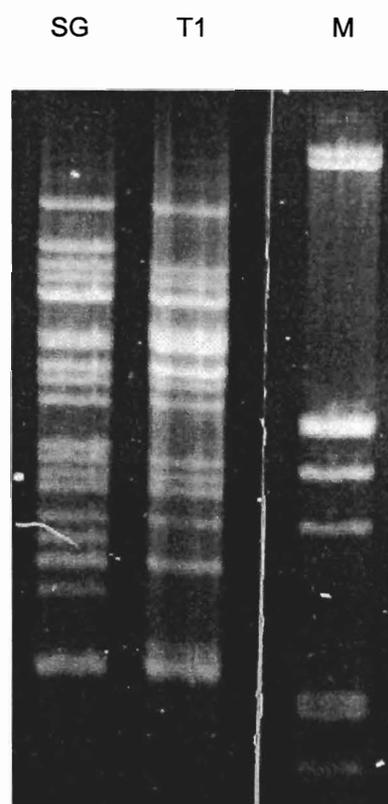


Figure 15a. Profils *EcoR* I d'ADN de T1 et SG33.

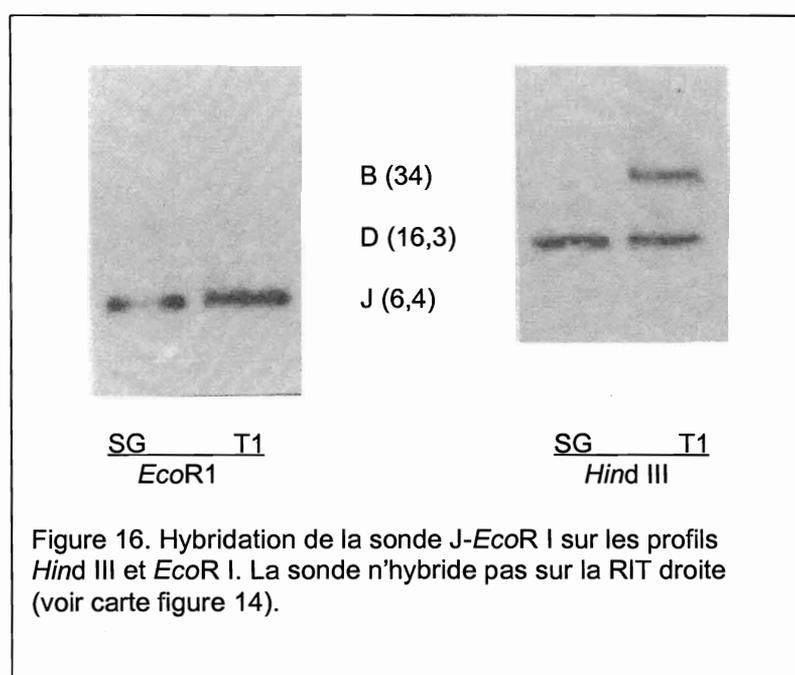


Figure 16. Hybridation de la sonde J-*EcoR* I sur les profils *Hind* III et *EcoR* I. La sonde n'hybride pas sur la RIT droite (voir carte figure 14).

La jonction semble localisée au niveau du fragment H-EcoR I, si l'on considère que la délétion est unique : ce résultat sera affiné et validé au cours des travaux de sous-clonage (Figure 18).

## **2- Sous-clonage de la région délétée**

La stratégie retenue pour le sous-clonage repose sur deux principes:

Nous avons décidé de ne pas nous intéresser à la région inversée terminale qui est en double copie sur le génome du virus myxomateux, (une copie est -au moins partiellement- préservée chez le SG33, Cf. Figure16) et qui a fait l'objet de travaux approfondis de la part du groupe canadien de Grant McFadden.

Nous nous sommes appuyés sur les acquis et les outils du laboratoire : ainsi, le clone H-EcoR I a été cartographié et sous-cloné et les quelques rares séquences connues dans cette région (*SERP-1*, situé dans la RIT et *serp2*, à l'extérieur de celle-ci) nous ont permis d'amplifier par PCR et de sous-cloner les régions manquantes.

Dans tous les cas, on s'est assuré par hybridation en dot-blot que les fragments clonés à partir d'ADN de la souche sauvage T1 étaient délétés sur le SG33.

### ***Cartographie et sous-clonage du fragment H-EcoR I***

La carte du génome viral établie par Russel et Robbins nous a amené à analyser ce fragment par digestion avec l'enzyme *Sa*II. La digestion de H-EcoR I par *Sal* I aboutit à 4 fragments de 3.2, 1.7, 1.6 et 0.7 Kb respectivement (le fragment de 3.2 Kb est lié au vecteur bluescript, ce qui donne une taille totale de 6.2 Kb).

Une digestion partielle par *Sa* I, réalisée en ramenant le temps de digestion à 1 à 2 minutes, permet d'ordonner les différents sous-fragments par recouplement des différents produits de digestion partielle et par référence à la carte de Russel et Robbins (Russel et Robbins, 1989). Nous avons décidé de sous-cloner les 3 sous-fragments de 0.7, 1.6 et 1.7 kb, qui sont probablement délétés sur l'ADN du SG33.

Les produits d'une digestion totale d'ADN du plasmide H-EcoR I par *Sa*II sont clonés en vecteur bluescript.

Les différents sous-clones s'avèrent ne pas hybrider en dot-blot avec l'ADN de la souche SG33 (non montré) : les inserts correspondants sont donc séquencés.

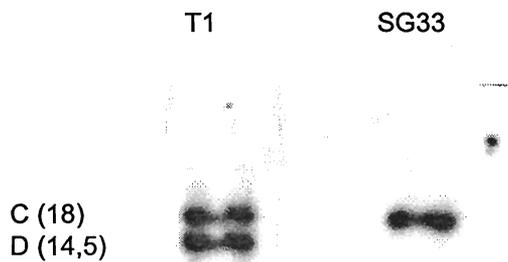


Figure 17. Hybridation de la sonde T2 sur des profils *Pvu* II de T1 et SG33. Le gène T2 est délété dans la RIT droite

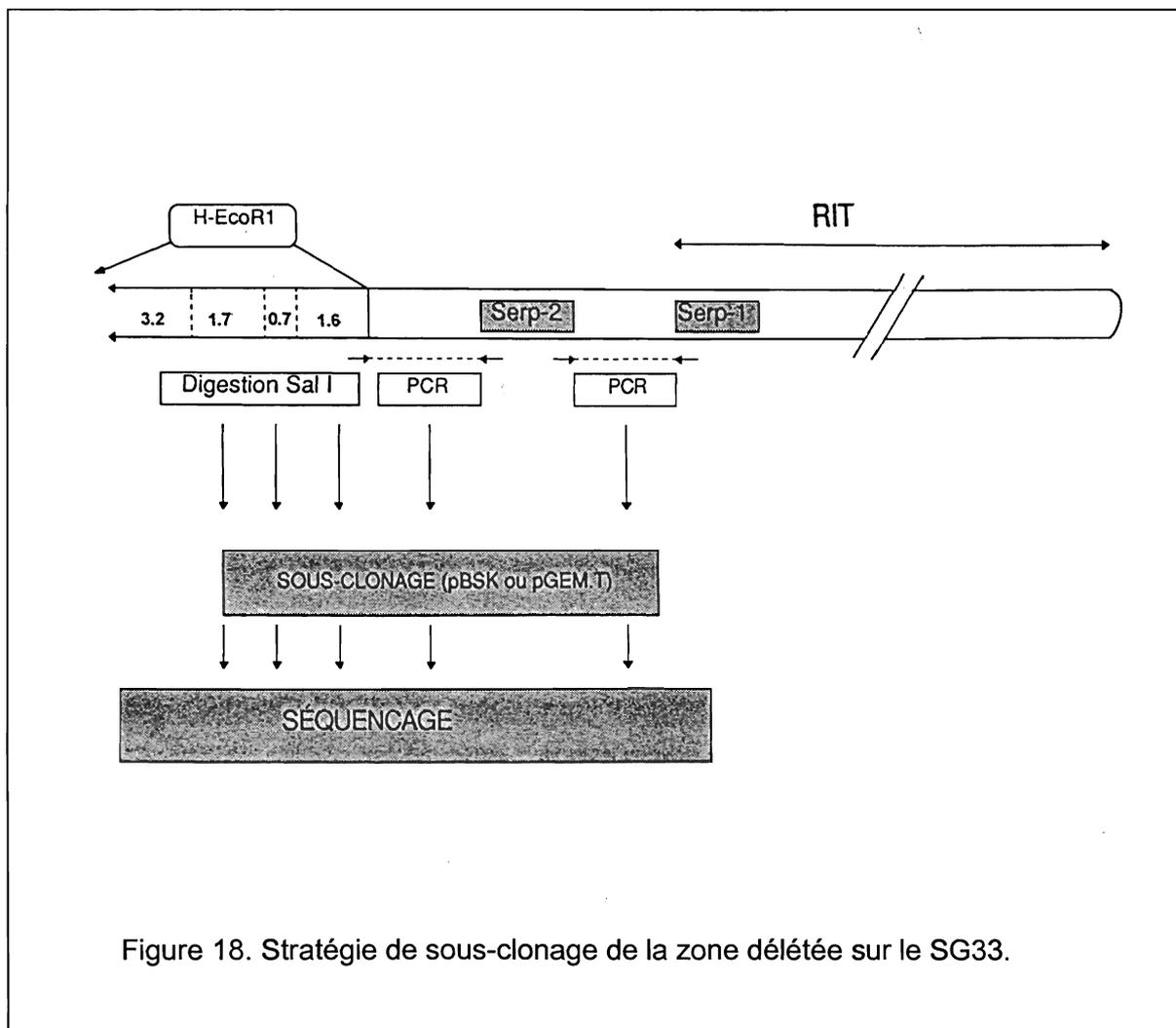


Figure 18. Stratégie de sous-clonage de la zone délétée sur le SG33.

### ***Sous-clonage de l'intervalle entre SERP-1 et serp2***

Un couple d'amorces est sélectionné aux extrémités 5' de *serp-1* et 3' de *serp-2* afin d'amplifier par PCR l'intervalle entre ces deux cadres de lecture. Un amplicon de 2,2 Kb est obtenu à partir de l'ADN de la souche T1; aucune amplification n'est obtenue avec l'ADN du SG33.

Cet amplicon est purifié sur gel, cloné en vecteur pGEM-T, et séquencé à l'aide des amorces M13 et M13 reverse.

### ***Sous-clonage de l'intervalle entre serp-2 et H-EcoR I***

Après réalisation de la séquence du fragment 1,6 H-EcoR I, situé à la borne "externe" de H-EcoR I, une amorce permettant une amplification vers *serp2* est synthétisée ; une autre amorce correspondant à l'extrémité 5' de *serp2* est choisie afin de permettre une amplification avec la borne externe de H-EcoR I. Cette amplification par PCR est réalisée : un amplicon de 2,1 Kb est obtenu à partir de l'ADN de la souche T1 (aucune amplification avec la souche SG33).

Cet amplicon est purifié sur gel et sous-cloné en vecteur pGEM-T et séquencé.

## **3- Analyse des séquences**

Les fragments séquencés sont tout d'abord ordonnés de manière à n'obtenir qu'une seule séquence; celle-ci est ensuite analysée à l'aide du logiciel DNA-strider®.

### **3.1. Mise en évidence des cadres de lecture ouverts**

Plusieurs cadres de lecture ouverts sont mis en évidence, tous orientés vers la répétition inversée terminale droite (figure 19). Les zones non-codantes sont très rares : on n'en retrouve qu'en amont de *serp-1*, au niveau de la limite de la répétition inversée terminale droite.

### **3.2. Analyse informatique des ORF**

Pour chaque ORF, une conversion en séquence protéique est effectuée, afin de rechercher des motifs caractéristiques et surtout des homologies avec des séquences publiées dans les bases de données informatiques, en utilisant les programmes BLAST, FASTA, et PROSITE consultés sur le réseau Internet. La recherche d'homologies permet de mettre en évidence trois groupes de gènes :

1. Gènes codant pour des protéines de "spectre d'hôte"

Trois séquences correspondent à des polypeptides de 675, 491 et 495 acides aminés, tous homologues avec des protéines dites de "spectre d'hôte", caractérisées par leurs motifs ankyrine répétés (consensus : GxTPLHxAxGH...) :

☞ protéine 77,2 kDa du virus du Fibrome de Shope.

☞ protéines T5 du virus du Fibrome de Shope et du virus myxomateux (Mossman *et al.*, 1995).

☞ de nombreuses protéines eucaryotes, comportant des répétitions ankyrines.

Les 3 séquences protéiques sont également fortement homologues entre elles.

Nous avons provisoirement dénommé ces gènes *Myxoma Host Range* (MHR), respectivement 1, 2, 3. Une recherche des motifs ankyrine est effectuée par comparaison avec les banques de données en utilisant le programme BLAST : elle montre que MHR1 compte 12 motifs de type "ankyrine-like", MHR2 possède 10 motifs et MHR3, 8 motifs.

L'analyse des profils d'hydrophobicité ne nous a pas fourni d'élément probant quant à la localisation des trois protéines (résultat non montré).

## 2. Gènes codant des protéines apparentées aux SERPINES

Cette séquence correspond à une protéine de 266 acides aminés. Les deux séquences en aval correspondent à des polypeptides homologues de plusieurs serpines (SERin Protease INhibitor) de poxvirus ou d'eucaryotes :

Serp2 était déjà caractérisé (Petit *et al.*, 1996) et l'autre "serpine-like", en aval, a donc été nommée Serp3.

## 3. Un gène codant une protéine « à doigts de zinc » de 206 AA

Le polypeptide correspondant à l'ORF de 621 pb est fortement homologue avec plusieurs protéines virales ou cellulaires, appartiennent à la classe des protéines à doigts de zinc, impliquées dans les interactions avec des acides nucléiques ou des protéines dans les phases précoces du cycle viral. D'ailleurs, 40 nucléotides en aval du codon stop, nous retrouvons un signal de terminaison TTTTTTGT qui évoque une expression précoce.

Ce facteur codé par le VM a été nommé MV-LAP, pour des raisons que nous évoquerons plus loin. L'ensemble de ces gènes a fait l'objet d'étude spécifiques, visant à caractériser la biologie de chaque protéine dans la cellule infectée et son implication dans la pathogénicité du virus myxomateux.

