Université du Québec
INRS – Institut Armand-Frappier

PROFILS DE CYTOKINES DANS LES TISSUS ÉPITHÉLIAUX ET IMMUNITAIRES DE FURETS INFECTÉS PAR DES SOUCHES LÉTALES OU ATTÉNUÉES DE CDV

Par
Louis-Etienne Bastien

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

Jury d'évaluation

Examinateur interne	Claude Daniel, Ph. D. INRS – Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Hugo Soudeyns, Ph. D. CHU – Ste-Justine Université de Montréal
Directeur de recherche	Veronika von Messling, Dr. Med. Vet. INRS – Institut Armand-Frappier

Remerciements

- Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche Veronika von Messling pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et supervisé tout au long de mon projet de maîtrise.

- Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler, soit particulièrement Nicholas et Penny qui ont contribué à ce projet.

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Ag : Antigène

APC : Cellule présentatrice d'antigène

ARN : Acide ribonucléique

ARNdb : ARN double brin viral

ARNm : Acide ribonucléique messager

CDV : Virus de la maladie de Carré

Cellule T_H : Cellule T auxiliaire

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CTL : Cellule T lymphotoxique

DAB : Diaminobenzène

DC : Cellule dendritique

DTT : Dithiothréitol

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

F : Protéine de la fusion

FBS : Sérum bovin fœtal

H : Hémagglutinine

IFN : Interféron

IL : Interleukine

IPMA : Immunoperoxydase monolayer assay

IPTG : Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

kDa : Kilodalton

LB : Milieu Luria-Bertani

M : Protéine de la matrice

MV : Virus de la rougeole

N : Nucléoprotéine

NK : Cellule tueuse naturelle

ns : Non spécifique

PBMC : Cellule mononucléaire du sang périphérique

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Réaction en chaîne de la polymérase

PHA : Phytohémagglutinine

RdRp : ARN polymérase ARN dépendante

RNP : Ribonucléoprotéine

RT-PCR : Réaction en chaîne de la polymérase par transcriptase inverse

SDS : Dodécylsulfate de sodium

SLAM : Molécule du signalement de l'activation lymphocytaire

TLR : Récepteur de type Toll

TNF : Facteur nécrosant des tumeurs

Trx : Thiorédoxine

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Génome (a) et structure (b) des morbillivirus 12
Figure 2 : Évolution de l'infection morbillivirale dans le temps 13
Figure 3: Éruptions cutanées après infection par le CDV 15
Figure 4 : Les cytokines déterminent le sous-type des cellules T_H naïves 21
Figure 5 : Schéma des protéines recombinantes lors de l'expression dans le vecteur pET32 36
Figure 6 : Expression des protéines recombinantes chez *E. coli* 37
Figure 7 : Purification de protéines recombinantes sur colonne Ni-TED 38
Figure 8 : Digestion des protéines recombinantes par l'entérokinase 39
Figure 9 : Purification des protéines recombinantes sous leur forme insoluble 40
Figure 10 : Évaluation de la réponse des animaux face à l'immunisation 42
Figure 11 : Schémas des génomes des virus utilisés 44
Figure 12 : Comparaison des manifestations cliniques associées aux deux virus chez le furet 45
Figure 13 : Coloration par immunohistochimie des cytokines dans le nodule lymphatique 48
Figure 14 : Coloration par immunohistochimie de TNF-α dans les tissus épithéliaux 50
Figure 15 : Quantification des protéines eucaryotes par immunobuvardage de type Western 51
Figure 16 : Courbe standard pour l'ELISA indirect en sandwich d'IFN-β 53
Tableau I : Amorces sens et anti-sens utilisées lors des clonages 27
Tableau II : Peptides utilisés pour l'immunisation des poulets 32
Tableau III : Bilan de la réponse à l'immunisation des lapins et des poulets 43
Tableau IV : Profils de cytokines observés dans les tissus immunitaires 47
Tableau V : Profils de cytokines obtenus dans les tissus épithéliaux 49
Tableau VI : Valeurs obtenues en ELISA indirect en sanwich pour l'IFN-β 53
Tableau VII : Probabilité de solubilité selon le modèle de Wilkinson-Harrison lors de l'expression de certaines cytokines dans les vecteur pET32 ou pET43.1 55

Résumé

Environ 40 millions de personnes contractent le virus de la rougeole (MV) chaque année et environ 600,000 d'entre elles en meurent. Le MV appartient au genre Morbillivirus dans la famille des paramyxoviridae qui comprend aussi le virus de la maladie de Carré (CDV). L'infection de furets par le CDV reproduit les principales caractéristiques de la rougeole chez l'humain, incluant des éruptions cutanées typiques, une forte fièvre, une haute virémie et une sévère immunosuppression. Cette immunosuppression se manifeste principalement par une sévère leucopénie et par l'inhibition de la prolifération lymphocytaire et peut mener à des complications graves, notamment des infections bactériennes secondaires ou des désordres neurologiques.

Nous avons précédemment montré par PCR en temps réel que les PBMCs d'animaux infectés par la souche sauvage 5804P, létale chez le furet, ne développent pas de réponse de cytokines, tandis que l'infection par des souches atténuées entraîne la régulation à la hausse de l'ARNm des interférons (IFNs) et d'autres cytokines. Afin d'évaluer la réponse immunitaire chez des tissus immunitaires et épithéliaux, et pour confirmer les résultats précédents au niveau protéique, nous avons produits des anticorps (Ac) contre plusieurs cytokines du furet, ceux-ci n'étant pas disponibles commercialement. Les cytokines choisies sont des représentants importants des réponses immunitaires innées et adaptatives, soit les IFNs de type I et II, le facteur nécrosant des tumeurs (TNF)-α et les interleukines (IL)-2, -4 et -6. Les gènes des cytokines ont été insérés dans un vecteur d'expression procaryotique et exprimés chez *E. Coli*. Une fois purifiées, les protéines bactériennes ont été utilisées pour l'immunisation de lapins. Des poulets ont également été immunisés par des peptides synthétiques choisis pour leur immunogénicité. La réponse des animaux à l'immunisation a été évaluée par « immunoperoxydase monolayer assay » (IPMA) ainsi que par immunobuvardage de type Western.

Une fois leur spécificité confirmée, les Ac ont été utilisés pour la coloration immunohistochimique de tissus immunitaires et épithéliaux d'animaux infectés par la souche létale 5804P, ou par une souche atténuée causant néanmoins une maladie sévère. Les profils de cytokines ont été évalués aux jours 7 et 14 post infection, qui correspondent respectivement

chez la souche sauvage à l'apparition de manifestations cliniques sévères et à la mortalité. L'expression des cytokines de l'immunité innée s'est avérée importante envers les deux souches du CDV, particulièrement pour la souche sauvage dans les tissus épithéliaux. La forte expression de cytokines proinflammatoires envers cette souche corrèle avec l'observation de manifestations cliniques plus sévères. De plus, une altération de l'immunité adaptative a été observée avec 5804P. Dans les ganglions mésentériques, l'expression des cytokines de la réponse adaptative s'est avérée soit inhibée, pour IFN-γ, ou retardée, pour IL-2 et IL-4. Nos résultats démontrent que les morbillivirus interfèrent de façon différente avec l'activation de la réponse innée dans des cellules immunitaires et épithéliales. Ceci suggère une contribution importante des cellules épithéliales au développement d'une réponse immunitaire appropriée et à la résolution de l'infection.

Table des matières

Remerciements ii
Liste des abréviations iii
Liste des figures et tableaux v
Résumé vi
Table des matières viii
Chapitre 1 : Revue de littérature 11
1.1 Les morbillivirus 11
1.1.1 Taxonomie 11
1.1.2 Génome et réplication 11
1.1.3 La pathogénèse morbillivirale 13
1.2 Modèles animaux pour l'étude des morbillivirus 14
1.3 L'immunosuppression morbillivirale 15
1.3.1 Principales caractéristiques 15
1.3.2 Impact de l'infection sur les leucocytes 15
1.3.3 Rôle de la protéine V 17
1.4 Les cytokines en réponse aux infections virales et morbillivirales 17
1.4.1 Immunité innée 17
1.4.1.1 Interférons de type I 18
1.4.1.2 Interféron gamma 19
1.4.1.3 Cytokines proinflammatoires 19
1.4.2 Immunité adaptative 20
1.4.2.1 Immunité à médiation cellulaire 21
1.4.2.2 Immunité humorale 23
Chapitre 2 : Objectifs du projet 24
Chapitre 3 : Matériel et méthodes 26
3.1 Clonage et expression des gènes 26
3.1.1 Stimulation de PBMCs de furet et isolement de l'ARN 26
3.1.2 Clonage des gènes à partir de l'ARN des PBMCs stimulés 26

3.1.3 Insertion dans les vecteurs d'expression 27
3.1.4 Production des protéines 29
3.1.4.1 Protéines bactériennes : expression et purification 29
3.1.4.2 Protéines eucaryotes 30
3.2 Production d'anticorps polyclonaux contre les cytokines de furet 31
3.2.1 Immunisation des animaux 31
3.2.1.1 Immunisation de lapins 31
3.2.1.2 Immunisation de poulets 31
3.2.2 Évaluation de la réponse à l'immunisation 32
3.2.2.1 Immunoperoxydase monolayer assay (IPMA) 32
3.3 Histologie 33
3.3.1 Infection des animaux et prélèvement des organes 33
3.3.2 Coloration des tissus et analyse microscopique 34
3.4 ELISA indirect en sandwich 34
Chapitre 4 : Résultats 35
4.1 Production des anticorps 35
4.1.1 Production et purification des protéines chez *E. coli* 35
4.1.1.1 Caractérisation des protéines recombinantes produites 36
4.1.1.2 Purification et digestion des protéines recombinantes 37
4.1.1.3 Purification des protéines sous leur forme insoluble 39
4.1.2 Évaluation de la réponse d'Ac des animaux 41
4.2 Évaluation du profil de cytokines associé à une infection létale ou atténuée de CDV 44
4.2.1 Introduction de la souche létale et atténuée 44
4.2.1.1 Virus utilisés 44
4.2.1.2 Manifestations cliniques 44
4.2.2 Immunohistochimie 46
4.2.2.1 Tissus immunitaire (nodule lymphatique) 46
4.2.2.2 Tissus épithélial (poumons) 49
4.3 Développement de tests ELISAs indirects en sandwich 50
4.3.1 Quantification de protéines 293 51
4.3.2 Développement d'un test ELISA pour l'IFNβ 51

Chapitre 5 : Discussion 54
5.1 Solubilisation des protéines bactériennes 54
5.2 Profils de cytokines dans les tissus épithéliaux 55
5.2.1 L'importance des cellules épithéliales dans le contrôle de l'infection 55
5.2.2 Une forte réponse innée pourrait contribuer à la pathogénèse 56
5.3 Profil de cytokines dans les tissus immunitaires 56
5.4 Perspectives 57
Liste des références 59

Chapitre 1 : Revue de littérature

1.1 Les morbillivirus

1.1.1 Taxonomie

La famille des *Paramyxoviridae* est divisée en deux sous-familles selon des critères morphologiques, soit *Paramyxovirinae* et *Pneumovirinae*. Les virus de cette famille sont enveloppés et leur génome est constitué d'ARN monocaténaire non segmenté de polarité négative. La sous-famille des *Paramyxovirinae* comprend cinq genres, soit *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus*, *Avulavirus* et *Morbillivirus* et les espèces d'un même genre possèdent une réaction antigénique croisée similaire (Lamb and Kolakofsky, 2001).

Le genre Morbillivirus englobe le virus de la rougeole (MV), qui infecte les humains, et les virus de la maladie de Carré (CDV), de la peste-des-petits-ruminants et de la peste bovine, ainsi que des virus touchant des mammifères marins (Lamb and Kolakofsky, 2001; Pringle, 1999). L'ensemble des morbillivirus infecte donc un large spectre d'espèces. Le CDV est un virus très apparenté à celui de la rougeole (MV). Une multitude d'espèces carnivores peuvent contracter le CDV, dont certaines appartenant aux canidés (chiens, renards), aux procyonidés (ratons laveurs), aux mustélidés (furets, visons), aux félins (lions) et certains mammifères marins (Appel et al., 1994; Kennedy et al., 2000; Montali et al., 1987; Roelke-Parker et al., 1996). L'infection par le CDV est potentiellement mortelle chez le chien, tandis qu'elle est associée à un très haut taux de mortalité chez le furet (Williams et al., 1988).

