Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

RÔLE DE L'HÉMAGGLUTININE DANS LA NEUROVIRULENCE MORBILLIVIRALE

Par
François Bonami

Mémoire présenté
pour l'obtention du grade Maître ès sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Examinateur interne	Peter Tijssen, PhD. INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Guy Lemay, PhD. Département de microbiologie, Université de Montréal
Directeur de recherche	Veronika von Messling, Dr. med. vet. INRS-Institut Armand-Frappier

Droits réservés de François Bonami, 2006

À mon grand-père Roger,

Remerciements

J'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de mon projet de recherche et plus particulièrement :

- Ma directrice de recherche, Dre Veronika von Messling, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et m'avoir permis de partager le résultat de mes recherches en participant à des congrès et autres activités scientifiques. Aussi, pour sa passion de la recherche et sa rigueur scientifique qui resteront un exemple pour moi.

- Tous les membres du laboratoire présents et passés, pour les moments agréables que nous avons vécus ensemble, les discussions scientifiques et pseudo-scientifiques. Je ne vous oublierai pas de sitôt et je vous engage dès que j'ai mon laboratoire!

- Mes parents, pour leurs encouragements, leur reconnaissance ainsi que pour leur support inconditionnel, sans lesquels il m'aurait été difficile de réaliser mon plein potentiel.

Liste des abréviations

ADEM : Encéphalomyélite démyélinisante aiguë

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ADN : Acide désoxyribonucléique

CDV : Virus de la maladie de carré

EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique

eGFP : Protéine fluorescente verte

F : Protéine de la fusion

FBS : Sérum bovin fœtal

g : Gramme

g : unité de gravité terrestre

GFAP : Protéine acidique fibrillaire gliale

H : Protéine de l'hémagglutinine

L : Protéine de la polymérase

LCS : Liquide cérébro-spinal

M : Protéine de la matrice

MIBE : Encéphalite à corps d'inclusion

MOI : Multiciplité d'infection

MV : Virus de la rougeole

MVA-T7 : Virus de la vaccine exprimant la polymérase T7

N : Nucléoprotéine

P : Phosphoprotéine

pb : Paire de base

PBMC : Cellules mononucléaire du sang périphérique

PCR : Réaction en chaîne de la polymérase

PHA : Phytohemagglutinine

p.i : Post infection

RNP : Ribonucléoprotéine

SLAM : Molécule du signalement de l'activation lymphocytaire

SNC : Système nerveux central

SSPE : Panencéphalite sclérosante subaiguë

$TCID_{50}$: 50% dose infectieuse en culture de tissus

µ : Micro

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation du génome et d'une particule morbillivirale 14
Figure 2 : Schéma de la pathogenèse morbillivirale 17
Figure 3 : Clonage du virus A75FH58 29
Figure 4 : Clonage du virus 58HA75 31
Figure 5 : Schéma des virus recombinants 41
Figure 6 : Phénotype d'infection des virus recombinants 43
Figure 7 : Graphique des cinétiques de réplication 44
Figure 8 : Furets survivants à l'infection 46
Figure 9 : Réplication virale *in vivo* 48
Figure 10 : Compte leucocytaires des furets infectés 49
Figure 11 : Prolifération lymphocytaire des furets infectés 51
Figure 12 : Imagerie macroscopique de cerveau infectés par A75H58 54
Figure 13 : Fluorescence de l'eGFP dans les bulbes olfactifs des furets infectés 55
Figure 14 : Niveau de l'infection du cerveau par voie hématogène et antérograde au moment du décès 57
Figure 15 : Identification des cellules cibles des virus A75eH et A75H58 au cerveau 59
Tableau 1 : Différence entre les protéines des souches 5804PeH et A75eH 63

Résumé

Les complications neurologiques sont la première cause de décès attribuable à la rougeole dans les pays sous-développés. L'encéphalite aigu, qui apparaît pendant la phase symptomatique de l'infection, est la forme la plus commune, et affecte un patient sur mille. Toutefois, les facteurs viraux qui contribuent à cette pathologie sont encore incompris dû au manque d'un modèle animal approprié.

Pour mieux comprendre les mécanismes et les facteurs viraux de la neurovirulence, nous avons utilisé un modèle basé sur l'étude du CDV chez les furets. Nous avons employé les virus recombinant A75eH, souche neurovirulente, et 5804PeH, souche non neurovirulente, qui contiennent une unité de transcription additionnelle codant pour l'eGFP qui permet la visualisation des cellules infectées.

Puisque l'attachement aux cellules cibles joue un rôle majeur dans le tropisme viral, nous avons émis l'hypothèse que la protéine d'attachement (H) déterminait le phénotype de neurovirulence observé avec le virus A75eH. Des virus chimériques ont été produits, dans lesquels la protéine H était échangée entre la souche neurovirulente A75eH et la souche non neurovirulente 5804PeH. Ainsi, les virus 58HA75 et A75H58 ont été produits. De plus, pour s'assurer que les protéines de fusion (F) et H interagissaient efficacement ensemble nous avons aussi créé des virus avec ces deux protéines échangées : 58FHA75 et A75FH58. Nous avons observé que la réplication de tous les virus chimériques, *in vitro*, était similaire aux virus parents, indiquant que les protéines H hétérologues interagissent efficacement et que les virus se répliquaient efficacement.

En caractérisant les virus, *in vivo*, nous avons trouvé que les différents virus chimériques se répliquaient efficacement et conservaient les propriétés immunosuppressives des virus parents. L'échange de la protéine H n'a pas influencé la durée de la maladie causée par les virus chimériques comparativement aux virus parents. Les virus ayant les protéines F et H échangées avaient une durée de la maladie qui différait d'avec les virus parents.

Les virus se sont révélés capables d'infecter le cerveau via deux voies d'infection : la voie antérograde par les bulbes olfactifs et hématogène par le plexus choroïde. Les virus possédant la protéine H de A75eH montre une plus forte expression de l'eGFP dans les bulbes olfactifs toutefois la protéine H de 5804PeH cause le même effet lors de

l'infection du plexus choroïde. Malgré cette influence positive de la protéine H de A75eH pour neuroinvasion par la voie antérograde, le facteur déterminant de l'intensité de la fluorescence était la durée de la maladie causée par le virus. Le tropisme des deux virus qui causent la maladie la plus longue, A75eH et A75H58, a permis de démontrer que peu importe la protéine H en question les deux virus sont efficaces pour infecter les cellules gliales et neuronales. Finalement, la protéine H de A75eH a une influence positive pour la neuroinvasion virale toutefois, la durée de la maladie est en majeur partie responsable de la neurovirulence observé aux bulbes olfactifs. Donc, d'autres protéines expliquant la différence dans la durée de la maladie entre les deux souches doivent être impliquées.

Étudiant

Directrice de recherche

Table des matières

Remerciements iii
Liste des abréviations iv
Liste des figures et tableaux vi
Résumé vii
Table des matières ix
Chapitre 1 : Revue de la littérature 12
1.1 Les morbillivirus 12
1.1.1 Taxonomie 12
1.1.1.1 La famille des *Paramyxoviridae* 12
1.1.1.2 Les morbillivirus 12
1.1.2 Le cycle de réplication 13
1.1.2.1 L'attachement et la fusion 13
1.1.2.2 Récepteurs des morbillivirus 15
1.1.2.3 Transcription, traduction et relâche 15
1.1.3 Tropisme viral 16
1.1.3.1 Transmission 16
1.1.4 Manipulation génique 16
1.1.4.1 Principe de génétique inverse 16
1.1.4.2 Production des morbillivirus recombinants 18
1.1.4.3 Production des virus recombinants sauvages 18
1.2 Le modèle animal 19
1.2.1 Les différents modèles animaux pour l'étude de la pathogenèse morbillivirale. 19
1.2.2 Les modèles pour l'étude du CDV 19
1.3 La neurovirulence morbillivirale 20
1.3.1 Les complications associées avec le MV 20
1.3.1.1 L'ADEM (encéphalomyélite démyélinisante aiguë) 21
1.3.1.2 La MIBE (encéphalite à corps d'inclusion) 21
1.3.1.3 La SSPE (panencéphalite sclérosante subaiguë) 21
1.3.2 Les complications associées avec le CDV 22

Chapitre 2 : Objectif du projet 25
Chapitre 3 : Matériel et Méthodes 26
3.1 Cellules et virus 26
3.1.1 Origine et propagation des cellules 26
3.1.2 Origine et propagation des virus 26
3.1.3 Titrage des préparations virales 27
3.1.4 Cinétiques virales 28
3.2 Production des virus recombinants 27
3.2.1 Stratégie de clonage 27
3.2.2 Clonage des virus chimériques avec les gènes F et H échangés 28
3.2.3 Clonage des virus chimériques avec le gène H échangé 30
3.2.4 Assemblage des plasmides génomiques 32
3.2.5 Génération des virus chimériques 33
3.3 Caractérisation des virus chimériques *in vitro* 34
3.4 Caractérisation des virus chimériques *in vivo* 35
3.4.1 Anesthésie, infection et prélèvements de sang 35
3.4.2 Évaluation clinique 35
3.4.3 Paramètres étudiés 36
3.4.3.1 Paramètres virologiques 36
3.4.3.1.1 Titrage viral 36
3.4.3.2 Paramètres immunologiques 37
3.4.3.2.1 Compte des globules blancs 37
3.4.3.2.2 Prolifération des PBMC 37
3.4.4 Pathologie et imagerie 38
3.4.5 Immunohistochimie 38
3.4.5.1 Préparation des tissus 38
3.4.5.2 Coloration des tissus 39
3.4.5.2.1 Localisation de la Protéine Acidique Fibrillaire Gliale (GFAP) 39
3.4.5.2.2 Localisation de Nissl 39

Chapitre 4 : Résultats 40
4.1 Production des virus chimériques avec un ou des gènes de l'enveloppe échangé(s) 40
4.2 Caractérisation des virus chimériques *in vitro* 40
4.2.1 Les virus chimériques possèdent un phénotype d'infection similaire . 42
4.2.2 Réplication efficace des virus chimériques 42
4.3 Infection des furets par les virus chimériques 45
4.3.1 Létalité des virus chimériques 45
4.3.2 Forte réplication des virus chimériques dans les PBMC 47
4.3.3 Évaluation du compte leucocytaire 47
4.3.4 Cinétique de la capacité de prolifération des lymphocytes 50
4.4 Caractérisation du tropisme 52
4.4.1 Imagerie macroscopique 52
4.4.2 Imagerie microscopique 53
4.4.2.1 Infection du plexus choroïde 53
4.4.2.2 Infection des bulbes olfactifs 56
4.4.2.3 Comparaison du tropisme de A75eH et A75H58 58
Chapitre 5 : Discussion 60
5.1 Durée de la maladie versus neuroinvasion 60
5.2 Effet positif de la protéine d'attachement de A75eH sur la neuroinvasion 61
5.3 Rôle de la protéine de fusion dans la pathogenèse 62
5.4 Lien entre l'immunosuppression et la neuroinvasion 65
5.5 Conclusions 66

Liste des références 68

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1 Les morbillivirus

1.1.1 Taxonomie

1.1.1.1 La famille des *Paramyxoviridae*

Les virus enveloppés à ARN (acide ribonucléique) monocaténaire négatif possédant un génome non-segmenté sont regroupés en quatre familles : les *Rhabdoviridae, Filoviridae*, *Paramyxoviridae et Bornaviridae*.

La famille des *Paramyxoviridae* a été classifié par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) en la sous-famille : des *Paramyxovirinae* qui regroupe cinq genres : Respirovirus, Rubulavirus, Henipavirus, Avulavirus et Morbillivirus, et la sous-famille des *Pneumovirinae* comportant les genres Pneumovirus et Metapneumovirus (Pringle, 1999). La classification est basée sur l'organisation du génome, les activités biologiques des protéines et l'identité de séquence entre les différentes protéines puisque la plupart des génomes sont maintenant séquencés.

1.1.1.2 Les morbillivirus

Les morbillivirus sont responsables d'une infection humaine (virus de la rougeole *measles virus* ou MV) et de plusieurs infections animales. Différents membres de cette famille peuvent infecter les animaux terrestres comme le bétail (virus de la peste bovine, *rinderpest virus* ou RPV), les chèvres et les moutons (virus de la peste des petits ruminants ou PPRV) et un grand éventail de carnivores (virus de la maladie de carré, *canine distemper virus* ou CDV). Les mammifères marins, par exemple, les phoques (*phocine distemper virus* ou PDV) ainsi que les marsouins et les dauphins (virus des cétacés) sont sujet à une infection morbillivirale.

Le génome morbilliviral est d'environ quinze à seize kilopaires de bases et est encapsidé de façon hélicoïdale par la nucléoprotéine (N). La polymérase (L) et le cofacteur de la polymérase (P) s'associent à l'ARN encapsidé pour former la

ribonucléoprotéine (RNP) qui est le complexe de réplication du virus (Pringle, 1991) (Fig. 1). La protéine de la matrice (M) fait le pont entre la RNP (Peeples, 1991) et les deux glycoprotéines de l'enveloppe : la protéine de fusion (F) et la protéine d'hémagglutinine (H) via les queues cytoplasmiques de celles-ci. Les deux protéines non-essentielles (C et V) sont traduites à partir du cadre de lecture ouvert de P par «RNA editing», qui consiste en l'ajout d'une guanine non appariée (V) ou par utilisation d'un autre cadre de lecture (C) (Bellini et al., 1984; Cattaneo et al., 1989).

1.1.2 Cycle de réplication

Le cycle de réplication des morbillivirus est entièrement cytoplasmique. Les morbillivirus n'ont pas besoin de la machinerie cellulaire de l'hôte pour leur réplication, étant des virus à ARN de polarité négative, puisqu'ils possèdent leur propre complexe de réplication.

1.1.2.1 Attachement et fusion

L'attachement au récepteur cellulaire est un pré-requis pour une infection efficace. Pour les morbillivirus, la protéine H est responsable de cet attachement au récepteur cellulaire. Après la liaison de la protéine H à son récepteur, la protéine F effectue la fusion des membranes virales et cellulaires. Plus précisément, suite à l'attachement du virus à la cellule cible via la protéine H, il y aura changement de conformation de la protéine F qui est étroitement liée à H. Ce changement de conformation va permettre l'insertion du peptide de fusion de la protéine F dans la membrane de la cellule et la fusion des membranes virales et cellulaires aura lieu. Il est à noter que la protéine F doit préalablement être activée dans l'appareil de Golgi. L'enzyme ubiquitaire furine clivera la protéine F_0 en F_1 et F_2. L'extrémité du peptide F1 possède le peptide de fusion et est libéré par ce clivage essentiel à l'activation de la protéine. Une fois que la fusion des membranes est effectuée via la protéine F, la RNP pénètre dans le cytoplasme de la cellule cible et le cycle de réplication du virus débute.

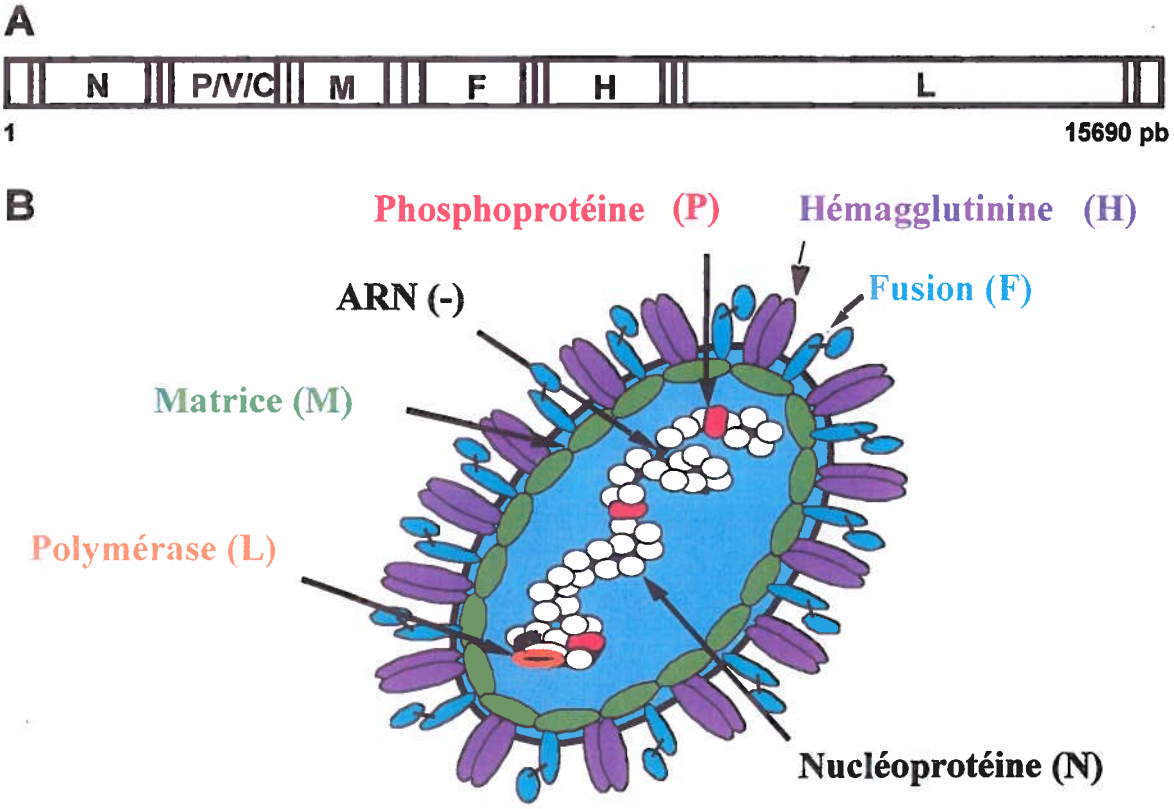

Figure 1: Représentation du génome et d'une particule morbillivirale. (A) Schéma du génome du CDV qui code pour huit protéines (N, nucléoprotéine; P, phosphoprotéine; protéine V; protéine C; M, matrice; F, fusion; H, hémagglutinine; L, polymérase), les barres entre les gènes représentent les régions intergéniques. (B) Schéma d'une particule morbillivirale. L'ARN génomique (noir) est encapsidé par la nucléoprotéine, ensuite viennent la matrice, l'enveloppe et les deux glycoprotéines.

1.1.2.2 Récepteurs des morbillivirus

Une des molécules connue comme étant un récepteur des morbillivirus est la molécule du signalement de l'activation lymphocytaire (*signaling lymphocyte activation molecule*; SLAM, CD150) qui est présente sur les cellules T activées, sur certaines cellules B et les macrophages, ce qui explique le tropisme lymphocytaire et l'immunosuppression associés aux morbillivirus (Hahm et al., 2003; Hsu et al., 2001 ; Tatsuo, Ono, and Yanagi, 2001). En plus, CD46, un cofacteur du complément est reconnu comme un récepteur des souches vaccinales de MV (Liszewski, Post, and Atkinson, 1991). L'implication de ce récepteur dans la pathogenèse du virus n'est toutefois pas élucidée. Finalement, pour expliquer le tropisme épithélial et neurologique observé, il faut présumer que d'autres molécules ou mécanismes d'entrées existent (Andres et al., 2003).

1.1.2.3 Transcription, traduction et relâche

Une fois à l'intérieur de la cellule, la RNP a deux fonctions différentes. D'une part, la transcription des gènes du virus en ARN messager (ARNm) ce qui va permettre la synthèse des protéines virales. D'autre part, la réplication du génome viral qui est aussi essentielle pour la production de particules virales. Ces deux événements surviennent séquentiellement dans le temps, c'est-à-dire, que tout d'abord, il y a la transcription de l'ARN du virus en ARNm qui mènera à la synthèse des protéines virales. Après l'accumulation suffisante des protéines virales, le virus débute la réplication de son génome. Premièrement, l'ARN de polarité négative du virus est répliqué en ARN de polarité positive qui peut ensuite servir de matrice pour la production d'autres copies d'ARN de polarité négative. Lorsqu'il y aura un nombre suffisant de protéïnes et d'ARN génomique virale la particule sera assemblée, toujours à l'intérieur du cytoplasme. La protéine M se dépose sur la face interne de la membrane cytoplasmique tandis que les glycoprotéines de l'enveloppe F et H s'insèrent dans celle-ci. Ces deux glycoprotéines ont tout d'abord, séjournées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi où elles ont été apprêtées, pour la glycosylation et le repliement de celle-ci. Les molécules de la RNP s'associeront à la protéine M et quitteront la cellule par bourgeonnement

entraînant avec elles une partie de la membrane cytoplasmique, par le fait même, les glycoprotéines de l'enveloppe F et H (Lamb, 1996).