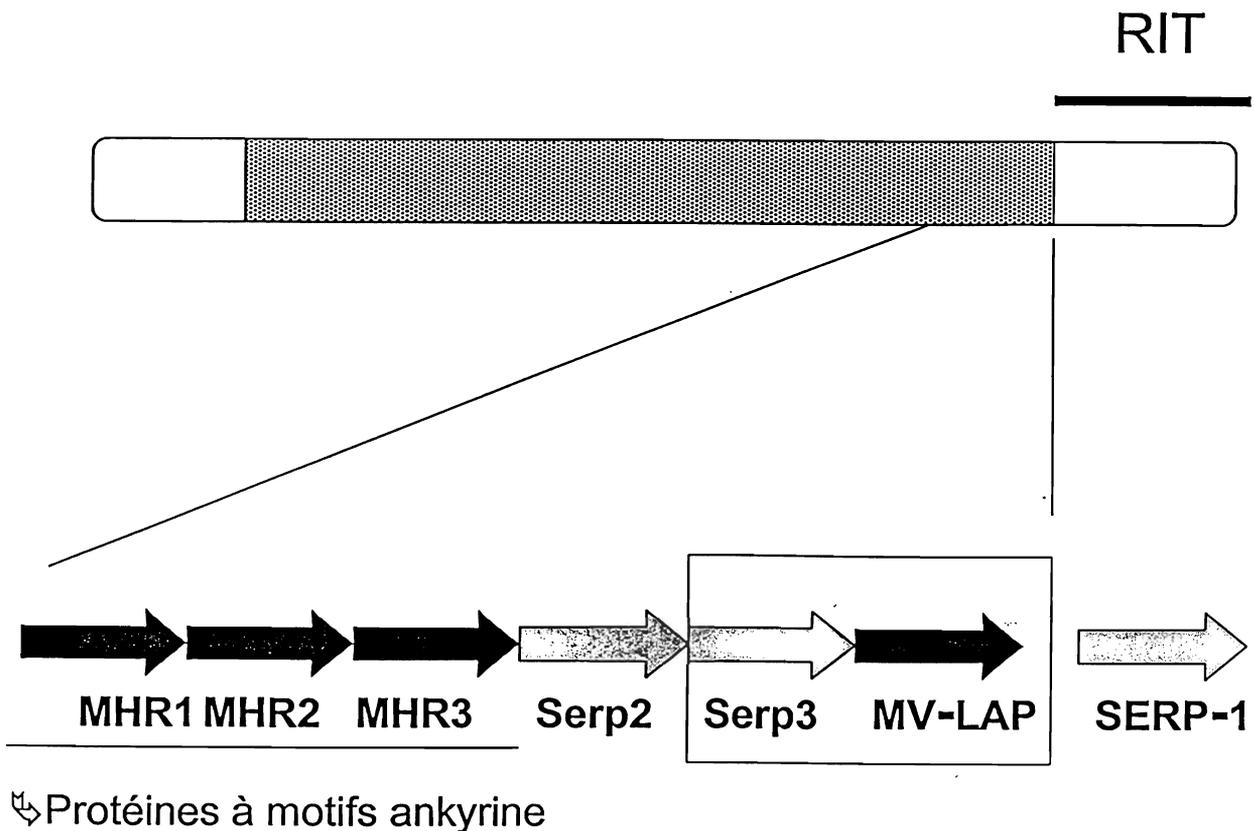


Figure 19. Représentation schématique des gènes codés en amont de la RIT droite du génome du VM. Cette zone correspond grossièrement à la délétion majeure observée sur la souche SG33

#### 4. Etude des protéines à motifs ankyrine (*Myxoma Host Range*)

L'ensemble des 3 facteurs présentant des répétitions de type ankyrine a fait l'objet d'une axe de recherche spécifique, qui a été pris en charge par le Dr Christelle Camus. Nous nous sommes consacrés à l'étude spécifique de Serp3 et MV-LAP, codés par les 2 gènes en aval de *serp2*. Nous présentons ici une synthèse des travaux réalisés dans notre groupe et qui ont notamment fait l'objet des thèses d'exercice vétérinaire d'Etienne FERRY, Laurence DEYMIER et Hélène SIX.

Les 3 ORF les plus en amont dans la séquence identifiée codent pour des protéines qui ont pour caractère commun de contenir des motifs ankyrine : ces motifs correspondent à des répétitions de blocs de 33 acides aminés plus ou moins conservés. Ces motifs sont largement répandus chez les protéines de Poxvirus : 13 des 198 protéines majeures du virus de la vaccine contiennent des répétitions ankyrine . Dans tous les cas les ORF correspondantes sont localisées près des extrémités du génome viral. Les répétitions ankyrine interviennent dans les interactions protéine-protéine et sont considérées comme des éléments clés des relations entre les protéines du cytosquelette et celles de la membrane cellulaire, sans que l'on puisse *a priori* leur attribuer des fonctions précises.

Les 3 ORF MHR-1, 2 et 3, présentent une homologie significative entre elles, de même qu'elles sont fortement homologues avec des ORF du virus du fibrome de Shope, ce qui illustre la proximité phylogénétique au sein du genre *Leporipoxvirus* (cf. synthèse bibliographique).

Ces gènes manifestement non essentiels pour la viabilité du virus pourraient intervenir dans sa capacité à se multiplier dans certains types cellulaires : ainsi, la protéine M-T5, qui contient un motif ankyrine, codée dans les RIT, permet au virus myxomateux de se répliquer sur lymphocytes de lapin (lignée RL5) en bloquant l'induction de l'apoptose (Mossman *et al.*, 1996).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de motif évoquant une insertion membranaire ou une excrétion, ce qui laisse supposer une localisation cytoplasmique. L'approche retenue pour la caractérisation du rôle des protéines MHR a été l'analyse de mutants délétés par insertion d'une cassette LacZ. Les mutants délétés de MHR1, MHR2 ou MHR3 présentent un phénotype atténué : la délétion de MHR1 entraîne un retard de plus de 48 heures dans l'évolution de l'infection (Ferry, 1999) ; la délétion de MHR2 entraîne une absence de myxomes secondaires et une diminution globale de l'intensité des signes cliniques (Deymier, 1999). Le virus délété de MHR3 présente la plus forte atténuation. La réponse inflammatoire semble en particulier modulée (Six, 1999). Une interaction avec NF- $\kappa$ B est une piste qui est explorée au laboratoire (Camus, communication personnelle). Même si aucune voie mécanistique solide n'est établie à ce jour, il est clair que cet ensemble de 3 facteurs joue un rôle dans l'expression du pouvoir pathogène du virus myxomateux.

## 5. Etude de Serp3

Les analyses de séquence nous ont indiqué une homologie indiscutable avec les SERPINES (SERine Proteinase INhibitor). Deux serpines ayant déjà été identifiées sur le VM, nous avons baptisé celle-ci Serp3. Il faut noter que la nomenclature des serpines poxvirales donne lieu à confusion, les dénominations n'étant pas cohérentes entre les genres : par exemple, la serpine SPI-1 des orthopoxvirus n'a aucune relation structurale ou fonctionnelle avec SERP1 des leporipoxvirus (Tableau 4).

Pour éclaircir les fonctions de Serp3, nous avons d'abord réalisé une analyse informatique qui a été poussée jusqu'à la réalisation d'un modèle de conformation. Nous avons ensuite essayé de caractériser la protéine, en l'exprimant en système recombinant. Enfin, nous avons construit et testé un mutant Serp3-, pour déterminer son rôle au cours de l'infection.

### 5.1. Analyse de la séquence et modélisation de Serp3

Sur la base des bons scores d'homologie globale résultant des consultations de banques de données (31% d'identité sur une séquence de 73 résidus), nous nous sommes intéressé à la région C-terminale, où est situé le site actif de toutes les serpines (Turner *et al.*, 1995). Les serpines se caractérisent par une signature, dont les résidus sont codés conventionnellement de P15 à P5', le point de scission se situant à la jonction P1-P1' (Figure 20). Ce résidu P1 au sein du centre réactionnel est une base de classification des serpines : on distingue ainsi celles qui ont comme résidu P1 une Phenylalanine [P], un aspartate [D] ou une arginine [R] (Turner et Moyer, 2001) (Tableau 4). Par comparaison, la région C-terminale de Serp3 a été alignée avec celle de plusieurs serpines cellulaires ou virales : on constate des remaniements majeurs affectant la boucle mobile («hinge region») de Serp3 (Figure 21).

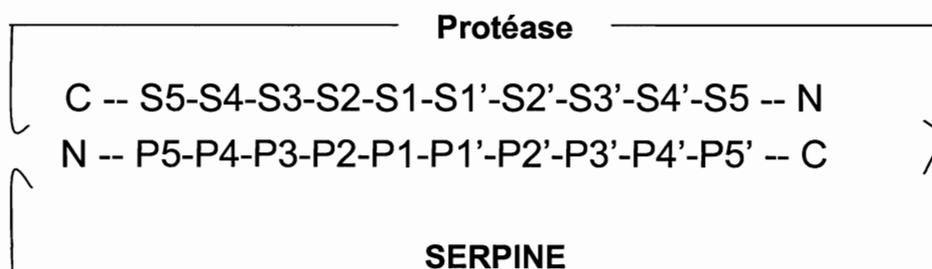


Figure 20. Nomenclature des résidus constituant le site actif d'une serpine et de sa protéase substrat.

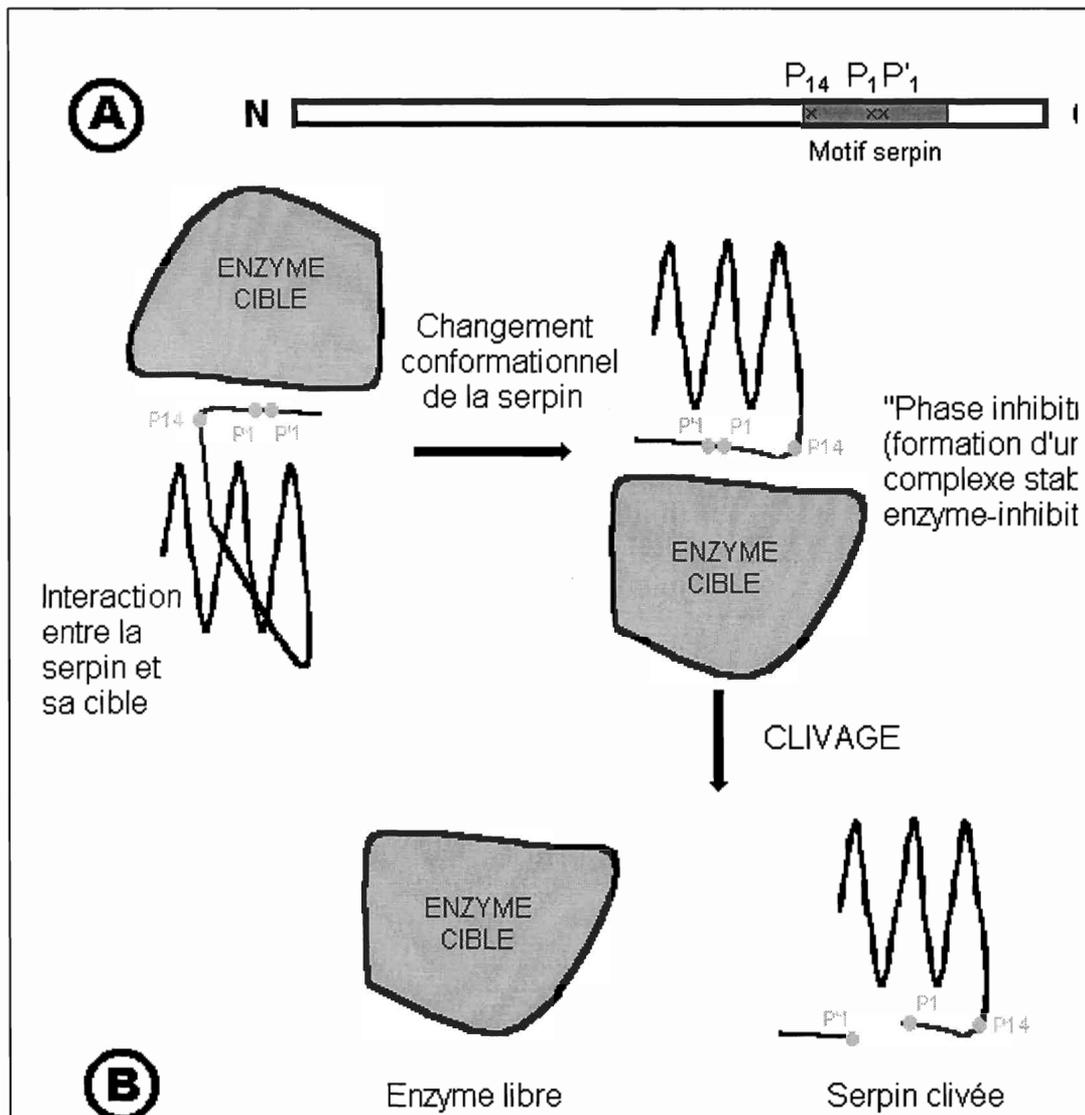
	Hinge region																																		
	P17								P8				P1P1'																						
MV-Serp3	H	R	C	R	I	T	I	T	K	T	G	V	D	A	T	A	F	S	C	V	D	G	D	T	C	T	.	.	.	.	.	.			
MV-Serp2	H	K	A	Y	I	E	V	T	E	F	G	T	T	A	A	S	C	T	Y	G	C	.	V	T	D	F	G	G	T	M	D	.	.		
VV-SPI1	H	I	T	F	I	D	V	N	E	E	Y	T	E	A	S	A	V	T	G	V	F	M	T	N	F	S	.	.	.	.	.	M	V	Y	
MV-SERP1	Q	T	S	K	I	E	A	D	E	R	G	T	T	A	S	S	D	T	A	I	T	L	I	P	R	N	.	.	.	.	.	.	A	.	
VV-SPI3	Q	N	A	K	I	D	V	D	E	Q	G	T	V	A	E	A	S	T	I	M	V	A	T	A	R	S	.	.	.	.	.	.	S	.	
SCCA2	H	K	A	F	V	E	V	T	E	E	G	V	E	A	A	A	A	T	A	V	V	V	E	L	S	.	.	.	.	.	.	S	P	S	T
Antitrypsin	H	K	A	V	L	T	I	D	E	K	G	T	E	A	A	G	A	M	F	L	E	A	I	P	M	S	.	.	.	.	.	.	.	I	
MV-Serp3	.	.	E	H	D	T	T	A	S	T	C	T	I	I	K	T	T	G	L	D	F	L	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MV-Serp2	P	V	V	L	K	V	N	K	P	P	I	F	I	I	K	H	D	D	T	F	S	L	L	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VV-SPI1	R	T	K	V	Y	I	N	H	P	P	F	M	Y	M	K	D	.	N	T	G	R	I	L	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MV-SERP1	L	T	A	I	V	A	N	K	P	P	F	M	F	L	I	Y	H	K	P	T	T	T	V	L	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VV-SPI3	P	E	K	L	E	F	N	T	P	P	F	V	F	I	I	R	H	D	I	T	G	F	I	L	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SCCA2	N	E	E	F	C	C	N	H	P	P	L	F	F	L	R	Q	N	K	T	N	S	I	L	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Antitrypsin	P	P	E	V	K	F	N	K	P	P	V	F	L	M	I	E	Q	N	T	K	S	P	L	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Figure 21. Alignement de la région C-terminale de Serp3 et de plusieurs serpines cellulaires ou virales.

En plus de cette signature, les serpines partagent des caractéristiques dans leur structure globale, qu'il fallait également retrouver. La structure secondaire d'une serpine comporte invariablement :

- **3 feuillets  $\beta$  A, B et C**, comptant chacun 6 brins notés s1A à s6A, s1B à s6B, etc...ils impliquent au total 40% des résidus de la serpine;
- **9 hélices  $\alpha$** , notées hA à hI, comprenant 30% des résidus ;
- **1 boucle réactionnelle, RCL** (pour *Reactive Center Loop*), située au sommet de la molécule, qui comprend la séquence critique évoquée précédemment.