1.1.2 Génome et réplication

Le génome des morbillivirus est composé de six gènes codant pour huit protéines (Figure 1a): la nucléoprotéine (N), un cofacteur de la polymérase (P), un antagoniste aux interférons (V), la protéine C (C), la matrice (M), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) (L) (Lamb and Kolakofsky, 2001). Les protéines V et C sont des protéines non structurales et non essentielles pour la réplication virale et proviennent du gène P; la protéine C est transcrite d'un cadre de lecture superposé

(Bellini et al., 1985) et la protéine V est produite par l'édition de l'ARNm du gène P (Cattaneo et al., 1989).

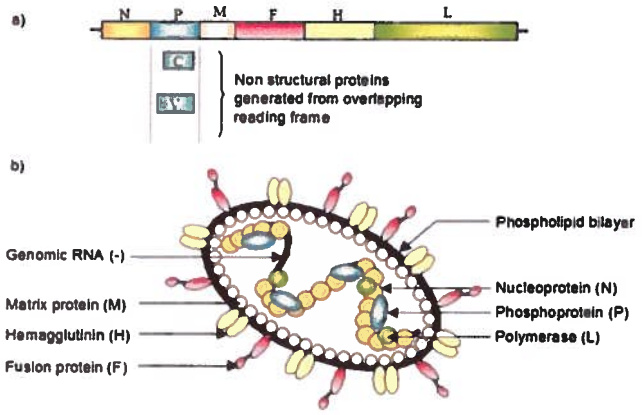


Figure 1 : Génome (a) et structure (b) des morbillivirus (Kerdiles et al., 2006)

L'attachement du morbillivirus à son récepteur via la protéine H fournit l'énergie d'activation nécessaire à la fusion des membranes, qui est réalisée par un complexe composé des protéines H et F. L'entrée de la ribonucléoprotéine (RNP) dans la cellule mène au début de la réplication virale, qui se déroule entièrement dans le cytoplasme. La RNP contient entre 20 à 30 copies de la protéine L (Lamb et al., 1976), qui possède une activité ARN polymérase ARN dépendante. Puisque le génome viral est de polarité négative, la RNP doit d'abord transcrire les gènes en ARNm, afin d'induire la production des protéines virales. Le complexe de polymérase se dissocie parfois au cours de la transcription du génome viral, ce qui conduit à une plus forte transcription des gènes situés en 3', soit des gènes N et P (Cattaneo et al., 1987). La réplication du génome se fait en deux étapes, soit d'abord la synthèse d'une copie d'ARN de polarité positive qui sert ensuite de matrice pour la synthèse de plusieurs copies de polarité négative. Les protéines F et H, glycosylées dans le réticulum endoplasmique, s'associent avec la protéine M présente à la membrane cytoplasmique. L'association de la RNP à la protéine M conduit finalement au bourgeonnement du virion, chez lequel les protéines F et H sont présentes à la membrane virale (Figure 1b) (Lamb and Kolakofsky, 2001).

1.1.3 La pathogénèse morbillivirale

Les morbillivirus sont très contagieux et se transmettent par aérosol. Les principaux symptômes de l'infection par le CDV sont similaires à ceux de la rougeole chez l'humain: éruptions cutanées, décharges nasales et oculaires, conjonctivite, perte de poids et signes gastro-intestinaux et respiratoires. De plus, il est possible que certaines complications surviennent par la suite, dont des infections bactériennes secondaires ou des désordres neurologiques (révisé dans Perry and Halsey, 2004). Les risques élevés d'infections opportunistes sont dus au fait que les morbillivirus causent une sévère immunosupression chez leur hôte (Griffin, 2001).

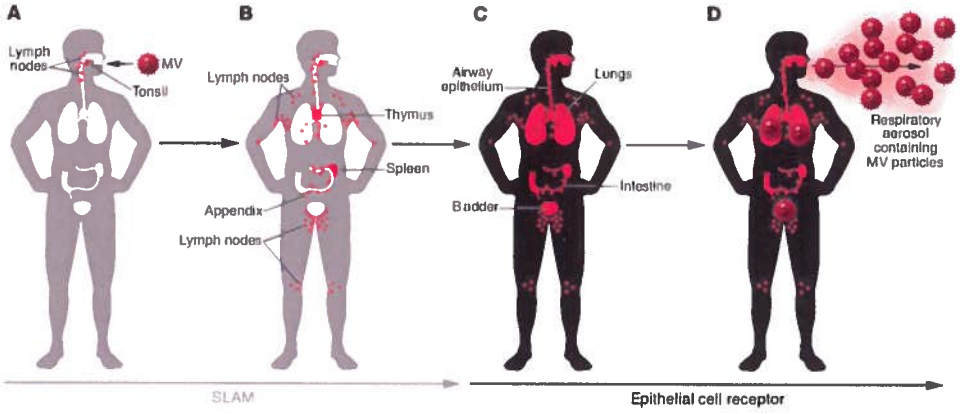


Figure 2 : Évolution de l'infection morbillivirale dans le temps. Le virus infecte d'abord les tissus lymphoïdes en utilisant le récepteur SLAM (A et B). Plus tard, l'infection se répand aux cellules épithéliales de tout l'organisme (C et D) (Takeda, 2008).

L'infection morbillivirale est caractérisée par deux phases de virémie (figure 2), chacune étant accompagnée d'une poussée de fièvre. La réplication initiale débute dans les tissus lymphoïdes du tractus respiratoire. Lors de la première phase, soit trois à six jours post infection, le virus se propage à tous les tissus lymphoïdes, dont les nodules lymphatiques, le thymus, la rate et les plaques de Peyer (Appel, 1970; Takeda, 2008; Wright et al., 1974). Lors de la seconde phase de virémie, quelques jours après la première, l'infection se répand aux cellules épithéliales de toutes les parties du corps, dont celles des poumons, de la vessie et de l'intestin. C'est à ce moment que se manifestent la majorité des symptômes de l'infection mentionnés précédemment (Blixenkrone-Moller, 1989; Okita et al., 1997; Takeda, 2008).

1.2 Modèles animaux pour l'étude des morbillivirus

La rougeole est classée parmi les 10 maladies mortelles les plus communes avec 40 millions de cas annuellement, parmi lesquels près de 600,000 ont une issue fatale (Griffin, 2001). Différents modèles animaux existent pour l'étude de la rougeole, dont les macaques et certaines lignées de souris transgéniques (Auwaerter et al., 1999; Oldstone et al., 1999). Seule l'utilisation de primates non humains permet l'étude de la réponse de l'hôte face au MV (Auwaerter et al., 1999), mais leur utilisation engendre des coûts importants.

L'infection du furet ou du chien par le CDV permet la reproduction des principales manifestations cliniques de la rougeole observées chez l'homme (Imagawa, 1968); la figure 3 illustre bien les éruptions cutanées typiques causées par une souche virulente du CDV chez le furet. Par contre, l'infection du furet par le CDV est souvent mortelle et beaucoup plus grave que celle causée par le MV chez l'homme ou le primate, ce qui en fait un excellent modèle pour étudier la pathogénèse morbillivirale. L'utilisation de souches atténuées entraînant une maladie moins sévère permet la reproduction d'une maladie proche de celle observée chez l'homme (Kauffman et al., 1982). Finalement, l'infection du furet par une souche sauvage de CDV entraîne aussi la reproduction des principales caractéristiques de l'immunosuppression morbillivirale (von Messling et al., 2003). Le furet consiste donc en un petit animal idéal pour l'étude de la virulence et de la pathogénèse morbillivirale.

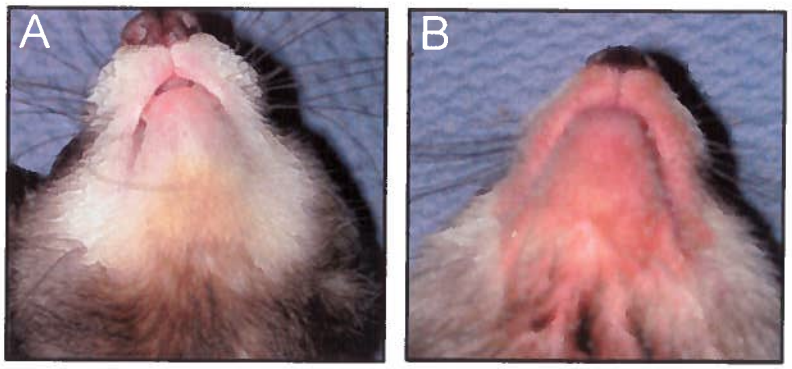


Figure 3: Éruptions cutanées après infection par le CDV. Des rougeurs importantes apparaissent chez un furet infecté par une souche virulente du CDV (**B**), non observées chez un furet en santé (**A**) (von Messling et al., 2003).

1.3 L'immunosuppression morbillivirale

1.3.1 Principales caractéristiques

L'infection par le CDV ou le MV peut provoquer une inhibition sévère et prolongée des fonctions immunitaires cellulaires et humorales normales. Ceci rend l'hôte susceptible au développement d'infections secondaires pouvant compliquer son rétablissement, tel que des pneumonies, des bronchites, des diarrhées, des encéphalites, des otites et des convulsions hyperthermiques (révisé dans Griffin, 2001; Perry and Halsey, 2004). L'immunosuppression morbillivirale a été observée pour la première fois par von Pirquet au début du 20e siècle. Il avait remarqué que la réponse d'hypersensibilité de type retardé (DTH) à la tuberculine de *Mycobacterium tuberculosis* était supprimée après un épisode récent de rougeole (von Pirquet, 1908). L'immunosuppression se manifeste principalement par une leucopénie et par l'inhibition de la prolifération lymphocytaire (Krakowka et al., 1975a; Okada et al., 2000).

1.3.2 Impact de l'infection sur les leucocytes

MV et CDV ont un tropisme élevé pour les cellules immunitaires. Le tropisme pour un type cellulaire corrèle avec l'expression chez celui-ci de « Signaling lymphocytes activation molecule » (SLAM), qui a été identifié comme étant le principal récepteur de MV et de CDV (Tatsuo et al., 2001). Aussi appelé CD150, SLAM est exprimé de façon constitutive à la surface de plusieurs types de cellules immunitaires, dont les thymocytes immatures, les

cellules T mémoires et certaines cellules B, et son expression est induite à la hausse lors de l'activation de d'autres types cellulaires, soit les lymphocytes T et B périphériques, les monocytes et les cellules dendritiques matures (Bleharski et al., 2001; Cocks et al., 1995; Kruse et al., 2001; Minagawa et al., 2001; Sidorenko and Clark, 1993). Le taux d'infection des PBMCs est faible lors d'une maladie généralement non mortelle, telle que la rougeole chez l'homme ou l'infection du furet par une souche atténuée de CDV (Esolen et al., 1993; Forthal et al., 1992; Schneider-Schaulies et al., 1991). Par contre, un épisode létal de CDV chez le furet corrèle avec un taux d'infection très élevé des PBMCs, soit autour de 40 ou 50% (von Messling et al., 2006). La mortalité associée à l'infection de nombreuses cellules immunitaires peut ainsi contribuer à l'induction d'une forte immunosuppression chez l'hôte. La leucopénie touche principalement les cellules B, les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes CD4 et CD8 (Okada et al., 2000). Finalement, le taux de cellules infectées associé à MV chez l'homme étant relativement faible, d'autres mécanismes contribuent à la lymphopénie, tel que l'apoptose de lymphocytes non infectés et la perturbation du microenvironnement thymique (Okada et al., 2000; Valentin et al., 1999). En effet, MV induit l'expression à la hausse de l'annexine V et de Fas (CD95) à la surface des cellules T CD4 et CD8 (Ryon et al., 2002).