1.1.3 Tropisme viral

1.1.3.1 Transmission

Les morbillivirus sont hautement contagieux et transmis par aérosols. Le premier foyer d'infection est constitué des cellules épithéliales du tissu lymphoïde du nasopharynx. La réplication primaire du virus s'effectue au niveau du tissu lymphatique du tractus respiratoire. Aux jours trois à sept post infection (p.i) on observe une fièvre transitoire ainsi qu'une lymphopénie qui marque la première virémie résultant de l'infection de tous les tissus lymphatiques (Iwatsuki et al., 1995; Krakowka, Higgins, and Koestner, 1980; Sakaguchi et al., 1986). La seconde virémie survient plusieurs jours plus tard et résulte en l'infection des cellules épithéliales dans tout le corps. (Blixenkrone-Moller, 1989; Okita et al., 1997) Accompagnant cette seconde virémie surviennent les éruptions cutanées qui marquent le début de la phase symptomatique de l'infection caractérisée par une conjonctivite ainsi qu'une perte de poids. Des signes gastro-intestinaux et respiratoires peuvent être observés et sont souvent compliqués par des infections secondaires bactériennes. De plus, différentes complications neurologiques peuvent survenir (Fig. 2).

1.1.4 Manipulation génique

1.1.4.1 Principe de génétique inverse

Avec l'avènement de la génétique inverse, plusieurs techniques sont utilisées pour produire les virus recombinants. Les virus à ADN ainsi que les virus à ARN de polarité positive, donc sous forme codante, utilisent la machinerie cellulaire de l'hôte pour se répliquer. Toutefois, les virus à ARN de polarité négative, sous forme anti-codante, ne peuvent se servir de cette machinerie mais possèdent leur propre complexe de réplication, la ribonucléoprotéine. Pour produire les virus recombinants d'ARN de polarité négative, il faut donc ajouter les protéines formant ce complexe.

Figure 2: Schéma de la pathogenèse morbillivirale. La maladie débute avec le prodrome jusqu'à une semaine après l'infection. Vient ensuite la phase symptomatique qui dure environ deux semaines. Une encéphalite aiguë peut se développer durant cette période ou survient la guérison. L'encéphalite tardive apparaît de six semaines à six mois après l'infection.

1.1.4.2 Production des morbillivirus recombinants

Puisque le CDV est un virus à ARN de polarité négative il faut fournir, en *trans*, les protéines N, P et L, formant son complexe de réplication. Différents systèmes ont été mis en place pour la génération de ces virus. Le plus populaire est de transfecter quatre plasmides, l'un contenant le génome du virus à produire et les trois autres codent pour les trois protéines formant le complexe de réplication. Ces quatre plasmides sont tous sous le contrôle d'un promoteur de la polymérase T7, qui sera fourni soit par un virus de la vaccine recombinant ou est déjà exprimée par les cellules utilisées (Radecke et al., 1995; Schneider et al., 1997). La polymérase T7 mène subséquemment à la production des ARNm des protéines du complexe de réplication ainsi qu'à l'ARN génomique viral. Les protéines N, P et L vont ensuite procéder à la transcription et la réplication du génome. Cette réplication va permettre la formation de syncytiums sur des cellules susceptibles au virus ainsi qu'à la relâche des particules infectieuses (von Messling et al., 2001). Jusqu'à ce jour, des systèmes analogues sont disponibles pour le MV, le CDV et le RPV (Barrett et al., 2003; Gassen et al., 2000; Radecke et al., 1995).

1.1.4.3 Production des virus recombinants sauvages

Les techniques de productions des virus recombinants ont tout d'abord été effectuées avec des souches de laboratoires, donc atténuées et adaptées en culture cellulaire. Pour ce qui est des souches sauvages, il est impératif d'utiliser un type cellulaire qui exprime le récepteur SLAM, pour prévenir l'atténuation du virus lors de la production et des passages subséquents. Un système utilisant les cellule de singe B95a exprimant le SLAM et le virus de la vaccine pour la polymérase T7 a été mis au point pour produire une souche sauvage de MV (Takeda et al., 2000). Un système analogue utilisant les cellules VerodogSLAMtag a été utilisé pour récupérer une souche sauvage de CDV (von Messling et al., 2003).

1.2 Le modèle animal

1.2.1 Les différents modèles animaux pour l'étude de la pathogenèse morbillivirale

L'étude de la pathogenèse et de la virulence morbillivirale s'effectue dans plusieurs espèces différentes. Les chimpanzés et les macaques sont utilisés pour étudier le virus de la rougeole toutefois, ce modèle comporte certaines lacunes puisque les animaux ne développent pas toute la gamme de symptômes associés à une infection chez l'homme. Par exemple, pour ces primates les éruptions sont moins sévères et la lymphopénie est transitoire (Stittelaar et al., 2000; Takeda et al., 2000; Zhu et al., 1997) De plus, ils sont très dispendieux et les expériences demandent un grand nombre d'animaux (Patterson, Manchester, and Oldstone, 2001).

Les rongeurs sont aussi utilisés pour étudier les morbillivirus maglré le fait qu'ils ne sont pas des hôtes naturels. Toutefois, les souris ont été employées pour la caractérisation de la neurovirulence suite à une injection intracrânienne (Duprex et al., 1999). Pour augmenter l'efficacité après une infection intra-nasale des souris transgéniques possédant les récepteurs SLAM et CD 46 humains seul ou en combinaison ont été créées (Mrkic et al., 2000; Shingai et al., 2005; Welstead et al., 2005). Cependant, elles ne reflètent pas une maladie typique et la réplication reste inefficace (Oldstone et al., 1999; Patterson, Manchester, and Oldstone, 2001). Des rats à queue blanche permettent une plus forte réplication mais ne reproduisent que des aspects respiratoires de la rougeole (Niewiesk, 1999; Niewiesk et al., 1997).

Le RPV et PPRV pourraient être étudiés chez leurs espèces hôtes naturelles, les bovins ou les chèvres et moutons, respectivement. Toutefois, ces virus sont indigènes à l'Amérique du Nord et leur utilisation est limitée aux laboratoires spécialisés (Lund et al., 2000; Mahapatra et al., 2006).

1.2.2 Les modèles pour l'étude du CDV

Le chien est l'un des modèles pour l'étude du CDV, cependant bien que le virus se réplique dans l'animal, seulement une fraction de ceux-ci développent des complications neurologiques (Summers, Greisen, and Appel, 1984; Winters et al., 1983).

L'avantage du CDV est qu'il infecte un large spectre de carnivores incluant le chien et le furet permettant l'étude des interactions entre le virus et l'hôte. Le furet présente des atouts comparativement aux autres modèles utilisés parce qu'il est très sensible au virus, en fait, 100% des souches sauvages sont létales pour le furet (Stephensen et al., 1997; Welter et al., 2000). Les signes cliniques notés suite à l'infection sont reproductibles d'un animal à un autre.

Un furet infecté par le CDV présente des signes cliniques caractéristiques de la maladie morbillivirales. Suite à l'infection, un tropisme du virus pour les PBMC est observé et mène à la diminution du nombre de ceux-ci et à une suppression du système immunitaire (von Messling et al., 2003). Ensuite, le furet développe des éruptions cutanées de couleur rougeâtre présentes, tout d'abord autour de la bouche du furet mais qui se généralise plus tard dans l'infection, ce qui correspond à l'infection du tissu épithélial (von Messling, Milosevic, and Cattaneo, 2004).

Selon la souche utilisée, c'est-à-dire, neurovirulente ou non, nous pouvons remarquer la présence du virus dans certaines régions du SNC, ce qui rend possible les études portant sur la neurovirulence morbillivirale (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006). Il est aussi à noter que l'inoculation de l'animal reproduit la voie naturelle d'infection, c'est-à-dire, de façon intranasale et non intracrânienne comme avec les souris.

Finalement, puisque le virus mène à une forte immunosuppression et il peut y avoir infection du furet par des pathogènes opportuniste qui peuvent causer une pneumonie menant à la mort du furet (Beckford, Kaschula, and Stephen, 1985).

1.3 La neurovirulence morbillivirale

1.3.1 Les complications associées avec le MV

Les trois complications les plus sérieuses causées par le MV surviennent dans le système nerveux central (SNC). Elles peuvent être de deux types, soit aiguë ou chronique. Ces complications sont l'encéphalomyélite démyélinisante aiguë (Acute Disseminated Encephalomyelitis; ADEM), l'encéphalite à corps d'inclusion (Measles Inclusion Body Encephalitis; MIBE) et la panencéphalite sclérosante subaiguë (Subacute Sclerosing Panencephalitis; SSPE).

1.3.1.1 Encéphalomyélite démyélinisante aiguë (ADEM)

L'ADEM se manifeste cinq à six jours après l'apparition des éruptions cutanées lorsqu'un enfant sur mille commence à souffrir d'une encéphalite aigu (Nasr, Andriola, and Coyle, 2000). Dans le cas d'enfants vaccinés, l'encéphalite est trois fois moins fréquente. L'atteinte du SNC est, selon certains, habituelle puisque des changements dans l'électroencéphalogramme sont notés pour près de 50% des patients. La présence des protéines ou de l'ARN virale n'a jamais été démontrée dans le cerveau des enfants qui décèdent de l'ADEM (Gendelman et al., 1984; Moench et al., 1988). L'ADEM est associée a une démyélination périvasculaire répandue de la gaine de myéline des neurones près de petits vaisseaux sanguins dans le cerveau. Toutefois, les mécanismes entourant ce phénomène sont encore incompris. Certains suggèrent que des réactions auto-immune jouerait un rôle.

1.3.1.2 Encéphalite à corps d'inclusion (MIBE)

La deuxième complication du SNC est la MIBE, qui affecte les patients immunodéprimés, deux à six mois après l'infection aiguë. Elle est autant due au vaccin qu'au virus de type sauvage. Le mécanisme par lequel le virus atteint le cerveau et cause une infection persistante chez les patients atteint de MIBE n'est pas bien compris.

1.3.1.3 Panencéphalite sclérosante subaiguë (SSPE)

La dernière complication, la SSPE est beaucoup plus rare et affecte les enfants (allant de un cas sur 10 000 à un cas sur 25 000) suite à la phase aigu de l'infection par le MV (Takasu et al., 2003). La SSPE touche plus les hommes que les femmes avec un ratio de 2,5 : 1 et elle est causée par l'infection persistante du MV (Connolly et al., 1967; Halsey et al., 1980). Les facteurs qui favorisent l'apparition d'une SSPE plusieurs années après l'infection aiguë sont inconnus. Toutefois, avoir été infecté par MV avant l'âge de deux ans est un facteur qui favoriserait l'apparition d'une SSPE (Jabbour et al., 1972). Un rôle potentiel des anticorps maternels a été suggéré puisque ces anticorps seraient capables d'établir une infection persistante et moduler l'infection aiguë, *in vitro*, en

culture cellulaire (Fujinami and Oldstone, 1979 ; Schneider-Schaulies et al., 1992). Cependant, aucune preuve directe ne vient confirmer cette théorie.

Les premiers symptômes de la SSPE apparaissent généralement huit ans après l'infection aiguë par le MV (Modlin et al., 1977). Il existerait un mécanisme de transmission du virus de neurone à neurone n'impliquant pas le récepteur ni la formation de syncytium, probablement via la synapse (Lawrence et al., 2000). Il a été montré que les virus causant la SSPE sont souvent mutés dans le gène M et dans la queue cytoplasmique de la protéine F ce qui rendrait ces virus plus efficaces à fusionner (Cathomen, Naim, and Cattaneo, 1998). La maladie est caractérisée par une forte démyélination ainsi qu'une profonde infection des neurones. Les inclusions spécifiques au MV sont présentes autant dans le cytoplasme que dans les noyaux de cellules infectées (McQuaid et al., 1993). Dans des stades plus tardif de la SSPE, une infection des astrocytes, oligodendrocytes et des cellules endothéliales a été montrée (Kirk et al., 1991). Il est suggéré que les inclusions cytoplasmiques correspondent aux sites de réplication et de transcription du virus, cependant la nature des inclusions présentes dans le noyau n'est pas connue. Il pourrait s'agir d'un complexe formé par la protéine N puisqu'elle peut migrer vers le noyau (Huber et al., 1991). L'incidence de la SSPE a été grandement réduite dû aux programmes de vaccination contre le MV.

1.3.2 Les complications associées avec CDV

Parmi les morbillivirus, le CDV et les virus apparentés qui infectent les mammifères marins entraînent la plus haute incidence de complications du SNC. Jusqu'à 30% des chiens infectés avec le CDV présentent des signes d'atteinte du SNC pendant ou après l'infection et la plupart des carnivores qui succombent au CDV ont des évidences d'infection au SNC (Domingo et al., 1990 ; Griot et al., 2003; Kennedy et al., 1989 ; Summers, Greisen, and Appel, 1984 ; Winters et al., 1983). Les complications neurologiques associées au CDV peuvent survenir pendant la phase symptomatique ou après la phase symptomatique, caractérisées par la présence ou l'absence de virus et survenir plus tardivement comme l'encéphalite du chien âgé qui rappelle les complications d'ordre neurologique observées avec le MV.

Tous les morbillivirus ont un fort tropisme lymphocytaire qui s'explique par la présence de leur récepteur principal le SLAM sur une variété de cellules immunitaires (Cocks et al., 1995 ; Sidorenko and Clark, 2003 ; Tatsuo, Ono, and Yanagi, 2001). Dans le cas d'un furet infecté par une souche virulente du CDV, plus de 50% des PBMC contiennent des particules infectieuses (von Messling et al., 2003). Grâce à ces résultats et au fait que les morbillivirus sont des virus hautement associés aux cellules, il est généralement pensé que le contact entre le virus et le SNC survient par l'intermédiaire de PBMC infectés. Des études précédentes réalisées sur des chiens avec des isolats sauvages typiques tel que la souche A75/17 supportent cette théorie (Summers, Greisen, and Appel, 1984).

Au début de la phase symptomatique, environ 14 jours après l'inoculation intranasale, les cellules infectées sont détectées majoritairement dans les espaces périvasculaires du SNC, du plexus choroïde et de l'épendyme (Higgins et al., 1982 ; Summers, Greisen, and Appel, 1979). Trois semaines après l'infection, des cellules gliales et des neurones infectés par le CDV sont trouvées dans la matière blanche et un commencement de démyélination est observé à l'intérieur de ces régions (Tipold et al., 1999). L'infection du SNC est a son maximum quatre à cinq semaines après l'inoculation. À ce moment, le virus est détecté dans les neurones et les cellules gliales à l'intérieur de la matière blanche et grise localisé en foyers (Lisiak and Vandevelde, 1979 ; Vandevelde et al., 1985 ; Wunschmann et al., 1999). À ce stade de l'infection, 10% des chiens meurent d'une encéphalite aiguë pendant que leur système immunitaire échoue à contrôler l'infection.

Parmi les animaux qui vont monter une réponse immunitaire cellulaire et humorale efficace l'engorgement leucocytaire périvasculaire et l'infiltration lymphocytaire des régions infectées surviennent en même temps que les éruptions cutanées tandis que les autres signes de la maladie régressent et des anticorps neutralisant spécifiques au CDV sont détectés dans le sérum et le LCS (Summers, Greisen, and Appel, 1979 ; Tipold et al., 1999 ; Wunschmann et al., 1999). Cette réponse immunitaire résulte en l'élimination du virus du SNC, mais peut-être accompagnée par une démyélination continue, laquelle est responsable du développement de signes neurologiques chez

certains animaux plusieurs semaines après la guérison de l'infection aiguë (Summers, Greisen, and Appel, 1984 ; Vandevelde and Zurbriggen, 2005).

Chapitre 2 : Objectifs du projet

Le but de mon projet était de déterminer le rôle de la protéine d'attachement du CDV dans la neurovirulence. Des études précédentes avaient démontré le rôle de la protéine H dans le tropisme des morbillivirus. Les protéines H d'une souche sauvage de CDV et de souches atténuées de MV et du CDV avaient été échangées entre elles et le tropisme viral en culture cellulaire dépendait de la protéine d'attachement présente (von Messling et al., 2001). Une autre étude avait montré que la protéine H provenant d'une souche adaptée au cerveau de souris pouvait conférer le neurotropisme à la souche vaccinale de MV, en infectant par la voie intracrânienne (Duprex et al., 1999).

Deux souches virales du CDV ont été utilisées pour procéder à l'infection des furets. La souche neurovirulente A75eH, qui mène au décès des animaux en trois à cinq semaines et la souche 5804PeH, qui cause une maladie de deux semaines et n'est pas connu pour infecter le cerveau (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006; von Messling, Milosevic, and Cattaneo, 2004). Les virus possèdent une unité de transcription additionnelle qui code pour la protéine fluorescente verte qui permet d'identifier les cellules ciblées lors de l'infection.

L'hémagglutinine étant responsable de l'attachement virale nous avons fait l'hypothèse que cette protéine était à la base du phénotype de neurovirulence observé pour la souche A75eH. Le premier objectif a été de produire des virus chimériques, en procédant à l'échange de la protéine H entre la souche A75eH et 5804PeH. Ces virus ont été nommés 58HA75 et A75H58. Puisque l'interaction entre les protéines F et H est essentielle à l'activation de la protéine F et l'efficacité de l'infection, nous avons aussi produits des virus ayant les deux glycoprotéines de l'enveloppe échangées : les virus 58FHA75 et A75FH58. La première partie du nom représente le génome utilisé pour la construction et la deuxième partie la ou les protéines échangée(s).

Le deuxième objectif était de caractériser ces virus chimériques, *in vitro*, et par la suite dans les furets. Puisque le but du projet était de déterminer le rôle de la protéine d'attachement dans la neurovirulence, l'expression et la localisation de l'eGFP des virus chimériques ont finalement été observées macroscopiquement et microscopiquement au cerveau.

Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

3.1 Cellules et virus

3.1.1 Origine et propagation des cellules

Les cellules VerodogSLAMtag (von Messling et al., 2003), dérivées des cellules Vero, qui expriment la molécule SLAM du chien de façon constitutive, et les cellules 293T (ATCC CRL-1573) issues de reins embryonnaires humains sont utilisées pour l'étude. Toutes les cellules sont cultivées dans du milieu Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM, Invitrogen) en présence de 5% de sérum fœtal bovin (FBS, Invitrogen). Une fois que les cellules atteignent une confluence de 90%, le milieu est enlevé et 0,25% trypsine/EDTA ou Versene (les deux d'Invitrogen) est ajouté pour détacher les cellules du flacon. Après une incubation de 10 min à 37°C et 5% CO_2, les cellules détachées sont mélangées dans du DMEM 5% FBS, centrifugées à 800 *g* pour 5 min à température de la pièce, et le culot est resuspendu dans un volume approprié pour l'utilisation envisagée. Dix % des cellules sont remis dans le flacon avec un volume de DMEM 5% FBS suffisant pour les maintenir.

3.1.2. Origine et propagation des virus

Toutes les souches du CDV utilisées dans cette étude sont recombinantes et expriment la protéine fluorescente verte (*enhanced green fluorescent protein,* eGFP). Les souches sauvages 5804PeH et A75eH (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006; von Messling, Milosevic, and Cattaneo, 2004) portent une unité de transcription additionnelle entre leurs gènes H et L. Les stocks viraux sont produits en infectant des cellules VerodogSLAMtag, dans le cas des virus sauvages, avec une multiplicité d'infection (*multiplicity of infection,* MOI) de 0,01. Le flacon est incubé à 32°C et 5% CO_2 jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique, caractérisé par la formation de cellules géantes nommées syncytiums, affecte 80% des cellules. Ensuite, elles sont grattées dans le surnageant, qui est aliquoté et congelé à –80°C.