Cette conformation est essentielle pour permettre l'exposition du site réactionnel à sa cible, puis le changement de conformation au moment du clivage (Carrell and Travis, 1985). La protéine passe de sa conformation native, « tendue » (ou S : « stressed ») en conformation « relâchée » (ou R : « relaxed »), plus stable sur le plan thermodynamique (Figure 23). Le site de clivage émane du brin 5 du feuillet A. Lors du clivage, la boucle RCL, comprenant les résidus P14-P1, s'insère dans le feuillet A, formant le brin s4A. Les résidus P1 et P1' sont alors séparés de quelques 70 Å (Whisstock *et al.*, 2000). En première intention, nous n'avons pas pu retrouver les éléments de séquence évoquant une interaction inhibitrice avec une protéinase cible et le changement de conformation irréversible qui s'en suit. Les serpinines non-inhibitrices, telle l'ovalbumine, ne sont pas capables de faire cette transition de la forme S vers la forme R, du fait notamment de contraintes structurales qui empêchent l'insertion du segment P14-P1 dans le feuillet A (Whisstock *et al.*, 1998). Une Thréonine en position P14 est également nécessaire pour assurer la mobilité de ce segment. De même, des molécules susceptibles d'opérer un encombrement stérique entre les brins s3A et s5A empêchent cette transition et agissent en inhibiteurs de la serpine (Rubin, 1996). Des travaux sont en cours pour bloquer ainsi certaines serpinines, comme le PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor type 1*) à des fins thérapeutiques (Xue *et al.*, 1998).



**Figure 22.** A. Topographie d'une serpine. Le site de clivage est situé près de l'extrémité C-terminale de la protéine. Le clivage a lieu entre les résidus P<sub>1</sub> et P<sub>1</sub>'.  
 B. Changements de conformation d'une serpine inhibitrice lors de son clivage. L'interaction entre la serpine et son enzyme cible entraîne un changement conformationnel de la serpine, dans lequel le résidu P<sub>14</sub> joue un rôle crucial. Cette interaction aboutit à la scission en P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' et l'enfouissement du segment P<sub>1</sub>-P<sub>14</sub> dans le feuillet A. Un complexe stable enzyme-serpine est formé, avant de libérer l'enzyme active et la serpine clivée. Cette dernière a totalement perdu son activité inhibitrice : la serpine doit donc être considérée comme un substrat suicide.

**Tableau 4. Les serpinés caractérisées chez les poxvirus**

(Adapté de Turner *et al.*, 1995)

NB : Les serpinés identifiées chez les avipoxvirus, dénommées FPV-SPI5, FPV SPI-6 et FPV-SPI7, ne sont pas caractérisées à ce jour. A ce titre, elles ne figurent pas dans ce tableau.

Nom « officiel »	Autres noms	Présent chez :	P.M. kDa	Promoteur	Localisation	Résidu P1	Fonctions biologiques
<b>Orthopoxvirus</b>							
SPI-1	ORF B24R	W, RPV, CPV, VAR	41	Précoce	Cytoplasm.	Phe [F]	Spectre d'hôte / Anti-apoptotique
SPI-2	ORF 13R, CrmA	CPV, VV, RPV, VAR	38	Précoce	Cytoplasm.	Asp [D]	Anti-ICE / anti-inflammatoire
SPI-3	ORF K2L	W, RPV, CPV, VAR, RCN	42 (50*)	Précoce	Membrane ?	Arg [R]	Inhibe la fusion cellule à cellule
<b>Leporipoxvirus</b>							
MYX SPI-4	SERP1	MYX, MRV	42 (55*)	Tardif	secrétée	Arg [R]	Inhibe la plasmine, l'urokinase. le C <sub>1s</sub> / anti-inflammatoire
MYX SPI-2	Serp2	MYX	34	Préc-tard	Cytoplasm.	Asp [D]	anti-inflammat. / anti-apoptotique
MYX SPI-8 ? ?	Serp3	MYX	31 (120)	Tardif	Cytoplasm ?	?	Formation des « myxomes »
<b>Suipoxvirus</b>							
SPV SPI-7	SpIA	SPV	37	Précoce	Cytoplasm.	Asp [D]	----

\* Poids moléculaire de la protéine glycosylée.

Rappel : W : virus de la vaccine ; CPV : cowpox, VAR : virus de la variole ; RPV : rabbitpox ; RCN : racoonpox. MRV : *Maalignant rabbit virus*.

Afin de clarifier la possibilité d'un caractère actif de Serp3, une collaboration a été engagée avec un biochimiste australien, James Whisstock, dont l'activité sur les relations phylogénétiques entre serpines est largement reconnue. La modélisation qui résulte de cette collaboration est riche d'enseignements. La séquence de Serp3 comporte 4 délétions, dont 2 sont *a priori* difficilement compatibles avec une fonction inhibitrice, en particulier celle qui concerne le feuillet A (entre l'hélice B et le brin s3A du feuillet A). Elle met en cause la structure secondaire de la molécule, à un endroit critique pour sa fonction. Cependant, on retrouve (i) le motif FSPVS au sommet de l'hélice B, (ii) l'asparagine au niveau du segment s3A et l'histidine dans le segment s5A et enfin, (iii) au niveau du site actif, le motif KTGVDATAFS qui signe les serpines inhibitrices. Il semble en fait que seuls les éléments essentiels soient conservés, certaines hélices étant réduites à de simples boucles permettant la connexion entre les différents feuillets (Figure 23A et B).

En bilan, sans apporter d'élément de certitude quant à la réalité d'une activité inhibitrice de Serp3, la prédiction montre qu'elle est possible, puisque Serp3 présente les caractères structuraux requis, même sous une forme minimaliste. Pour valider cette prédiction, la cristallographie de Serp3 est en cours dans le laboratoire de James Whisstock.

**Légendes de la figure 23 (page suivante) :**

**Figure 23 A.** Modélisation de l' $\alpha_1$ -antitrypsine. La majorité du feuillet A est en rouge, le feuillet B en vert et C en jaune. La boucle réactionnelle, notée RCL (Reactive Center Loop), est au sommet de la molécule, prête à rencontrer sa cible.

**Figure 23 B.** Modélisation de Serp3. Les couleurs sont les mêmes que sur la figure A. Les hélices délétées sont réduites à des boucles de connexion entre les feuillets, sans affecter la structure tertiaire de la protéine : en particulier, la boucle RCL apparaît dans une conformation compatible avec son insertion entre les brins s3A et s5A du feuillet A.



## 5.2. Analyse de l'expression dans la cellule infectée

Déterminer si une protéine est intracellulaire (comme Serp2) ou sécrétée (comme SERP-1) est essentiel pour approcher sa fonction. Nous avons donc décidé d'exprimer Serp3 en système recombinant, et notre choix s'est porté sur le système baculovirus-cellules d'insectes, respectant au mieux les modifications post-traductionnelles susceptibles d'intervenir dans la cellule eucaryote, sachant que nous avons repéré 3 sites de N-glycosylation putatifs dans la séquence de Serp3. Le système baculovirus avait aussi le gros avantage...d'être disponible au laboratoire. Si le clonage, la transfection des cellules d'insectes Sf9, le criblage des virus recombinants et, finalement, la production de la protéine n'ont pas posé de problème majeur, nous avons été surpris de constater que la protéine produite ne se comportait pas selon les « prédictions ». En effet, alors que nous attendions un poids moléculaire de 30kDa, Serp3 se présentait en SDS-PAGE sous une forme minoritaire de 60 kDa et une forme très majoritaire de 120 kDa. Ces deux formes pourraient donc correspondre respectivement à un dimère et un tétramère de Serp3. Nous ne sommes pas parvenu à dissocier ce complexe, ce qui témoigne de la force des liaisons engagées. L'oligomérisation d'une serpine n'est pas surprenante en soi et est plutôt compatible avec sa fonctionnalité. La cristallographie de cette protéine recombinante est en cours.

L'objectif, une fois Serp3 produite en grande quantité, était d'obtenir un sérum hyperimmun permettant de détecter la protéine dans la cellule. Malgré plusieurs protocoles d'immunisation avec la protéine « brute » ou purifiée en chromatographie, les sérums contre Serp3 ne nous ont jamais permis d'obtenir un signal spécifique, que ce soit en immunoprécipitation, en western-blot, ou en immunofluorescence. Pour expliquer ce résultat, nous pouvons invoquer le caractère oligomérisé, qui dans d'autres modèles, a été cité comme cause possible d'échec d'obtention d'anticorps. Nous pouvons également supposer que cette protéine est intrinsèquement peu immunogène, quelle que soit sa configuration.

Pour essayer de contourner cette difficulté, nous avons construit une fusion *serp3-gfp*, où *serp3* est dans la continuité d'un gène codant pour la *green fluorescent protein* (*gfp*). Nous avons transfecté des cellules RK13 selon le protocole classique et observé 24h post-transfection en microscopie à fluorescence l'adressage de cette fusion : nous n'avons constaté aucune

différence entre cette construction *serp3-gfp* et le vecteur *gfp* natif. Ce résultat, s'il ne permet pas d'avoir de certitude, est en faveur d'un adressage « neutre », dans le cytoplasme de la cellule infectée, sans excrétion ni localisation dans une structure membranaire ou un organite. La construction d'un virus recombinant « MV-Serp3-HA », où *serp3* est en fusion dans sa partie N-terminale avec un épitope de l'hémagglutinine, est en cours, pour vérifier l'adressage (i) dans le contexte de l'infection, (ii) en limitant les contraintes liées à la taille de la *gfp* (20 kDa) et (iii) sous la dépendance du propre promoteur de *serp3*.

## 6. Etude de MV-LAP

Le travail sur ce facteur codé par le VM obéit au départ à une démarche commune avec *Serp3* : analyse de séquence, expression de la protéine et réalisation d'un virus délété. Des avancées très récentes concernant des homologues codés par les  $\gamma$ -herpesvirus nous ont conduits à réorienter le programme...

### 6.1. Analyse de la séquence de MV-LAP

Le cadre de lecture ouvert de 621 pb en aval de *serp3* a fait l'objet d'une recherche d'homologies : il s'avère homologue avec un ensemble de protéines à motif « en doigts de zinc », cellulaires ou virales. On remarque d'emblée que l'architecture de tous les homologues viraux est très conservée (figures 24 et 25) : un domaine en doigts de zinc en N-terminal, 2 domaines transmembranaires et un segment C-terminal de longueur variable qui ne comporte aucun motif particulier. Le motif en doigts de zinc de type  $C_4HC_3$  étant dénommé LAP/PHD, nous avons baptisé ce nouveau facteur MV-LAP.



Figure 24. Architecture commune des facteurs LAP codés par les poxvirus et les herpesvirus. (TM : domaine transmembranaire).

**poxvirus**  
 MV-MVLAP CWICKEACDI-VPNYCKCRGDNKIVKECLEEWINTDVVKNSCAIC  
 SFV-153R CWICKESCDV-VRNYCKCRGDNKIVKECLEEWINTDTVKNSCAIC  
 SPV-C7L CWICKDDYSI-EKNYCNCKNEYKVVHDECMKKWIQYS--RERSCKLC  
 YLDV-5L CWICNDVCDE-RNNFCGCNEEYKVVHIKCMQLWINYS--KKKECNLC

**herpesvirus**  
 BHV4-IE1A CWICRDGESLPEARYCNCYGDLYCNEECLKTWISMS--GEKKCKFC  
 BHV4-IE1B CWICKGSEGIIDVKYCHCIGDLQYVHSECLVHWIRVS--GTKQCKFC  
 HHV8-K3 CWICNEELGNERFRACGCTGELENVHRSCLSTWLTIS--RNTACQIC  
 HHV8-K5 CWICREEVGNEGIHPCA CTGELD VVHPQLSTWLTVS--RNTACQMC  
 MHV68-IE1 CWICHQPEG-PLKRFCCCKGSCAVSHQDCLRGWLETS--RRQTCALC  
 HSV-ORF12 CLICCNIGEEELLQACDCPSR---VHHTCLQSHIQCF--KSSHCTFC  
 Consensus C--C-----C-C-----H--C-----C--C

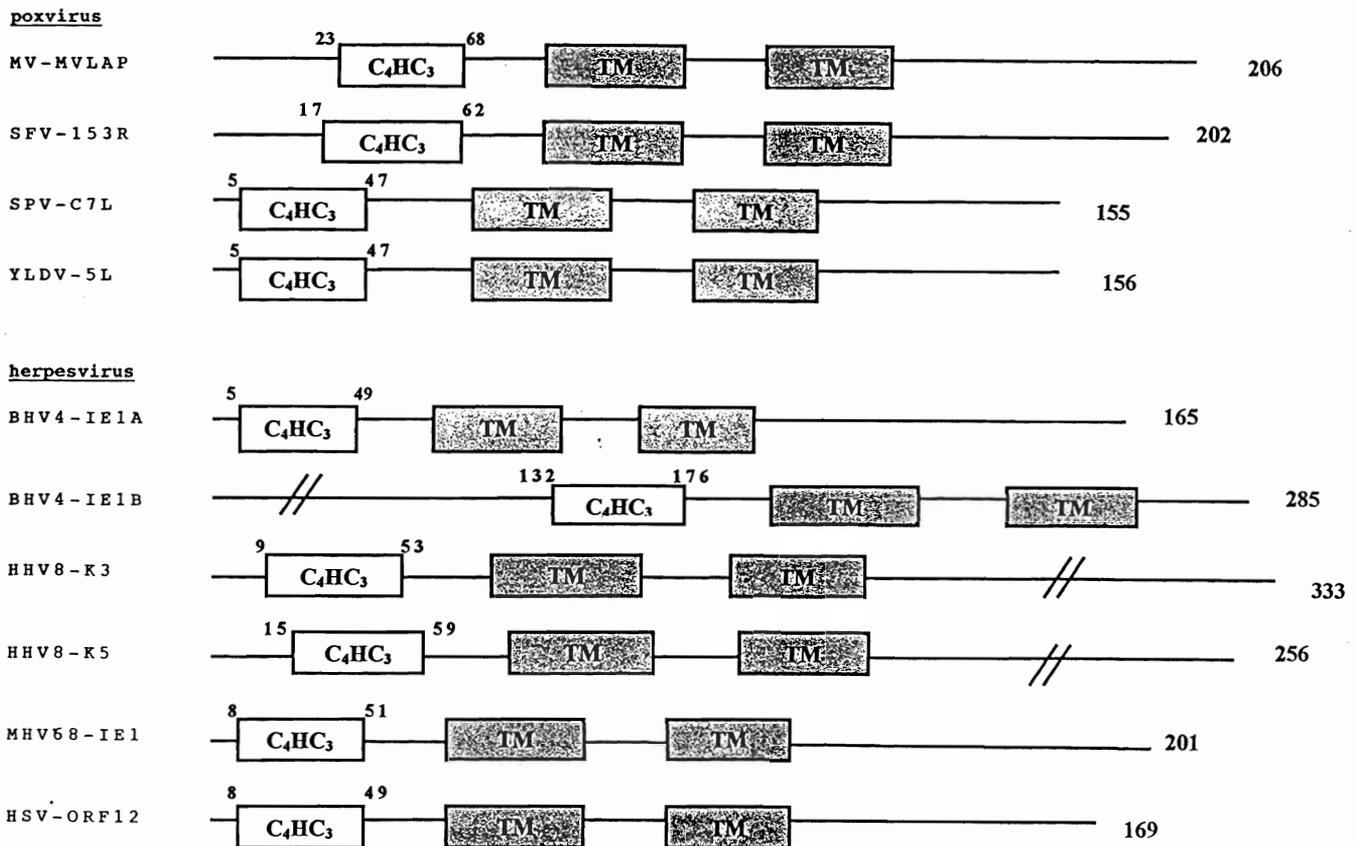


Figure 25 A. Alignement des motifs C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> (LAP) viraux. MV : virus myxomateux ; SFV : virus du fibrome de Shope ; SPV : virus swinepox ; YLDV : *Yaba-like disease virus* ; BHV4 : Herpesvirus bovin de type 4 ; HHV8 : Herpesvirus humain de type 8 (associé au sarcome de Kaposi) ; MHV68 : Herpesvirus murin 68 ; HSV : Herpesvirus Saimiri.