Des anomalies au niveau des fonctions normales des lymphocytes sont également observées pendant et après l'infection morbillivirale, notamment au niveau de la lymphoprolifération. En effet, les PBMCs isolés de patients atteints de la rougeole ne prolifèrent pas en présence de mitogènes (Hirsch et al., 1984). Chez le furet, l'inhibition de la prolifération lymphocytaire associée à une infection létale du CDV s'est révélée plus importante que celle associée à une infection atténuée (von Messling et al., 2006). L'inhibition de la prolifération lymphocytaire affecte également les cellules non infectées; par exemple, l'incubation de cellules T avec le surnageant irradié de cellules infectées par MV conduit quand même à l'inhibition de leur prolifération (Sun et al., 1998). La rougeole chez l'homme entraîne l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G0/G1 d'une grande proportion des cellules T, soit un taux largement supérieur à celui des cellules infectées (Yanagi et al., 1992). De plus, le plasma d'enfants atteints de la rougeole contient des niveaux élevés d'IL-10, et ce durant plusieurs semaines (Moos et al. 2002). L'IL-10, cytokine immunosuppressive, entraîne

entre autres une inhibition de la production de plusieurs cytokines ainsi que de la prolifération lymphocytaire.

1.3.3 Rôle de la protéine V

La protéine V joue un rôle important dans la virulence de l'infection morbillivirale. En effet, un mutant du CDV qui est déficient pour la protéine V (Vko) entraîne chez le furet une infection dont la sévérité est atténuée comparé à celle associée à une souche sauvage. L'infection par Vko entraîne l'apparition de plusieurs symptômes typiques du CDV, quoique moins prononcés. Contrairement à ceux infectés par une souche sauvage, les furets infectés par la souche Vko ne succombent pas à la maladie. Finalement, les PBMCs des furets infectés par la souche sauvage ne développent pas de réponse de cytokines, tandis que l'infection par Vko entraîne chez les PBMCs une régulation à la hausse de l'ARNm des cytokines de l'immunité innée et adaptative (von Messling et al., 2006). Les protéines V de plusieurs paramyxovirus, dont MV et CDV, interfèrent avec la signalisation des IFNs de type I (révisé dans Fontana et al., 2008).

1.4 Les cytokines en réponse aux infections virales et morbillivirales

1.4.1 Immunité innée

L'immunité innée défend l'organisme contre les infections d'une manière rapide et non spécifique. Elle ralentit les infections virales durant l'activation et l'expansion de la réponse adaptative. Les cytokines de l'immunité innée sont majoritairement produites par les cellules de l'immunité innée, tel que les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques (DCs) et les cellules « natural killers » (NK), et certaines le sont aussi par des cellules non immunitaires (Biron et al., 2002). L'ensemble des cytokines forme un réseau très complexe, et certaines d'entre elles favorisent ou inhibent l'expression d'autres cytokines. L'immunité innée joue donc un rôle critique pour le développement d'une réponse adaptative appropriée. Une immunosuppression causant l'inhibition de cytokines de l'immunité innée peut donc nuire également au développement de la réponse adaptative. L'immunité innée comprend entre autres les interférons (IFNs) de type I et II et les cytokines proinflammatoires.

1.4.1.1 Interférons de type I

Les IFNs α et β procurent une défense immédiate contre les infections virales. Ils peuvent être produits par toutes les cellules nucléées. L'ARN double brin viral (ARNdb) est produit durant le cycle de réplication de la majorité des virus. Puisqu'il n'est jamais présent chez une cellule normale, l'ARNdb est reconnu par l'hôte comme étranger et est un inducteur majeur des interférons de type I et II (Katze et al., 2002). L'un des rôles principaux des IFNs consiste à interférer avec la réplication virale. Les IFNs sont d'une grande importance pour restreindre le tropisme d'une infection virale. En effet, il a été démontré que blocage des fonctions normales des IFNs lors de plusieurs infections virales entraîne l'infection d'un plus grand nombre de types de cellules (Garcia-Sastre et al., 1998; Leib et al., 1999; Sandberg et al., 1994).

La reconnaissance de composants viraux par les « Toll like receptors » (TLRs) entraîne l'induction de la synthèse des IFNs de type I. La liaison des IFNs à leurs récepteurs, présents à la surface de toutes les cellules nucléées, conduit alors à l'activation de la signalisation par les JAK/STAT chez ces dernières, ce qui mène à la transcription de nombreux gènes impliqués dans la défense antivirale (Malmgaard, 2004). On sait que MV peut interférer tant avec l'induction des IFNs qu'avec la signalisation par les JAK/STAT. En effet, il a été démontré que MV n'induit généralement que de très faibles niveaux d'IFNs de type I. De plus, une souche sauvage de MV entraîne une plus faible induction des IFNs α/β comparé à des souches vaccinales, i.e. atténuées (Naniche et al., 2000). Toutes les souches de MV entraînent néanmoins une certaine induction des IFNs de type I due à la présence de composants viraux, soit par exemple celle de transcrits leader viraux terminant par un 5'-triphosphate (Plumet et al., 2007). Il a aussi été démontré que les IFNs induits par MV peuvent interférer avec la réponse immunitaire dans certains sites, notamment par l'induction de l'apoptose de cellules épithéliales thymiques (Auwaerter et al., 1996), par la perturbation de la thymopoïèse (Vidalain et al., 2002) et par l'interférence avec la maturation et la différenciation appropriée des DCs (Hahm et al., 2005). De plus, MV inhibe la signalisation des IFNs par l'intermédiaire des protéines codées par le gène P, soit les protéines P, V et C (Caignard et al., 2007; Devaux et al., 2007; Nakatsu et al., 2008; Palosaari et al., 2003; Takeuchi et al., 2003). La protéine V du CDV joue un rôle important dans l'immunosuppression (von Messling et al., 2006). En

somme, l'infection par MV peut entraîner une induction des IFNs, mais leurs effets antiviraux sont majoritairement inhibés par l'interférence de MV avec la signalisation en aval de leurs récepteurs.

1.4.1.2 Interféron gamma

L'IFN-γ, ou IFN de type II, est sécrété rapidement en réponse à de nombreux virus. Il y a une certaine redondance entre les effets des IFNs de type I et II. Comme pour les IFNs de type I, de nombreux gènes peuvent être activés par l'IFN-γ, dont certains ont des fonctions antivirales. L'infection par MV de souris déficientes pour l'IFN-γ est associée à une plus haute morbidité et mortalité (Finke et al., 1995; Patterson et al., 2002). Au début d'une infection virale, cette cytokine est produite principalement par les cellules NK. Les cellules NK sont activées par les IFNs de type I et peuvent ensuite induire un état antiviral en relâchant de l'IFN-γ. MV, qui provoque une diminution du nombre de plusieurs cellules immunitaires, n'influence pas la quantité de cellules NK (Okada et al., 2001). De plus, l'infection des DCs par MV entraîne une augmentation de la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK (Ebihara et al., 2007). Finalement, l'IFN-γ stimule également l'activation des macrophages et des cellules NK, augmentant respectivement la présentation des CMH de classe II et l'activité cytotoxique. En présence de MV, l'IFN-γ favorise chez les macrophages la synthèse d'oxyde nitrique (NO) qui peut modifier un grand nombre de molécules importantes dans la réplication virale (Biron and Brossay, 2001; Hirano et al., 1999).

1.4.1.3 Cytokines proinflammatoires

Les cytokines proinflammatoires TNF-α, IL-1 et IL-6 sont habituellement produites rapidement par des cellules de l'immunité innée, notamment par les macrophages activés en réponse aux infections virales. Elles favorisent l'inflammation aux sites de l'infection, stimulent la maturation des DCs et peuvent induire la fièvre chez l'hôte (Biron et al., 2002). Une souche sauvage de MV, contrairement à une souche atténuée, stimule la production de certaines cytokines proinflammatoires par l'activation de TLR2 par l'intermédiaire de la protéine H (Bieback et al., 2002). Une dérégulation dans l'expression de certaines cytokines

proinflammatoires a été observée lors de l'infection avec MV, notamment au niveau de l'IL-1 et TNF-α (Leopardi et al., 1992). Des niveaux trop élevés de cytokines proinflammatoires peuvent également être impliqués dans la pathogénèse, notamment en provoquant d'importants dommages tissulaires (Gutierrez-Ramos and Bluethmann, 1997).

1.4.2 Immunité adaptative

Une présentation appropriée des antigènes viraux par les APCs est responsable du déclenchement de la réponse adaptative contre l'infection. Les principales APCs sont les DCs, les macrophages et les cellules B. L'élimination complète d'un virus nécessite l'activation des branches cellulaires et/ou humorales de la réponse adaptative, leur contribution respective variant selon le virus impliqué. L'activation rapide de ces deux branches suite à l'infection est essentielle pour l'élimination complète du CDV. La maturation des DCs est d'abord stimulée par l'internalisation des antigènes et par les cytokines proinflammatoires. Les DCs matures procèdent ensuite à l'activation des cellules T auxiliaires CD4+ (T_H) principalement dans les organes lymphoïdes périphériques, dont les nodules lymphatiques (Szomolanyi-Tsuda et al., 2002).

L'activation des cellules T_H par leur antigène spécifique stimule leur prolifération, grâce à la synthèse de protéines anti-apoptotiques et de certaines cytokines. En effet, les cellules T naïves activées produisent de l'IL-2 et régulent son récepteur à la hausse. L'IL-2 est bien connue pour promouvoir la lymphoprolifération. Le rôle majeur des cellules T_H consiste à stimuler et à réguler la réponse immunitaire, tant au niveau des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (CTL) que des cellules B. Les cellules T_H exercent principalement leur fonction par la sécrétion de cytokines, qui modulent ensuite l'action des autres cellules immunitaires. Selon les cytokines présentes dans leur environnement, les cellules T_H naïves acquièrent habituellement l'un des deux sous-types majeurs, soit T_H1 ou T_H2. Ceux-ci se distinguent principalement selon les cytokines produites et sécrétées. Les cellules T_H1 stimulent l'immunité à médiation cellulaire, et les cellules T_H2 stimulent la réponse humorale (révisé dans Rengarajan et al., 2000). Comme le montre la figure 4, les principales cytokines régulant ces deux types de réponse sont l'IFN-γ, l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-12.

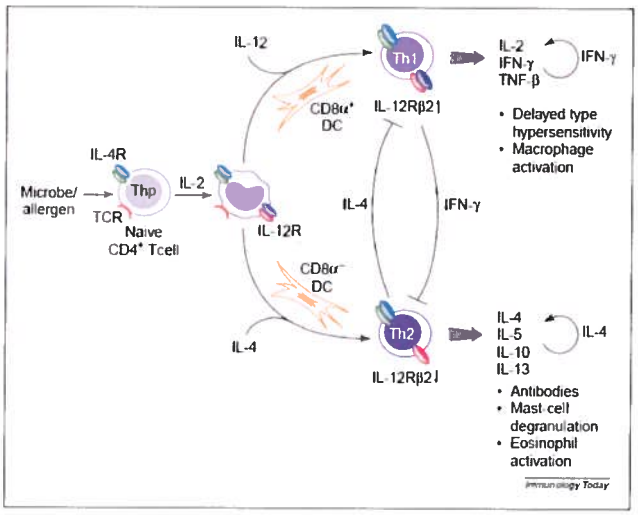


Figure 4 : Les cytokines déterminent le sous-type des cellules T_H naïves. La présence d'IL-12 est essentielle pour le déclenchement d'une réponse T_H1 et celle d'IL-4 pour le déclenchement d'une réponse T_H2. Les cellules T_H1 amplifient la réponse T_H1 par la sécrétion d'IFN-γ et les cellules T_H2 amplifient la réponse T_H2 par la sécrétion d'IL-4. De plus, ces deux cytokines inhibent respectivement les réponses T_H2 et T_H1 (Rengarajan et al., 2000).

Certaines cellules T sécrètent de l'IL-17 ainsi que d'autres cytokines inflammatoires. Cette population est considérée comme appartenant à la réponse T_H17. Plusieurs cytokines, dont l'IL-6, le TGF-β et l'IL-21, favorisent la réponse T_H17, alors que d'autres, dont l'IFN-γ, l'IL-4 et certaines autres cytokines de la réponse T_H2, l'inhibent (révisé dans Ivanov et al., 2007). L'on sait que la réponse T_H17 peut entraîner certaines maladies auto-immunes et inflammatoires. Or, celle-ci joue également un rôle dans la réponse immunitaire envers certains pathogènes, dont les bactéries et les champignons, notamment en favorisant la maturation des neutrophiles. Finalement, il a été suggéré que la réponse T_H17 pourrait permettre de prévenir l'apparition d'infections secondaires à certaines infections virales (révisé dans Louten et al., 2009).