3.1.3. Titrage des préparations virales

Le titre des préparations virales est déterminé dans des plaques de 96 puits contenant 10 000 cellules/puit dans 50 uL de DMEM 5% FBS. Le titrage des virus est réalisé avec les cellules VerodogSLAMtag. Après une nuit à 37°C et 5% CO_2 afin de laisser les cellules adhérer, 100 µL d'une dilution 1/10 la préparation virale dans du DMEM 5% FBS sont transférés dans 4 des 96 puits. Le titrage consiste en huit dilution 1/10 successives, résultant dans des dilutions de $1:10^1$ jusqu'à $1:10^8$. Après trois jours d'incubation à 37°C et 5% CO_2, les puits sont examinés sous le microscope à contraste de phase pour identifier le développement des syncytiums. Le titre est calculé avec la formule de Kaerber (Mahy, 1996) et exprimé en en $\log_{10}$ $TCID_{50}$. Pour chaque stock viral, le titrage est répété au moins deux fois.

3.1.4 Cinétiques virales

Les capacités de réplication et de dissémination des différents virus sont évaluées en effectuant des cinétiques de production. Pour y parvenir, 400 000 cellules VerodogSLAMtag dans 500 µl de DMEM 5 % FBS sont déposées dans chaque puit d'une plaque de 12 puits. Les cellules sont infectées avec un volume de 500 µl du virus à une MOI de 0,01 par puit. Après 3 h d'incubation, le milieu est aspiré et remplacé par 1 mL de DMEM 5 % FBS. Chaque jour, le surnageant de deux puits est récolté. Ensuite, 1 mL de DMEM 5 % FBS est ajouté à chaque puit et les cellules sont grattées. Les échantillons contenant le surnageant et les cellules sont ensuite aliquotés et congelés à -80°C, avant d'évaluer leur titre viral tel que décrit dans la section 3.1.3. Pour chaque virus l'expérience est réalisée à deux reprises, résultant en quatre valeurs par point de récolte.

3.2. Production des virus recombinants

3.2.1. Stratégie de clonage

Pour élucider le rôle de l'enveloppe virale dans la neurovirulence, quatre virus chimériques ont été produits. Nous avons échangé les gènes codant pour les protéines H

et F ou seulement celui codant pour la protéine H entre les virus 5804PeH et A75eH. Les virus 58FHA75, 58HA75, A75FH58 et A75H58 ont donc été produits. La première partie du nom signifie le génome qui est utilisé pour construire le virus et la dernière partie correspond à la provenance des protéines soit H ou F et H.

Pour effectuer le clonage de ces virus, nous nous sommes servis de sites de restriction qui sont présents aux mêmes endroits dans les séquences deux virus parents. Les gènes F et H peuvent être échangés en effectuant une digestion, à l'aide de sites de restriction unique (Fig. 3A, les sites utilisés sont indiqués par une flèche).

Dans le cas du virus avec l'échange de la protéine H seulement, une des extrémités ne possède pas de site restriction. Alors, il a fallu amplifier le gène H en deux temps. Tout d'abord, en amplifiant le fragment en 3' du gène H (Fig. 4B, fragment A1) par PCR. Ensuite, amplifier l'extrémité 5' de ce fragment jusqu'à la fin du gène H (Fig. 4B, fragment A2). Nous ne pouvons effectuer l'échange entre les deux souches directement puisque seul le site de restriction à la fin du gène H est unique au génome.

Pour les virus ayant l'échange des deux protéines de l'enveloppe ainsi que ceux dont la protéine H seulement est échangée, il faudra utiliser un autre fragment pour faire le lien de notre insert jusqu'au prochain site de restriction unique (Fig. 3B et 4C, fragment B). Il est à noter que pour l'échange des protéines F et H ensemble les deux sites de restrictions utilisés (SpeI et AscI) sont situés dans des régions intergéniques, tandis que chacun des autres sites de restriction utilisés ont leur site de restriction dans la partie codante des gènes.

3.2.2 Clonage des virus chimériques avec les gènes F et H échangés

Tout d'abord, il fallait digérer le fragment contenant les gènes F et H provenant d'une même souche. Par exemple, pour le virus A75FH58, 5 µg du plasmide p5804PeH ont été digérés, pendant 1 h à 37°C, par les enzymes SpeI et AscI dans un volume de 50 µL contenant de l'albumine de sérum bovin et un tampon complémentaire pour les deux enzymes. Ceci correspond à la digestion du fragment A regroupant les gènes F et H (Fig. 3B). Ensuite, le produit de la digestion est migré dans un gel d'agarose 1%, pour séparer les différents fragments d'ADN. La bande de 4232 paire de bases (pb), correspondant au produit attendu, est alors extraite et purifiée en utilisant la trousse QIA

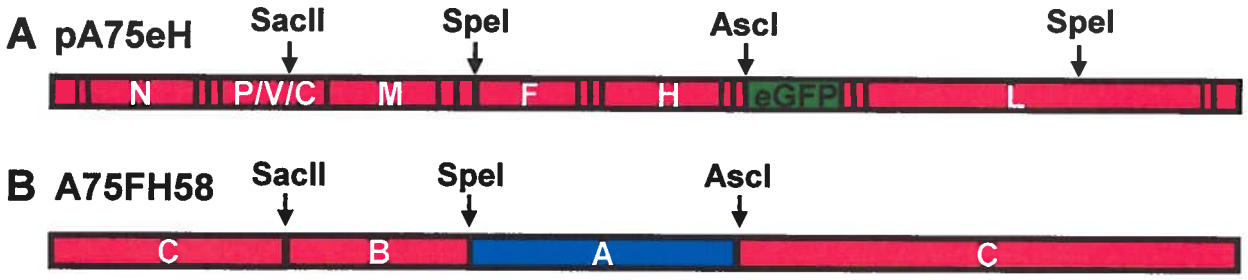

Figure 3: Clonage du virus A75FH58. (A) Schéma du génome de pA75eH (rouge) codant pour huit protéines (nucléoprotéine; N, phosphoprotéine; P, protéine V, protéine C, matrice; M, protéine de fusion; F, hémagglutinine; H et polymérase; L). Une unité de transcription additionnelle code pour la protéine fluorescente verte. Les sites de restrictions sont mentionnés au-dessus du génome. (B) Clonage du virus A75FH58. La couleur bleue représente le fragment provenant de p5804PeH. Le fragment A est obtenu en digérant les gènes F et H de p5804PeH avec les enzymes de restriction SpeI et AscI. Le fragment B provient du plasmide pA75eH et a été digéré avec SacII et SpeI. Le fragment C provient du même plasmide et a été digéré avec SacII et AscI.

Quick (Qiagen). Le fragment B qui fait le pont entre le prochain site de restriction unique, SacII, et l'extrémité SpeI du fragment A, provient du plasmide pA75eH et est obtenu en digérant 5 µg de pA75eH (Fig. 3B). La bande de 1725 pb est extraite du gel et purifiée. Les sites de restrictions aux extrémités des fragments A et B, soit SacII et AscI sont utilisés pour produire le fragment C, 14150 pb, provenant du plasmide pA75eH (Fig. 3B). Dans le cas du virus inverse, le 58FHA75, la même approche a été utilisée.

3.2.3 Clonage des virus chimériques avec le gène H échangé

Pour l'échange du gène H seulement la stratégie est similaire. Cependant l'extrémité 3' du gène H ne contient pas de site de restriction unique. À cause de cela, il faut recourir à la technique de PCR superposé qui consiste à amplifier deux fragments PCR ayant une région qui se superpose. Ensuite, nous pouvons hybrider ces deux produits PCR en un seul fragment que nous pourrons amplifier. En plus, il faudra digérer deux autres fragments à cause de la présence de site de restriction unique (comme pour le clonage des virus avec les gènes F et H échangés).

Pour le 58HA75, il fallait d'abord amplifier le fragment appelé A1 à partir du plasmide p5804PeH (Fig. 4B). Ce fragment A1, correspond à ce qui se trouve entre le site de restriction BsrGI qui précède le gène H jusqu'au début de ce gène. Ce fragment de 200 pb est ensuite migré sur gel et purifié (Fig. 4B, fragment A1). La région couvrant le gène H de pA75eH, qui constitue le fragment A2, est ensuite amplifiée et migrée sur gel d'agarose 1% afin de confirmer qu'il s'agit bien de la région désirée (Fig. 4B. fragment A2). L'amplification du fragment A1 et A2 par PCR s'effectue comme suit : une étape de dénaturation à 94°C suivit de l'hybridation à 55°C et l'élongation à 72°C, le tout répété pendant 25 cycles. La bande correspondante à la taille désirée, environ 2000 pb, est extraite du gel et purifiée. Ensuite, il faut amplifier à partir du prochain site de restriction jusqu'à l'extrémité du gène H, une région qui est délimitée par les sites de restriction BsrGI et AscI.

Le fait d'utiliser deux amorces qui chevauchent la même région, l'extrémité 3' du gène H, va nous permettre lors d'un deuxième PCR d'hybrider les fragments A2 et A1 pour former le fragment A en utilisant les amorces de chaque extrémité (Fig. 4B, Schéma à droite). Par la suite, le PCR est migré sur gel et la bande est extraite avant de l'insérer

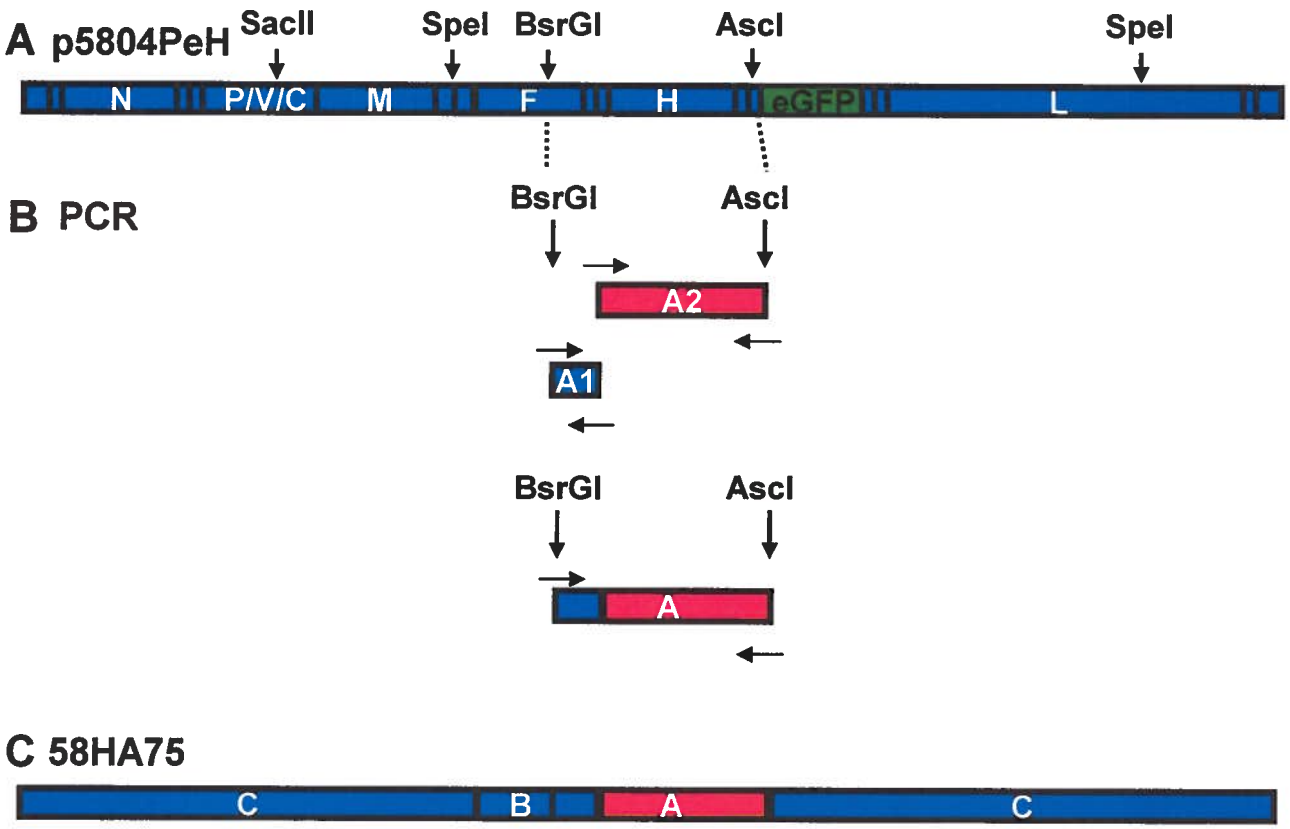

Figure 4: Clonage du virus 58HA75. (A) Schéma du génome de p5804PeH (rouge) codant pour huit protéines (nucléoprotéine; N, phosphoprotéine; P, protéine V, protéine C, matrice; M, protéine de fusion; F, hémagglutinine; H et polymérase; L). Une unité de transcription additionnelle code pour la protéine de fluorescence verte. Les sites de restrictions sont mentionnés au-dessus du génome. (B) PCR des fragments A1 et A2 pour le clonage du virus 58HA75. Le fragment A1 est obtenu en amplifiant par PCR le gène H du plasmide pA75eH, tandis que le fragment A2, provenant du plasmide 5804PeH, a été amplifié du site de restriction BsrGI jusqu'au gène H. Le fragment A est formé de la combinaison de A1 et A2 par PCR. (C) Les fragments B et C proviennent du plasmide 5804PeH et ont été digérés respectivement par SpeI, BsrGI et SpeI, AscI.

dans le vecteur TOPO (Invitrogen). Lors de l'amplification par PCR, la polymérase Taq ajoute une poly queue d'adénosine à chacune des extrémités 3' du fragment amplifié. Le vecteur TOPO est un vecteur linéaire dans lequel les extrémités 3' possèdent une deoxythymidine ce qui permet donc d'insérer notre fragment dans le vecteur TOPO.

Cette ligation va ensuite pénétrer dans des bactéries compétentes grâce à un choc thermique à 42 °C pendant 30 secondes. On ajoute ensuite 250 µL de milieu de culture NZY+ (Fisher) et l'échantillon est remué pendant 1 h à 37 °C. Les bactéries ayant effectivement incorporées le fragment sont identifiées grâce à une culture sélective d'ampicilline. Quarante µL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal), 40 mg / mL, et 100 mM d'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) sont ajoutés pour permettre la sélection des colonies blanches versus les bleues et les pétris sont placés à 37°C pour environ 15 h. Le lendemain du milieu de culture est inoculé, à raison d'une colonie pour 5 mL de milieu de culture Luria-Bertani (LB) avec ampicilline (0,1µg / ml), et remuées à 37°C pendant environ 15 h. Ensuite, l'ADN des bactéries est extrait à l'aide de la trousse QIA Quick (Qiagen). En résumé, cela consiste à lyser les bactéries des clones pour ensuite récupérer et purifier l'ADN, à l'aide de colonnes. Des digestions de contrôle sont effectuées pour confirmer la présence de l'insert. L'ADN des clones positifs ayant incorporé l'insert est envoyé au séquençage pour confirmer qu'aucune mutation n'est survenue lors des réactions de PCR. Le fragment B, provenant du plasmide p5804PeH, qui fait le pont entre l'extrémité BsrGI du fragment A et le site SpeI est ensuite digéré tel que décrit précédemment. Les sites de restriction, AscI et SacII sont utilisés pour digérer le fragment C qui provient du plasmide p5804PeH. Dans le cas du virus inverse, A75H58, la même stratégie a été employée.

3.2.4 Assemblages des plasmides génomiques

Tout d'abord, il faut procéder à la déphosphorylation du vecteur C, qui contient le gène de résistance à l'ampicilline, en utilisant un kit de déphosphorylation (Roche) (Fig. 3B, fragment C). La *Shrimp Alkaline Phosphatase* effectuera la déphosphorylation de l'ADN lors d'une incubation d'une heure à 37°C suivit d'une période d'inactivation de 15 min à 65°C. Pour la jonction des trois fragments, la trousse (Roche) a été utilisée. En

bref, 1 µL du vecteur déphosphorylé est combiné avec les deux inserts, selon leur concentration, et la ligase pendant 30 min à 1 h à température de la pièce.

Une fois terminée, le produit de la jonction est mélangé aux bactéries et incubé sur glace pendant 20 min avant d'effectuer un choc thermique à 42°C pour permettre à l'ADN d'entrer dans les bactéries. L'échantillon est mélangé à 250 µL de milieu de culture NZY+ remué pendant 1 h à 37°C et ensuite étalé sur deux boîtes de pétris recouvert d'agar contenant de l'ampicilline et déposé à 37°C pendant environ 15 h.

Une dizaine de colonies sont prélevées, du pétri et ajoutées à 5 mL de milieu de culture LB avec ampicilline et remuées pour une période de 15 h à 37°C. Ensuite, pour extraire l'ADN des différents clones la trousse QIA Quick (Qiagen) est utilisée. Lorsque l'ADN est obtenu il faut vérifier s'il y a des clones positifs pour le génome entier contenant l'échange désiré. Pour ce faire, les différents clones sont digérés dans le cas présent par BamHI, qui présente un profil de digestion différent pour les deux parents. Puisque que les séquences d'ADN de ces génomes sont connues et que les deux génomes parents p5804PeH et A75eH possèdent des patrons de digestions différents, nous sommes en mesure de prédire la taille des fragments obtenus pour chaque génome. Suite à l'analyse de la digestion par migration sur gel d'agarose, l'ADN des clones positifs ayant incorporé le produit voulu est séquencé, pour confirmation, et amplifié à nouveau pour obtenir une plus grande quantité d'ADN qui sera purifié avec la trousse QIA Filter (Qiagen).

3.2.5 Génération des virus chimériques

Les virus chimériques sont générés en utilisant un système basé sur le virus de la vaccine exprimant la polymérase T7 (MVA-T7) (von Messling et al., 2003). La polymérase T7 sert à transcrire l'ARNm des plasmides du complexe de réplication (N, P et L) ainsi que le plasmide contenant le génome du virus à générer. Tous ces plasmides possèdent le promoteur de la polymérase T7. Lorsque les protéines du complexe de réplication sont transcrites, la ribonucléoprotéine sera formée ce qui mènera à la réplication et à la génération du virus chimérique.

Pour récupérer les virus chimériques, 0,5 mL d'une suspension de $2x10^6$ cellules / mL de cellules 293T sont transférées dans une plaque de six puits. Le MVA-T7

est ensuite ajouté dans le puit à une MOI de un. Après 0,5 mL d'OptiMEM (Invitrogen), est ajouté dans chaque puit et la plaque est incubée à 37°C et 5 %CO_2 pour 1 h.

Pendant la période d'incubation, les échantillons à transfecter sont préparés. Le réactif cationique Lipofectamine 2000 (Invitrogen) est utilisé en raison de sa faible toxicité et sa forte efficacité de transfection des cellules 293T. Suivant les instructions de la compagnie, 8 µL de Lipofectamine 2000 sont mélangés avec 200 µL d'OptiMEM pour chaque échantillon. Un µg des plasmides d'expression pour les gènes N et P, 0,5 µg du plasmide codant pour le gène L, et 5 à 7 µg du plasmide contenant le génome viral sont ajoutés à 200 µL d'OptiMEM. La lipofectamine est ensuite mélangée à l'échantillon à transfecter. Ce mélange est vortexé et repose durant 30 min à température pièce. Le mélange est alors ajouté aux cellules et 1 mL de DMEM 5% FBS est ajouté dans chaque puit par la suite.

Le lendemain, le surnageant est remplacé par du DMEM 5% FBS avec pénicilline et streptomycine. Trois jours après la transfection, les cellules sont resuspendues et transférées dans des pétris de 10 cm^2 contenant des cellules VerodogSLAMtag à une confluence de 60 à 80%. Une fois que des syncytiums sont détectés dans le pétri, ils sont prélevés, à l'aide d'un cône de pipette, et ajoutés à des cellules VerodogSLAMtag préalablement placées dans une plaque de six puits à raison de 10^6 cellules par puit. Suite à cette étape d'amplification du virus, les cellules sont trypsinisées et transférées dans un flacon de 75 cm^2 contenant des cellules VerodogSLAMtag à une confluence de 90 à 100%. Le stock viral est produit tel que décrit dans la section 3.1.2.