25 B. Architecture générale des protéines LAP virales. TM : domaines transmembranaires. Les nombres indiquent les aminoacides flanquant le motif LAP et les domaines transmembranaires.

## Les protéines à doigt de zinc : quelles fonctions ?

Les protéines à doigt de zinc ont fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années, tant en ce qui concerne leur caractérisation structurale que leurs rôles fonctionnels. Le zinc se présente sous la forme d'un cation bivalent  $Zn^{2+}$  qui peut interagir fortement avec une variété de ligands, dont l'atome de soufre de la cystéine, l'azote de l'histidine, l'oxygène de l'aspartate, du glutamate ou de l'eau. On comprend alors que ce cation puisse jouer un rôle de médiateur d'interactions entre des macromolécules biologiques, protéines ou acides nucléiques. Le zinc interagit avec de très nombreuses enzymes et il est établi depuis de nombreuses années qu'il est aussi impliqué dans la régulation des interactions protéines acides nucléiques.

On estime que les protéines à motif en doigt de zinc « classique » représentent 1% des produits de gènes humains. Les motifs en doigts de zinc sont engagés dans des interactions qui régulent le fonctionnement de la cellule ou ses relations avec des effecteurs extérieurs. Les doigts peuvent être de type  $C_2-H_2$ ,  $C_2-C_2$ ,  $C_3-H$  ou  $H-C_3$ . Cependant, il n'y a aucune unité fonctionnelle parmi les protéines qui partagent ces motifs. Il est en particulier très difficile d'associer une structure donnée à des propriétés d'interaction avec des acides nucléiques et/ou des protéines. On distingue de nombreuses classes de protéines à doigts de zinc :

### ➤ Les motifs en doigts de zinc « classiques » :

Historiquement, la première protéine à doigt de zinc décrite a été le facteur transcriptionnel TFIIIA, identifié chez *Xenopus laevis*, qui présente 9 répétitions du consensus :

**X-Cys-X<sub>2-4</sub>-Cys-X<sub>3</sub>-F-X<sub>5</sub>-C-L-X<sub>2</sub>-His-X<sub>3-5</sub>-His-X<sub>2-6</sub>**

Ce motif contrôle la transcription de l'ARN 5S, dans les ovocytes du xénope (Miller *et al.*, 1985). La liaison protéine – ARN s'exerce au niveau d'une séquence cible de 50 nucléotides : chacun des 9 doigts interagit avec une guanine, avec une périodicité de  $5\frac{1}{2}$  nucléotides, soit un  $\frac{1}{2}$  tour d'hélice d'acide nucléique. Dans ce modèle, chaque quartet formé de deux cystéines et de deux histidines se lie à un ion zinc et la boucle peptidique reliant la paire de cystéines et la paire d'histidines forme un doigt de liaison à l'acide nucléique (Figure 26) (Perutz, 1996). Plusieurs motifs dérivés ont été identifiés chez les

eucaryotes. Ils interviendraient quasiment tous dans des mécanismes de régulation de l'expression de gènes.

➤ Les récepteurs d'hormones stéroïdiennes

Les récepteurs d'hormones stéroïdes (glucocorticoïdes ou œstrogènes) sont des activateurs de transcription qui se lient à de courtes séquences d'ADN et régulent ainsi l'expression de gènes dans la cellule cible de l'hormone.

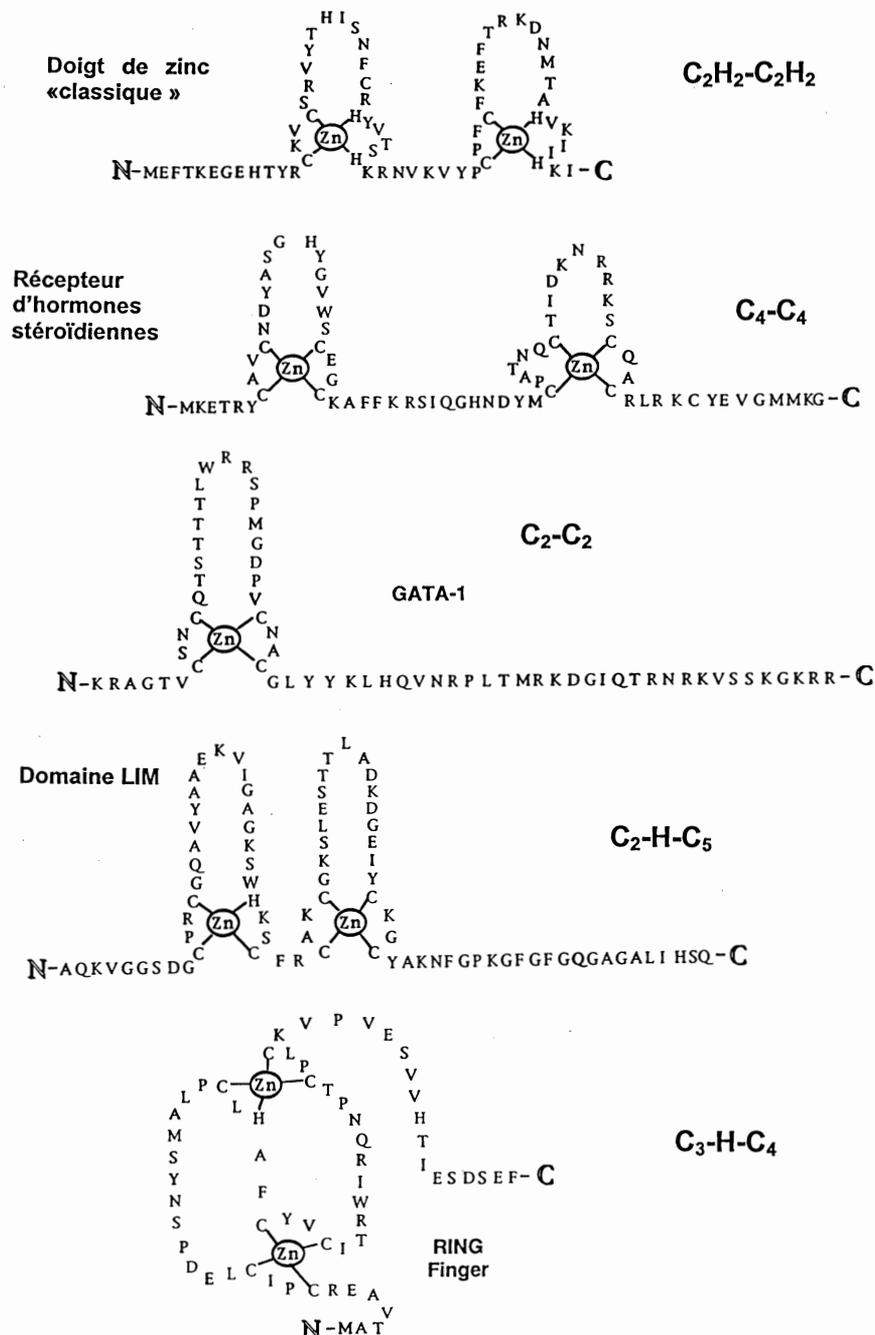


Figure 26. Structure des principales classes de motifs en doigts de zinc (Green et al, 1998).

Ces facteurs présentent un signal de localisation nucléaire et ont une affinité pour des séquences promotrices spécifiques, appelées éléments de réponse aux hormones, localisés en 5' des gènes à activer. Leur structure est sensiblement différente de TFIIIA (Figure 26).

➤ **Le facteur de transcription érythroïde GATA-1**

Ce facteur est exprimé dans les lignées érythroïdes, où il régule l'expression de plusieurs gènes. GATA-1 se lie spécifiquement à une séquence consensus (T/A)**GATA**(A/G). Un seul doigt de zinc est impliqué dans l'affinité avec la séquence cible, les autres stabilisant simplement l'interaction protéine – ADN.

➤ **Le domaine LIM**

Le domaine LIM est retrouvé dans une grande variété de protéines : il consiste en deux atomes de zinc, liés par des motifs Cys-Cys-His-Cys et (Cys)<sub>4</sub>. La plupart des protéines présentant ce domaine sont des facteurs de transcription. Il semblerait que LIM en tant que tel soit impliqué dans des interactions protéine-protéine et agisse en synergie avec d'autres motifs à doigt de zinc.

➤ **Les motifs Ring Finger**

Ce nouveau groupe de facteurs, appelés RING (pour *Really Interesting New Gene*), contient une séquence consensus :

**Cys-X-(I/V)-Cys-X<sub>9-27</sub>-Cys-X<sub>1-3</sub>-His-X-(P/I/L)-Cys-(I/L/M)-X-Cys-X<sub>4-48</sub>-Cys-P-X-Cys**

Ce motif est atypique pour son schéma de liaison avec les atomes de zinc : la 1<sup>ère</sup> paire coordonne un atome de zinc avec la 3<sup>ème</sup> paire, alors que l'autre atome est coordonné par les 2<sup>èmes</sup> et 4<sup>ème</sup> paires (Figure 26).

L'atome de zinc est supposé stabiliser les structures secondaire et tertiaire de la protéine et permettre ainsi sa liaison avec un acide nucléique, une protéine ou une structure membranaire. Ce motif est retrouvé dans des protéines impliquées dans la régulation des gènes, la recombinaison ou la réparation de l'ADN. On ne sait pas vraiment si ces protéines interagissent avec les acides nucléiques, ou plutôt avec des protéines elles-mêmes liées à l'ADN. Plusieurs protéines RING ont été identifiées chez les virus, notamment chez les herpesvirus et les poxvirus : dans le virus du fibrome de Shope, la protéine N1R est localisée dans les virosomes des cellules infectées, se lie à l'ADN simple ou double brin et inhibe le déclenchement de l'apoptose. Une délétion,

même partielle, du motif RING abolit sa localisation et sa fonction, même si ce motif n'intervient pas seul (Upton *et al.*, 1994 ; Brick *et al.*, 1998).

➤ **Le motif C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> ou LAP/PHD, un « nouveau » motif en doigt de zinc**

Le motif C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> a été considéré un temps comme un motif Ring finger (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>) atypique. En 1995, le groupe de Bryan Young a décrit un nouveau type de motif « zinc finger » dans la protéine CEZF de *Caenorhabditis elegans*. Ce motif était retrouvé dans 25 protéines, chez les animaux, les plantes et la levure (Saha *et al.*, 1995). Sachant que l'interruption du domaine fonctionnel dans deux types de translocations chromosomiques était associée à des leucémies, les auteurs ont donné à ce motif le nom **LAP**, pour *leukemia-associated-protein*. Cependant, la fonction précise de protéines à motif LAP n'a pas été véritablement élucidée. Les protéines LAP pourraient se lier de manière non spécifique à de grands fragments d'ADN (Schindler *et al.*, 1993) et exercer ainsi des fonctions de régulation de l'expression des gènes. Dans les protéines complexes décrites chez les eucaryotes, le motif LAP est le plus souvent retrouvé en association avec d'autres types « classiques » de doigts de zinc, ce qui a amené les auteurs à évoquer une complémentarité entre le motif LAP, assurant la cohésion, et d'autres motifs contrôlant la spécificité de l'interaction (Saha *et al.*, 1995). Un autre groupe a décrit la même année ce type de motif sous l'appellation PHD (pour *Plant homeo domain*) (Aasland *et al.*, 1995).

**Quelle(s) fonction(s) pour MV-LAP ?**

En mai et juin 2000, 2 groupes américains ont simultanément montré que deux protéines à motif LAP codées par le virus HHV-8 (associé au sarcome de Kaposi), K3 et K5, jouaient un rôle majeur dans la diminution de l'expression du CMH 1 à la surface des cellules infectées, en activant l'endocytose de ces molécules (Coscoy et Ganem, 2000 ; Ishido *et al.*, 2000a). Nous avons donc réorienté nos travaux sur le facteur MV-LAP, pour tenter de répondre à plusieurs questions :

- Est-ce que MV-LAP a, comme K3 et K5, un rôle dans la dérégulation de l'expression de surface du CMH 1 ?
- Ce facteur est-il majeur pour cette fonction dans le contexte de l'infection par le VM ou intervient-il dans une voie de dérégulation parmi d'autres ?
- Quelle est l'incidence de ce facteur dans la biologie du virus et la pathologie qu'il induit chez le lapin ?

Les travaux de caractérisation biologique et fonctionnelle présentés ici ont donc pour objet de tenter de répondre à ces questions.

## 6.2. Expression de MV-LAP : localisation dans la cellule cible

Cette phase du travail avait pour objectif d'explorer deux questions :

1. La cinétique d'expression de MV-LAP est-elle de type « Immediate-Early », comme chez les facteurs homologues codés par les herpesvirus ? ce volet ne sera pas développé ici.
2. MV-LAP réside-t-elle dans le réticulum endoplasmique, comme les homologues K3 et K5 du virus de Kaposi ? Cette propriété est en effet vraisemblablement essentielle pour la fonction de la protéine.

Pour évaluer la localisation de la protéine dans la cellule, nous avons choisi de construire des fusions avec la GFP (*Green fluorescent protein*) : ce gène rapporteur est maintenant largement utilisé pour suivre des protéines en transfection ou, plus rarement, des virus recombinants. Plusieurs fusions, avec le gène entier, la région N-terminale ou le gène délété du domaine LAP, ont été construites, pour évaluer les rôles respectifs du domaine LAP et des domaines transmembranaires dans la localisation et la fonction de MV-LAP.

Les transfections transitoires réalisées sur les cellules RK13 (cellules de reins de lapin) ou BGMK (cellules rénales de singe vert) avec les différentes fusions montrent que MV-LAP s'adresse dans le réticulum, alors que la GFP native est présente dans toute la cellule, y compris le noyau (Figure 29). La délétion du domaine LAP n'affecte pas la localisation de la protéine. MV-LAP a donc une localisation tout à fait similaire à celui de K3 et K5 du virus HHV-8 (Haque *et al.*, 2000 ; Coscoy et Ganem, 2000 ; Ishido *et al.*, 2000a).