1.4.2.1 Immunité à médiation cellulaire

L'APC présente d'abord l'antigène viral à la cellule T CD8 naïve. Cette dernière régule ensuite à la hausse ses récepteurs d'IL-2. Cette cytokine, produite majoritairement par les cellules T_H1, est essentielle pour l'activation des CTLs, puis pour leur prolifération. Pour cette raison, l'IL-2 est surtout considérée comme une cytokine de la réponse T_H1. Pour acquérir le

sous-type T_H1, les cellules T_H naïves nécessitent d'abord la présence d'IL-12, qui est produite principalement par les macrophages et les DCs. Par la suite, l'IFN-γ, qui est une autre cytokine essentielle pour la réponse cellulaire, exerce une rétroaction positive sur la réponse T_H1 en stimulant la production d'IL-12 (révisé dans Rengarajan et al., 2000). En plus des cellules NK, l'IFN-γ est produit par les cellules T_H1 et par les CTLs. Comme mentionné précédemment, la présence d'IFN-γ défavorise le sous-type T_H2 (Szabo et al., 2000). On sait que MV tente d'exercer un certain contrôle sur la réponse T_H1 en inhibant l'IL-12, notamment chez les monocytes et les DCs (Karp et al., 1996; Servet-Delprat et al., 2000). De plus, il a également été rapporté que la transduction du signal de SLAM, récepteur de MV, entraîne une diminution de la production d'IFN-γ par les cellules T CD4 et CD8 suite à leur stimulation (Wang et al., 2004).

Les CTLs sont très importantes pour l'élimination complète d'une infection virale. Elles reconnaissent et lysent les cellules infectées, dont les CMH de classe I présentent les antigènes viraux, par la relâche de granules cytotoxiques ou par l'induction de l'apoptose via le ligand Fas (Russell and Ley, 2002). Une fréquence élevée de CTLs spécifiques aux protéines virales F, H et N a été observée lors d'épisodes aigus de rougeole (Jaye et al., 1998). L'immunité à médiation cellulaire est d'une très grande importance pour la résolution de l'infection par le MV et il a été suggéré qu'elle pourrait être suffisante pour induire une immunité à long terme (Gans et al., 2001; Jaye et al., 1998; Samb et al., 1995; Ward et al., 1995). Le MV entraîne chez des macaques appauvris en CTLs une virémie plus élevée ainsi qu'une maladie et une mortalité plus importantes (Permar et al., 2003). Le MV est aussi souvent mortel chez les enfants ayant des déficiences de l'immunité cellulaire, causées par exemple par une leucémie (Burnet, 1968; Good and Zak, 1956). Il a été démontré qu'une forte réponse cellulaire envers le CDV ou MV est associée à son élimination, alors qu'une réponse affaiblie ou retardée est associée à la persistance du virus dans le système nerveux central (SNC) (Appel et al., 1982; Maehlen et al., 1989).

1.4.2.2 Immunité humorale

L'IL-4 est une cytokine essentielle pour l'induction de l'immunité humorale. Elle induit fortement le développement de la réponse T_H2. Elle induit également la prolifération et le développement de plusieurs types de cellules, soit des cellules T_H2, des cellules B et des monocytes (Tato and Cua, 2008). Aucune réponse T_H2 ne peut être observée chez des souris déficientes pour le gène d'IL-4. À partir d'une certaine quantité d'IL-4, le développement d'une réponse T_H2 est favorisé par rapport à celui d'une réponse T_H1, et ce même en présence d'IL-12 et d'IFN-γ, ce qui démontre la tendance de l'IL-4 à inhiber le sous-type T_H1 (Ouyang et al., 1998). L'IL4, via le facteur de transcription GATA-3, stimule la production par les cellules T_H2 de plusieurs cytokines impliquées dans l'immunité humorale, notamment de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13 (révisé dans Li-Weber and Krammer, 2003).

Les anticorps (Ac) peuvent contrôler les infections virales par plusieurs mécanismes, notamment par l'inhibition de l'attachement, de l'internalisation et de la fusion membranaire des virus, par l'aggrégation des particules virales et par l'activation du complément. De plus, la présence d'Ac contre un virus est un mécanisme majeur pour prévenir une réinfection subséquente (Szomolanyi-Tsuda et al., 2002). Lors de l'infection par MV, des Ac spécifiques sont habituellement détectés dès l'apparition des éruptions cutanées. Puis, les titres augmentent rapidement (Bech, 1959). Les Ac sont principalement produits contre la nucléocapside, puis ensuite contre l'hémagglutinine et la protéine de fusion (Norrby and Gollmar, 1972; Norrby et al., 1981). Une infection naturelle entraîne une protection à vie contre le MV, les Ac polyclonaux produits pouvant neutraliser n'importe quelle souche de MV (Bellini and Rota, 1998). La réponse humorale envers le CDV joue aussi un rôle capital dans la résolution de l'infection. La production de titres élevés d'Ac contre le CDV favorise le rétablissement complet. Or, une réponse humorale intermédiaire entraîne la persistance du virus et une réponse faible ou absente est associée avec une forte mortalité (Krakowka et al., 1975b). La détection d'Ac spécifiques plus tôt dans l'infection morbillivirale est donc associée avec l'élimination complète du virus.

Chapitre 2 : Objectifs du projet

Des études précédentes ont montré une inhibition totale de la réponse de cytokines chez les PBMCs de furets infectés par une souche létale de CDV. Par contre, une forte et rapide expression à la hausse était observée au niveau de l'ARNm de plusieurs cytokines lors d'infections atténuées, notamment pour les IFNs de type I et II (Svitek and von Messling, 2007). Malgré ces connaissances, la réponse des cytokines au niveau tissulaire demeure encore mal connue. Ceci devient encore plus intéressant si l'on tient compte du fait que l'apparition de la réponse immunitaire coïncide dans le temps avec la dissémination virale dans les tissus épithéliaux (von Messling et al., 2004). Le but de notre projet était donc l'évaluation des profils de cytokines dans les tissus épithéliaux et immunitaires de furets infectés par des souches létales ou atténuées de CDV. Nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition de la réponse des cytokines était moins forte dans les tissus épithéliaux qu'immunitaires. Pour tester cette hypothèse, nous avons poursuivi deux objectifs spécifiques :

1) La production d'Ac contre un panel de cytokines du furet.
2) La comparaison de l'expression des cytokines dans des tissus épithéliaux suite à l'infection avec une souche mortelle ou atténuée de CDV.

La production d'Ac a été effectuée contre des cytokines majeures des réponses immunitaires innée et adaptative, soit les IFNs de type I et II, TNF-α et les interleukines 2, 4 et 6. Les gènes des cytokines ont d'abord dû être insérés dans un vecteur d'expression procaryotique et exprimés chez *E. coli*. Une fois purifiées, les protéines bactériennes ont été utilisées pour l'immunisation de lapins. Des poulets ont également été immunisés par des peptides synthétiques choisis pour leur potentiel immunogénique estimé selon l'indice de Jameson-Wolf.

Des outils étant alors disponibles pour l'évaluation de la réponse immunitaire du furet, le deuxième objectif consistait observer par immunohistochimie des profils de cytokines dans les tissus immunitaires et épithéliaux de furets infectés par la souche sauvage 5804P ou la souche atténuée 5804P-Vko-V(H:L). Le poumon et le nodule lymphatique (ganglion mésentérique) ont été choisis pour représenter respectivement les tissus épithéliaux et

immunitaires. Les tissus ont été prélevés aux jours 7 et 14; ces derniers correspondent respectivement à l'apparition de manifestations cliniques sévères et à la mortalité chez le furet infecté par la souche sauvage 5804P.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1 Clonage et expression des gènes

3.1.1 Stimulation de PBMCs de furet et isolement de l'ARN

Les PBMCs de furets en santé sont tout d'abord isolés par gradient de ficoll. Un volume de trois ou quatre millilitres (ml) de sang est dilué le même volume de PBS. Le mélange est ensuite déposé délicatement sur 4,5 ml de Ficoll (GE Healthcare), puis le tout est centrifugé à 400 g à température pièce pour une durée de 40 min. Les lymphocytes, qui se retrouvent dans la mince fraction blanche, sont prélevés et lavés trois fois dans du PBS. Le culot est resuspendu dans du RPMI contenant 10% de sérum FBS et 1% de pénicilline/streptomicine (RPMI complet), ajusté à une concentration de $5x10^6$ cellules par ml. Un ml de cellules par puits est déposé dans des plaques à 12 puits (Corning), et 10 µg/ml de phytohémagglutinine (PHA, Sigma) sont ajoutés. Les cellules sont ensuite incubées pour une durée de deux jours à 37°C, avant d'être resuspendues dans du RNAlater (Qiagen), à raison de $1,5x10^6$ de cellules par ml. Les aliquots obtenus sont conservés à -80°C.

Pour l'isolement de l'ARN, le RNAlater est d'abord enlevé entièrement. L'ajout de 350 µl de tampon RLT (Qiagen), qui contient 10 µl/ml de β–mercaptoéthanol, permet ensuite la lyse des cellules. Le lysat obtenu est transféré dans une colonne QIAshredder (Qiagen), puis centrifugé à vitesse maximale pour deux minutes. Le surnageant recueilli est mélangé avec 350 µl d'éthanol 70% et purifié à l'aide d'une mini colonne RNAeasy (Qiagen). L'ARN est élué dans 30 µl d'eau sans ARNase.

3.1.2 Clonage des gènes à partir de l'ARN des PBMCs stimulés

Pour le clonage des gènes de cytokines de furet, l'ARN de PBMCs stimulés est amplifié par l'usage d'une transcriptase inverse et d'un mélange d'oligo dT et d'hexamères aléatoires (Superscript III, Invitrogen). Le gène d'intérêt est par la suite amplifié à partir de l'ADNc par PCR à l'aide des amorces appropriées (tableau I). Les amorces utilisées pour le clonage des cytokines consistent en des régions conservées entre les gènes correspondants du chien et du chat, parce que ces deux animaux et le furet sont proches au niveau évolutif. Le

PCR s'effectue selon le programme suivant : désappariement de 2 minutes à 94°C, suivi de 10 cycles de 10 sec à 94°C, 25 secondes à 50°C et 1 minute à 72°C, puis 20 cycles de 10 secondes à 94°C, 25 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C. La taille de l'ADN obtenu est vérifiée par migration sur gel d'agarose.

Tableau I : Amorces sens et anti-sens utilisées lors des clonages.

	pCG Sens	pET32a Sens	Antisens
IFN-α	5'-TTTTGGATCCACCATGGC CCTGCCCTGCTCCTTCTTG-3'	5'-TTTTGGATCCCTCGGCT CTCTGGGATGTGACCTG-3'	5'- TTTTGTCGACTCACTT CCTGCTCCGCAATCTC-3'
IFN-β	5'-TTTTGGATCCACCATGAC CAGCAGGTGTATCCTCC-3'	5'-TTTTGGATCCATGAACT ATAACTTACTTCGATTC-3'	5'-TTTTGTCGACTCAGTTAG GGAGAGAATCTGTAAG-3'
IFN-γ	5'-TTTTGGATCCACCATGAAT TATACAAACTATATCTTAG-3'	5'-TTTTGGATCCATGTTTTT TAAAGAAATAGAAGAC-3'	5'-TTTTGTCGACTTATTTC GATGCTCTGCGGCCTC-3'
TNF-α	5'-TTTTGGATCCACCATGAGC ACTGAAAGCATGATCCGG-3'	5'-TTTTGGATCCCTGTTCTG CCTGCTGCACTTTGGAG-3'	5'-TTTTGTCGACTCACAGGG CAATGATCCCAAAGTAG-3'
IL-2	5'-TTTTGGATCCACCATGTA CAAAATGCAACTCTTGTC-3'	5'-TTTTGGATCCGCACCTA CTACTTCAAGCTCTACG-3'	5'TTTTGTCGACTCAAGTC AGTGTTGAGAAGATGC-3'
IL-4	5'-TTTTGGATCCACCATGGGT CTCACCTCCCAACTGATTC-3'	5'-TTTTGGATCCCATAACT TCAGTATTGCCATTAAG-3'	5'-TTTTGTCGACTCAGTGC CTGTAGTATTTCTGTTG-3'
IL-6	5'-TTTTGGATCCACCATGAAC TCCCTCTCCACAAGCGCC-3'	5'-TTTTGGATCCTTCCCTAC CCCGGGACCCCTGGGAG-3'	5'-TTTTGTCGACCTACATG ATCCGAATGGCCCTCAG-3'

3.1.3 Insertion dans les vecteurs d'expression

Le produit de PCR obtenu est digéré par les enzymes de restrictions BamHI et SalI (NEB) pendant une heure à 37°C. Après migration du produit de la digestion sur gel d'agarose, la bande est coupée et l'ADN contenu dans le morceau recueilli est isolé sur colonne d'extraction de gel (Qiagen). Le vecteur d'expression eucaryotique pCG est également digéré par les mêmes enzymes de restriction et purifié de manière similaire. Le vecteur pCG est par la suite déphosphorylé par l'enzyme « shrimp alcaline phosphatase » (NEB) durant 1 h à 37°C. Une incubation subséquente de 15 minutes à 65°C permet l'inactivation de la phosphatase. Pour l'insertion du fragment digéré dans le vecteur pCG, 7 µl d'insert sont incubés à température pièce pour 30 min avec 1 µl de vecteur, en présence de T4 DNA ligase (Invitrogen).