3.3 Caractérisation des virus chimériques *in vitro*

Les virus parents ainsi que les virus chimériques ont été caractérisés *in vitro*, afin de pouvoir déceler une différence au niveau du phénotype ou de la réplication virale. Des cellules VerodogSLAMtag ont été mises en culture dans une plaque de six puits à raison de $4x10^5$ cellules / puit. Elles ont ensuite été infectées, à une MOI de 0,01. Les cellules ont été observées chaque jour sous un microscope à fluorescence (Nikon ECLIPSE TE2000-V) afin de détecter la présence de l'eGFP. Des photos ont été prises à un grossissement de 100X à l'aide d'une caméra (Nikon digital camera DXM-1200F). Pour

compléter la caractérisation *in vitro* des différents virus, des cinétiques virales ont aussi été effectuées, tel que décrit dans la section 3.1.4.

3.4 Caractérisation des virus chimériques *in vivo*

Les virus parents et chimériques ont été caractérisés, *in vitro*, quant à leur phénotype et leur réplication. Ensuite, les virus sont caractérisés, in vivo, en infectant des furets. Au jour zéro, l'infection du furet se fait sur un animal préalablement anesthésié. Un échantillon de sang est prélevé pour étudier des paramètres immunologiques et virologiques. Subséquemment, les autres prélèvements sont effectués aux jours trois, sept, dix, quatorze après l'infection Ensuite, la prise d'échantillon est réalisée chaque semaine jusqu'à l'euthanasie du furet.

3.4.1 Anesthésie, infection et prélèvements de sang

Les furets sont anesthésiés à l'aide d'un mélange de 0,4 mL de kétamine (Bioniche Animal Health, Canada) et de 0,4 mL de midazolam (Sandoz). L'infection est effectuée par voie intranasale avec 10^5 $TCID_{50}$ du virus testé en déposant de fines gouttelettes dans chacune des narines, à l'aide d'une pipette, en prenant soin d'attendre que celles-ci soient inspirées avant de continuer.
Pour les anesthésies suivantes, 0,3 mL de kétamine et de midazolam sont utilisés. Le prélèvement du sang se fait au niveau d'une des deux veines jugulaire externes. Trois mL de sang sont prélevés dans un tube avec héparine et 3 mL dans un tube contenant de l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA).

3.4.2 Évaluation clinique

Les furets infectés sont observés quotidiennement afin de détecter le développement de signes cliniques. La température est prise chaque jour et le poids deux fois par semaine. L'animal peut présenter des signes cliniques suivant la progression de l'infection, tels que des éruptions sur la peau, une hausse de température, de la conjonctivite et de la diarrhée.

Les atteintes neurologiques peuvent se manifester différemment, par exemple, un animal qui tourne en rond, qui est désorienté, qui développe de la paralysie ou qui se

presse la tête contre des objets. Dans le stade avancé de la maladie, l'animal est déshydraté, peut avoir de la difficulté à voir, ne plus sortir de sa cage, présente une forte hausse de température et une perte de poids considérable. Afin, de ne pas faire souffrir l'animal des points limites ont été établis qui justifient l'euthanasie de l'animal. L'animal est euthanasié, lorsque sa température dépasse 40°C durant trois jours, lorsqu'il ne mange pas pendant plus de 48 h, perd plus de 15 à 20% de son poids ou développe des signes d'atteintes du système nerveux central.

3.4.3 Paramètres étudiés

Suite à l'infection des furets par les virus parents ou chimériques, différents paramètres virologiques et immunologiques sont évalués à chaque fois que le sang est prélevé tels que le titre viral associé aux cellules, le compte des globules blancs et la prolifération des cellules mononucléaire du sang périphérique (peripherical blood mononuclear cells, PBMC).

3.4.3.1 Paramètres virologiques

3.4.3.1.1 Titrage viral

Dix mL d'ACK (150 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0.01 mM EDTA [pH 7.2 to 7.4]) sont ajoutés à l'échantillon de sang prélevé dans le tube contenant de l'EDTA afin de lyser les globules rouges. La suspension est alors centrifugée à 800 *g* durant 5 min. Le surnageant est enlevé et les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS sans calcium ni magnésium (Invitrogen). Elles sont ensuite resuspendues dans 1 mL de DMEM 5 % FBS et comptées. Le titrage du virus provenant des PBMC est effectué tel que décrit dans la partie 3.1.3 mais la dilution maximale utilisée est dans ce cas de 10^6 contrairement à 10^8. De plus, lors de l'analyse des échantillons du jour trois p.i, la dilution maximale est de 10^5 et le virus non dilué est aussi titré. Suite à l'euthanasie de l'animal, le liquide cérébro-spinal (*cerebrospinal fluid*, CSF) et l'urine de l'animal sont aussi titrés selon les mêmes procédures.

3.4.3.2 Paramètres immunologiques

3.4.3.2.1 Compte des globules blancs

Dix µL de l'échantillon de sang avec héparine sont prélevés dans un unopette (BD Bioscience). L'échantillon est alors bien mélangé et le compte des globules blancs est effectué à l'aide d'un hémacytomètre. Le résultat obtenu est le nombre de globules blancs sanguins / mm^3.

3.4.3.2.2 Prolifération des PBMC

Les PBMC et le plasma du sang avec héparine sont récoltés pour chaque animal. Tout d'abord, l'échantillon de sang est centrifugé à 800 *g* pendant 5 min. Le plasma est prélevé et gardé à -20°C. Le sang est ensuite dilué dans 4,5 mL de PBS sans calcium ni magnésium. Les PBMC sont alors isolés sur un gradient de Ficoll (Amersham Biosciences), qui est constitué de 4,5 mL de Ficoll avec le reste de la dilution centrifugés pendant 40 min à 400 *g*. Les PBMC sont recueillis à l'interface entre le gradient et le sang dilué. Ils sont ensuite lavés trois fois avec le PBS sans calcium ni magnésium. La capacité de prolifération des PBMC est déterminée *in vitro* suite à une stimulation par la phytohemagglutinine (PHA; Sigma). Deux fois 50 µL de PBMC sont dilués dans 50 µL de RPMI 10% FBS et mis en culture dans une plaque de 96 puits à fond rond. Les cellules du premier puit sont stimulées avec 1 µg de PHA et celles du second puit ne sont pas stimulées. La plaque est incubée 24 h à 37°C et 5%CO_2. Ensuite, le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Roche Biochemicals) est ajouté à une concentration finale de 10 µM et les cellules sont de nouveau incubées 24 h dans les mêmes conditions. Les cellules sont ensuite transférées dans une plaque noire de 96 puits et centrifugées à 800 *g* 5 min. Le surnageant est enlevé et le tampon ACK est ajouté. Ensuite, la plaque est centrifugée à nouveau. Le surnageant est enlevé et un lavage avec du PBS est effectué. Après une centrifugation finale, le surnageant est retiré et les cellules sont fixées à 65 °C pendant une heure. Le BrdU qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en division est détecté en utilisant un anticorps anti-BrdU lié à la peroxydase (Roche Biochemicals), et est révélé avec un substrat luminescent. Le signal est quantifié à l'aide d'un appareil Luminoskan Ascent (Thermo Electron Corporation). L'activité de prolifération est exprimée par le

ratio entre l'incorporation du BrdU dans les cellules stimulées et dans celles non stimulées.

3.4.4 Pathologie et imagerie

Lors de l'euthanasie, l'animal est anesthésié grâce à l'injection intra-musculaire de 0,5 mL de kétamine et midazolam. Ensuite, 1 mL de pentobarbital (Bimedal-MTC) est injecté de façon intra péritonéale. Lorsque l'animal ne répond plus aux stimuli, une incision est pratiquée dans la cage thoracique pour exposer le cœur. L'oreillette droite est coupée et le ventricule gauche est perfusé avec environ 200 mL de PBS. Après la perfusion, le liquide cérébro-spinal (*cerebrospinal fluid*, CSF) et l'urine sont prélevés. L'animal est ensuite perfusé avec 50 mL de PBS contenant 4% paraformaldéhyde (Electron Microscopy Sciences). Les poumons, les ganglions lymphatiques mésentériques, la rate, le petit intestin et le cerveau sont ensuite prélevés pour détecter la présence de l'eGFP.

Les organes plus susceptibles à l'infection sont photographiés. Les poumons, l'intestin grêle, le ganglion mésentérique, la rate, l'hypophyse, le nez, la boîte crânienne et le cerveau sont ainsi observés pour détecter l'expression de l'eGFP. Le cerveau est photographié en position dorsale et ventrale et est coupé de façon sagittale. Les bulbes olfactifs sont ensuite photographiés. Chaque photographie est prise à l'aide d'une caméra à une exposition de 312 millisecondes.

3.4.5 Immunohistochimie

3.4.5.1 Préparations des tissus

Les tissus prélevés chez les animaux sont placés à 4°C dans une solution de PBS contenant 30 % de sucrose pour au moins 24 h à 4°C. Avant la coupe, les tissus sont congelés sur la glace sèche pendant au moins 1 h. Des coupes consécutives de 10 µm sont obtenues en utilisant un cryostat (Kryostat 1720 Digital, Leitz, Midland, ON) et placées sur des lames Superfrost Plus (Fisher Scientific, Whitby, ON). Ces préparations sont ensuite, séchées à l'air libre et conservées à -20°C.

3.4.5.2 Colorations des tissus

3.4.5.2.1 Localisation de la Protéine Acidique Fibrillaire Gliale (GFAP)

Les lames sont hydratées avec du PBS pendant 5 min et bloquées durant 30 min avec du sérum de cheval dilué 1 : 100 dans du PBS. Ensuite, elles sont incubées pendant 1 h avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-GFAP dilué 1 : 100. Après deux à trois lavage avec du PBS l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa 568 est ajouté à une concentration de 10 µg / mL. Après une incubation de 1 h, deux ou trois lavages avec du PBS sont effectués. Les lames sont ensuite montées, en utilisant le prolong (Invitrogen), séchées et gardées à 4°C.

3.4.5.2.2 Localisation de Nissl

Les lames sont hydratées dans du PBS durant 15 min et lavées dans du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 pendant 10 min. Deux lavages de 5 min avec du PBS sont effectués et les lames sont placés pendant 1 h dans 200 µL du colorant marqueur de neurones NeuroTrace (Molecular Probes, Invitrogen) dilué 1 : 300 dans du PBS. Le colorant est ensuite retiré et les lames sont lavés avec du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 pendant 10 min et deux fois avec du PBS pendant 5 min. Un dernier lavage de 2 h est effectué avec du PBS. Les lames sont ensuite montées, en utilisant le prolong, séchées et gardées à 4°C.

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Production des virus chimériques avec un ou des gènes de l'enveloppe échangé

Pour mieux comprendre le rôle de l'hémagglutinine dans la neurovirulence morbillivirale, des virus chimériques ayant la protéine H seulement échangée ont été produits. Pour s'assurer que les protéines F et H interagissaient bien ensemble, des virus chimériques avec les deux protéines échangées ont aussi été produits. La souche 5804PeH qui cause une maladie mortelle en deux semaines et sans signes neurologiques et la souche A75eH, qui occasionne une maladie mortelle en trois à cinq semaines et infecte le cerveau, constituaient la base pour la construction des virus chimériques (Fig. 5A et B, p5804PeH et pA75eH, schéma du haut A et B respectivement). Les virus parents et chimériques possèdent tous une unité de transcription additionnelle qui code pour l'eGFP permettant la visualisation des tissus infectés. Les virus 58HA75 et A75H58 contiennent la protéine H d'une souche dans le contexte de l'autre (Fig. 5A et B, schéma au milieu). Les virus 58FHA75 et A75FH58 ont été générés de façon similaire et possèdent les deux protéines de l'enveloppe d'une souche dans le contexte de l'autre (Fig. 5A et B, schéma du bas).

4.2 Caractérisation des virus chimériques *in vitro*

Lorsque la construction des virus chimériques a été terminée, il a fallut procéder à la caractérisation *in vitro* de ces virus pour s'assurer qu'ils n'avaient pas de défaut de réplication et d'assemblage des particules virales infectieuses. Cette étape est cruciale pour ne pas procéder à l'infection de furets avec des virus chimériques défectueux ce qui rendraient les conclusions impossible à tirer.

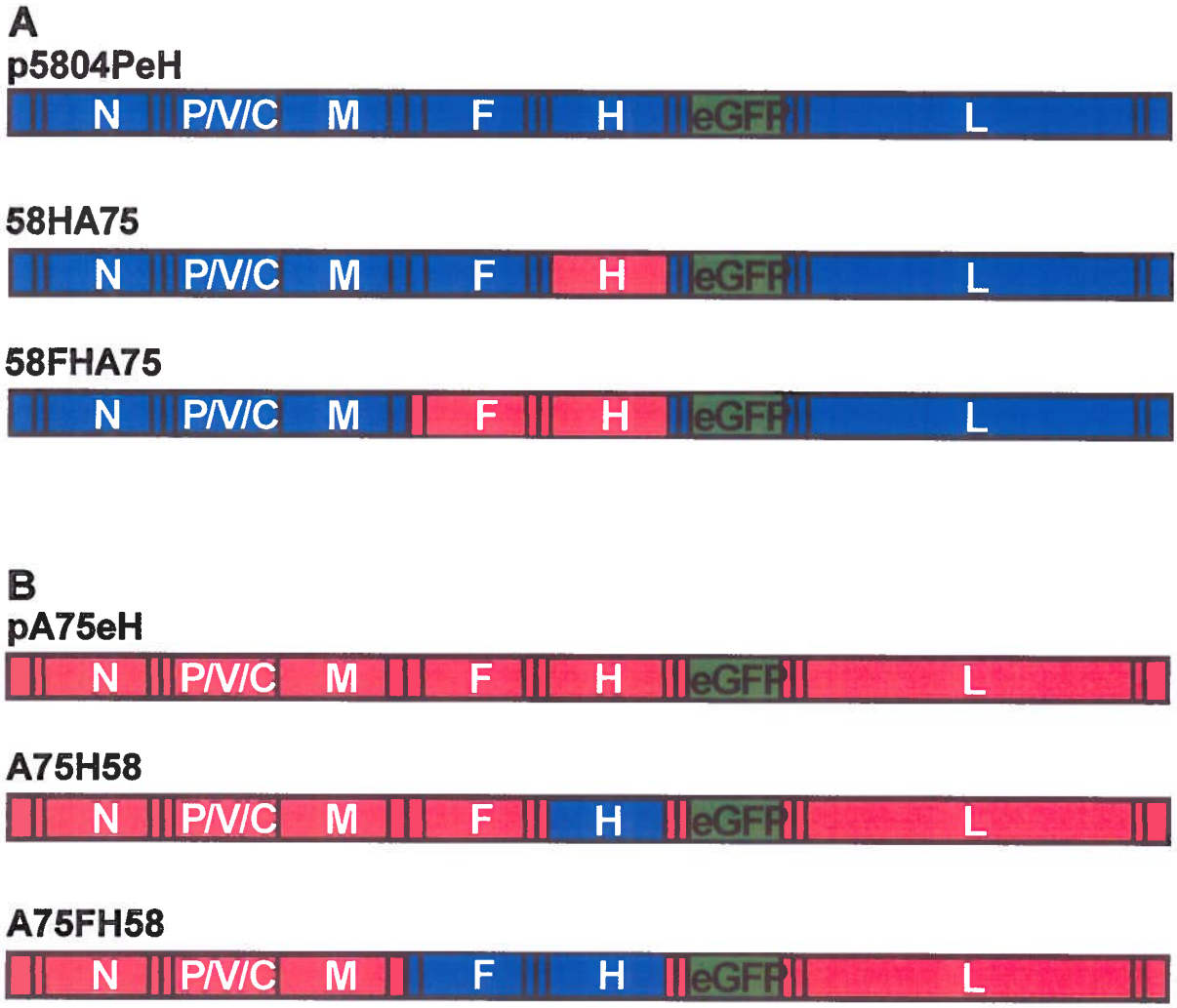

Figure 5: Schéma des virus recombinants. (A) Schéma du génome de p5804PeH (bleu) codant pour huit protéines (nucléoprotéine, N; phosphoprotéine, P; protéine V; protéine C; matrice, M; protéine de fusion, F; hémagglutinine, H et polymérase, L). Une unité de transcription additionnelle code pour la protéine fluorescente verte (vert). Le virus 58HA75 qui est composé du génome de 5804PeH avec le gène H de A75eH (rouge). Le virus 58FHA75 qui est composé du génome de 5804PeH avec les gènes F et H de A75eH (rouge). (B) Schéma du génome de pA75eH (rouge) codant pour huit protéines et la protéine fluorescente verte (voir A). Le virus A75H58 qui est composé du génome de A75eH avec le gène H de 5804PeH (bleu). Le virus 58FHA75 qui est composé du génome de A75eH avec les gènes F et H de 5804PeH (bleu).

4.2.1 Les virus chimériques possèdent un phénotype d'infection similaire

Dans le but de s'assurer que les virus chimériques produits se répliquaient efficacement, nous avons d'abord caractérisé leur phénotype d'infection dans les cellules VerodogSLAMtag. Ces cellules supportent la réplication des virus sauvages sans causer d'atténuation puisqu'elles expriment la molécule SLAM qui est le récepteur du CDV. Les virus parents forment des syncytiums géants, eGFP positifs, deux jours après l'infection (Fig. 6A et B, 5804PeH et A75eH, première colonne). Le phénotype d'infection observé pour les virus chimériques correspondait au phénotype des virus parents tant pour la grosseur des syncytiums que pour l'expression de l'eGFP (Fig. 6A et B, comparez la deuxième et troisième colonne avec la première). Suite à ces résultats qui confirmaient que le phénotype observé était similaire pour tous les virus, nous avons vérifié l'efficacité de la réplication des virus chimériques.

4.2.2 Réplication efficace des virus chimériques

Des cinétiques de réplication virale ont donc été effectuées pour chacun des virus chimériques sur des cellules VerodogSLAMtag. Le titre viral exprimé en $\log_{10}TCID_{50}$ dans le surnageant (virus libre) et les cellules adhérentes (virus associé aux cellules) a été quantifié quotidiennement durant une période de cinq jours. Les virus parents, 5804PeH et A75eH se répliquent efficacement dans ce type cellulaire autant pour ce qui est du virus associé aux cellules que pour le virus libre (Fig. 7A et B, triangle brun et carré bleu foncé). Une cinétique comparable a été observé pour tous les virus chimériques, indiquant que les changements apportés n'avaient pas d'effet négatif sur la réplication virale (Fig. 7A et B, comparez les virus chimériques avec les virus parents). Le pic de réplication pour le virus associé aux cellules se situe au jour 3 et ensuite le titre viral diminue ce qui correspond au moment où les cellules se détachent (Fig. 7A et B, schéma à gauche). La fusion des membranes cellulaires qui forment les syncytiums provoque le détachement de ces cellules. Pour les virus libres, le pic de réplication est observé au jour 4 et le titre viral se maintient jusqu'au jour 5, ce qui peut-être expliqué par la présence de cellules détachées dans le surnageant (Fig. 7A et B, schéma à droite).