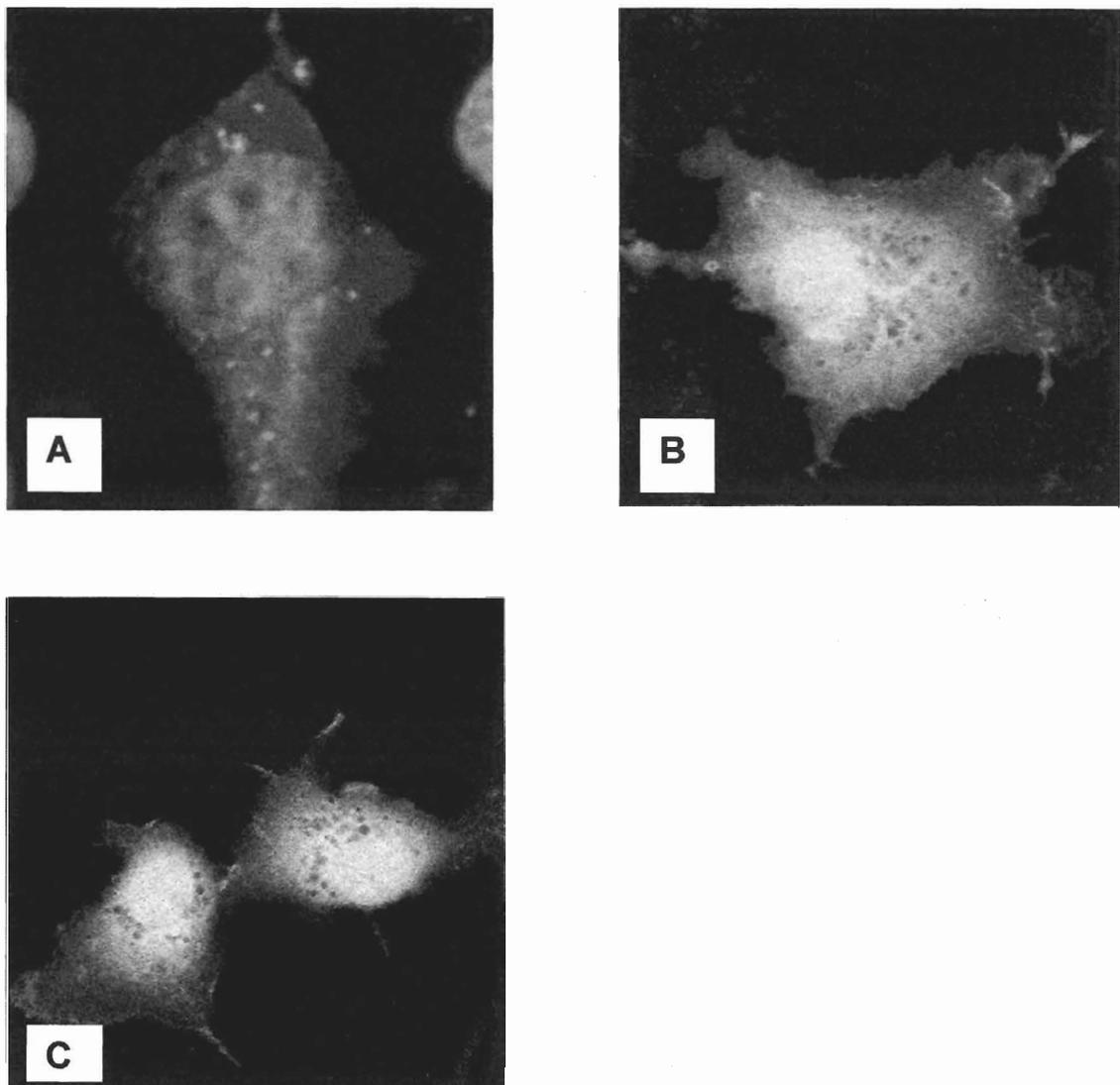


Figure 27. Localisation intracellulaire de MV-LAP. Des cellules RK13 cultivées sur lames de verre (LabTek) ont été transfectées avec des vecteurs exprimant des fusions du gène complet ou tronqué de MV-LAP avec la GFP. Les cellules ont été fixées 24h post-transfection. A : fusion MV-LAP-GFP, B : GFP contrôle, C : (N-term)-LAP-GFP.

### 6.3. Expression des molécules du CMH 1 à la surface des cellules transfectées

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), appelé HLA, pour *Human Leucocyte Antigen* (HLA) chez l'homme, est l'une des composantes majeures du système immunitaire et permet notamment l'activité cytotoxique des cellules CD8+. Le CMH code pour des glycoprotéines de surface qui s'associent à des fragments peptidiques dérivés de protéines intracellulaires (et, dans une moindre mesure, extracellulaires) pour les présenter aux effecteurs du système immunitaire. Les gènes du CMH sont divisés en 2 familles majeures, les gènes de classe I et de classe II. Les gènes de classe I sont eux-mêmes subdivisés en gènes de classe Ia (HLA-A, -B, -C chez l'homme) et en gènes de classe Ib (HLA-E, -F, -G, chez l'homme). Les molécules de classe I sont distribués à la surface de toutes les cellules nucléées. Les molécules de classe I sont des hétérodimères constitués d'une chaîne lourde de 44 kDa (codée par les gènes HLA-A, -B ou -C), caractérisée par 3 domaines extracellulaires ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ ), et de la  $\beta_2$  microglobuline de 12 kDa.

Ces 2 parties s'assemblent dans le Réticulum Endoplasmique (RE) avec les fragments peptidiques dégradés par les protéases cytosoliques. Ces peptides sont transportés à l'intérieur du RE par le *Transporter Associated with Antigen Processing* (TAP), lui-même codé par les gènes de classe II. La région qui fixe le peptide (PBR, pour *peptide binding region*), se fixe à 8 à 11 résidus. Après la fixation au peptide, l'ensemble est dirigé vers la surface de la cellule où il est présenté aux lymphocytes cytotoxiques CD8+. Ces lymphocytes ne reconnaissent que les peptides étrangers présentés *via* le CMH I : on parle de restriction associée au CMH (Pamer et Cresswell, 1998).

Les constructions évoquées précédemment ont été utilisées pour apprécier l'action de MV-LAP sur l'expression de surface des molécules du CMH 1. Pour valider la spécificité de cette action, nous avons suivi en parallèle l'expression de 2 marqueurs sensés être stables : nous avons retenu le récepteur de la transferrine et FAS. Ce dernier marqueur avait en effet été utilisé à cette fin par Coscoy et Ganem pour l'étude de K3 et K5 sur cellules HeLa. Nous avons effectivement constaté que le CMH 1 était affecté par l'expression de MV-LAP (diminution de 1  $\log_{10}$  pour 30% des cellules), alors que le TR restait stable, mais à notre grande surprise, FAS était lui aussi diminué dans les mêmes mesures que le CMH 1 (Figure 30). Ces résultats, reproduits plusieurs fois, sont donc en contradiction avec les travaux de Coscoy et Ganem. A ce stade

de notre démarche, l'hypothèse qui nous paraît la plus probable est que les cellules HeLa utilisées par le groupe américain ne permettaient pas d'apprécier une variation de l'expression de FAS. Si la diminution marquée de FAS dans notre système ne fait pas de doute, il nous faudra plus de recul pour apprécier le comportement de ce marqueur dans différents contextes cellulaires. Nous avons en tout cas engagé des essais dans le contexte de l'infection par le VM : ce volet fait l'objet de la thèse de doctorat vétérinaire de Frédérique-Anne BELLANGER (rédaction en cours).

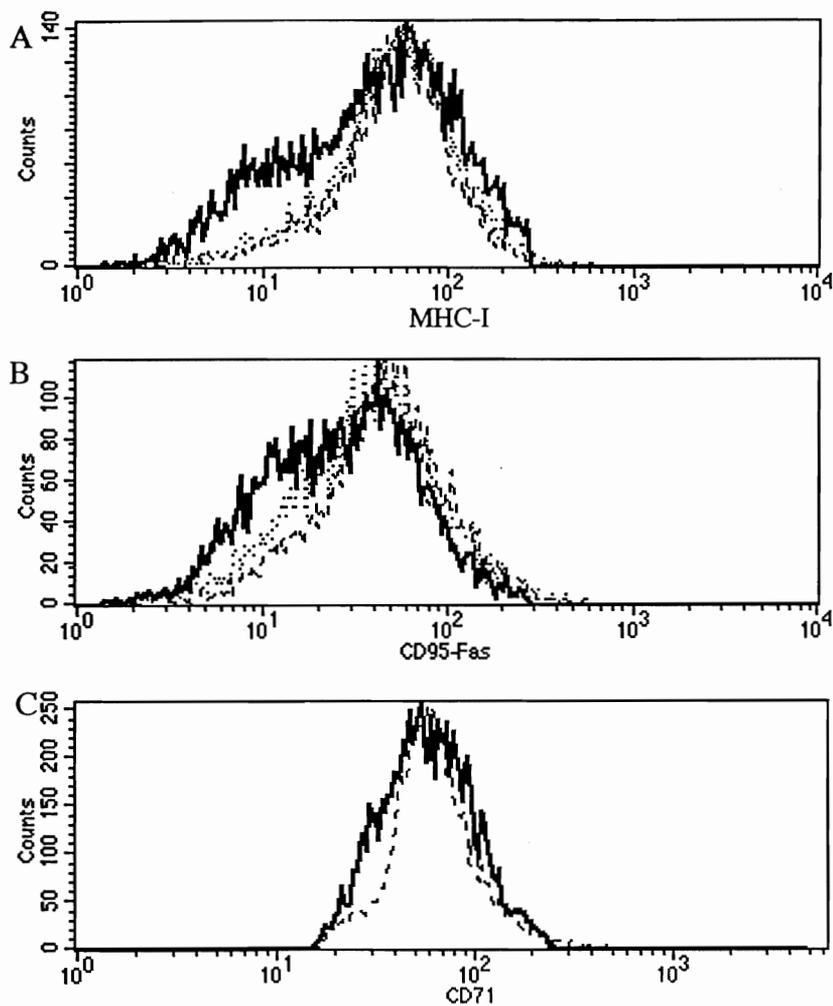


Figure 28 Dérégulation de l'expression de surface des molécules de classe I du CMH et de FAS-CD95. Les cellules BGGMK transfectées avec les fusions sont sélectionnées sur la base de leur fluorescence associée à la GFP (FL-1) et sont analysées pour l'expression du CMH1 (A), CD95 (B) ou CD71 (C). En gras : MV-LAP-GFP, en pointillé : plasmide GFP contrôle ; en hachuré : N-term-GFP.

### III- DISCUSSION GENERALE

L'objectif de notre travail était de déterminer précisément la localisation d'une délétion majeure affectant le génome de la souche SG33 du virus myxomateux, puis d'identifier et caractériser les gènes présents dans cette zone.

La carte du génome du virus myxomateux établie par Russel et Robbins a, à l'époque, grandement facilité le travail de cartographie. La taille totale de l'ADN du SG33 obtenue d'après le profil de restriction par *Pvu* II indique que la délétion couvre 15 Kb environ. Notre travail a permis de montrer que la totalité du fragment F-*EcoR* I et la moitié du fragment H-*EcoR* I ont disparu sur le SG33. Si la borne interne de la délétion n'a pas été clairement déterminée à ce jour, la poursuite des travaux de séquençage du fragment H-*EcoR* I nous permettra d'aboutir rapidement.

L'approche de l'autre jonction, située dans la RIT droite, était plus délicate car nous devons discriminer les deux RIT. Les résultats d'hybridation sur le profil *Pvu* II laissent supposer que la RIT droite est en grande partie délétée. Les sondes dont nous disposons ne couvrent pas toute la RIT : il est vraisemblable que des fragments de la RIT droite subsistent. On peut d'ailleurs s'interroger sur les conséquences fonctionnelles de l'absence d'une copie d'un gène normalement présent dans les deux RIT ; il y a peut-être surexpression de la copie résiduelle : dans ce cas une délétion unilatérale n'aurait guère de signification biologique...

Les délétions et recombinaisons sont fréquentes chez les Poxvirus et constituent un des instruments majeurs de la plasticité de leur génome, permettant ainsi l'adaptation du virus à des modifications de son environnement. L'ampleur de la délétion observée sur le SG33 est cependant inhabituelle ; c'est en tout cas la plus importante identifiée à ce jour sur le virus myxomateux. En plus de cette macro-délétion, un polymorphisme plus ponctuel, concrétisé ou non par la modification de sites de restriction, peut lui aussi entraîner des inactivations d'ORF et rendre compte du phénotype du SG33. Cependant, Il est clair que la délétion de 15 Kb constitue vraisemblablement le support majeur du phénotype du SG33, ce qui justifie son séquençage, à l'exclusion de la RIT déjà largement étudiée.

Serp-2 avait déjà été identifiée par notre équipe (Petit *et al.*, 1996) au début de mon travail, la découverte de la localisation de cette ORF dans la zone délétée sur le SG33 étant totalement fortuite.

Nous ne discuterons pas ici les résultats afférents aux 3 facteurs MHR, présentés en détail par ailleurs (Deymier, 1999 ; Ferry, 1999 ; Six , 1999).

Nous avons mis en évidence Serp3, la 3<sup>ème</sup> serpine codée par le VM, et initié sa caractérisation. Cette serpine ne correspond à aucune identifiée à ce jour chez les poxvirus et n'a d'ailleurs pas non plus de vrai homologue cellulaire, ce qui complique considérablement la recherche d'une piste fonctionnelle. On peut être surpris de retrouver les 3 gènes codant pour les serpines dans un même « îlot de virulence ». Serp2 et Serp3 présentent en particulier des similarités importantes, ce qui pourrait suggérer une origine commune et une scission en 2 cadres de lecture distincts.

La délétion observée dans Serp3 est certes importante mais n'est pas totalement unique dans l'univers des serpines puisque des serpines identifiées chez *Caenorhabditis elegans* présentent aussi des troncatures majeures, qui ne remettent en cause ni l'architecture, ni la fonctionnalité de ces molécules (whisstock *et al.*, 1999). SPI-3, codée par les orthopoxvirus, est également un exemple de serpine atypique caractérisée chez les poxvirus (Turner et Moyer, 1992).

Un axe important de la caractérisation de serp3 repose sur la réalisation et l'analyse *in vitro* et *in vivo* d'un virus mutant délété : ce travail a été réalisé et a montré que Serp3 est effectivement un facteur de pathogénicité significatif du VM. L'ensemble de ce volet fait l'objet de la thèse de doctorat vétérinaire d'Emmanuelle COPPENS (en cours de rédaction).

Lorsque nous avons commencé l'étude de MV-LAP, nous avons entrepris une caractérisation selon le schéma classique évoqué en préambule, sans avoir d'idée claire sur le rôle fonctionnel de ce facteur. En effet, plus encore que pour Serp3, l'existence d'un domaine en doigt de zinc ne nous donnait aucune piste sérieuse. Les autres protéines « zinc finger » identifiées jusqu'alors chez les poxvirus ont fait l'objet de peu de travaux évoquant une fonction précise. De plus, le motif de type C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> apparaissait comme une forme atypique de motif RING (encore une protéine atypique...). Ce n'est que tout récemment (mai 2000) que nous avons pu faire la connexion avec un travail en cours de publication sur des facteurs homologues du virus de Kaposi, K3 et K5. Dès lors, une hypothèse forte apparaissait et demandait à être validée : nous avons effectivement montré que MV-LAP était un facteur de dérégulation du CMH 1, mais aussi du CD95, et certainement d'autres marqueurs de surface qui restent à tester. A ce stade de notre réflexion et sans revenir sur ce qui a été évoqué dans les résultats, nous pouvons nous interroger sur deux points :

Quelles interactions moléculaires pourraient expliquer ce mécanisme ?

Quelles implications peut avoir ce facteur dans la biologie du virus ?

On sait que K3 et K5 ne colocalisent pas avec les molécules de CMH 1, ce qui exclue une interaction directe (Coscoy et Ganem, 2000). Une hypothèse avancée par le groupe de Jae Jung serait que K5 agirait sur les protéines de liaison à l'actine, protéines telles que la filamine, la ezrine ou la furine, qui assurent la cohésion du cytosquelette impliqué dans le trafic intracellulaire des vésicules d'endocytose. Les molécules de surface, telles que la chaîne lourde du CMH 1 ou CD95, se connectent aux éléments du cytosquelette à l'aide de ces protéines de liaison (Ishido *et al.*, 2000b ; Liu *et al.*, 1997 ; Parlato *et al.*, 2000). Le motif LAP serait donc engagé dans une interaction protéine-protéine avec la filamine et/ou l'ezrine et/ou la furine. Des travaux étayant ce qui n'est encore qu'une hypothèse séduisante sont, semble-t-il, en cours de publication (mai 2001).