Des bactéries compétentes sont ensuite transformées par choc thermique avec le produit de ligation. Un volume de 5 µl de la ligation est ajouté à 20 µl de bactéries et le tout

est conservé pour 20 minutes sur glace. Le choc thermique consiste à l'exposition des bactéries pour 30 secondes à une température de 42°C. Le choc est suivi par deux minutes d'attente sur glace, puis par l'ajout de 250 µl de milieu NZY+ (Fisher). Une incubation d'une heure à 37°C sous agitation précède l'inoculation sur pétri d'environ 50 µl de culture. Le pétri est composé de Luria-Bertani (LB) Agar (Novagen) et contient de l'ampicilline, le vecteur pCG possédant un gène de résistance pour cet antibiotique. Les pétris sont incubés pour environ 16 h à 37°C. Plusieurs des colonies obtenues sont mises en culture jusqu'à saturation à 37°C dans un volume de 5 ml de LB avec ampicilline. Ensuite, le surnageant est enlevé, les bactéries sont lysées et leur ADN est isolé à l'aide d'une trousse de miniprep (Qiagen). Pour finir, l'ADN des différents clones est envoyé à Génome Québec pour séquençage. Pour chaque cytokine, les séquences obtenues sont comparées avec la séquence consensus et un clone dont la séquence concorde est sélectionné. Son ADN est amplifié dans 100 ml de LB avec ampicilline en vue de purification par midiprep (Qiagen). C'est ce clone qui sera utilisé pour les étapes suivantes du projet.

Les gènes des cytokines sont également insérés dans un vecteur d'expression procaryote, soit pET32a (Novagen), qui permettra la production de protéines recombinantes chez les bactéries. Or, les gènes utilisés pour l'expression chez les procaryotes doivent être sous leur forme mature, c'est-à-dire sans séquence de peptide signal. Un deuxième clonage est donc nécessaire, cette fois en utilisant des amorces sens reconnaissant le site de clivage du peptide signal. Deux programmes ont été utilisés pour prédire ce site, soit SignalIP 3,0 (Université du Danemark) et SIG-Pred (University of Leeds). Le clonage est effectué par RT-PCR à partir des gènes insérés dans pCG en utilisant l'amorce sens pET32a (voir Tableau X). L'enzyme Dpn I (NEB), qui ne digère que l'ADN bactérien, est utilisée après le PCR afin de se débarrasser du vecteur pCG qui était utilisé en tant que matrice. L'ADN des différents clones obtenus est encore validé par séquençage.

3.1.4 Production des protéines

3.1.4.1 Protéines bactériennes : expression et purification

Les bactéries d'expression BL21(DE3) et Origami2(DE3) (Novagen) sont utilisées pour la production des protéines nécessaires à l'immunisation des animaux. Les bactéries produisent généralement un haut niveau de protéines recombinantes, mais celles-ci se retrouvent souvent presque exclusivement dans les corps d'inclusion, soit sous une forme insoluble (Fahnert et al., 2004). Puisque les protéines bactériennes seront utilisées uniquement pour l'immunisation, elles peuvent être produites et purifiées même si elles sont insolubles. Des bactéries BL21(DE3) sont donc transformées par le plasmide pET32a dans lequel ont été insérés les gènes des cytokines. Les protéines exprimées dans ce vecteur sont couplées à la thiorédoxine, ce qui permet de favoriser leur solubilité et leur repliement (Novagen, 2006). Les protéines seront purifiées sur gel d'acrylamide et utilisées pour l'immunisation.

L'expression de protéines commence tout d'abord par une préculture composée de milieu LB avec ampicilline sous agitation à 37°C. Lorsque le milieu est saturé, la préculture est transférée dans environ 20 fois son volume de LB frais avec ampicilline. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint une valeur d'environ 0,8, 1 mM d'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fisher) est ajouté au milieu de culture, puis l'incubation se poursuit pour une durée de trois heures. Une fois le milieu de culture enlevé par centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans du tampon LEW (Protino), dans un volume 50 fois inférieur au volume de culture. Elles sont ensuite lysées en présence de 1 mg/ml de lysozyme (NEB) à 4°C pour 30 minutes sous agitation douce. Afin de compléter la lyse et de réduire la viscosité, six sonications de 10 secondes à 4°C sont nécessaires, chacune étant espacée d'environ 10 secondes. Suite à 15 min de centrifugation à 10,000 g et 4°C, les protéines insolubles sont vortexées et homogénéisées à l'aide d'une seringue dans 300 µl de LEW et 300 µl de tampon d'électrophorèse contenant du dithiothréitol (DTT) par 50 ml de culture.

Les protéines sont ensuite dénaturées à 65°C durant 10 minutes. Un gel d'acrylamide 12% est coulé pour chaque 50 ml de culture. Le gel (5 ml) est préparé par le mélange de 2,2 ml d'eau distillée, de 1,5 ml d'acrylamide 30% (Biorad), de 1,3 ml de Tris 1,5 M à pH 8,8

(Biorad), de 50 µl de SDS 10% (Biorad), de 50 µl d'ammonium persulfate 10% et de 2 µl de TEMED (Fisher). Le gel de regroupement est ensuite coulé. Ce dernier est composé, par millilitre, du mélange de 590 µl d'eau distillée, de 130 µl d'acrylamide 40%, de 260 µl de Tris 0,5 M à pH 6,0 (Biorad), de 10 µl de SDS 10%, de 10 µl d'APS 10% et de 1 µl de TEMED. Le mélange des protéines et de tampon d'électrophorèse est chargé entièrement sur le gel, avec à une extrémité 5 µl d'un standard dont les poids moléculaires sont connus (Fermentas). Les protéines sont séparées par électrophorèse, puis le gel est rincé dans de l'eau distillée et dans une solution froide de KCl 0,3 M. Les protéines deviennent alors de couleur blanche et une portion du gel est prélevée avec un scalpel au bon poids moléculaire. Afin d'extraire les protéines, le morceau est broyé avec le scalpel et les protéines sont solubilisées durant la nuit, sous agitation, dans 1 ml de 0,1% SDS. La teneur en protéines de la solution est vérifiée le lendemain par électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie (Biorad) d'un gel d'acrylamide 12%. La concentration en protéines est mesurée par MicroBCA (Biofx), en utilisant différentes solution d'albumine bovine (Pierce) comme étalons. Toutes les protéines sont conservées à -20°C.

Les fractions bactériennes peuvent également être analysées par immunobuvardage de type Western. Les protéines sont d'abord séparées sur gel d'acrylamide comme à la section 3.1.4.1 et transférées sur membrane PVDF (Millipore) à 12 V pour 30 min. Après le transfert, la membrane est bloquée avec un tampon de blocage (Roche) durant un minimum de 1 h. L'Ac primaire est d'abord ajouté à une dilution appropriée dans une solution de TBS avec 0,1% de tween 20 (Fisher) (TBS-tween) sous agitation douce pour 1 h. La membrane est ensuite lavée trois fois 10 min dans du TBS-tween, puis l'Ac secondaire est ajouté pour 1 h dans du TBS-tween. Après une autre série de lavages, la membrane est finalement incubée 5 min avec du ECL western blotting detection kit (GE healthcare) avant la visualisation des bandes par système d'imagerie (Kodak).

3.1.4.2 Protéines eucaryotes

La transfection de cellules eucaryotes permet la production de protéines identiques à celles retrouvées chez le furet, soit au niveau de leur repliement et structure. La veille de la transfection, 10^6 cellules 293 sont déposées dans des puits contenant 2 ml de DMEM 5% FBS.

Juste avant la transfection, le milieu est remplacé par du DMEM 1% FBS. Pour chaque puits, 8 µl de lipofectamine et 4 µg d'ADN sont dilués séparément dans 250 µl de milieu Opti-MEM (Gibco). Les deux volumes sont mélangés 5 min plus tard. Suite à une attente de 20 min, les cellules sont incubées à 37°C avec le mélange ADN-lipofectamine. Le milieu sans sérum est remplacé après environ 5 h. Les cellules 293 sont récoltées dans le milieu 2 jours plus tard. Après gel et dégel, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et le surnageant obtenu est conservé à -20°C.

3.2 Production d'Ac polyclonaux contre les cytokines de furet

3.2.1 Immunisation des animaux

3.2.1.1 Immunisation de lapins

Deux lapins par cytokine sont immunisés avec les protéines bactériennes. L'immunisation est effectuée par la compagnie Cocalico Biologicals selon leur protocole standard pour les lapins. Un mélange de 100 µg de protéines et d'adjuvant incomplet de Freund est administré aux animaux de manière intramusculaire. L'immunisation initiale est suivie de rappels après deux, trois, et sept semaines. Afin d'évaluer la réponse des animaux à l'immunisation, du sérum est prélevé avant la première administration, puis cinq et huit semaines après celle-ci. Des rappels supplémentaires sont nécessaires si la réponse des animaux est jugée insuffisante.

3.2.1.2 Immunisation de poulets

Deux poulets par cytokine sont immunisés avec des peptides synthétiques couplés au KLH (Tableau II). Ces peptides ont été choisis pour leur immunogénicité estimée selon l'indice de Jameson-Wolf (Jameson and Wolf, 1988). L'immunisation est aussi effectuée par la compagnie Cocalico Biologicals selon leur protocole standard pour les poulets. L'immunisation initiale, effectuée de manière intramusculaire, est suivie de rappels après trois, six, neuf et onze semaines. Comme pour les lapins, du sérum est prélevé avant la première administration, puis après cinq, huit, neuf et douze semaines après celle-ci afin d'évaluer la

réponse à l'immunisation. Des rappels supplémentaires sont nécessaires si la réponse des animaux est jugée insuffisante.

Tableau II : Peptides utilisés pour l'immunisation des poulets.

IFN-α	CDNYTNHFGFPQEAFDSKQ
IFN-β	CLKDRMNFKIPEEIQKSQK
IFN-γ	CNLRKRKRSHSLFRGRRASK
TNF-α	CQRETPEGTEAKPWYE/ CVKSSSRTPSDKPV
IL-2	CNGVKNYESPRMLTFKFYM
IL-4	CSNRLLRGLHRNLRNM
IL-6	CGDSKDDATSNRPPLTSAD

3.2.2 Évaluation de la réponse à l'immunisation

3.2.2.1 Immunoperoxydase monolayer assay (IPMA)

L'IPMA sert à détecter les Ac présents dans les sérums. Cette technique consiste à incuber différentes dilutions des sérums avec des cellules transfectées par les gènes d'intérêt. Des cellules Vero sont transfectées à 90 % de confluence de manière semblable aux 293. Cette fois, le milieu de transfection ne contient pas de FBS et n'est pas enlevé après 5 heures. Le lendemain de la transfection, les cellules sont trypsinisées et resuspendues dans du DMEM 5% avec antibiotiques, avant d'être transférées dans des plaques de 96 puits à raison de $2x10^4$ cellules par puits. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les puits sont lavés par du PBS, puis par du PBS dilué 1:3. Les cellules sont ensuite fixées pendant 4 heures à 65°C.