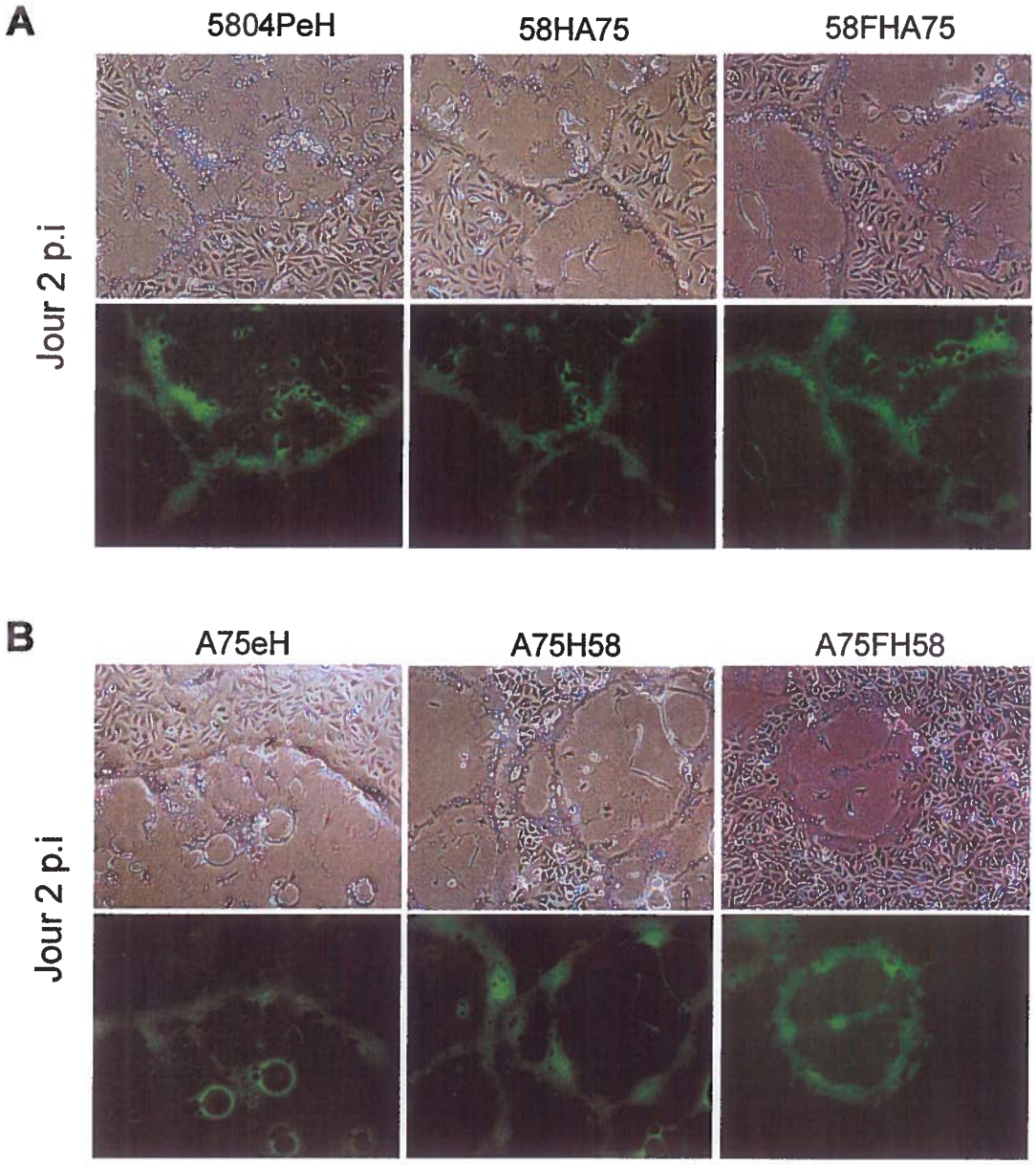

Figure 6: Phénotype d'infection des virus recombinants. (A) Phénotype d'infection des virus 5804PeH, 58HA75 et 58FHA75 sur des cellules VerodogSLAMtag au jour 2 p.i. La formation des syncytiums est visible pour chacun des virus (rangée du haut). Visualisation de l'effet cytopathique via la détection de l'eGFP (rangée du bas). (B) Phénotype d'infection des virus A75eH, A75H58 et A75FH58 sur des cellules VerodogSLAMtag au jour 2 p.i. La formation de syncytiums est visible pour chacun des virus (rangée du haut). Visualisation de l'effet cytopathique via la détection de l'eGFP.

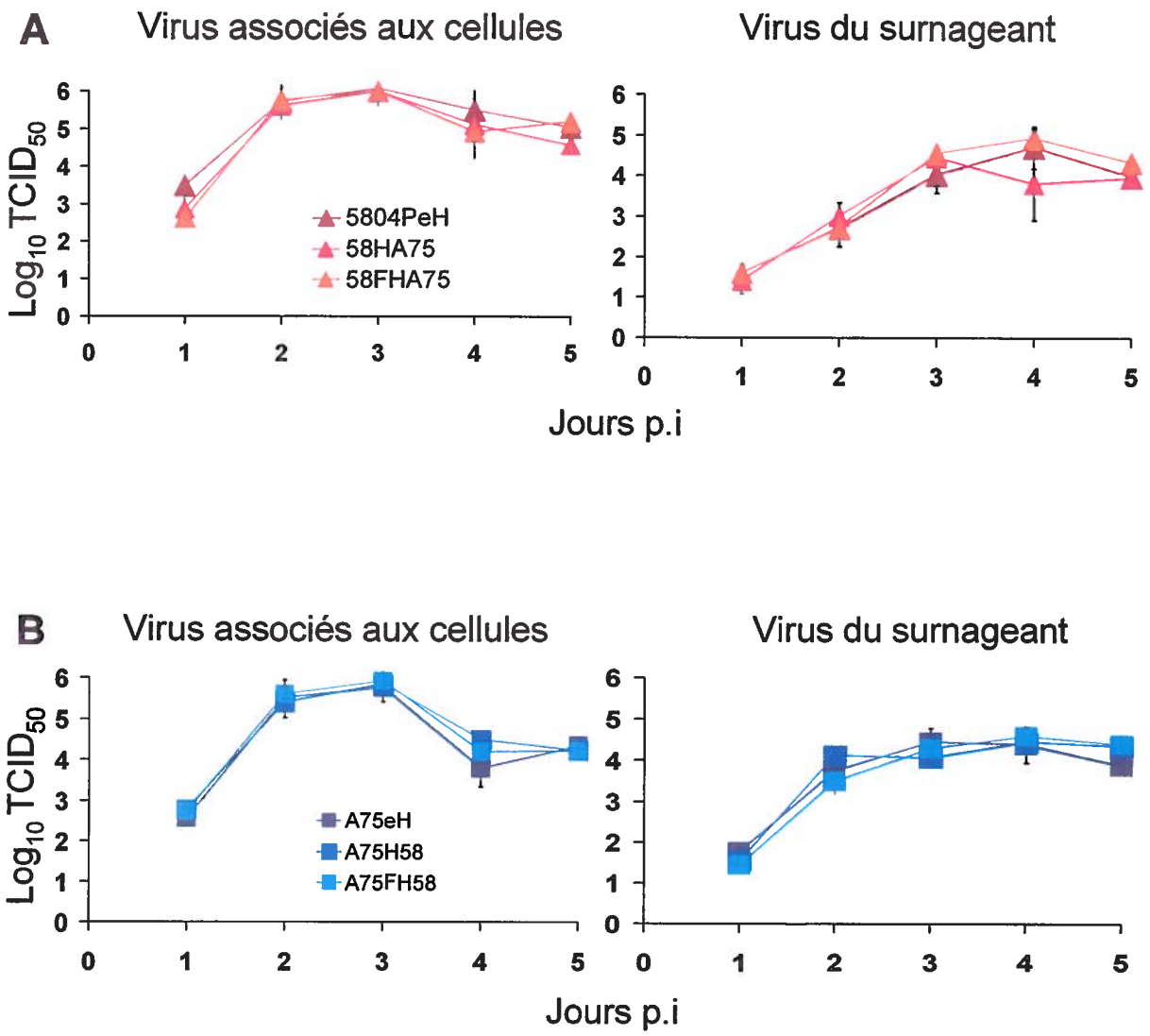

Figure 7: Schéma des cinétiques de réplication. (A) Cinétiques de réplication des virus 5804PeH (triangle brun), 58HA75 (triangle rouge) et 58FHA75 (triangle orange), exprimées en Log_{10} $TCID_{50}$ pour le virus associé aux cellules ou le virus du surnageant chaque jour p.i. (B) Cinétiques de réplication des virus A75eH (carré bleu foncé), A75H58 (carré bleu ciel) et A75FH58 (carré turquoise), exprimées en Log_{10} $TCID_{50}$ pour le virus associé aux cellules ou le virus du surnageant chaque jour p.i.

4.3 Évaluation de la pathogenèse des virus chimériques

4.3.1 Létalité des virus chimériques

Pour caractériser l'effet de l'échange des protéines de l'enveloppe, *in vivo*, des groupes de six furets ont été infectés pour chacun des quatre virus chimériques et des groupes de quatre animaux pour les virus parents. Comme démontré précédemment, les virus parents 5804PeH et A75eH sont létaux à 100% pour les furets (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006; von Messling, Milosevic, and Cattaneo, 2004) (Fig. 8, triangle brun et carré bleu foncé). Les virus chimériques avec la protéine H échangée ont conservés leur virulence chez les furets puisque le virus 58HA75 a causé le décès de tous les furets infectés alors que juste un seul furet a survécu à l'infection par le virus A75H58 (Fig. 8, 58HA75 et A75H58, triangle rouge et carré bleu ciel, comparez avec les virus parents). Ces deux virus chimériques causent une maladie d'une durée semblable à celle de leur souche parentale, c'est-à-dire, deux semaines pour 58HA75 et trois à cinq semaines pour A75H58.

Pour ce qui est des virus chimériques avec les protéines F et H échangées, le virus A75FH58 a conservé sa virulence puisque cinq des six animaux meurent suite à l'infection virale. Toutefois, pour le virus 58FHA75, deux des six animaux qui ont été infectés ont survécus ce qui amène à la conclusion que ce virus chimérique est partiellement atténué. Avec une moyenne de trois semaines, la durée de la maladie causée par ces virus chimériques se retrouve entre ce qui était observé pour les souches parentales, indiquant que la protéine F, et non la protéine H, influence cet aspect de la pathogenèse (Fig. 8, 58FHA75 et A75FH58, triangle orange et carré turquoise, comparez avec les virus parents). Donc, les virus avec la protéine H échangée conservent leur virulence et la durée de la maladie correspond à la souche parentale respective. Toutefois, lorsque l'échange des protéines F et H est effectuée, la virulence du virus 58FHA75 est affectée et le cours de la maladie devient un intermédiaire entre les deux souches parentales. Il est à noter que les animaux qui ont survécus à la maladie ont été observés durant au moins huit semaines avant d'être euthanasiés.

Puisque nous évaluions le rôle de la protéine d'attachement du CDV dans la neurovirulence, seul les animaux qui sont décédés de la maladie ont été considérés pour

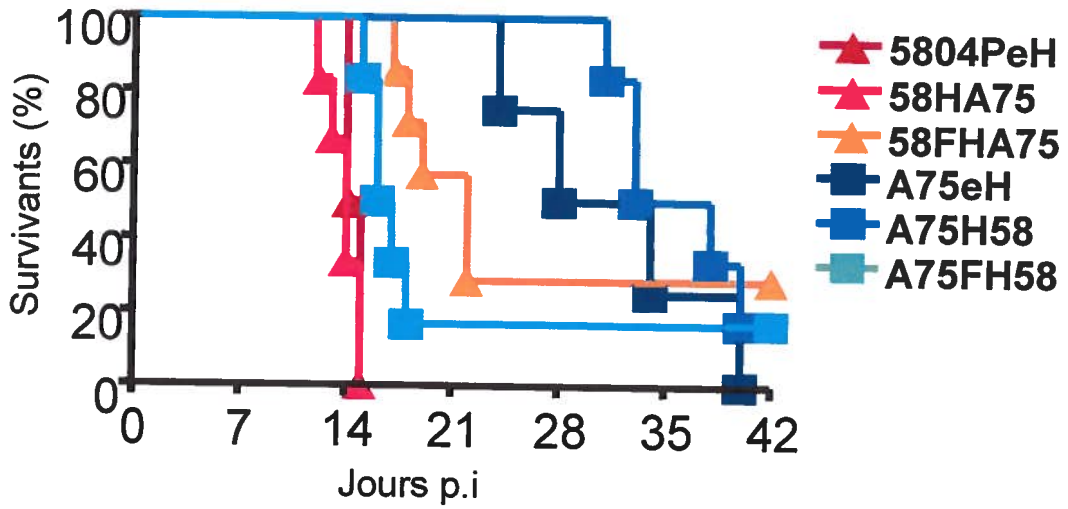

Figure 8: Furets survivants à l'infection. Quatre furets ont été infectés pour les deux virus parents (5804PeH et A75eH, triangles bruns et carrés bleus foncés). Six furets ont été infectés par les virus chimériques (58HA75, 58FHA75, A75H58 et A75FH58, triangles rouges, triangles oranges, carrés bleus ciel et carrés turquoises respectivement. Le graphique représente le pourcentage de furets survivants à l'infection par chacun des virus.

les prochaines expériences. Toutefois, les données obtenues avec les animaux qui ont survécu vont permettent de soulever d'autres questions.

4.3.2 Forte réplication des virus chimériques dans les PBMC

Les PBMC regroupe différents types cellulaires comme les leucocytes, les granulocytes et les monocytes. Ces trois populations possèdent toutes le récepteur SLAM, ce qui explique pourquoi elles sont ciblées lors d'une infection morbillivirale (Hahm, Arbour, and Oldstone, 2004). Les deux virus parents se répliquaient efficacement dans les PBMC des furets infectés (Fig. 9A et B, 5804PeH et A75eH, triangle brun et carré bleu foncé). Le cinétique de la réplication des virus ayant des protéines H ou F et H échangées montre que ces virus se répliquaient aussi efficacement (Fig. 9A et B, 58HA75, A75H58, 58FHA75 et A75FH58, triangle rouge et carré bleu ciel, triangle orange et carré turquoise, comparez les virus chimériques avec les virus parents). Le titre viral est quantifié en $\log_{10}TCID_{50}$ / 10^6 cellules dans le but d'évaluer la fraction des PBMC sanguins infectés. Pour chaque virus, la réplication débute près du jour trois p.i et un pic est observé au jour sept, ce qui correspond à la forte infection des cellules du système immunitaire, observé en imagerie macroscopique (von Messling, Milosevic, and Cattaneo, 2004). Le titre se stabilise ou diminue dans certains cas, jusqu'à l'euthanasie du furet (Fig. 9A et B, tous les virus). En résumé, chaque virus chimérique se répliquait et infectait efficacement les PBMC à des cinétiques similaires aux virus parents.

4.3.3 Évaluation du compte leucocytaire

Tous les morbillivirus sont hautement lymphotropiques et provoquent une leucopénie (Cocks et al., 1995; Sidorenko and Clark, 2003; Tatsuo, Ono, and Yanagi, 2001). Cette diminution des leucocytes sanguins est évidente pour les virus parents (Fig. 10A et B, 5804PeH et A75eH, triangle brun et carré bleu foncé) et également pour les virus ayant les protéines H ou F et H échangées (Fig. 10A et B, comparez les virus chimériques avec les virus parents). Il est à remarquer que la diminution débute au jour trois p.i pour se poursuivre au jour sept et ensuite se stabilise à un niveau peu élevé jusqu'à l'euthanasie du furet (Fig. 10A et B, tous les virus).

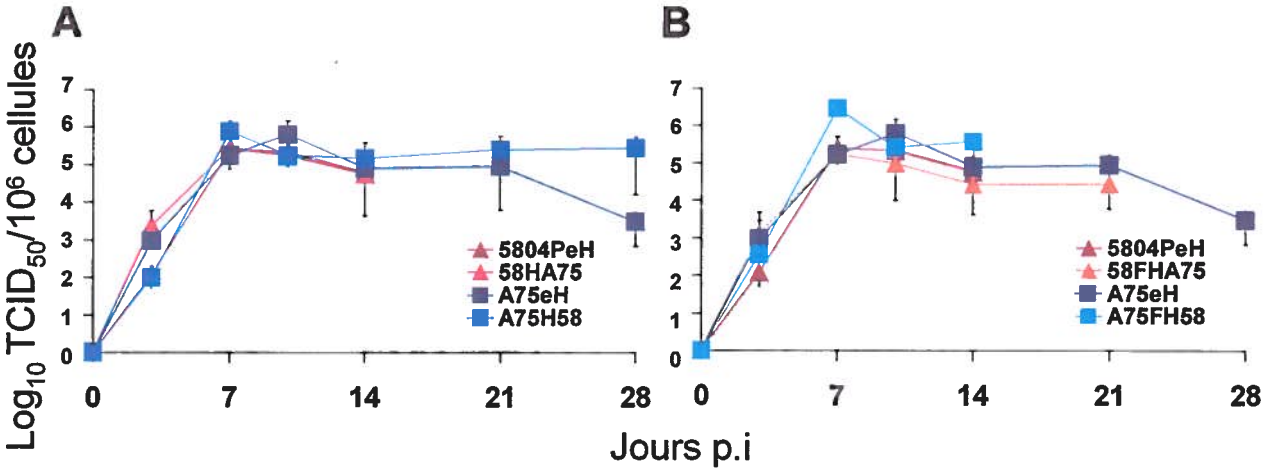

Figure 9: Schéma de la réplication virale *in vivo*. Le titre viral des différents virus dans les PBMC est exprimé en $Log_{10}TCID_{50}$ selon le jour p.i. (A) Les virus parents (5804PeH et A75eH, triangle brun et carré bleu foncé) et les virus chimériques ayant leur gène H échangé (58HA75 et A75H58, triangle rouge et carré bleu ciel) sont représentés. (B) Les virus parents et les virus chimériques (58FHA75 et A75FH58, triangle orange et carré turquoise) ayant les gènes F et H échangés sont représentés. Quatre furets ont été infectés pour les deux virus parents et six furets ont été infectés par les virus chimériques et la moyenne est représentée.

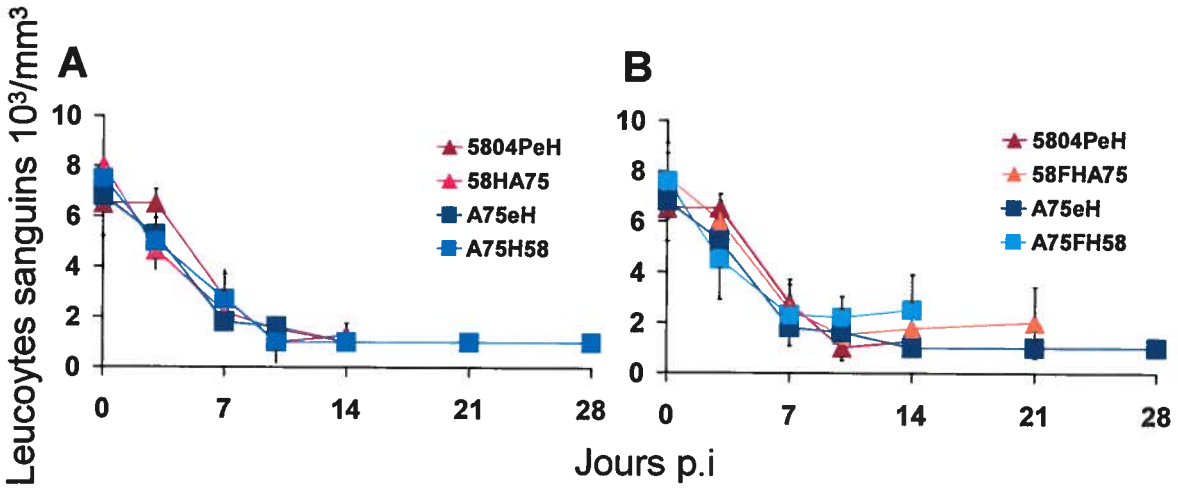

Figure 10: Schéma du compte leucocytaire des furets infectés. Le compte leucocytaire provient d'un échantillon de sang et est exprimé en nombre de leucocytes sanguins à différents jours p.i. (A) Les virus parents (5804PeH et A75eH, triangle brun et carré bleu foncé) et les virus chimériques ayant leur gène H échangé (58HA75 et A75H58, triangle rouge et carré bleu ciel) sont représentés. (B) Les virus parents et les virus chimériques (58FHA75 et A75FH58, triangle orange et carré turquoise) ayant les gènes F et H échangés sont représentés. Quatre furets ont été infectés pour les deux virus parents et six furets ont été infectés par les virus chimériques et la moyenne est représentée.