En ce qui concerne la caractérisation moléculaire de MV-LAP, plusieurs axes de travail peuvent être envisagés :

- Identifier les régions de MV-LAP supports de la fonction, par des constructions de fusions tronquées, voire des travaux de mutagenèse dirigée.
- Evaluer l'impact de transfections avec nos différentes fusions GFP sur la structure du réseau d'actine, soit par observation en microscopie confocale, soit en cytométrie de flux. Nous pourrions également approcher plus finement les interactions LAP-filamine ou LAP-ezrine en réalisant des co-immunoprécipitations.
- Tester d'autres marqueurs de surface susceptibles d'être concernés par ce mécanisme de dérégulation par MV-LAP. D'une part de nombreux marqueurs candidats n'ont pas fait l'objet d'essais. D'autre part, si l'extrapolation des fonctions des facteurs LAP du HHV-8 et du VM semble satisfaisante et pourrait évoquer une similitude absolue de fonction et de protéines cellulaires cibles au sein du groupe de protéines LAP virales, il faudra valider expérimentalement toutes les cibles. En effet, une variabilité semble exister : par exemple, K3 et K5 ont une efficacité de dérégulation du CMH 1 inégale et K3, contrairement à K5, n'a pas la capacité de déréguler les marqueurs ICAM-1 et B7-2 (Ishido *et al.*, 2000a). Il y a donc vraisemblablement un polymorphisme, affectant le domaine LAP ou d'autres régions des facteurs LAP, qui pourrait expliquer une affinité privilégiée pour telle ou telle protéine de liaison à l'actine, aboutissant à la dérégulation d'un spectre de molécules de surface lui-même variable.

Les récepteurs ICAM-1 et B7-2, dérégulés par K5, devront être testés prioritairement (Ishido *et al.*, 2000b). ICAM-1 et B7-2 étant des ligands pour les cellules Natural Killer, nous pouvons envisager les conséquences d'une diminution de l'expression de ces marqueurs sur la physiopathologie d'une maladie virale (Karre et Welsh, 1997). Cependant, ces données ne sont pas univoques, car la régulation de l'activité cytotoxique des cellules NK fait appel à une balance très subtile de signaux activateurs et represseurs (Maghazachi *et al.*, 1999). Par exemple, les cellules qui présentent un défaut d'expression des molécules du CMH 1 à leur surface sont exposées à l'élimination par les cellules NK (Garrido *et al.*, 1997).

Un intérêt majeur de notre modèle est la possibilité d'accéder à la pathologie expérimentale, ce qui n'est pas imaginable pour le modèle HHV-8 ! Une démarche a été entreprise pour chacun des gènes concernés : elles font l'objet de mémoires de thèse vétérinaire spécifiques, soutenues ou en cours de préparation.

Les facteurs LAP sont partagés par plusieurs poxvirus, appartenant aux genres *Leporipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Swinepoxvirus* et *Yatapoxvirus* et au sein de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*, les membres du genre *Rhadinovirus*. Ce n'est pas la première fois que des similitudes sont retrouvées entre poxvirus et gammaherpesvirus : les analyses de génomes complets montrent en effet que les grands virus à ADN partagent des stratégies d'immunomodulation communes, impliquant par exemple des protéines de contrôle du complément, des homologues de récepteurs au TNF ou des leurres de chimiokines (McFadden et Murphy, 2000). Nous pouvons nous interroger sur cette convergence entre ces groupes viraux et émettre l'hypothèse que ces virus présentent dans leurs relations avec leur(s) hôte(s) respectif(s) des contraintes similaires qui ont donné un même avantage évolutif aux virus ayant intégré dans leur « arsenal » un (ou deux) facteurs LAP ; ces contraintes communes pourraient par exemple être liées à un tropisme électif pour un même type cellulaire. Il n'est pas question ici d'aller plus avant dans une tentative, forcément hasardeuse, d'explication phylogénique, mais d'évoquer cette nouvelle illustration de convergence chez les grands virus à ADN.

L'objectif de départ de notre travail consistait en la cartographie de la souche vaccinale SG33, largement utilisée dans les élevages cynicoles français : l'objectif présenté était d'y rechercher les gènes délétés, qui expliqueraient le phénotype très atténué. De fait, nous avons montré que cette souche présente

une macrodélétion majeure, dont les contours définitifs restent à valider, mais qui résulte en l'absence de plusieurs gènes de pathogénicité. Le risque de réversion vers la virulence de la souche SG33 est donc très limité, car le polymorphisme qu'elle présente concerne plusieurs Kb de séquence. Cette stabilité génétique est un élément important à considérer pour la sécurité d'usage d'un vaccin atténué. A terme, l'objectif est d'optimiser la balance entre la virulence et l'immunogénicité, le vaccin « idéal » étant capable de se répliquer efficacement sans affecter les réponses immunes de l'hôte. Ce point est d'autant plus important que les poxvirus sont des vecteurs potentiels d'antigènes vaccinaux (Cox *et al.*, 1992).

Une retombée de notre travail concerne directement cet aspect : le virus myxomateux est un candidat vecteur pour exprimer des antigènes à des fins de protection vaccinale (Bertagnoli *et al.*, 1996, Barcena *et al.*, 2000) ou d'immunostérilisation (Hollande et Jackson, 1994 ; Tyndale-Biscoe, 1994). De même, les capripoxvirus sont utilisés en tant que vecteurs vaccinaux, notamment contre des maladies tropicales des petits ruminants, comme la peste des petits ruminants (Romero *et al.*, 1993) ou la fièvre catarrhale (Wade-Evans *et al.*, 1996). Le swinepox est lui aussi un vecteur potentiel d'antigènes vaccinaux chez le porc (Tripathy, 1999). Dans tous les cas, la réponse vaccinale est fondée sur la présentation des antigènes *via* le CMH-1 aux effecteurs cytotoxiques et aux cellules mémoires. On peut dès lors imaginer qu'un facteur LAP, susceptible de diviser par 10 la quantité de molécules de classe 1 à la surface des cellules infectées, pénalise considérablement la réponse vaccinale. On notera que la souche vaccinale SG33, utilisée comme vecteur de la VP60 du calicivirus de la maladie hémorragique virale du lapin (Bertagnoli *et al.*, 1996), est effectivement LAP-. D'autres souches vaccinales atténuées européennes ont par contre un gène MV-LAP fonctionnel (Bertagnoli et Py, communication personnelle). On peut à cet égard s'interroger sur les échecs enregistrés par les australiens dans leurs essais d'immunocontraception : leurs virus vecteurs sont des souches à forte pathogénicité résiduelle, synonyme de capacité de diffusion au sein des populations de lapins sauvages. Il sera sans doute instructif de tester l'intégrité du gène *mv-lap* dans les souches utilisés dans ces constructions.

Dans le cadre du développement de poxvirus vecteurs d'antigènes vaccinaux, cette recherche du compromis entre la capacité de répllication et l'absence d'immunomodulation fait l'objet d'une attention toute particulière (Blanchard *et al.*, 1998). Dans cette perspective, chez les poxvirus dont les souches sauvages possèdent un facteur LAP, le caractère LAP- pourrait être considéré

comme une condition *sine qua none* de l'efficacité vaccinale et intégré dans le cahier des charges de toute construction de vecteur. L'influence de MV-LAP sur la réponse vaccinale pourrait être évaluée, par exemple en construisant un virus SG33-VP60-LAP+ et en comparant l'expression de la VP60 à la surface de cellules infectées et finalement, la réponse sérologique post-vaccinale induite par cette construction et le virus SG33-VP60 parental.

En conclusion, nous pouvons nous interroger sur le futur du travail de caractérisation des facteurs de pathogénicité chez le VM. Il y a certes encore beaucoup à faire, mais il est clair que la démarche présentée dans ce travail trouve maintenant ses limites.

Les nouveaux outils d'élaboration et d'analyses de séquences sont entrés en action et en quatre ans, nous avons assisté au séquençage complet de nombreux poxvirus, dont le virus myxomateux en 1999 (Cameron *et al.*, 1999). L'approche « géographique », fondée sur l'analyse ciblée de telle ou telle région du génome est donc révolue, et fera place à un travail plus raisonné et plus transversal entre virus apparentés, dans lequel l'outil informatique va jouer un rôle décisif. Même s'il reste des facteurs à caractériser, nous ne sommes plus à l'époque où chaque séquençage était l'occasion de découvrir de nouveaux gènes, dont nous ne savions rien *a priori*. L'étude des facteurs de pathogénicité évoluera donc vers une approche polyfactorielle de phénomènes biologiques complexes, tels que l'immunomodulation par le VM ou la cancérogenèse viro-induite par son cousin le virus du fibrome de Shope. Dans ce contexte, comme nous avons pu le percevoir au cours de notre travail, les connaissances de fond sur l'immunologie du lapin et la pathogénie de la myxomatose apparaîtront certainement comme les vrais facteurs limitants...

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, M. BONNES , Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**M. GUERIN Jean-Luc, Henri, Marcel**  
a été admis(e) sur concours en : 1991  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 10 juillet 1995  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussignée, Frédérique MESSUD-PETIT, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
déclare que j'ai lu la thèse de :  
**M. GUERIN Jean-Luc, Henri, Marcel**  
intitulée :  
*Analyse moléculaire de la souche atténuée vaccinale SG33 du virus myxomateux ; à la recherche des gènes perdus*  
et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**

**Docteur Frédérique MESSUD-PETIT**



**Vu :  
Le Président de la thèse :**



**Professeuse Jacqueline PUEL**

**Vu :  
Le Directeur par intérim  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



**Professeur Gilbert BONNES**

**Vu le : 22 mai 2001  
Le Président  
de l'Université de Sabatier**



**Professeur R. BASTIDE**

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Aasland, R., Gibson, T.J. and Stewart, A.F. (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 20, 56-59.
- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Oma, E., Kutish, G.F. and Rock, D.L. (1999) The genome of *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*. *J Virol*, 73, 533-552.
- Afonso, C.L., Tulman, E.R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G.F. and Rock, D.L. (2000) The genome of fowlpox virus. *J Virol*, 74, 3815-3831.
- Ahn, K., Meyer, T.H., Uebel, S., Sempe, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P.A., Fruh, K. and Tampe, R. (1996) Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *Embo J*, 15, 3247-3255.
- Albrecht, J.C., Nicholas, J., Biller, D., Cameron, K.R., Biesinger, B., Newman, C., Wittmann, S., Craxton, M.A., Coleman, H., Fleckenstein, B. and R.W. Honess. (1992) Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J Virol*, 66, 5047-5058.
- Alcami, A. and Smith, G.L. (1992) A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*, 71, 153-167.
- Alcami, A. and Smith, G.L. (1995) Cytokine receptors encoded by poxviruses: a lesson in cytokine biology. *Immunol Today*, 16, 474-478.
- Allison, A.C., and Friedman, R.M. (1966) Effects of immunosuppressants on Shope rabbit fibroma. *J Natl Cancer Inst*, 36:859-868.
- Antoine, G., Scheifflinger, F., Dorner, F., and Falkner, F.G. (1998) The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244: 365-396.
- Aragão, H.B. (1927) Myxoma of rabbits. *Mem Instit Oswaldo Cruz*, 20 :237-247.

Barcena, J., Morales, M., Vazquez, B., Boga, J.A., Parra, F., Lucientes, J., Pages-Mante, A., Sanchez-Vizcaino, J.M., Blasco, R. and Torres, J.M. (2000) Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J Virol*, 74 : 1114-1123.

Barry, M., Lee, S.F., Boshkov, L. and McFadden, G. (1995) Myxoma virus induces extensive CD4 downregulation and dissociation of p56lck in infected rabbit CD4+ T lymphocytes. *J Virol*, 69 : 5243-5251.

Barry, M., Hnatiuk, S., Mossman, K., Lee, S.F., Boshkov, L. and 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 : 360-377.

Bayliss, C.D., Wilcock, D. and Smith, G.L. (1996) Stimulation of vaccinia virion DNA helicase I8R, but not A18R, by a vaccinia core protein L4R, an ssDNA binding protein. *J Gen Virol*, 77 : 2827-2831.

Bayliss, C.D. and Smith, G.L. (1996) Vaccinia virion protein I8R has both DNA and RNA helicase activities: implications for vaccinia virus transcription. *J Virol*, 70 : 794-800.

Beattie, E., Paoletti, E. and Tartaglia, J. (1995) Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology*, 210: 254-263.

Beattie, E., Tartaglia, J., and Paoletti, E. (1991) Vaccinia-virus encoded eIF-2a homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology*, 183: 419-422.

Beaud, G. (1995) Vaccinia virus DNA replication: a short review. *Biochimie*, 77 : 774-779.

Bertagnoli, S., Gelfi, J., Le Gall, G., Boilletot, E., Vautherot, J.F., Rasschaert, D., Laurent, S., Petit, F., Boucraut-Baralon, C. and 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.

Best, S.M., Collins, S.V. and 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. and 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.

Beutler, B., Ed. (1992) Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine. Raven Press, New-York.

Blanchard, T.J., Alcami, A., Andrea, P. and Smith, G.L. (1998) Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol*, 79 : 1159-1167.

Blancou, J., Kieny, M.P., Lathe, R., Lecocq, J.P., Pastoret, P.P., Soulebot, J.P. and Desmettre, P. (1986) Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, 322 : 373-375.

Block, W., Upton, C. and McFadden, G. (1985) Tumorigenic poxviruses: genomic organization of malignant rabbit virus, a recombinant between Shope fibroma virus and myxoma virus. *Virology*, 140 : 113-124.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15 : 749-795.

Boshkov, L.K., Macen, J.L. and McFadden, G. (1992) Virus-induced loss of class I MHC antigens from the surface of cells infected with myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus. *J Immunol*, 148 : 881-887.

Brick, D.J., Burke, R.D., Schiff, L. and Upton, C. (1998) Shope fibroma virus RING finger protein N1R binds DNA and inhibits apoptosis. *Virology*, 249 : 42-51.

Brown, J.P., Twardzik, D.R., Marquardt, H. and Todaro, G.J. (1985) Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature*, 313 : 491-492.

Brun, A., Saurat, P., Gilbert, Y., Godard, A. and Bouquet, J.F. (1981) Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose. *Rev Med Vet*, 132: 585-590.

Buller, R.M.L., Holmes, K.L., Hugin, A., Fredrickson, T.N. and Morse, H.C. (1987) Induction of cytotoxic T-cells responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. *Nature*, 328: 77-79.

Buller, R.M.L. and Palumbo, G. (1991) Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev*, 55:80-122.

Cacoulos, N. and Bablanian, R. (1991) Polyadenylated RNA sequences produced in vaccinia virus-infected cells under aberrant conditions inhibit protein synthesis in vitro. *Virology*, 184: 747-751.

Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J.X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. and McFadden, G. (1999) The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus. *Virology*, 264 : 298-318.

Carpenter, G. and Wahl, M.I. (1991) The epidermal growth factor family. in *Peptide growth factors and their receptors*. Sporn MB and Roberts AB, Ed. Springer Verlag. p.69-170.

Carrell, R.W. and Travis, J. (1985) Alpha-1-antitrypsin, and the serpins: Variation and countervariation. *Trends Biochemical Sciences*, 10 : 20-24.

Chang, A. and Metz, D.H. (1976) Further investigations on the mode of entry of vaccinia virus into cells. *J Gen Virol*, 32: 275.

Chang, W., Upton, C., Hu, S.L., Purchio, A.F. and 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 : 535-540.

Chang, H.W., Watson, J.C. and Jacobs, B.L. (1992) The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, doubled-stranded protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 4825-4829.

Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S. and Chang, W. (1998) A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J virol*, 72 : 1577-1585.

Coscoy, L. and Ganem, D. (2000) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 : 8051-8056.

Cox, W.I., Tartaglia, J. and Paoletti, E. (1992) Poxvirus recombinants as live vaccines. In Press, C. (ed.) *Recombinant poxviruses*. Binns MM and Smith GL, Boca Raton, pp. 123-162.

Cudmore, S, Cossart, P, Griffiths, G and Way, M. (1995) Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*, 378: 636-638.

Da Fonseca, F.G., Silva, R.L., Marques, J.T., Ferreira, P.C. and Kroon, E.G. (1999) The genome of cowpox virus contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. *Virus Genes*, 18 : 151-160.

Dales, S. and Kajioka, R. (1964) The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells. I. Uptake and penetration. *Virology*, 24: 278

Davison, A.J. and Moss, B. (1989) Structure of vaccinia virus late promoters. *J Mol Biol*, 210 : 771-784.

Delange, A.M. & McFadden, G. (1990) The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Curr. Top Microbiol Immunol*, 163 : 71-92

Delange, A.M. & McFadden, G. (1986) Sequence nonspecific replication of transfected plasmids in poxvirus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 614-618

## Références bibliographiques

---

- Deymier, L. (1999) Rôle du gène MHR2 dans l'expression du pouvoir pathogène du virus de la myxomatose. *Thèse pour le doctorat vétérinaire*. Université Paul Sabatier, Toulouse.
- Dinarelo C.A. (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 77: 1627-1652.
- Drillien, R., Koehren, F. and Kirn, A. (1981) Host range deletion mutant of vaccinia virus defective in human cells. *Virology*, 111 : 488-499.
- Duncan, S.A. and Smith, G.L. (1992) Identification and characterization of an extracellular envelope glycoprotein affecting vaccinia virus egress. *J Virol*, 66 : 1610-1621.
- Engelstad, M. and Smith, G.L. (1993) The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. *Virology*, 194 : 627-637.
- Everett, H., Barry, M., Lee, S.F., Sun, X., Graham, K., Stoen, J., Bleacklay, R.C., McFadden, G. (2000) M11L :a novel mitochondrial-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leulocytes. *J Exp Med*, 191: 1487-1498.
- Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Ann Rev Immunol* 11: 571-611.
- Fenner F. (1948) The clinical features and pathogenesis of mousepox (infectious ectromelia of mice). *J Pathol Bacteriol*, 60: 529-552.
- Fenner, F., Day, M.F., and Woodroffe, G.M. (1956) Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *J hygiene*, 57: 284-303.
- Fenner, F., and Marschall, I.D. (1957) A comparison of the virulence for european rabbis (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J hygiene*, 55 : 149-191.
- Fenner, F. and Ratcliffe, F.N. (Ed). (1965) *Myxomatosis*. Cambridge University press, Cambridge.

Fenner, F., Henderson, D.A., Arita, I., Jezek, Z. and Ladnyi I.D. (1988) Smallpox and its eradication. World Health Organization Ed, Genève.

Fenner, F. (1992) Vaccinia virus as a vaccine, and poxvirus pathogenesis in Recombinant Poxviruses. M.M. BINNS and G.L. SMITH Editors, CRC Press, Boca Raton, Florida. p.1-43.

Fenner, F. and Fantini, B. (1999) Biological control of vertebrate pests. The history of myxomatosis - an experiment in evolution. CABI Publishing, Wallingford - Oxon.

Fenner, F. and Woodroffe, G.M. (1960) The reactivation of poxviruses. II. The range of reactivating viruses. *Virology*, 11: 185-201.

Ferry, E. (1999) Rôle du gène MHR1 dans l'expression du pouvoir pathogène du virus myxomateux. *Thèse pour le doctorat vétérinaire*. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J.J., Lopez-Botet, M., Dugan-Keen, M. and Stern, P.L. (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA classe I phenotypes in human tumors. *Immunol Today*, 18: 89-95.

Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R. and Kirn, A. (1986) Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 : 5573-5577.

Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P. and Paoletti, E. (1990) The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, 179 : 247-266, 517-263.

Graham, K.A., Lalani, A.S., Macen, J.L., Ness, T.L., Barry, M., Liu, L.Y., Lucas, A., Clark-Lewis, I., Moyer, R.W. and McFadden, G. (1997) The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology*, 229 : 12-24.

Green, A., Parker, M., Conte, D., and Sarkar, B. (1998) Zinc Finger proteins : a bridge between transition metals and gene regulation. *J Trace elem Exp Med*, 11: 103-118.

Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11 : 184-189.

Haque, M., Chen, J., Ueda, K., Mori, Y., Nakano, K., Hirata, Y., Kanamori, S., Uchiyama, Y., Inagi, R., Okuno, T. and Yamanishi, K. (2000) Identification and analysis of the K5 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol*, 74 : 2867-2875.

Heslot, H. (1996) *L'ingénierie des protéines et ses applications*. Lavoisier Tec & Doc Eds, Londres Paris New York, p262-268.

Hirschmann, P., Vos, J.C. and Stunnenberg, H.G. (1990) Mutational analysis of a vaccinia virus intermediate promoter in vivo and in vitro. *J Virol*, 64 : 6063-6069.

Holland, M.K. and Jackson, R.J. (1994) Virus-vectored immunocontraception for control of wild rabbits: identification of target antigens and construction of recombinant viruses. *Reprod Fertil Dev*, 6 : 631-642.

Hnatiuk S., Barry, M., Zeng, W., Liu, L., Lucas, A., Percy, D. and McFadden, G. (1999) Rôle of the C-terminal RDEL motif of the myxoma virus M-T4 proteins in terms of apoptosis regulation and viral pathogenesis. *Virology*, 263: 290-306.

Hsiao, J.C., Chung, C.S. and 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: 8750-8761.

Hu, F.Q., Smith, C.A. and Pickup, D.J. (1994) Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology*, 204 : 343-356.

Ichiashi, Y. (1996) Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology*, 217: 478-485.

Ishido, S., Choi, J.K., Lee, B.S., Wang, C., DeMaria, M., Johnson, R.P., Cohen, G.B. and Jung, J.U. (2000) Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protein. *Immunity*, 13 : 365-374.

Ishido, S., Wang, C., Lee, B.S., Cohen, G.B. and Jung, J.U. (2000) Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *J Virol*, 74 : 5300-5309.

Jackson, R.J. and Bults, H.G. (1992a) A myxoma virus intergenic transient dominant selection vector. *J Gen Virol*, 73 : 3241-3245.

Jackson, R.J. and Bults, H.G. (1992b) The myxoma virus thymidine kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *J Gen Virol*, 73 : 323-328.

Jackson, R.J., Hall, D.F. and Kerr, P.J. (1999) Myxoma virus encodes an alpha2,3-sialyltransferase that enhances virulence. *J Virol*, 73 : 2376-2384.

Joubert, L., Leftheriotis, E. and Mouchet J. (1972) La myxomatose, T.1 et 2. L'expansion scientifique française, Edt. Paris.

Karre, K., and Welsh, R.M. (1997) Viral decoy vetoes killer cell. *Nature*, 386: 446-447.

Kempe, C.H. (1960) Studies on smallpox and complications of smallpox vaccination. *Pediatrics*, 20: 176-189.

Kerr, P.J. and Best, S.M. (1998) Myxoma virus in rabbits. *Rev Sci Tech*, 17: 256-268.

Kitching, R.P. and Hammond, J.M. (1998) Poxvirus, infection and immunity. *In Encyclopedia of Immunology*, Second Edition. Academic Press, pp1995-1998.

Kotwal, G.J. (2000) Poxviral mimicry of complement and chemokine system components: what's the end game ? *Immunol Today*, 21: 242-248.

Kotwal, G.J. and Moss, B. (1988) Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature*, 335 : 176-178.

Kotwal, G.J., Isaacs, S.N., Mckenzie, R., Frank, M.M. and Moss B. (1990) Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* 250: 827-830.

Lalani, A.S., Ness, T.L., Singh, R., Harrison, J.K., Seet, B.T., Kelvin, D.J., McFadden, G. and Moyer, R.W. (1998) Functional comparisons among members of the poxvirus T1/35kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Virology*, 250 : 173-184.

Lalani, A.S., Masters, J., Graham, K., Liu, L., Lucas, A. and McFadden, G. (1999) Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M- T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology*, 256 : 233-245.

Lalani, A.S., Masters, J., Zeng, W., Barrett, J., Pannu, R., Everett, H., Arendt, C.W. and McFadden, G. (1999) Use of Chemokine Receptors by Poxviruses. *Science*, 286 : 1968-1971.

Laurence, D.J. and 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 : 229-261.

Leddy, J.P., Simons, R.L. and Douglas, R.G. (1977) Effect of selective complement deficiency on the rate of neutralization of enveloped viruses by human sera. *J Immunol*, 118: 28-34.

Lee, H.J., Essani, K. and Smith, G.L. (2001) The genome sequence of yaba-like disease virus, a yatapoxvirus. *Virology*, 281 : 170-192.

Lehner, P.J., Karttunen, J.T., Wilkinson, G.W. and Cresswell, P. (1997) The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 : 6904-6909.

Lengyel, P. (1982) Biochemistry of interferons and theirs actions. *Annu Rev Biochem*, 51: 251-282.

Liu, G., Thomas, L., Warren, R.A., Enns, C.A., Cunningham, C.C., Hartwig, J.H. and Thomas, G. (1997) Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J Cell Biol*, 139 : 1719-1733.

Macen, J.L., Upton, C., Nation, N. and McFadden, G. (1993) SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation. *Virology*, 195 : 348-363.

Macen, J.L., Graham, K.A., Lee, S.F., Schreiber, M., Boshkov, L.K. and 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.

Mackett, M., Smith, G.L. and Moss, B. (1992) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. 1982 [classical article]. *Biotechnology*, 24 : 495-499.

Maghazachi, A.A. (1999) Intracellular signalling pathways induced by chemokines in natural killer cells. *Cell Signal*, 11 : 385-390.

Massung, R.F., Esposito, J.J., Liu, L.I., Qi, J., Utterback, T.R., Knight, J.C., Aubin, L., Yuran, T.E., Parsons, J.M., Loparev, V.N. and et al. (1993) Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature*, 366 : 748-751.

Massung, R.F., Jayarama, V. and Moyer, R.W. (1993) DNA sequence analysis of conserved and unique regions of swinepox virus: identification of genetic elements supporting phenotypic observations including a novel G protein-coupled receptor homologue. *Virology*, 197 : 511-528.

Massung, R.F., Liu, L.I., Qi, J., Knight, J.C., Yuran, T.E., Kerlavage, A.R., Parsons, J.M., Venter, J.C. and Esposito, J.J. (1994) Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. *Virology*, 201: 215-240.

McFadden, G. (1994) Poxviruses: rabbit, hare, squirrel and swine. in *Encyclopedia of Virology*. R.G. Webster and A. Granoff, eds. Sanders Scientific Publications, p.1153-1160.

McFadden, G. (1998) Even viruses can learn to cope with stress [comment]. *Science*, 279 : 40-41.

- McFadden, G. and Barry, M. (1998) How poxviruses oppose apoptosis. *Semin Virol*, 8: 429-442.
- McFadden, G. and Kane, K. (1994) How DNA viruses perturb functional MHC expression to alter immune recognition. *Adv Cancer Res*, 63 : 117-209.
- McFadden, G. and Murphy, P.M. (2000) Host-related immunomodulators encoded by poxviruses and herpesviruses. *Curr Opin Microbiol*, 3: 371-378.
- Messud-Petit, F. and Bertagnoli, S. (2000) Le virus myxomateux : de l'agent pathogène au vecteur vaccinal. *Virologie*, 4: 453-462.
- Messud-Petit, F., Gelfi, J., Delverdier, M., Amardeilh, M.F., Py, R., Sutter, G. and Bertagnoli, S. (1998) Serp2, an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus. *J Virol*, 72 : 7830-7839.
- Miller, J., McLaehlin, A.D. and Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIa from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 4 : 1609-1614.
- Moss, B. (1992) Molecular biology of Poxviruses. in *Recombinant Poxviruses*. M.M. BINNS and G.L. SMITH Editors, CRC Press, Boca Raton, Florida. p.45-80.
- Moss, B. (1994) Vaccinia virus transcription. In Conaway, R.C.C.a.J.W. (ed.) *Transcription: mechanism and regulation*. Raven Press, New-York, pp. 185-205.
- Moss, B. (1996) *Poxviridae* : The viruses and their replication. In : Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., *Field's Virology – Third Edition – Philadelphia*, Lippincott-Raven Publishers, pp. 2637-2671.
- Mossman, K., Lee, S., Barry, M., Boshkov, L. and McFadden, G. (1996) Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of the poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *J Virol*, 70 : 4394-4410.

Mossman, K., Nation, P., Macen, J., Garbutt, M., Lucas, A. and McFadden, G. (1996) 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.

Nash, P., Lucas, A. and McFadden, G. (1997) SERP-1, a poxvirus-encoded serpin, is expressed as a secreted glycoprotein that inhibits the inflammatory response to myxoma virus infection. *Adv Exp Med Biol*, 425 : 195-205.

Nash, P., Whitty, A., Handwerker, J., Macen, J. and McFadden, G. (1998) Inhibitory specificity of the anti-inflammatory myxoma virus serpin, SERP-1. *J Biol Chem*, 273 : 20982-20991.

Nash, P., Barry, M., Seet, B.T., Veugelers, K., Hota, S., Heger, J., Hodgkinson, C., Graham, K., Jackson, R.J. and McFadden, G. (2000) Post-translational modification of the myxoma virus anti-inflammatory serpin SERP-1 by a virally encoded sialyltransferase. *Biochem J*, 15: 375-382.

Neilan, J.G., Lu, Z., Afonso, C.L., Kutish, G.F., Sussman, M.D., Rock, D.L. (1993) An african swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. *J Virol*, 67: 4391-4394.

Nicholas, J., Ruvolo, V., Zong, J., Ciuffo, D., Guo, H.G., Reitz, M.S. and Hayward, G.S. (1997) A single 13-kilobase divergent locus in the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome contains nine open reading frames that are homologous to or related to cellular proteins. *J Virol*, 71 : 1963-1974.

O'Neill, H.C. and Brennan, M. (1987) A role for early cytotoxic T cells in resistance to ectromelia virus infection in mice. *J Gen Virol*, 68: 2669-2673.

Oda, K-I. and 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. and McFadden, G. (1992) Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and myxoma growth factor. *J Virol*, 66 : 4720-4731.

Opgenorth, A., Strayer, D., Upton, C. and McFadden, G. (1992) Deletion of the growth factor gene related to EGF and TGF alpha reduces virulence of malignant rabbit fibroma virus. *Virology*, 186 : 175-191.

Pamer, E. and Cresswell, P. (1998) Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 16 : 323-358.

Parlato, S., Giammarioli, A.M., Logozzi, M., Lozupone, F., Matarrese, P., Luciani, F., Falchi, M., Malorni, W. and Fais, S. (2000) CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes : a novel regulatory mechanism of CD95 apoptotic pathway. *EMBO J*, 19: 5123-5134.

Perkus, M.E., Tartaglia, J. and Paoletti, E. (1995) Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases. *J Leukoc Biol*, 58 : 1-13.

Pestka, S. and Baron, S. (1981) Definition and classification of the interferons. *Meth Enzymol*, 78: 3-14.

Perutz, M. (Ed).(1996) *Structure des protéines : pathologie et approches thérapeutiques*. John Libbey Eurotext, Paris, 68-78.