Les sérums des lapins et poulets sont évalués par IPMA à différentes dilutions, variant entre 1:100 et 1:6400. Les cellules fixées sont incubées pendant 2 heures avec 100 µl de sérum dilué, puis avec 50 µl d'Ac IgG de chèvre anti-lapin peroxidase (Sigma) pendant 90 min. Trois lavages au PBS tween 0,05% sont nécessaires après chaque étape d'incubation d'Ac. La plaque est ensuite lavée par du PBS avant d'être révélée par l'ajout de 50 µl d'un substrat jusqu'à l'apparition de cellules colorées. Le substrat, pour une plaque, est préparé par l'ajout à

5 ml de tampon AEC de 250 µl de 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC) et de 2,5 µl de H_2O_2 30% (Fisher). Les animaux chez qui le signal obtenu est non spécifique ou jugé insuffisant se font administrer des rappels supplémentaires.

3.3 Histologie

3.3.1 Infection des animaux et prélèvement des organes

Un mélange de 0,4 ml de kétamine (Bioniche Animal Health) et de 0,4 ml de midazolam (Sandoz) est d'abord utilisé pour l'anesthésie des furets avant qu'une dose de 10^5 $TCID_{50}$ du virus d'intérêt soit administrée par voie intranasale. Le développement de signes cliniques est observé quotidiennement et du sang est prélevé à différents jours post infection. Après avoir été traité à l'EDTA, le sang des furets infectés est mélangé avec un tampon ACK (150 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0.01 mM EDTA, pH 7.2 à 7.4) qui permet la lyse des érythrocytes. Après leur compte, les PBMCs sont cultivés en présence de cellules VerodogSLAMtag à des dilutions de facteur 10 et en quadriplicata. La formation de syncytiums, évaluée après trois jours, permet ensuite de déterminer la virémie cellule-associée. Sept ou 14 jours post infection, les furets sont anesthésiés comme précédemment, puis euthanasiés par l'administration d'Euthanyl (Bimeda-MTC) de manière intra péritonéale. Le furet est perfusé par une solution de NaCl 0,9 % (Baxter), puis par 50 ml de PBS.

Les organes d'intérêts sont ensuite prélevés et divisés en deux morceaux égaux. La moitié des organes est ensuite refroidie durant 1 heure à -20°C, avant d'être conservée à -80°C en vue de PCR en temps réel. L'autre moitié est fixée pendant quelques jours dans du PBS contenant 3,2% de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Science). Les morceaux d'organes pour l'histologie sont déshydratés dans plusieurs bains d'alcool pour ensuite être emparaffinés. Des coupes tissulaires de 5 µm sont effectuées à l'aide d'un microtome et fixées sur des lames de microscope à 65°C.

3.3.2 Coloration des tissus et analyse microscopique

Avant la coloration, les coupes sont déparaffinées dans du xylène, réhydratées dans plusieurs bains d'éthanol (successivement 100, 95, 70 et 50%), trempées 15 min dans une solution de 0,3% H_2O_2 et bloquées dans du sérum de chèvre (Vector) dilué 1/100 dans du PBS. Les tissus sont incubés durant 1 h avec l'Ac primaire dilué dans la solution de blocage, puis avec l'Ac anti-lapin biotinylé de chèvre (Vector) dilué 1/100 dans du PBS. Le signal est amplifié par l'usage du kit Vectastain ABC (Vector), qui contient un enzyme couplé à de l'avidine, puis les tissus sont colorés avec du di-aminobenzène (Sigma). Trois lavages de 5 min au PBS sont nécessaires après l'exposition aux Ac, à la solution d'ABC et au DAB. Les coupes sont ensuite colorées par de l'hématoxyline (EMD chemicals) pour 5 min et par de l'eau ammoniée brièvement. Finalement, elles sont déshydratées dans différents bains d'éthanol (50, 70, 95 et 100%), trempées dans du xylène, puis la lamelle est montée en présence de permount (Fisher). L'observation et la prise de photos sont effectuées à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse 80i et du logiciel Nikon ACT-1.

3.4 ELISA indirect en sandwich

Toutes les étapes suivantes sont effectuées sous agitation douce et à température pièce, en utilisant un volume de 100 µl. L'Ac de capture est tout d'abord dilué dans une solution de 0,05 M de carbonate-bicarbonate à un pH de 9,6, pour ensuite être déposé dans chaque puits d'une plaque de 96 puits pour une durée de 1,5 h. Suite à trois lavages de la plaque avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20 (PBS-tween), cette dernière est bloquée pendant 1 h dans une solution de bicarbonate ayant une teneur de 1% en BSA. Les échantillons, à une dilution appropriée, sont ensuite déposés dans les puits en triplicata pour une durée de 2 h. Après lavages de la plaque, l'Ac de détection est ajouté pour une durée de 1 h à une dilution appropriée. D'autres lavages sont encore nécessaires avant et après l'ajout de l'Ac conjugué à la peroxydase. Le signal est révélé par l'incubation de la plaque avec du TMB HRP microwell substrate (biofx) durant 10 à 15 min, puis la réaction est bloquée avec une solution de 0,6 M de H_2SO_4 et 1 M de HCl (Fisher). La lecture de la plaque est finalement effectuée à une longueur d'onde de 450 nm.

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Production des anticorps

Afin de permettre la détection des cytokines de furet, nous avons poursuivi une approche parallèle en immunisant soit des poulets avec des peptides synthétiques, soit des lapins avec des protéines recombinantes produites chez les bactéries. L'utilisation du poulet permet de diminuer les réactions croisées dans le contexte des applications nécessitant deux Ac, tel que les ELISAs. Le poulet est connu pour minimiser les réactions croisées avec les protéines de mammifères, puisqu'il est éloigné phylogénétiquement de ces derniers (Tini et al., 2002). Comme les lapins ont été immunisés par les protéines bactériennes dont il reste toujours une certaine quantité de protéines résiduelles suite à la purification, l'utilisation de peptides synthétiques chez les poulets permet de minimiser le signal non spécifique.

4.1.1 Production et purification des protéines chez *E. coli*

Le vecteur d'expression bactérienne pET32a a été choisi pour la production de protéines recombinantes (Fig. 5). Ce vecteur crée une protéine de fusion de la protéine d'intérêt et de la thiorédoxine, ce qui favorise la solubilité des protéines recombinantes et augmente leur résistance envers les protéases. Le vecteur mène également à l'ajout d'une séquence His-tag qui est composée de 6 histidines consécutives. Cette séquence permet la purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité, ainsi que leur détection par immunobuvardage de type Western en utilisant un Ac commercial. Finalement, les protéines recombinantes possèdent en amont de la protéine d'intérêt une séquence composée de 4 aspartates et d'une lysine qui représente le site de clivage par l'entérokinase, permettant de séparer la protéine produite de la thiorédoxine et de l'étiquette His-tag.

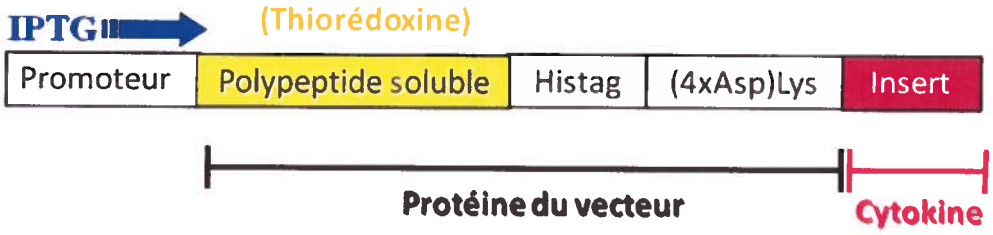


Figure 5 : Schéma des protéines recombinantes lors de l'expression dans le vecteur pET32. L'ajout d'IPTG au milieu de culture entraîne la production de protéines recombinantes qui contiennent en amont de la protéine d'intérêt la thiorédoxine, la séquence His-tag et le site de clivage par l'entérokinase.

4.1.1.1 Caractérisation des protéines recombinantes produites

L'un des problèmes principaux souvent rencontré lors de la production de protéines chez *E. coli* est que celles-ci ont tendance à se retrouver dans les corps d'inclusion (Fahnert et al., 2004). Nous avons tout d'abord testé l'expression chez la lignée de bactéries compétentes BL21(DE3). Le niveau d'expression était très élevé, mais les protéines recombinantes se retrouvaient exclusivement dans les fractions insolubles (Fig. 6A). Nous avons donc évalué différentes conditions d'expression afin de favoriser la production des protéines de manière soluble, notamment l'utilisation de différentes lignées de bactéries compétentes ou la culture à 25°C ou 30°C plutôt qu'à 37°C. Seule l'utilisation de la lignée Origami2 (Novagen, 2006) a permis l'expression de 3 cytokines sous leur forme soluble, soit de TNF-α, IFN-γ et IL-2 (Fig. 6B).

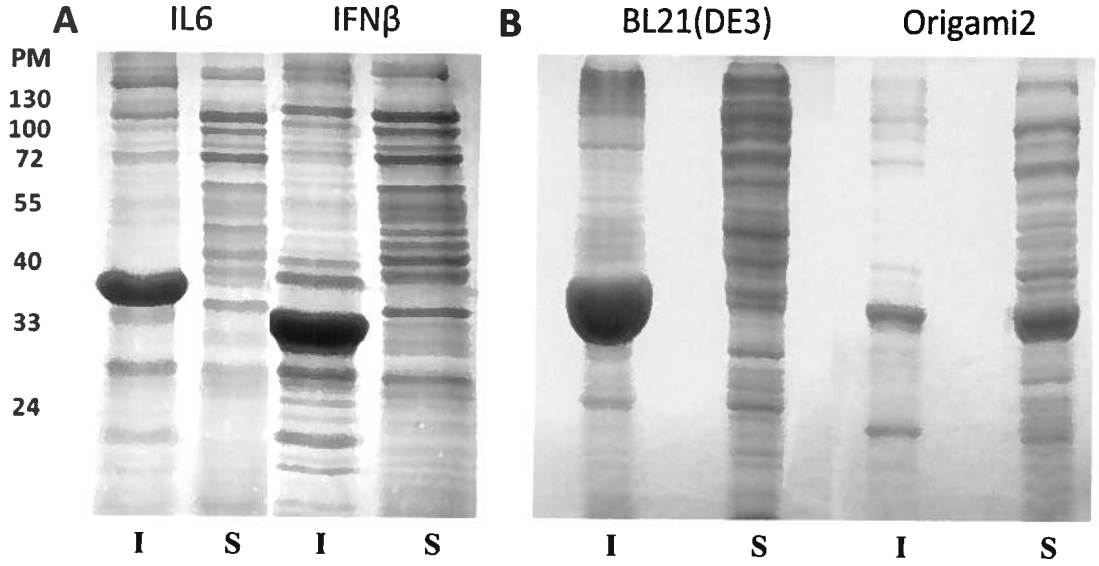


Figure 6 : Expression des protéines recombinantes chez *E. coli.* Distribution dans les fractions insolubles (I) et solubles (S) d'IL-6 et d'IFN-β chez la lignée BL21(DE3) (A) et de TNF-α chez la lignée BL21(DE3) ou Origami2(DE3) (B).

4.1.1.2 Purification et digestion des protéines recombinantes

Les protéines exprimées de manière soluble ont été purifiées par chromatographie d'affinité. La purification d'IL-2 a d'abord été effectuée, puisque c'était la première cytokine que nous avons exprimée de manière soluble. Après les étapes de liaison et de lavages, l'ajout d'imidazole a permis l'élution d'une quantité appréciable d'IL-2 sous une forme pure (Fig. 7).

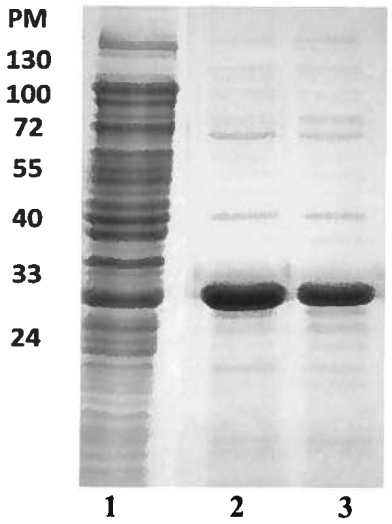


Figure 7 : Purification de protéines recombinantes sur colonne Ni-TED. Coloration au bleu de coomassie du lysat bactérien non purifié (1) et des deux premières fractions récoltées après l'ajout d'imidazole à la colonne Ni-TED (2,3).