Le début de la leucopénie correspond à la première détection de l'infection virale des PBMC et au jour 7, au moment où la majorité de ces cellules sont infectées, une chute dramatique dans le nombre de leucocytes est constatée (Fig. 9 et 10, comparez le titre viral avec la leucopénie des différents virus). Cette diminution du compte leucocytaire est observée chez tous les animaux infectés. Néanmoins, des animaux qui survivent récupèrent leurs leucocytes une fois qu'ils commencent à contrôler l'infection (von Messling, Svitek, and Cattaneo, 2006).

4.3.4 Cinétique de la capacité de prolifération des lymphocytes

La suppression immunitaire à long terme provoquée par l'infection morbillivirale est l'une des cause principale du haut taux de morbidité et mortalité associé à la rougeole (Clements and Cutts, 1995). Une des caractéristique de cette suppression immunitaire est que les PBMC des individus infectés présentent une réduction dans la capacité à proliférer en réponse à un mitogène, ce qui a aussi été observé avec le CDV (Schlender et al., 1996; von Messling et al., 2003). En utilisant un test qui consiste à stimuler les lymphocytes avec un mitogène et comparer la prolifération cellulaire avec un échantillon des cellules non-stimulées, il a été démontré précédemment que la prolifération lymphocytaire est inhibé suite à une infection avec les virus parents (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006) (Fig. 11A et B, 5804PeH et A75eH, triangle brun et carré bleu foncé). Au début de l'infection (jour trois) les deux virus parents exhibent un ratio de prolifération lymphocytaire semblable cependant, le virus 5804PeH est constamment plus efficace que le virus A75eH à inhiber la prolifération des cellules PBMC du jour sept jusqu'à la fin de la maladie (Fig. 11A et B, comparez 5804PeH et A75eH du jour 7 jusqu'à la fin de la maladie). Chez les virus chimériques ayant les protéines H ou F et H échangées la diminution du ratio de prolifération lymphocytaire se produit similairement entre les jours trois et sept, ce qui correspond avec la forte infection de lymphocytes, et se stabilise jusqu'au jour de l'euthanasie (Fig. 11A et B, tous les virus).

Bien qu'une diminution dans le ratio de prolifération lymphocytaire puisse être observée pour chacun des virus chimériques, ceux qui sont dans le contexte du génome A75eH sont moins efficaces à inhiber la prolifération que les virus chimériques dérivés

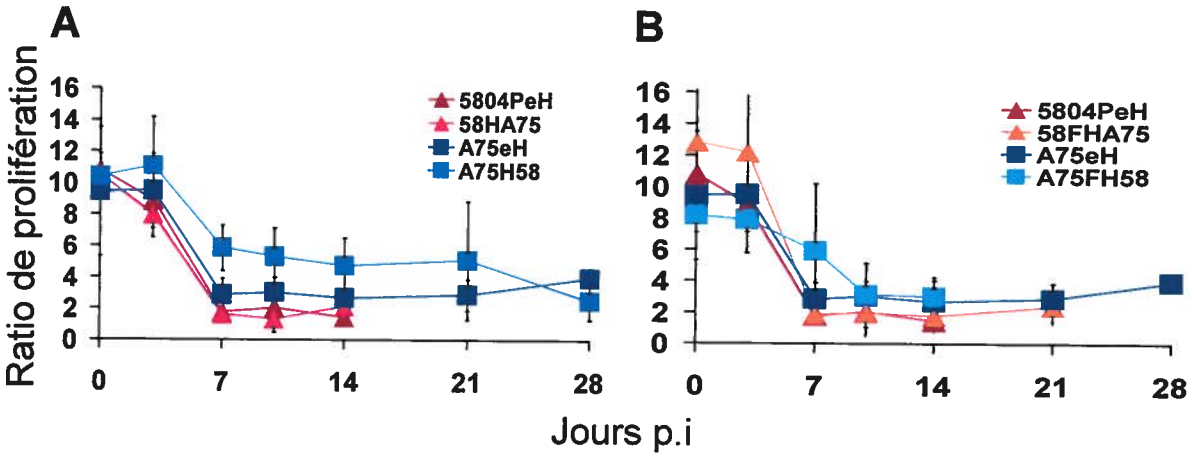

Figure 11: Schéma de la prolifération lymphocytaire des furets infectés. La prolifération des lymphocytes est exprimée par un ratio de lymphocytes stimulés versus non-stimulés à différents jours p.i. (A) Les virus parents (5804PeH et A75eH, triangle brun et carré bleu foncé) et les virus chimériques ayant leur gène H échangé (58HA75 et A75H58, triangle rouge et carré bleu ciel) sont représentés. (B) Les virus parents et les virus chimériques (58FHA75 et A75FH58, triangle orange et carré turquoise) ayant les gènes F et H échangés sont représentés. Quatre furets ont été infectés pour les deux virus parents et six furets ont été infectés par les virus chimériques et la moyenne est représentée.

du 5804PeH. Le ratio de prolifération du virus A75H58 est même plus élevé que celui du A75eH mais pourtant comme montré précédemment, ce virus infecte efficacement les PBMC et provoque aussi une leucopénie comparable aux autres virus chimériques et parents (Fig. 11, comparez Fig. 9 et 10). Il faut aussi remarquer que malgré cette réduction dans la capacité à inhiber la prolifération lymphocytaire ce virus chimérique est létal.

Le virus 58FHA75, quant à lui, est aussi efficace que le virus 5804PeH en inhibant la prolifération lymphocytaire, en infectant les PBMC ainsi qu'en provoquant une leucopénie malgré le fait que ce virus est atténué partiellement (Fig. 11, comparez 58FHA75 avec Fig. 9 et 10).

Donc, les virus chimériques conservent la capacité d'inhiber la prolifération lymphocytaire, néanmoins une corrélation avec leur souche parentale respective est observée.

4.4 Caractérisation du tropisme

4.4.1 Imagerie macroscopique

Après avoir confirmé que les virus chimériques affectaient les furets sensiblement de la même manière que les virus parents quant aux paramètres virologiques et immunitaires, nous avons vérifié le rôle de l'attachement dans la neurovirulence, à l'aide d'imagerie macroscopique de cerveaux infectés, grâce à la visualisation de l'eGFP.

Il a été démontré précédemment, que la souche A75eH pouvait infecter le SNC par deux voies différentes : de façon antérograde via les nerfs olfactifs jusqu'au bulbe olfactif et par la voie sanguine dans le plexus choroïde et les vaisseaux sanguins cérébraux (Higgins et al., 1982; Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006). À l'opposé, aucune fluorescence macroscopique n'a été observée dans les cerveaux des animaux infectés avec 5804PeH.

Pour évaluer le niveau et la localisation de l'infection causée par nos virus chimériques les cerveaux ont été soumis à l'imagerie macroscopique. La fluorescence de l'eGFP, indiquant les cellules infectées, était toujours observée dans les bulbes olfactifs et

les lobes frontaux, et quelques fois dans le tronc cérébral de façon localisée (Fig. 12A, B et C, observez la fluorescence selon les différents points de vue).

Comme la région du bulbe olfactif est le premier endroit où la fluorescence a été détectée, nous l'avons choisie pour la comparaison des virus chimériques. Il est à noter que les images présentées subséquemment pour chaque virus sont représentatives de la tendance générale observée. À part du virus 5804PeH, pour lequel nous avons confirmé l'absence, l'expression de l'eGFP observée précédemment tous les autres virus permettaient la détection de la fluorescence à cet un endroit (Fig. 13A, B et C, comparez le 5804PeH avec les autres virus. La protéine d'attachement d'A75eH semble augmenter légèrement la capacité du virus à envahir les bulbes olfactifs alors que de la fluorescence est augmentée pour les virus 58HA75 et 58FHA75 comparativement aux virus qui possèdent la protéine H de 5804PeH (5804PeH et A75FH58) (Fig. 13A et B, comparez la première et la deuxième colonne). Il faut mentionner que la durée de la maladie de ces virus était la même. Néanmoins, l'influence de la protéine H est toutefois négligeable pour ce qui est des virus A75eH et A75H58 qui infectent tous les deux efficacement le bulbe olfactif à la fin de la maladie, cinq semaines après l'infection (Fig. 13C, comparez les deux colonnes).

En général l'expression de l'eGFP était plus faible pour les virus qui causent une maladie plus rapide alors qu'elle augmentait avec la durée de la maladie (Fig. 13A à C, comparez les trois rangées). Ceci indique que malgré l'influence positive de la protéine d'attachement de la souche A75eH pour la neuroinvasion (Fig. 13A), le facteur décisif est le temps disponible entre l'inoculation et le décès de l'animal (Fig. 13B et C).

4.4.2 Imagerie microscopique

4.4.2.1 Infection du plexus choroïde

Comme démontré précédemment, le cerveau des furets pouvaient être infectés via deux routes d'infections : le bulbe olfactif et le plexus choroïde (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006). Pour évaluer le rôle de la protéine d'attachement dans l'utilisation de ces deux voies d'invasion, nous avons préparé des coupes histologiques. Puisque nous

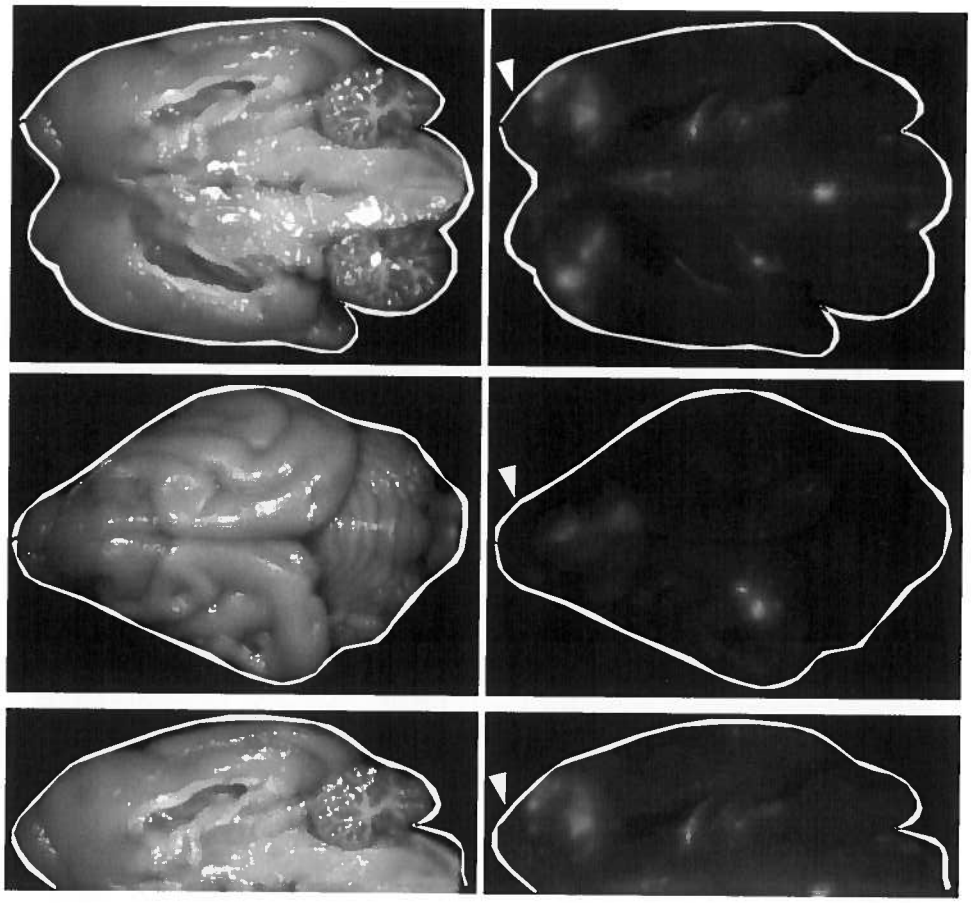

Figure 12: Imagerie macroscopique de cerveau infectés par A75H58. La première rangée correspond à une vue de dessus, la deuxième à une vue de dessous et la dernière à la vue suite à une coupe sagittale. La dernière colonne montre la détection de la protéine fluorescente verte. L'animal a été euthanasié 30 jours p.i. Les triangles blancs indiquent le bulbe olfactif.

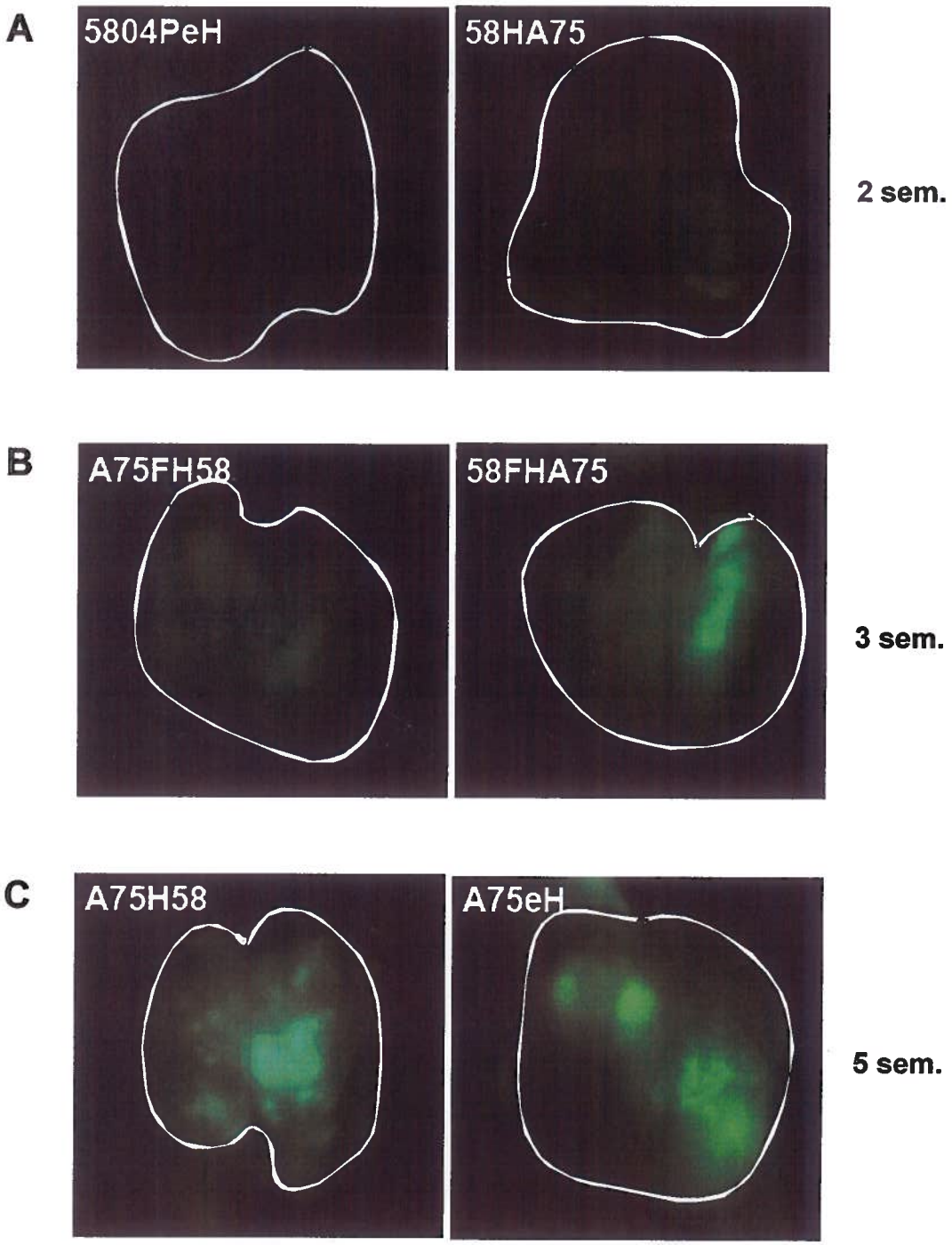

Figure 13: Fluorescence de l'eGFP dans les bulbes olfactifs de furets infectés. Imagerie du bulbe olfactif de furets infectés par les virus ayant la protéine d'attachement de 5804PeH (première colonne) et ceux ayant celle de A75eH (deuxième colonne). Les virus sont groupés en trois groupes selon la durée de la maladie. 5804PeH et 58HA75 (A), A75FH58 et 58FHA75 (B) et A75H58 et A75eH (C).

étions intéressés spécifiquement dans le rôle de la protéine H les virus chimériques ayant l'échange des deux glycoprotéines de l'enveloppe ont été exclus de cette analyse.

Il est bien établi que les virus qui ont un fort lymphotropisme peuvent, suite à l'infection des lymphocytes, voyager à travers la circulation sanguine jusqu'à la barrière hémato-encéphalique et causer une infection des cellules immunitaires résidentielles ainsi que des cellules épithéliales et endothéliales (Frisk et al., 1999; Goh et al., 2000). Consistent avec ces rapports, nous avons observé une forte infection dans le plexus choroïde par tous les virus, indépendamment de décès ou de la protéine H présente (Fig. 14A). Il est à noter que les virus possédant la protéine H de 5804PeH semble induire une infection plus disséminée, respectivement au temps de décès, comparativement aux virus ayant la protéine H de A75eH (Fig. 14A, comparez la fluorescence de 58HA75 et 5804PeH ainsi que A75H58 et A75eH).

4.4.2.2 Infection des bulbes olfactifs

Les structures infectées des bulbes olfactifs ont été identifiées comme étant les glomérules olfactifs. Dans cette structure, les fibres nerveuse olfactives interagissent avec les cellules mitrales qui relient les nerfs olfactifs jusqu'au cortex olfactif (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006). Conformément à l'observation macroscopique le virus A75eH établi une forte infection dans les cellules impliquées, toutefois pour l'autre virus parent, le 5804PeH, où l'imagerie macroscopique s'était révélée négative, quelques cellules positives pour l'eGFP ont été révélées par l'analyse microscopique (Fig. 14B, comparez avec l'imagerie macroscopique Fig. 13A, première colonne, 5804PeH).

Pour les deux virus chimériques nous avons observé un niveau de fluorescence qui était relié aux premières observations macroscopiques alors que le A75H58 causait plus de foyers d'infection que le 58HA75 (Fig. 14B, comparez avec Fig. 13A et C, 58HA75 et A75H58). Malgré le fait que le déterminant majeur de l'étendue de l'infection dans cette région est la durée de la maladie comme déjà observé au niveau macroscopique, la protéine H provenant de la souche A75 semble conférer un avantage pour l'invasion via cette voie (Fig. 14B, comparez 5804PeH avec 58HA75 et A75eH avec A75H58).