Petit, F., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Fassy, F., Boucraut-Baralon, C. and Milon, A. (1996) Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Virol*, 70 : 5860-5866.

Quan, L.T., Caputo, A., Bleackley, R.C., Pickup, D.J. and Salvesen, G.S. (1995) Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J Biol Chem*, 270 : 10377-10379.

Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S. and Pickup, D.J. (1992) Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 69 : 597-604.

Romero, C.H., Barrett, T., Evans, S.A., Kitching, R.P., Gershon, P.D., Bostock, C. and Black, D.N. (1993) Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, 11 : 737-742.

Rosel, J.L., Earl, P.L., Weir, J.P. and Moss, B. (1986) Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and the translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment. *J Virol*, 60: 436-449.

Rother, K. And Till, G.O.(Ed). (1988) *The complement system*. Springer-Verlag, Berlin.

Rubin, H. (1996) Serine protease inhibitors (SERPINS): where mechanism meets medicine. *Nat Med*, 2 : 632-633.

Ruby, J. and Ramshaw, I. (1991) The antiviral activity of immune CD8+ T cells is dependant on interferon- $\gamma$ . *Lymph Cyto Res*, 10: 353-358.

Russell, R.J. and Robbins, S.J. (1989) Cloning and molecular characterization of the myxoma virus genome. *Virology*, 170: 147-159.

Saha, V., Chaplin, T., Gregorini, A., Ayton, P. and Young, B.D. (1995) The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cysteine-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:9737-9741.

Saurat, P., Gilbert, Y. and Ganiere J.-P. (1978) Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev Med Vet*, 129: 415-451.

Schindler, U., Beckmann, H. and Cashmore, A.R. (1993) HAT3.1, a novel Arabidopsis homoeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant J*, 4 : 137-150.

Schreiber, M. and McFadden, G. (1996) Mutational analysis of the ligand-binding domain of M-T2 protein, the tumor necrosis factor receptor homologue of myxoma virus. *J Immunol*, 157 : 4486-4495.

Schreiber, M., Rajarathnam, K. and McFadden, G. (1996) Myxoma virus T2 protein, a tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, is secreted as a monomer and dimer that each bind rabbit TNF $\alpha$ , but the dimer is a more potent TNF inhibitor. *J Biol Chem*, 271 : 13333-13341.

Schreiber, M., Sedger, L. and 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 : 2171-2181.

Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. and Heard, J.M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*, 2 : 338-342.

Sedger, L. and McFadden, G. (1996) M-T2: a poxvirus TNF receptor homologue with dual activities. *Immunol Cell Biol*, 74 : 538-545.

Senkevich, T.G., Bugert, J.J., Sisler, J.R., Koonin, E.V., Darai, G. and Moss, B. (1996) Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. *Science*, 273 : 813-816.

Sharp, T.V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G.N. and 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 : 302-315.

Shisler, J.L., Senkevich, T.G., Berry, M.J. and Moss, B. (1998) Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus [see comments]. *Science*, 279 : 102-105.

Shope, R.E. (1932) A transmissible tumor-like condition in rabbits. *J Exp Med*, 56: 793-802.

Shope, R.E. (1938) Protection of rabbits against naturally acquired infectious myxomatosis by previous infection by fibroma virus. *Proc. Soc.Exp.Biol.* 38:86.

Six, H. (1999) Rôle du gène MHR3 dans la pathogénie de la myxomatose. *Thèse pour le doctorat vétérinaire*. Université Paul Sabatier, Toulouse.

Smith, G.L. and Moss, B. (1983) Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene*, 25 : 21-28.

Smith, G.L. and Mackett, M. (1992) The design, construction, and use for vaccinia virus recombinants. In PRESS, C. (ed.) *Recombinant poxviruses*. Binns MM and Smith GL, Boca Raton, pp. 81-120.

Smith, G.L. (1993) Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion. The sixteenth Fleming Lecture. *J Gen Virol*, 74 :1725-1740.

Smith, G.L. and Vanderplasschen, A. (1998) Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol*, 440 : 395-414.

Sodeik, B., Doms, R.W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C.E., Van't Hof, W., Van Meer, G., Moss, B. and Griffiths, G. (1993) Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. *J Cell Biol*, 121: 521-541.

Spehner, D., Gillard, S., Drillien, R. and Kirn, A. (1988) A cowpox virus gene required for multiplication in Chinese hamster ovary cells. *J Virol*, 62 : 1297-1304.

Spriggs, M.K., Hruby, D.E., Maliszewski, C.R., Pickup, D.J., Sims, J.E., Buller, R.M. and VanSlyke, J. (1992) Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. *Cell*, 71 : 145-152.

Strayer, D.S., Cabirac, G., Sell, S. and Leibowitz, J.L. (1983) Malignant rabbit fibroma virus: observations on the cultural and histopathologic characteristics of a new virally-induced rabbit tumor. *J Natl Cancer Inst*, 71: 91-104.

Thouless, M.E. and Wildy P. (1975) Deoxypyrimidine kinases of herpes simplex viruses type 1 and 2: comparison of serological and structural properties *J Gen Virol*, 26: 159-170.

Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Darsak, K. and Kern, H. (1993) Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol*, 60: 163-178.

Tripathy, D.N. (1999) Swinepox virus as a vaccine vector for swine pathogens. *Adv Vet Med*, 41:463-480.

Tsuru, S., Kitani, H., Seno, M., Abe, M., Zinnaka, Y. and Nomoto K. (1983) Mechanism of protection during the early phase of a generalized viral infection. Contribution of phagocytes to protection against ectromelia virus. *J Gen Virol*, 64: 2021-2026.

Tulman, E.R., Afonso, C., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G.F. and Rock, D.L. (2001) The genome of lumpy skin disease virus. *J Virol* (In press).

Turner, P.C. and Moyer, R.W. (1992) An orthopoxvirus serpinlike gene controls the ability of infected cells to fuse. *J Virol*, 66 : 2076-2085.

Turner,P.C., and Moyer R.W. (2001) Serpins enable poxviruses to evade immune defenses. *ASM news*, 67: 201-209.

Turner, P.C., Musy, P.Y. and Moyer, R.W. (1995) Poxvirus serpins. In G.McFadden (ed.) *Viroceptors, virokines and related immunomodulators encoded by DNA viruses*. R.G. Landes Company, Austin, Texas, pp. 67-88.

Tyndale-Biscoe, C.H. (1994) Virus-vectored immunocontraception of feral mammals. *Reprod Fertil Dev*, 6 : 281-287.

Upton, C. and McFadden, G. (1986) Tumorigenic poxviruses: analysis of viral DNA sequences implicated in the tumorigenicity of Shope fibroma virus and malignant rabbit virus. *Virology*, 152 : 308-321.

Upton, C. and McFadden, G. (1986) DNA sequence homology between the terminal inverted repeats of Shope fibroma virus and an endogenous cellular plasmid species. *Mol Cell Biol*, 6 : 265-276.

Upton, C., Macen, J.L. and McFadden, G. (1987) Mapping and sequencing of a gene from myxoma virus that is related to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Virol*, 61 : 1271-1275.

Upton, C., Macen, J.L., Wishart, D.S. and McFadden, G. (1990) Myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus encode a serpin-like protein important for virus virulence. *Virology*, 179 : 618-631.

Upton, C., Macen, J.L., Schreiber, M. and McFadden, G. (1991) Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology*, 184 : 370-382.

Upton, C., Mossman, K. and McFadden, G. (1992) Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science*, 258 : 1369-1372.

Upton, C., Schiff, L., Rice, S.A., Dowdeswell, T., Yang, X. and McFadden, G. (1994) A poxvirus protein with a RING finger motif binds zinc and localizes in virus factories. *J Virol*, 68 : 4186-4195.

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.B (Eds). (2000) *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses.* Academic press, New York San Diego.

van Santen, V.L. (1991) Characterization of the bovine herpesvirus 4 major immediate-early transcript. *J Virol*, 65 : 5211-5224.

Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R.B. and Smith, G.L. (1998) 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 : 7544-7549.

Vanderplasschen, A., Hollinshead, M. and Smith, G.L. (1998) Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J Gen Virol*, 79 : 877-887.

- Vilagines, P. and Vilagines R. (1985) Les Poxviridés: caractères généraux in *Virologie médicale*, J. Maurin. Flammarion Médecine Sciences. P.310-319.
- Wade-Evans, A.M, Romero, C.H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasagayam, J., Fleming, M.J., Mertens, P.P. and 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*, 220:227-231.
- Wakamiya, N., Okada, N., Wang, Y.L., Ito, T., Ueda, S., Kato, S. and Okada H. (1989) Tumor cells treated with vaccinia virus can activate the alternative pathway of mouse complement. *Jpn J Cancer Res*, 80: 765-770.
- Watson, J.C., Chang, H-W. and Jacobs B.L. (1991) Characterization of a vaccinia virus-encoded double-stranded RNA-binding protein that may be involved in inhibition of the double stranded RNA-dependent protein kinase. *Virology*, 185: 206-216.
- Whisstock, J.C., Irving, J.A., Bottomley, S.P., Pike, R.N. and Lesk, A.M. (1999) Serpins in the *Caenorhabditis elegans* genome. *Proteins*, 36 : 31-41.
- Whisstock, J.C., Skinner, R., Carrell, R.W. and Lesk, A.M. (2000) Conformational Changes in Serpins: I. The Native and Cleaved Conformations of alpha(1)-Antitrypsin. *J Mol Biol*, 295 : 651-665.
- Whisstock, J., Skinner, R. and Lesk, A. M. (1998). An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem Sci*, 23: 63-67.
- Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1996) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, 84 : 769-779.
- Willer, D.O., McFadden, G. and Evans, D.H. (1999) The Complete Genome Sequence of Shope (Rabbit) Fibroma Virus. *Virology*, 264: 319-343.

Wong, G; and Goeddel D. (1986) Tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature*, 323: 819-822.

Woodroffe, G.M. and Fenner, F. (1962) Serological relationship within the poxvirus group : an antigen common to all members of the group. *Virology*, 16 : 334-341.

Woodroffe, G.M. and Fenner, F. (1965) Viruses of the Myxoma-Fibroma subgroup of the poxviruses. I. Plaque production in cultured cells, plaque reduction tests and cross-protection in rabbits. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 43: 123-142.

Xue, Y., BJORQUIST, P., INGHARDT, T., LINSCHTEN, M., MUSIL, D., SJOLIN, L., DEINUM, J. (1998) Interfering with the inhibitory mechanism of serpins ; crystal structure of a complex formed between cleaved plasminogen activator inhibitor type 1 and a reactive-centre loop peptide. *Structure*, 15 : 627-636.

Xu, X., Nash, P. and McFadden, G. (2000) Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. *Virus Genes*, 21 :97-109.

Yuen, L. and Moss, B. (1987) Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 : 6417-6421.

Zuniga, M.C., Wang, H., Barry, M. and McFadden, G. (1999) Endosomal/lysosomal retention and degradation of major histocompatibility complex class I molecules is induced by myxoma virus. *Virology*, 261 : 180-192.

Zuniga, M., Wang, H., Barry, M. and McFadden, G. (1999) Myxoma Virus Abrogates Cell-surface Expression of MHC I by Multiple Mechanisms. In *Virology*, A.i.A. (ed.) Second ICGEB-UCI Virology Symposium. Science Publishers, Inc., New Delhi.







Toulouse, 2001

NOM : GUERIN

PRENOM : Jean-Luc

TITRE : ANALYSE MOLECULAIRE DE LA SOUCHE ATTENUÉE VACCINALE SG33 DU VIRUS MYXOMATEUX. A LA RECHERCHE DES GENES PERDUS.

RESUME :

Le virus myxomateux (VM) est un poxvirus à spectre d'hôte très étroit, agent de la myxomatose, une maladie majeure du lapin européen *Oryctolagus cuniculus*.

La comparaison du génome d'un virus sauvage et de la souche atténuée vaccinale SG33 a permis d'identifier une macro-délétion dans la partie droite du génome viral. Le clonage et le séquençage de cette région délétée sur le SG33 a conduit à la mise en évidence de 6 gènes codant pour des facteurs non essentiels mais qui sont impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire et/ou le « spectre d'hôte ». L'analyse informatique des séquences nucléotidiques et protéiques a permis d'émettre des hypothèses fonctionnelles. Deux gènes, *serp2* et *serp3*, codent pour des protéines de la super-famille des Serpines (pour SERine Proteinase INhibitor) qui regroupe des protéines aux fonctions biologiques très variées : coagulation, fibrinolyse, inhibition du complément et inflammation. Trois gènes en tandem codent pour des protéines à répétition *ankyrine* qui interviennent dans des interactions protéine-protéine et sont présentes dans un grand nombre de protéines de poxvirus et qui réguleraient notamment le spectre tissulaire des virus. Ces facteurs ont été nommés MHR (*Myxoma Host Range*)-1, -2 et -3.

Le dernier gène identifié code pour une protéine comportant un motif *zinc finger*, appartenant à la classe des motifs LAP (*Leukemia Associated Protein*) et baptisée MV-LAP. MV-LAP est notamment homologue aux facteurs K3 et K5, codés par l'herpesvirus HHV-8, associé au sarcome de Kaposi. Ces deux facteurs sont impliqués dans la diminution de l'expression du CMH 1 à la surface des cellules infectées.

La caractérisation fonctionnelle de chacun de ces facteurs a confirmé leur implication dans le pouvoir pathogène du VM à des degrés divers. Les conséquences sur l'immunogénicité, l'innocuité et la stabilité de la souche vaccinale SG33 sont discutées.

MOTS-CLES : POXVIRUS / MYXOMATOSE / VACCIN / ANKYRINE / SERPINE / DOIGT DE ZINC

---

ENGLISH TITLE : MOLECULAR ANALYSIS OF THE MYXOMA VIRUS ATTENUATED VACCINAL STRAIN SG33. WHERE ARE THE LOST GENES GONE ?

ABSTRACT :

Myxoma virus (MV), a poxvirus, shows a very narrow host range and is agent of myxomatosis, a great disease of the European rabbit *Oryctolagus cuniculus*. By genome comparizon of a wild virus and the vaccinal attenuated strain SG33, we identified a huge deletion at the right side of the genome. Cloning and sequencing of the region deleted on SG33 allowed us to identify six genes encoding non essential factors involved in modulation of the host immune response and/or host-range. Computer analysis of nucleotide and protein sequences allowed functional hypothesis.

Two genes, *serp2* and *serp3*, encode serpins (SERine Proteinase INhibitor). Cellular members of the Serpin super-family play various biological roles in clotting, fibrinolysis, inhibition of Complement and inflammation.

Three tandemly-arranged genes encode ankyrin-rich proteins. Ankyrin motifs are involved in protein-protein interactions and are described in most if not all poxviruses, where they are supposed to regulate tissular host range. These MV factors were named MHR (*Myxoma Host Range*)-1, -2 and -3. Last gene encodes a zinc finger protein, member of LAP subclass (*Leukemia Associated Protein*) ; this factor was thus named MV-LAP. MV-LAP is homologous to K3 et K5 factors, encoded by Kaposi-associated herpesvirus HHV-8. These two factors downregulate MHC class I expression at the surface of infected cells. Fonctionnal characterization of these factors confirmed their involvement in MV virulence at various levels. Consequences on immunogenicity, safety and stability of the vaccinal strain SG33 are discussed.

KEY WORDS : POXVIRUS / MYXOMATOSIS / VACCINE / ANKYRIN / SERPIN / ZINC FINGER