L'étape suivante consistait à la digestion par l'entérokinase des protéines recombinantes. Après avoir testé différentes concentrations d'enzyme, nous avons choisi d'utiliser celle recommandée par le fabriquant, soit de 0,0006% (poids/poids). La digestion a entraînée l'apparition de deux bandes supplémentaires d'un poids moléculaire d'environ 17 kilodaltons (kDa) (Fig. 8A) et qui correspondent à IL-2 (15,9 kDa) et à la thiorédoxine (13 kDa). Un immunobuvardage de type Western en utilisant un Ac anti-His-tag a confirmé que la bande inférieure représente portion thiorédoxine avec l'étiquette. La bande supérieure, qui n'était plus détectable avec l'Ac, a donc été identifiée comme étant l'IL-2. Afin de faciliter la séparation des protéines recombinantes non clivées et de la thiorédoxine de l'IL-2, nous avons ensuite procédé à la digestion enzymatique directement sur la colonne de chromatographie. Après les étapes de liaison et de lavages, l'enzyme était ajoutée à la colonne pour une durée d'environ 16 h. Des lavages subséquents ont permis d'éluer l'IL-2 clivée sous une forme relativement pure, avec un rendement d'environ 2 mg de protéines par 300 ml de culture bactérienne (Fig. 8B).

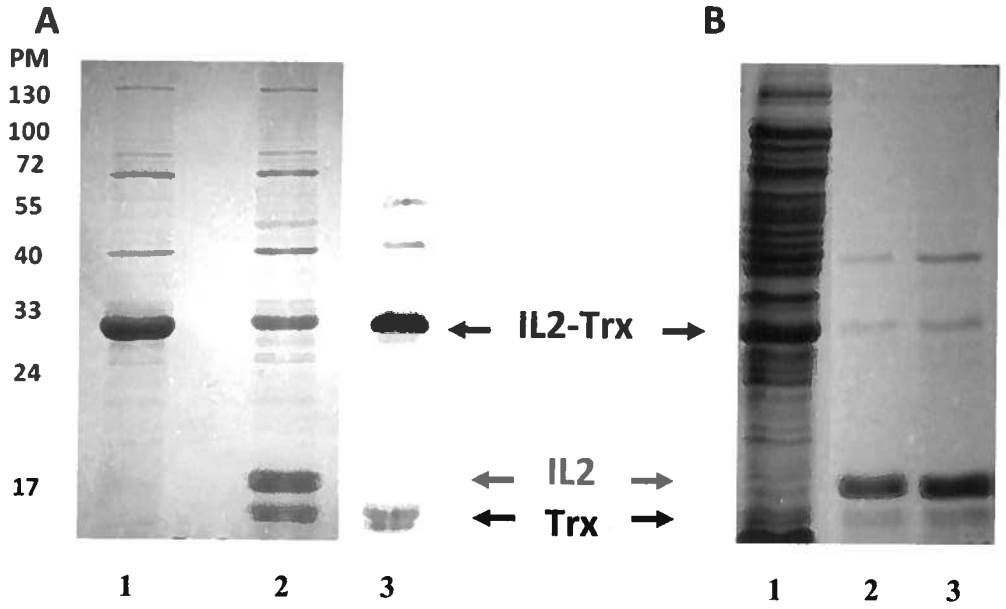


Figure 8 : Digestion des protéines recombinantes par l'entérokinase. (A) Coloration par bleu de Coomassie d'IL-2 recombinante non digérée (1) ou digérée par l'ajout de 0,0006% d'entérokinase (2) et immunobuvardage de type Western d'IL-2 digérée en utilisant un Ac anti-His-tag (3). (B) Coloration par bleu de Coomassie du lysat bactérien non purifié (1) et des 2 fractions récoltées après lavage de la colonne suite à l'ajout de 0,0006% d'entérokinase (2,3).

4.1.1.3 Purification des protéines sous leur forme insoluble

Puisque la majorité des cytokines d'intérêt n'étaient pas exprimées de manière soluble, nous avons ensuite décidé de les purifier sous leur forme insoluble. Lorsque le niveau d'expression est très élevé chez *E. coli*, il est connu que la protéine d'intérêt peut représenter jusqu'à 50% des protéines bactériennes totales; la protéine exprimée se retrouve alors souvent dans les corps d'inclusion, qui sont composés presque exclusivement de cette dernière (Lilie et al., 1998). Nous avons donc produit les protéines partiellement purifiées suite à une séparation par électrophorèse des corps d'inclusion isolés par centrifugation et une extraction de la bande correspondant au poids moléculaire approprié. Les protéines insolubles obtenues avec ce protocole sont sous une forme dénaturée et linéaire, où la thiorédoxine n'a pas été clivée. Les protéines recombinantes ne servant qu'à l'immunisation des animaux, leur resolubilisation et

leur clivage par l'entérokinase n'ont pas été nécessaires. L'extraction sur gel d'acrylamide s'est montrée beaucoup plus simple, rapide et efficace que la chromatographie. En effet, le rendement obtenu par extraction sur gel était d'environ 2 mg de protéines recombinantes par 50 ml de culture. Les cytokines IL-6 et IFN-β ont été les premières à être purifiées de cette façon (Fig. 9). Puisque les lapins répondaient aussi bien à l'immunisation par les protéines recombinantes solubles (IL-2) qu'insolubles (IL-6, IFN-β), nous avons ensuite purifié toutes les autres cytokines d'intérêt par extraction sur gel.

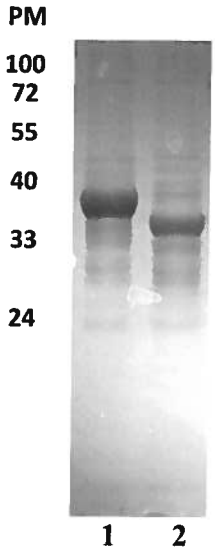


Figure 9 : Purification des protéines recombinantes sous leur forme insoluble. Coloration par Coomassie de fractions purifiées par extraction sur gel d'acrylamide pour IL-6 (1) et IFN-β (2).

Les protéines bactériennes et les peptides choisis pour leur immunogénicité ont finalement été envoyés à la compagnie Cocalico pour l'immunisation respective de lapins et de poulets. Plusieurs rappels furent nécessaires et des prélèvements sanguins à différent temps du calendrier d'immunisation ont permis l'évaluation de la réponse des animaux.

4.1.2 Évaluation de la réponse d'Ac des animaux

La première évaluation de la réponse à l'immunisation des lapins et des poulets a été effectuée par IPMA, suivie par une confirmation des échantillons positifs par immunobuvardage de type Western. Quoique l'IPMA soit une technique plus longue que l'immunobuvardage, nous l'avons préférée pour son efficacité. En effet, l'IPMA permettait une comparaison plus évidente et quantitative de la réponse des différents animaux. La figure 10A montre les résultats obtenus par IPMA pour un lapin immunisé par les protéines bactériennes d'IFN-β, pour lequel un signal spécifique est obtenu à une dilution aussi forte que 1 : 12800; aucun signal n'est évidemment obtenu pour le contrôle négatif, récolté du même animal avant l'immunisation. Il est attendu que seulement une partie des cellules apparaissent comme positives, puisque la majorité d'entre elles n'ont pas été transfectées avec le plasmide d'expression de la cytokine en question utilisé pour la production d'antigène. Une coloration non spécifique de toutes les cellules diminuant progressivement selon la dilution était observée lorsqu'un animal répondait mal à l'immunisation. Les animaux négatifs par IPMA se voyaient ensuite administrer un ou deux rappels supplémentaires. Une fois les animaux sacrifiés, les sérums finaux étaient évalués également par immunobuvardage de type Western, en utilisant les protéines bactériennes comme antigènes. La figure 10B montre les résultats d'immunobuvardage obtenus pour les poulets immunisés par le peptide d'IL-6; ces résultats concordaient avec ceux obtenus par IPMA, qui montraient que le premier poulet avait mieux répondu que le deuxième (résultats non montrés). La bande d'intérêt correspond à celle un peu inférieure à 40 kDa; l'origine des bandes à 115/125 kDa est inconnue, mais il pourrait s'agir de formes multimériques de la protéine produite chez la bactérie.

Les résultats obtenus pour les poulets se sont avérés variables. En effet, nous n'avons pas réussi à produire des Ac contre l'IFN-γ et l'IL-2 chez le poulet. Il y a toujours une possibilité qu'un peptide soit inefficace pour induire une réponse face à la protéine native, ceci pouvant être dû entre autres à la conformation tridimensionnelle de cette dernière (Harlow and Lane, 1988). Par contre, l'immunisation des lapins par les protéines bactériennes a permis d'obtenir des Ac polyclonaux contre les sept cytokines d'intérêt (Tableau III). Des outils immunologiques pour l'évaluation de la réponse immunitaire du furet étaient ainsi disponibles.

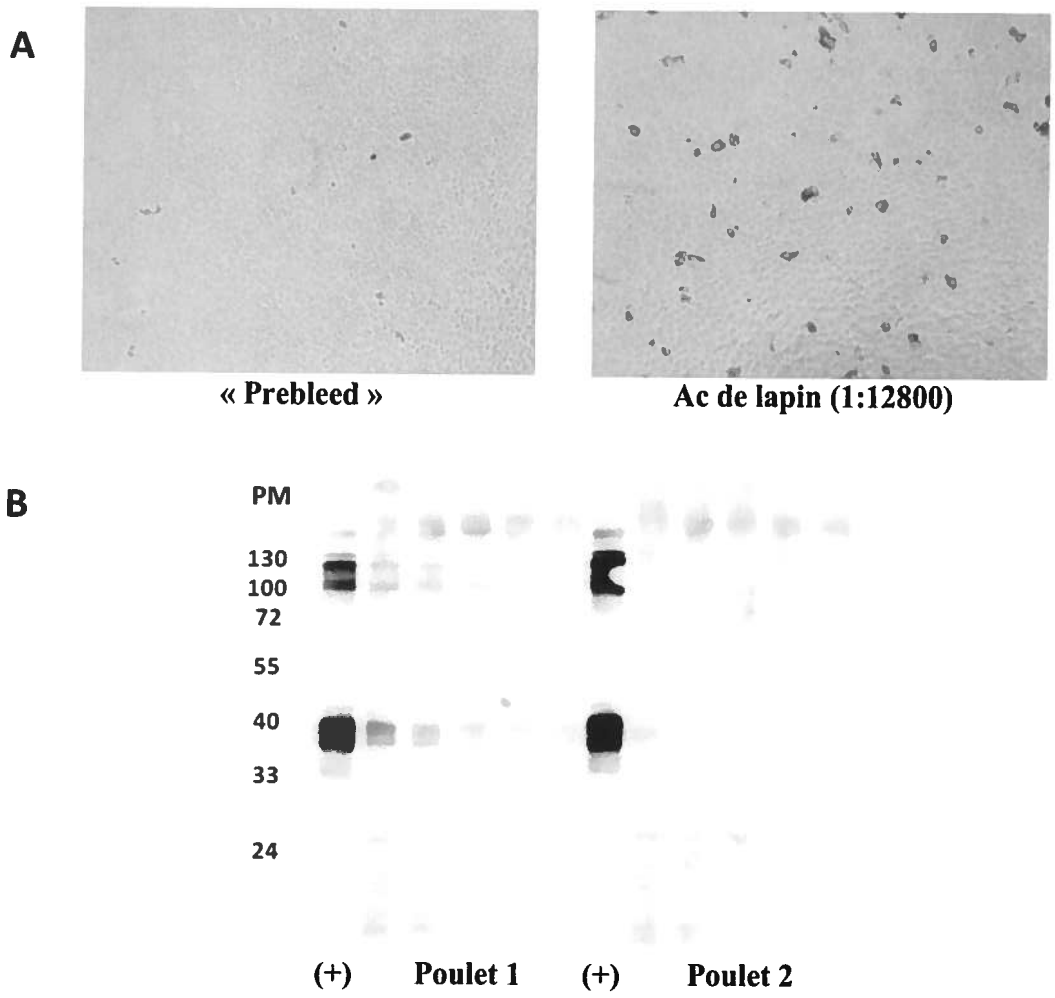


Figure 10 : Évaluation de la réponse des animaux face à l'immunisation. (**A**) IPMA pour le sérum pré-immun (prebleed) et le sérum final d'un lapin immunisé par l'IFN-β à une dilution 1:12800. (**B**) Immunobuvardage de type Western des protéines bactériennes purifiées exposées à des dilutions en série (1:500 à 1:8000) du sérum des poulets immunisés par le peptide d'IL-6; le témoin positif (+) consiste à l'Ac anti-His-tag.