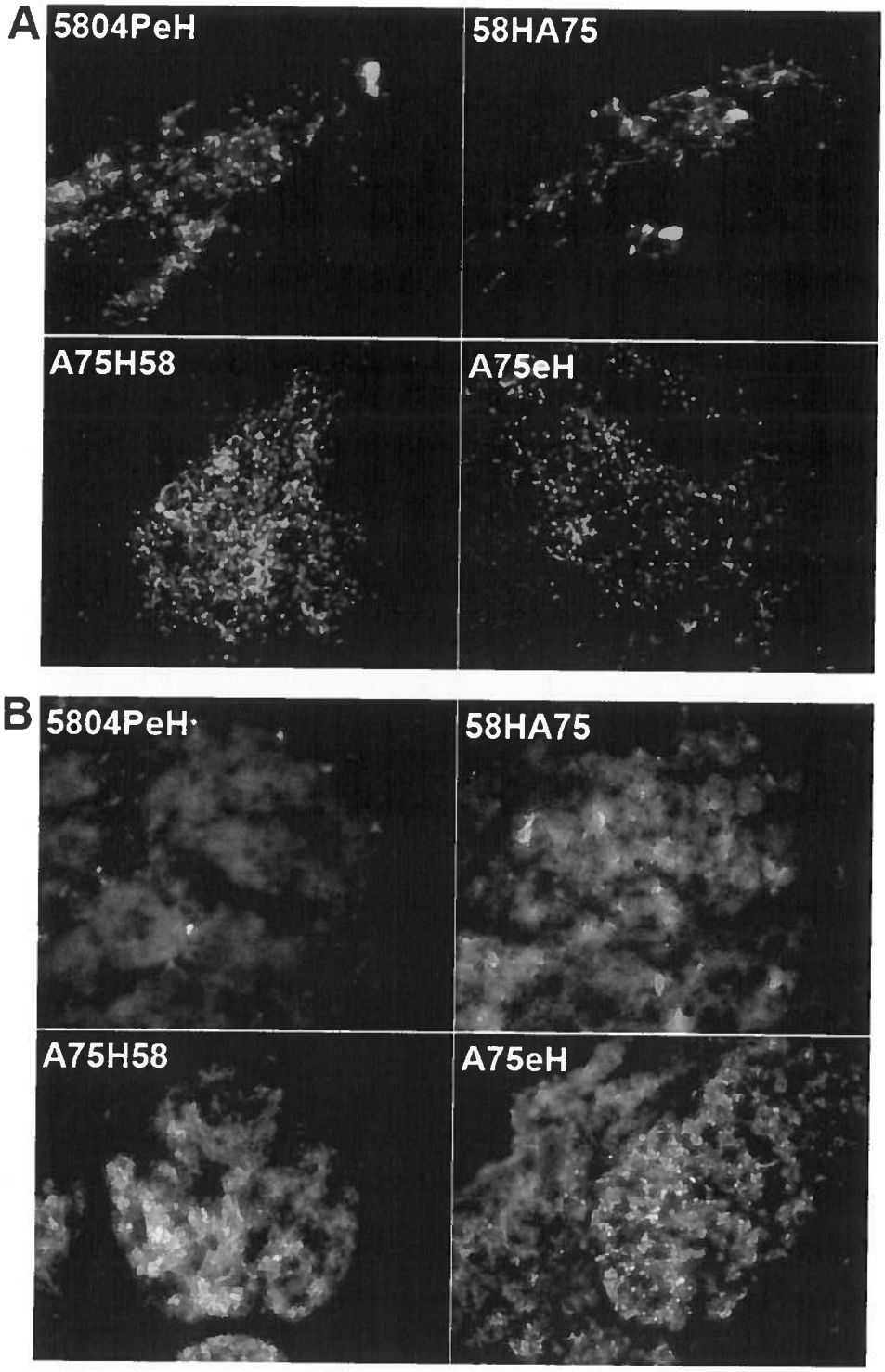

Figure 14: Niveau de l'infection du cerveau par voie hématogène et antérograde au moment du décès. Visualisation des cellules infectées dans le plexus choroïde (A) et le bulbe olfactif (B) des animaux infectés par 5804PeH et 58HA75 qui sont décédés après deux semaines et ceux infectés par A75eH et A75H58 qui sont décédés après cinq semaines. Les images du plexus choroïde ont été prises à un grossissement de 200X, celles du bulbe olfactif de 400X.

4.4.2.3 Comparaison du tropisme de A75eH et A75H58

Pour déterminer si l'échange de la protéine H mène à une variation du neurotropisme, une fois que l'infection est établie, nous avons identifié les cellules du cerveau ciblées par les virus A75eH et A75H58. Ces deux virus causent une maladie d'environ cinq semaines et l'infection du SNC est déjà bien établie, ce qui permet de bien comparer le tropisme observé.

Les deux virus, indifféremment de la protéine H présente, se sont révélés efficaces à infecter les cellules gliales (Fig. 15A, comparez la dernière colonne (haut et bas), les triangles blancs indiquent les cellules gliales infectées). Cela a confirmé l'observation précédente qui avait montré que les cellules gliales étaient infectées lors d'une infection par le virus A75eH (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006).

Cependant cette étude avait aussi montré que l'infection par le virus A75eH, via la voie antérograde (bulbe olfactif) se faisait via la muqueuse olfactive jusqu'au glomérule olfactif, en passant par les nerfs olfactifs, qui constitue le lien entre les fibres nerveuses olfactives et les cellules mitrales. Nous avons confirmé cette observation, en plus d'observer que le virus A75H58 était aussi capable d'infecter les neurones (Fig. 15B, comparez la dernière colonne (haut et bas), les triangles blancs indiquent les neurones infectés).

L'analyse du type cellulaire infecté au cerveau, une fois l'infection établie, a permis d'identifier les cellules gliales et les neurones comme cellules cibles des virus A75eH et A75H58. Ceci démontre que la protéine H n'influence pas le neurotropisme viral. Toutefois, la protéine H de A75eH semble influencer la capacité neuroinvasive d'un virus, en lui permettant d'accéder plus rapidement au SNC, via la voie antérograde, comme montré précédemment (Fig. 13A, comparez la fluorescence du 5804PeH et 58HA75).

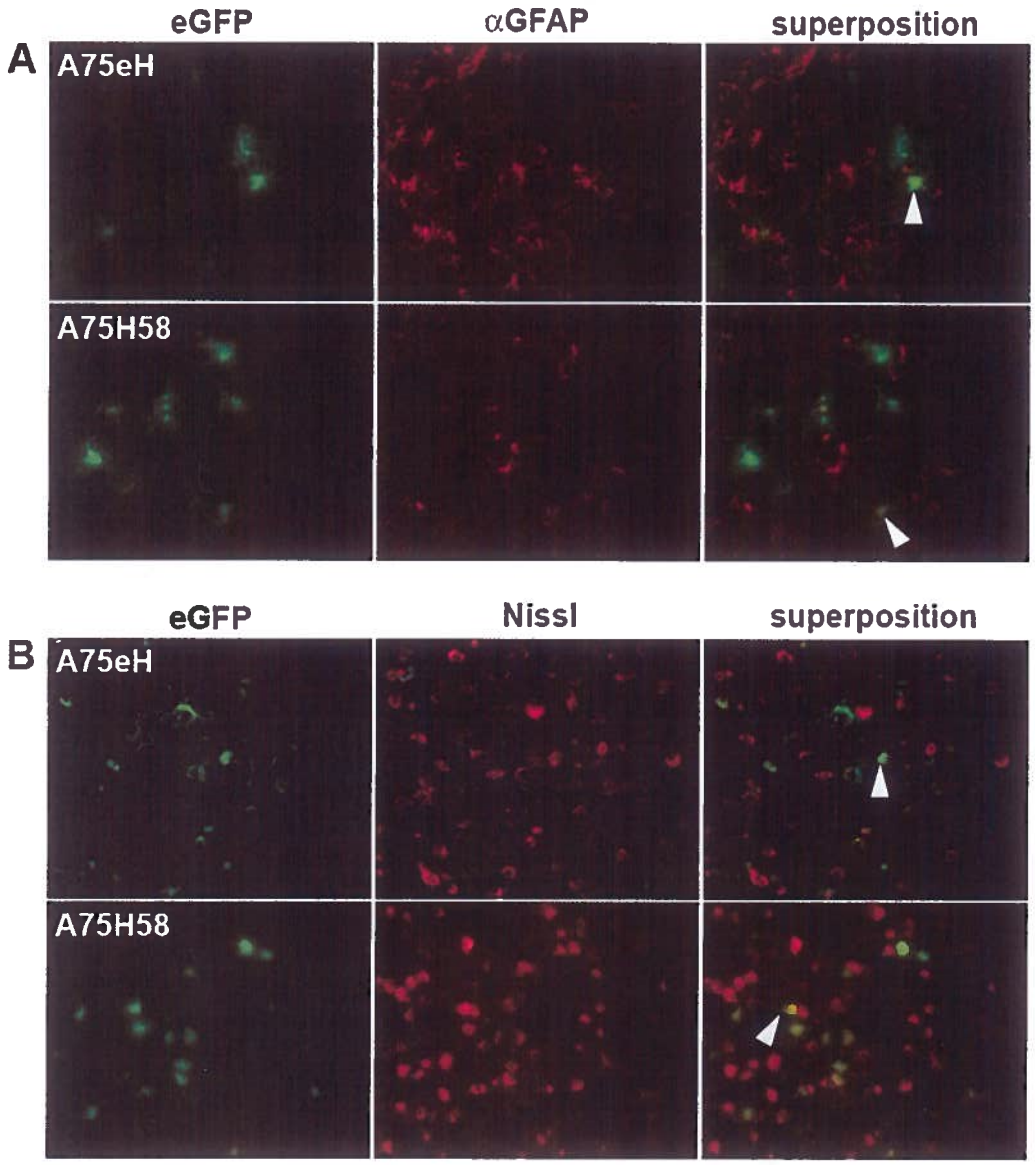

Figure 15: Identification des cellules cibles des virus A75eH et A75H58 au cerveau. Détection des cellules gliales (A) et des neurones (B). La première colonne montre la fluorescence verte émise par l'eGFP indiquant les cellules infectées. La deuxième colonne montre les cellules marquées par un anticorps contre la protéine fibrillaire des cellules gliales (GFAP) en combinaison avec un anticorps secondaires couplé avec Alexa 568 ou coloré directement avec le colorant Nissl qui émet aussi a une longueur d'onde de 568 nm, et la dernière colonne représente la superposition des deux images précédentes. Les images ont été prises à un grossissement de 400X. Les triangles blancs montrent les cellules infectées positivent pour αGFAP ou Nissl.

Chapitre 5 : Discussion

L'objectif de cette recherche était de déterminer le rôle de l'attachement dans la neurovirulence morbillivrale. Deux souches virales ont été utilisées : la souche 5804PeH et la souche A75eH. La souche 5804PeH n'est pas connue pour infecter le cerveau tandis que la souche A75eH infecte le cerveau. Puisque la protéine H est responsable de l'attachement à la cellule hôte, nous avons fait l'hypothèse que cette protéine est à la base du phénotype neurovirulent observé pour la souche A75eH.

Pour vérifier cette affirmation, nous avons produits des virus chimériques, dans lesquels nous avons échangé la protéine H ou les deux protéines membranaires, F et H, entre les deux virus. Le neurotropisme des virus chimériques a finalement été vérifié macroscopiquement et microscopiquement dans le but de déterminer le rôle de l'hémagglutinine.

5.1 Durée de la maladie versus neuroinvasion

Il était déjà connu pour d'autres virus tel que le virus de Sendai, le virus de la Piedad Michoacan et le virus émergent Nipah qu'en plus de la voie hématogène, la voie antérograde via le bulbe olfactif était aussi utilisé pour atteindre le SNC (Allan et al., 1996; Mori et al., 1995; Weingartl et al., 2005). En plus d'avoir observé les mêmes routes d'invasions : antérograde et hématogène, les résultats obtenus avec les virus chimériques nous ont indiqué que la durée de la maladie était le facteur clé influençant la neuroinvasion via la voie antérograde. En ce sens, nous avons observé que plus la maladie durait, plus forte était l'infection au cerveau. En effet, les virus 5804PeH et 58HA75, qui occasionnaient une maladie de deux semaines, n'étaient pas aussi neuroinvasifs que les virus 58FHA75 et A75FH58, qui entraînaient une maladie d'environ trois semaines, alors que les virus A75H58 et A75eH causaient la maladie la plus longue et étaient les plus neurovirulent (Fig. 13). Le SNC n'est pas le premier organe atteint par les virus puisque l'infection de celui-ci ne survient qu'après celle du tissus lymphatique et épithélial ce qui suggère que l'infection au cerveau n'est pas une conséquence directe de l'utilisation de la voie intranasale contrairement à ce qui est connu pour les virus neurotrope primaire comme le virus de l'herpès simplex (Mori et al., 2005).

Comme il avait été montré précédemment pour le virus A75eH, les voies antérograde et hématogène ont été identifiées comme les deux sites par lesquels les virus envahissaient le SNC (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006). La durée de la maladie n'avait pas d'effet sur l'invasion du plexus choroïde alors que chacun des virus étaient efficaces à infecter cette structure. Rudd *et al.*, ont montré que l'infection du plexus choroïde par A75eH survient à la suite de l'infection massive des lymphocytes. Nous avons observé que le virus 5804PeH infecte aussi efficacement le plexus choroïde, sinon plus efficacement que le virus A75eH (Fig. 14A). Les virus chimériques ayant la protéine H du virus 5804PeH ont aussi montré une plus grande infection du plexus choroïde que les virus chimériques ayant la protéine H de A75eH. L'explication réside peut-être dans une infection plus efficace des cellules résidentes du plexus choroïde par les virus possédant la protéine H de 5804PeH comparativement à ceux possédant la protéine H de A75eH.

5.2 Effet positif de la protéine d'attachement de A75eH sur la neuroinvasion

Le but de cette recherche était d'analyser le rôle de la protéine H dans le neurotropisme morbillivirale et des résultats ont été obtenus à cet égard. Comme mentionné précédemment, la souche A75eH était connue pour cibler le cerveau des furets suite à l'infection, contrairement à la souche 5804PeH où cette infection est beaucoup plus faible. Nous avons démontré que les virus possédant la protéine H de la A75eH avait un potentiel neuroinvasif plus élevé que ceux qui possèdent la protéine H de 5804PeH. Le virus 58HA75 permettait une plus forte infection du SNC par la voie antérograde que le virus 5804PeH et la même chose peut-être vérifié avec le virus 58FHA75 en comparaison avec A75FH58 (Fig. 13). Nous constatons que la durée de la maladie de ces deux groupes est respectivement de deux et trois semaines donc l'influence positive pour la neuroinvasion se doit de provenir de la protéine H de A75eH.

Toutefois, les deux virus pour lesquels la maladie est la plus longue, A75eH et A75H58, l'étendue de l'infection au SNC est similaire. La protéine de l'attachement de A75eH est donc plus efficace que la protéine H de 5804PeH pour ce qui est de la neuroinvasion, cependant les virus ayant cette protéine H peuvent tout de même envahir le cerveau et causer une infection similaire à plus long terme, ce qui suggère que la

protéine d'attachement provenant de chacune des souche est aussi efficace pour la neurovirulence. Ceci a été confirmé lorsque nous avons observés que les cellules gliales et les neurones pouvaient être infectés aussi efficacement peu importe la provenance de la protéine H (Fig. 15).

Ces résultats suggèrent donc que la protéine H n'est pas la seule responsable du neurotropisme. Certaines études avaient pourtant démontré le rôle de cette protéine dans le tropisme des morbillivirus. Les protéines H d'une souche sauvage de CDV et de souches atténuées de la rougeole et du CDV avaient été échangées entre elles et le tropisme viral en culture cellulaire dépendait de la protéine d'attachement présente (von Messling et al., 2001). Cependant, pour ce qui est du neurotropisme, l'échange de cette protéine ne permet pas d'observer une différence au niveau des types cellulaire infectés au cerveau. Une autre étude avait montrée que la protéine H provenant d'une souche adaptée au cerveau de souris pouvait conférer la neurovirulence à la souche vaccinale de la rougeole, quoique les infections ont été faites par voie intracrânienne contrairement à notre protocole d'infection qui ce fait de façon intranasale (Duprex et al., 1999).

En bref, tous les virus chimériques générés ont été capable d'infecter le cerveau. Nous pouvons constater avec le virus 58HA75, qui possède la protéine H de la souche neurovirulente A75eH, que l'attachement est impliqué dans la neuroinvasion de ce virus. Cependant, lorsque le H de cette même souche n'est pas présent, le virus conserve sa capacité à infecter le cerveau. Ces différents résultats nous permettent de dire que l'attachement est impliqué mais n'est pas primordiale pour la neurovirulence morbillivirale et que d'autres protéines doivent aussi jouer un rôle.

5.3 Rôle de la protéine de fusion dans la pathogenèse

Les virus avec les protéines F et H échangées avaient été générés dans le but d'évaluer le rôle de l'attachement dans la neurovirulence advenant que les virus avec les protéines H échangées ne soient pas fonctionnels à cause d'une interaction inefficace des protéines F et H hétérologues. Il y a 17 différences au niveau des acides aminés entre les protéines H des souches 5804PeH et A75eH (Tab. 1, dernière rangée). Il avait déjà été démontré en culture cellulaire pour le virus de la rougeole qu'une interaction diminuée entre les protéines F et H amenait une plus grande activité de fusion (Plemper et al.,

Différences	5804PeH/A75eH (acides aminés)	5804PeH/A75eH (nucléotides)
Peptide signal F	24	34
Protéine mature F	10	57
Protéine H	17	47

Tableau 1: Différence entre les protéines des souches 5804PeH et A75eH. La différence est exprimée en nombre d'acides aminés, pour la protéine de fusion (F) (peptide signal et la protéine mature) et pour la protéine d'attachement (H).

2002). Cependant, la similarité entre ces virus chimériques et leur souches parentales, *in vitro*, ainsi que, *in vivo*, suggère que les différences entre les protéines H ne sont pas situés à des endroits essentiels pour l'interaction entre les protéines F et H, ou encore, que le changement d'acide aminé n'a pas d'impact sur cette interaction.

Des résultats ont été obtenus avec les virus chimériques ayant les protéines F et H échangées au niveau de l'atténuation partielle et de la durée de la maladie. En effet, lorsque nous comparons la survie des animaux infectés avec les virus chimériques ayant les protéines H échangées versus les virus avec les protéines F et H échangées, il devient évident que ces derniers ne sont pas aussi efficaces pour entraîner la mort du furet. Pour le virus 58FHA75 nous avons observés que deux des six furets infectés ont survécus à l'infection. Il est donc clair que ce virus chimérique est atténué partiellement suite à l'échange des deux glycoprotéines de l'enveloppe qui empêche le virus d'agir aussi efficacement que les deux virus parents ou les virus chimériques avec la protéine H seulement échangée. Puisque les protéines F et H proviennent de la même souche et que l'échange de H seule ne provoque pas d'atténuation, les éléments responsables de cette atténuation partielle doivent donc se trouver dans la protéine F.

Nous avons aussi constaté que, contrairement aux virus chimériques avec les protéines H échangées, la durée de la maladie est différente de celle causée par le génome parent. Ceci indique que la protéine de fusion doit influencer la durée de la maladie par un mécanisme indéterminé. Pour cerner les implications de l'échange de la protéine de fusion, il faut comprendre la transcription de l'ARNm de ce gène ainsi que la structure de la protéine.

Une particularité de tous les mononegavirales est l'existence de régions non traduites entre chacun des gènes contenant les séquences de début et d'arrêt de la transcription (Takeda et al., 2005). Cependant la fonction de la région intergénique entre les gènes M et F chez les morbillivirus n'est pas encore correctement élucidée (Liermann et al., 1998). Lorsque nous avons procédé à l'échange des protéines F et H, nous avons aussi échangé la région non traduite en 5' de F ainsi que la région codant pour la protéine F. Nous pouvons spéculer que l'échange de F mène à une interaction moins efficace de l'ARN virale entre les régions non traduites en 3' de M et en 5' de F qui pourrait nuire au virus. Cette interaction pourrait empêcher un repliement efficace de l'ARN virale.

Certains croient que cette région jouerait un rôle dans la stabilité de l'ARNm, sa localisation intracellulaire et l'efficacité de la traduction de cet ARN en protéines (Takeda et al., 2005). Toutefois, aucun motif connu n'a été observé dans cette région jusqu'à maintenant (Pesole et al., 2002).

Le gène F code pour une glycoprotéine de type I, c'est-à-dire, une protéine qui a son extrémité aminoterminal extracellulaire et son extrémité carboxyterminal cytoplasmique. Donc, cette protéine possède un peptide signal à son extrémité aminoterminal et un domaine transmembranaire et cytoplasmique à son extrémité carboxyterminal. Il se pourrait que le peptide signal clivé pour former la protéine de fusion mature joue un rôle dans la pathogenèse du CDV. Ce peptide qui a pour fonction de permettre le transport au réticulum endoplasmique les protéines destinées à être déplacées par la voie du transport vésiculaire de la cellule pourrait avoir d'autres fonctions. Jusqu'à maintenant son rôle dans la pathogenèse reste obscur quoique quelques hypothèses ont été avancées. Certains suggèrent que le peptide signal pourrait interagir avec d'autres protéines cellulaires de façon semblable à celui de la glycoprotéine du HIV qui interagirait avec la calmoduline ce qui expliquerait le dysfonctionnement des processus calmoduline dépendant (Martoglio, Graf, and Dobberstein, 1997; Miller et al., 1993; von Messling and Cattaneo, 2002). De plus, il est connu que suite au clivage de ce peptide, celui-ci n'est pas dégradé immédiatement mais seulement après un certain temps, donc il est permis de penser qu'il pourrait interagir avec d'autres protéines virales durant cet intervalle de temps. Toutefois il n'y a aucune évidence qui corrobore ce fait jusqu'à maintenant (von Messling and Cattaneo, 2002).

5.4 Lien entre l'immunosuppression et la neuroinvasion

Lors des expériences de prolifération lymphocytaire, le virus A75eH semblait légèrement moins immunosuppressif que le virus 5804PeH qui inhibait quasi totalement la prolifération lymphocytaire. Il pourrait y avoir un lien entre la gravité de l'immunosuppression et la présence du virus au cerveau, ce qui expliquerait pourquoi ce virus peut envahir le cerveau tandis que le 5804PeH, qui agit plus efficacement sur le système immunitaire, ne pourrait accéder au cerveau du furet puisqu'il mène à la mort de celui-ci trop rapidement. Cette hypothèse concorderait avec le fait que la neuroinvasion,

observée chez A75eH est un phénomène tardif (Rudd, Cattaneo, and von Messling, 2006).

Alors, certaines protéines virales pourraient jouer un rôle dans le neurotropisme du CDV, via leur fonction immunosuppressive. Les protéines C et V des morbillivirus sont connues comme possédant ces propriétés. La protéine C du virus de la rougeole inhibe la réponse d'interféron de type I et est requise pour une la réplication virale en culture cellulaire ainsi que chez les macaques (Shaffer, Bellini, and Rota, 2003; Takeuchi et al., 2005). La protéine V a un rôle dans l'immunosuppression entre autres en interférant avec la protéine STAT et en empêchant la transduction des signaux pour la production de cytokines (Horvath, 2004; Palosaari et al., 2003). D'autres études utilisant des virus déficients en protéines C et/ou V du CDV chez le furets ont montré que la protéine C n'était pas essentielle pour l'inhibition du système immunitaire contrairement à la protéine V (von Messling, Svitek, and Cattaneo, 2006). De plus, les virus déficients pour la protéine V étaient atténués chez le furet.

Puisque cette protéine est différente, au niveau des acides aminés, entre les virus 5804PeH et A75eH, il serait peut-être possible d'observer une différence au niveau de l'efficacité de neuroinvasion en procédant à l'échange de ces deux protéines.

5.5 Conclusions

Nous avons remarqué que la durée de la maladie détermine l'étendue de la dissémination virale aux cerveaux des furets. Toutefois, la protéine H de A75eH a une influence positive dans la neuroinvasion du SNC par les virus dérivés du génome de 5804PeH. L'influence de cette protéine est négligeable lors d'une infection qui cause une maladie de longue durée. Le furet est incapable de se défendre contre le virus en établissant une bonne réponse immunitaire. La diminution de la prolifération lymphocytaire et de la leucopénie observées suite à l'infection viennent confirmer l'inefficacité du système immunitaire du furet à combattre la maladie. Nous pouvons spéculer que la durée de la maladie corrèle avec la présence du virus au cerveau. Autrement dit, un animal qui développe une maladie plus longue a plus de chance d'être infecté au SNC.

De plus, notre étude qui visait à déterminer le rôle de la protéine H dans la neurovirulence a permis de remarquer que la protéine F était aussi impliquée dans la neuroinvasion morbillivirale via un mécanisme encore inconnu.

Finalement, les résultats de ce projet soulèvent quelques questions. La capacité d'un virus à inhiber le système immunitaire pourrait être lié à la vitesse à laquelle progresse la maladie. La réponse à cette interrogation pourrait être obtenue en menant une expérience dans laquelle un virus dérivé du 5804PeH possédant la protéine V de A75eH serait généré. En infectant des furets avec ce virus, possiblement moins immunosuppressif que le 5804P, cela pourrait mener à une maladie de plus longue durée. Il serait donc possible, d'évaluer si le virus 5804PeH, possédant sa protéine d'attachement originale, est capable d'envahir le cerveau, aussi efficacement que le A75eH, seulement en faisant varier la durée de la maladie.

Liste des références

Allan, G. M., McNeilly, F., Walker, I., Linne, T., Moreno-Lopez, J., Hernandez, P., Kennedy, S., Carroll, B. P., Herron, B., Foster, J. C., and Adair, B. (1996). A sequential study of experimental porcine paramyxovirus (LPMV) infection of pigs: immunostaining of cryostat sections and virus isolation. *J Vet Diagn Invest* **8,** 405-13.

Andres, O., Obojes, K., Kim, K. S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (2003). CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol* **84,** 1189-97.

Barrett, T., Parida, S., Mohapatra, M., Walsh, P., Das, S., and Baron, M. D. (2003). Development of new generation rinderpest vaccines. *Dev Biol (Basel)* **114,** 89-97.

Beckford, A. P., Kaschula, R. O., and Stephen, C. (1985). Factors associated with fatal cases of measles. A retrospective autopsy study. *S Afr Med J* **68,** 858-63.

Bellini, W. J., Englund, G., Richardson, C. D., and Rozenblatt, S. (1984). Positive identification of a measles virus cDNA clone encoding a region of the phosphoprotein. *J Virol* **50,** 939-42.

Blixenkrone-Moller, M. (1989). Detection of intracellular canine distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine distemper virus. *Am J Vet Res* **50,** 1616-20.

Cathomen, T., Naim, H. Y., and Cattaneo, R. (1998). Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* **72,** 1224-34.

Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K., and Billeter, M. A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* **56,** 759-64.

Clements, C. J., and Cutts, F. T. (1995). The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* **191,** 13-33.

Cocks, B. G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Yssel, H., de Vries, J. E., and Aversa, G. (1995). A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376,** 260-3.

Connolly, J. H., Allen, I. V., Hurwitz, L. J., and Millar, J. H. (1967). Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* **1,** 542-4.

Domingo, M., Ferrer, L., Pumarola, M., Marco, A., Plana, J., Kennedy, S., McAliskey, M., and Rima, B. K. (1990). Morbillivirus in dolphins. *Nature* **348,** 21.

Duprex, W. P., Duffy, I., McQuaid, S., Hamill, L., Cosby, S. L., Billeter, M. A., Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V., and Rima, B. K. (1999). The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. *J Virol* **73,** 6916-22.

Frisk, A. L., Konig, M., Moritz, A., and Baumgartner, W. (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol* **37,** 3634-43.

Fujinami, R. S., and Oldstone, M. B. (1979). Antiviral antibody reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature* **279,** 529-30.

Gassen, U., Collins, F. M., Duprex, W. P., and Rima, B. K. (2000). Establishment of a rescue system for canine distemper virus. *J Virol* **74,** 10737-44.

Gendelman, H. E., Wolinsky, J. S., Johnson, R. T., Pressman, N. J., Pezeshkpour, G. H., and Boisset, G. F. (1984). Measles encephalomyelitis: lack of evidence of viral invasion of the central nervous system and quantitative study of the nature of demyelination. *Ann Neurol* **15,** 353-60.

Goh, K. J., Tan, C. T., Chew, N. K., Tan, P. S., Kamarulzaman, A., Sarji, S. A., Wong, K. T., Abdullah, B. J., Chua, K. B., and Lam, S. K. (2000). Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med* **342,** 1229-35.

Griot, C., Vandevelde, M., Schobesberger, M., and Zurbriggen, A. (2003). Canine distemper, a re-emerging morbillivirus with complex neuropathogenic mechanisms. *Anim Health Res Rev* **4,** 1-10.

Hahm, B., Arbour, N., Naniche, D., Homann, D., Manchester, M., and Oldstone, M. B. (2003). Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol* **77,** 3505-15.

Hahm, B., Arbour, N., and Oldstone, M. B. (2004). Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology* **323,** 292-302.

Halsey, N. A., Modlin, J. F., Jabbour, J. T., Dubey, L., Eddins, D. L., and Ludwig, D. D. (1980). Risk factors in subacute sclerosing panencephalitis: a case-control study. *Am J Epidemiol* **111,** 415-24.

Higgins, R. J., Krakowka, S. G., Metzler, A. E., and Koestner, A. (1982). Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. *Acta Neuropathol (Berl)* **58,** 1-8.

Horvath, C. M. (2004). Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. *Eur J Biochem* **271,** 4621-8.

Hsu, E. C., Iorio, C., Sarangi, F., Khine, A. A., and Richardson, C. D. (2001). CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* **279,** 9-21.

Huber, M., Cattaneo, R., Spielhofer, P., Orvell, C., Norrby, E., Messerli, M., Perriard, J. C., and Billeter, M. A. (1991). Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology* **185,** 299-308.

Iwatsuki, K., Okita, M., Ochikubo, F., Gemma, T., Shin, Y. S., Miyashita, N., Mikami, T., and Kai, C. (1995). Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. *J Comp Pathol* **113,** 185-90.

Jabbour, J. T., Duenas, D. A., Sever, J. L., Krebs, H. M., and Horta-Barbosa, L. (1972). Epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). A report of the SSPE registry. *Jama* **220,** 959-62.

Kennedy, S., Smyth, J. A., Cush, P. F., Duignan, P., Platten, M., McCullough, S. J., and Allan, G. M. (1989). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in seals. *Vet Pathol* **26,** 97-103.

Kirk, J., Zhou, A. L., McQuaid, S., Cosby, S. L., and Allen, I. V. (1991). Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* **17,** 289-97.

Krakowka, S., Higgins, R. J., and Koestner, A. (1980). Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am J Vet Res* **41,** 284-92.

Lamb, R. A., Kolakofsky, D. (1996). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. 3rd ed. *In* "Field's Virology" (D. M. K. B.N. Fields, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman, and S.E. Straus, Ed.), pp. 1177-1204. Lippinscott-Raven, Philadelphia, PA.

Lawrence, D. M., Patterson, C. E., Gales, T. L., D'Orazio, J. L., Vaughn, M. M., and Rall, G. F. (2000). Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *J Virol* **74,** 1908-18.

Liermann, H., Harder, T. C., Lochelt, M., von Messling, V., Baumgartner, W., Moennig, V., and Haas, L. (1998). Genetic analysis of the central untranslated genome region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper morbilliviruses. *Virus Genes* **17,** 259-70.

Lisiak, J. A., and Vandevelde, M. (1979). Polioencephalomalacia associated with canine distemper virus infection. *Vet Pathol* **16,** 650-60.

Liszewski, M. K., Post, T. W., and Atkinson, J. P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* **9,** 431-55.

Lund, B. T., Tiwari, A., Galbraith, S., Baron, M. D., Morrison, W. I., and Barrett, T. (2000). Vaccination of cattle with attenuated rinderpest virus stimulates CD4(+) T cell responses with broad viral antigen specificity. *J Gen Virol* **81,** 2137-46.

Mahapatra, M., Parida, S., Baron, M. D., and Barrett, T. (2006). Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex. *J Gen Virol* **87,** 2021-9.

Mahy, B. W. J., and H. O. Kangro (1996). *In* "Virology methods manual". Academic Press, San Diego, Calif.

Martoglio, B., Graf, R., and Dobberstein, B. (1997). Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *Embo J* **16,** 6636-45.

McQuaid, S., Kirk, J., Zhou, A. L., and Allen, I. V. (1993). Measles virus infection of cells in perivascular infiltrates in the brain in subacute sclerosing panencephalitis: confirmation by non-radioactive in situ hybridization, immunocytochemistry and electron microscopy. *Acta Neuropathol (Berl)* **85,** 154-8.

Miller, M. A., Mietzner, T. A., Cloyd, M. W., Robey, W. G., and Montelaro, R. C. (1993). Identification of a calmodulin-binding and inhibitory peptide domain in the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9,** 1057-66.

Modlin, J. F., Jabbour, J. T., Witte, J. J., and Halsey, N. A. (1977). Epidemiologic studies of measles, measles vaccine, and subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatrics* **59,** 505-12.

Moench, T. R., Griffin, D. E., Obriecht, C. R., Vaisberg, A. J., and Johnson, R. T. (1988). Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *J Infect Dis* **158,** 433-42.

Mori, I., Komatsu, T., Takeuchi, K., Nakakuki, K., Sudo, M., and Kimura, Y. (1995). Parainfluenza virus type 1 infects olfactory neurons and establishes long-term persistence in the nerve tissue. *J Gen Virol* **76 (Pt 5),** 1251-4.

Mori, I., Nishiyama, Y., Yokochi, T., and Kimura, Y. (2005). Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* **11,** 129-37.

Mrkic, B., Odermatt, B., Klein, M. A., Billeter, M. A., Pavlovic, J., and Cattaneo, R. (2000). Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *J Virol* **74,** 1364-72.

Nasr, J. T., Andriola, M. R., and Coyle, P. K. (2000). ADEM: literature review and case report of acute psychosis presentation. *Pediatr Neurol* **22,** 8-18.

Niewiesk, S. (1999). Cotton rats (Sigmodon hispidus): an animal model to study the pathogenesis of measles virus infection. *Immunol Lett* **65,** 47-50.

Niewiesk, S., Eisenhuth, I., Fooks, A., Clegg, J. C., Schnorr, J. J., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. (1997). Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (Sigmodon hispidus) model depends on viral glycoproteins. *J Virol* **71,** 7214-9.

Okita, M., Yanai, T., Ochikubo, F., Gemma, T., Mori, T., Maseki, T., Yamanouchi, K., Mikami, T., and Kai, C. (1997). Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *J Comp Pathol* **116,** 403-8.

Oldstone, M. B., Lewicki, H., Thomas, D., Tishon, A., Dales, S., Patterson, J., Manchester, M., Homann, D., Naniche, D., and Holz, A. (1999). Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell* **98,** 629-40.

Palosaari, H., Parisien, J. P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M., and Horvath, C. M. (2003). STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* **77,** 7635-44.

Patterson, J. B., Manchester, M., and Oldstone, M. B. (2001). Disease model: dissecting the pathogenesis of the measles virus. *Trends Mol Med* **7,** 85-8.

Peeples, M. E. (1991). Paramyxovirus M Proteins: Pullig It All Together and Taking It on the Road. *In* "The Paramyxoviruses" (D. W. Kingsbury, Ed.), pp. 427-456. Plenum Press, New York.

Pesole, G., Liuni, S., Grillo, G., Licciulli, F., Mignone, F., Gissi, C., and Saccone, C. (2002). UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002. *Nucleic Acids Res* **30,** 335-40.

Plemper, R. K., Hammond, A. L., Gerlier, D., Fielding, A. K., and Cattaneo, R. (2002). Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol* **76,** 5051-61.

Pringle, C. R. (1991). The Genetics of Paramyxoviruses. *In* "The Paramyxoviruses" (D. W. Kingsbury, Ed.), pp. 1-39. Plenum Press, New York.

Pringle, C. R. (1999). Virus taxonomy 1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *In* "Arch. Virol." pp. 421-429.

Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G., and Billeter, M. A. (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *Embo J* **14,** 5773-84.

Rudd, P. A., Cattaneo, R., and von Messling, V. (2006). Canine Distemper Virus Uses Both the Anterograde and the Hematogenous Pathway for Neuroinvasion. *J Virol* **80,** 9361-70.

Sakaguchi, M., Yoshikawa, Y., Yamanouchi, K., Sata, T., Nagashima, K., and Takeda, K. (1986). Growth of measles virus in epithelial and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys. *Microbiol Immunol* **30,** 1067-73.

Schlender, J., Schnorr, J. J., Spielhoffer, P., Cathomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M. A., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1996). Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93,** 13194-9.

Schneider-Schaulies, S., Liebert, U. G., Segev, Y., Rager-Zisman, B., Wolfson, M., and ter Meulen, V. (1992). Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells. *J Virol* **66,** 5534-41.

Schneider, H., Spielhofer, P., Kaelin, K., Dotsch, C., Radecke, F., Sutter, G., and Billeter, M. A. (1997). Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector. *J Virol Methods* **64,** 57-64.

Shaffer, J. A., Bellini, W. J., and Rota, P. A. (2003). The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* **315,** 389-97.

Shingai, M., Inoue, N., Okuno, T., Okabe, M., Akazawa, T., Miyamoto, Y., Ayata, M., Honda, K., Kurita-Taniguchi, M., Matsumoto, M., Ogura, H., Taniguchi, T., and Seya, T. (2005). Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic cells establish systemic viral infection. *J Immunol* **175,** 3252-61.

Sidorenko, S. P., and Clark, E. A. (2003). The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol* **4,** 19-24.

Stephensen, C. B., Welter, J., Thaker, S. R., Taylor, J., Tartaglia, J., and Paoletti, E. (1997). Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* **71,** 1506-13.

Stittelaar, K. J., Wyatt, L. S., de Swart, R. L., Vos, H. W., Groen, J., van Amerongen, G., van Binnendijk, R. S., Rozenblatt, S., Moss, B., and Osterhaus, A. D. (2000). Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies. *J Virol* **74,** 4236-43.

Summers, B. A., Greisen, H. A., and Appel, M. J. (1979). Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)* **46,** 1-10.

Summers, B. A., Greisen, H. A., and Appel, M. J. (1984). Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. *J Comp Pathol* **94,** 65-75.

Takasu, T., Mgone, J. M., Mgone, C. S., Miki, K., Komase, K., Namae, H., Saito, Y., Kokubun, Y., Nishimura, T., Kawanishi, R., Mizutani, T., Markus, T. J., Kono, J., Asuo, P. G., and Alpers, M. P. (2003). A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol Infect* **131,** 887-98.

Takeda, M., Ohno, S., Seki, F., Nakatsu, Y., Tahara, M., and Yanagi, Y. (2005). Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol* **79,** 14346-54.

Takeda, M., Takeuchi, K., Miyajima, N., Kobune, F., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Nagai, Y., and Tashiro, M. (2000). Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J Virol* **74,** 6643-7.

Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Ami, Y., Nagata, N., Suzaki, Y., Shahnewaz, J., Kadota, S., and Nagata, K. (2005). Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol* **79,** 7838-44.

Tatsuo, H., Ono, N., and Yanagi, Y. (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* **75,** 5842-50.

Tipold, A., Moore, P., Zurbriggen, A., Burgener, I., Barben, G., and Vandevelde, M. (1999). Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol (Berl)* **97,** 45-56.

Vandevelde, M., and Zurbriggen, A. (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol (Berl)* **109,** 56-68.

Vandevelde, M., Zurbriggen, A., Higgins, R. J., and Palmer, D. (1985). Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol (Berl)* **67,** 211-8.

von Messling, V., and Cattaneo, R. (2002). Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *J Virol* **76,** 4172-80.

von Messling, V., Milosevic, D., and Cattaneo, R. (2004). Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101,** 14216-21.

von Messling, V., Springfeld, C., Devaux, P., and Cattaneo, R. (2003). A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* **77,** 12579-91.

von Messling, V., Svitek, N., and Cattaneo, R. (2006). Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol* **80,** 6084-92.

von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., and Cattaneo, R. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* **75,** 6418-27.

Weingartl, H., Czub, S., Copps, J., Berhane, Y., Middleton, D., Marszal, P., Gren, J., Smith, G., Ganske, S., Manning, L., and Czub, M. (2005). Invasion of the central nervous system in a porcine host by nipah virus. *J Virol* **79,** 7528-34.

Welstead, G. G., Iorio, C., Draker, R., Bayani, J., Squire, J., Vongpunsawad, S., Cattaneo, R., and Richardson, C. D. (2005). Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102,** 16415-20.

Welter, J., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E., and Stephensen, C. B. (2000). Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J Virol* **74,** 6358-67.

Winters, K. A., Mathes, L. E., Krakowka, S., and Olsen, R. G. (1983). Immunoglobulin class response to canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* **5,** 209-15.

Wunschmann, A., Alldinger, S., Kremmer, E., and Baumgartner, W. (1999). Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Vet Immunol Immunopathol* **67,** 101-16.

Zhu, Y. D., Heath, J., Collins, J., Greene, T., Antipa, L., Rota, P., Bellini, W., and McChesney, M. (1997). Experimental measles. II. Infection and immunity in the rhesus macaque. *Virology* **233,** 85-92.