Tableau III : Bilan de la réponse à l'immunisation des lapins et des poulets. Tous les animaux ont été testés en duplicata par IPMA. Le tableau montre la plus forte dilution à laquelle un signal spécifique était observé; certains sérums se sont avérés non spécifiques (ns). Les sérums étaient dilués en série de 1:100 à 1:12800.

	Lapin 1	**Lapin 2**	**Poulet 1**	**Poulet 2**	**Poulet 3**	**Poulet 4**
IFN-α	12800	12800	6400	ns		
IFN-β	800	1600	3200	12800		
IFN-γ	800	800	ns	ns		
TNF-α	12800	1600	ns	ns	6400	X
IL-2	12800	1600	ns	ns		
IL-4	3200	6400	ns	3200		
IL-6	6400	12800	12800	6400		

4.2 Évaluation du profil de cytokines associé à une infection létale ou atténuée de CDV

4.2.1 Introduction de la souche létale et atténuée

4.2.1.1 Virus utilisés

La souche sauvage 5804P (Fig. 11A) a été isolée du chien lors d'une épidémie sévissant dans un chenil en Allemagne (von Messling et al., 2003) et la souche 5804P-Vko-V(H:L) (Fig. 11B) provient d'études précédentes dans notre laboratoire (données non publiées). Chez celle-ci, le gène P est muté pour ne pas exprimer la protéine V et cette dernière est exprimée d'une cassette transcriptionnelle séparée insérée entre les gènes H et L.

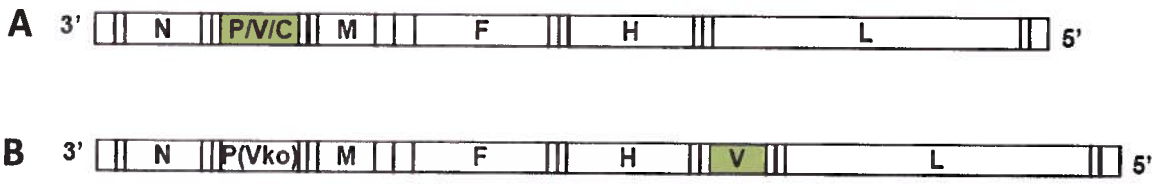


Figure 11 : Schémas des génomes des virus utilisés. (**A**) La souche sauvage 5804P est létale chez le furet. (**B**) La souche V(H:L) est atténuée dû à l'expression de V d'une cassette transcriptionnelle séparée insérée entre les gènes H et L. Les génomes respectifs de ces virus sont représentés ci-haut.

4.2.1.2 Manifestations cliniques

La souche sauvage 5804P cause des manifestations cliniques sévères chez le furet, notamment des éruptions cutanées, de la fièvre, de la perte de poids, de la virémie associée aux PBMCs et de la leucopénie menant au décès de l'animal en 14 jours. Par contre, l'infection par la souche V(H:L) entraîne chez l'animal plusieurs signes cliniques typiques du CDV, mais d'une plus faible sévérité. Cette souche est non létale chez tous les sujets (Fig. 12A). La virémie associée aux PBMCS des furets infectés par la souche atténuée s'est avérée diminuée par rapport à la souche létale (Fig. 12B). La souche V(H:L) possède donc toujours un tropisme élevé pour les cellules immunitaires, mais avec des taux d'infection et de

réplication diminués. Une leucopénie sévère s'est aussi manifestée lors de l'infection par la souche atténuée, mais d'une durée transitoire (Fig. 12C). En somme, quoique l'infection par la souche V(H:L) est non mortelle et atténuée chez le furet, elle maintient chez celui-ci les principales caractéristiques cliniques du CDV. C'est pour cette raison que nous l'avons choisi comme virus atténué dans le cadre de ce projet.

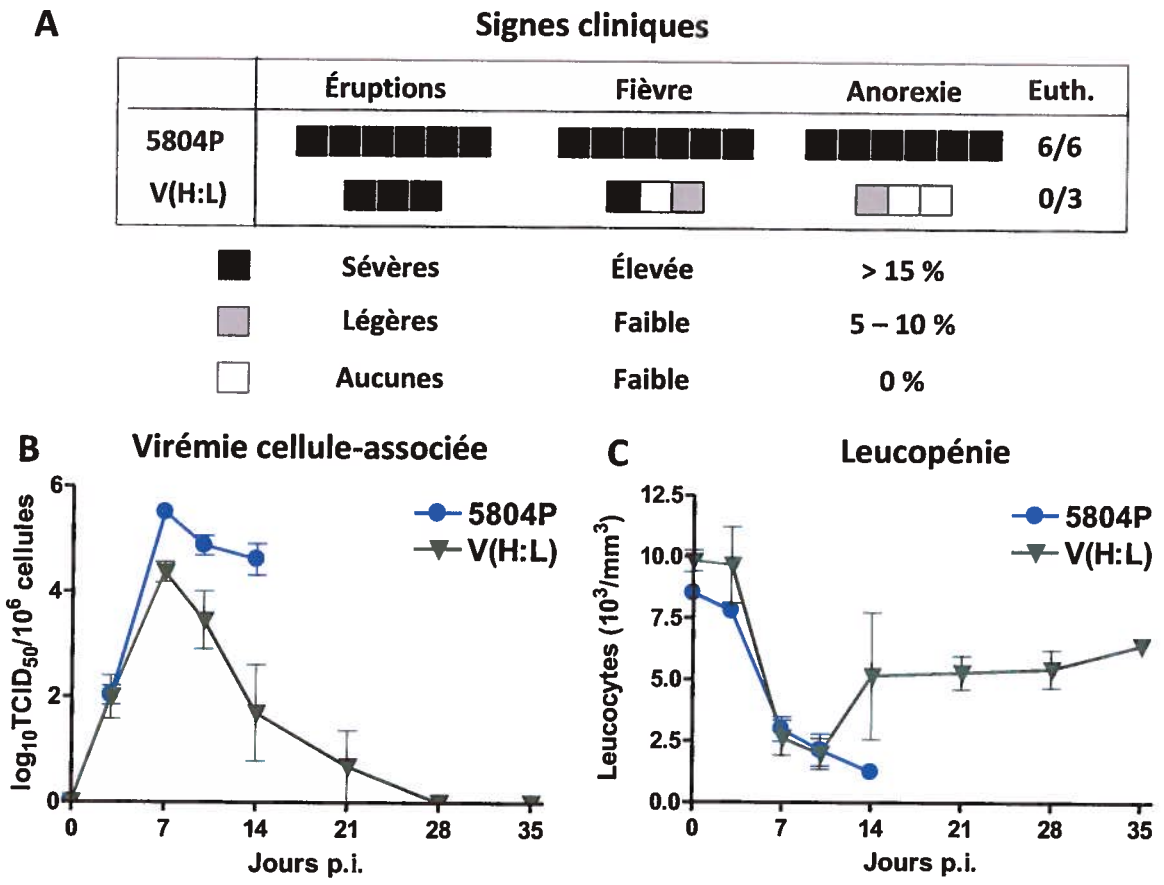


Figure 12 : Comparaison des manifestations cliniques associées aux deux virus chez le furet. (**A**) Les signes cliniques ont été évalués pour leur sévérité suite à l'administration intranasale de 10^5 $TCID_{50}$ de la souche sauvage 5804P ou de la souche atténuée V(H:L). (**B**) La virémie associée aux PBMCs et (**C**) la leucopénie ont aussi été évaluées chez ces furets à différents jours post infection.

4.2.2 Immunohistochimie

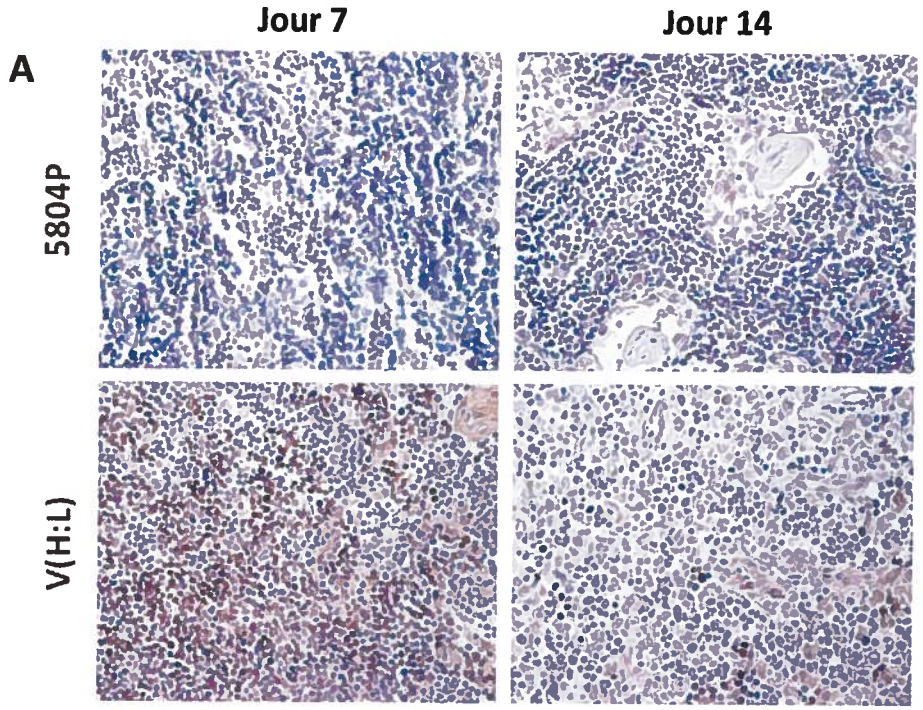
4.2.2.1 Tissus immunitaire (nodule lymphatique)

Afin d'observer dans les tissus les profils de cytokines associés à ces deux souches de CDV, nous avons donc utilisé les Ac polyclonaux produits chez le lapin. Deux furets ont été sacrifiés pour chaque virus aux jours 7 et 14 post infection, qui représentent soit le début des signes cliniques ou le temps de décès pour la maladie la plus sévère. Les résultats obtenus par immunohistochimie n'étaient pas toujours identiques à l'intérieur d'un même groupe. Par contre, la compilation des résultats montrait des différences importantes entre les profils généraux de cytokines associés à l'infection par les deux virus.

L'expression des différentes cytokines d'intérêt a en premier été évaluée dans les ganglions mésentériques. Des différences importantes entre les deux infections y ont été observées pour l'expression des cytokines de l'immunité adaptative (IFN-γ, IL-2 et IL-4) (Tableau IV). En effet, une forte et rapide expression à la hausse de l'IFN-γ n'était induite chez les cellules immunitaires que lors de l'infection par la souche atténuée V(H:L). Par contre, presqu'aucune cellule positive pour cette cytokine n'était détectée dans les nodules lymphatiques des animaux infectés par la souche létale (Fig. 13A). Au jour 7 post infection, les cytokines IL-2 et IL-4 étaient fortement exprimées dans le nodule lymphatique lors de l'infection atténuée, contrairement à l'infection létale au cours de laquelle elles n'ont pas été détectées. Au jour 14 post infection, c'est l'inverse qui était observé (Fig. 13B, 13C). L'expression de ces cytokines serait donc retardée lors de l'infection létale. En somme, nos résultats suggèrent que l'infection par la souche létale 5804P interfère avec une activation appropriée des réponses à médiation cellulaire et humorale.

Tableau IV : Profils de cytokines observés dans les tissus immunitaires. Le niveau d'expression de plusieurs cytokines a été évalué par immunohistochimie dans le nodule lymphatique d'animaux infectés par la souche létale et atténuée de CDV en utilisant les Ac produits chez le lapin; les résultats sont présentés selon l'index suivant : négatif -, faible (+), fort + et très fort ++.

	5804P Jour 7		5804P Jour 14		V(H:L) Jour 7		V(H:L) Jour 14	
	958	971	732	725	375	353	380	383
IFN-α	+	-	-	-	(+)	-	-	-
IFN-β	(+)	+	(+)	-	(+)	+	-	+
IFN-γ	-	(+)	(+)	-	+	+	+	(+)
TNF-α	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	+	+	+	(+)	-	-
IL-4	-	+	++	++	+	+	-	-
IL-6	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-



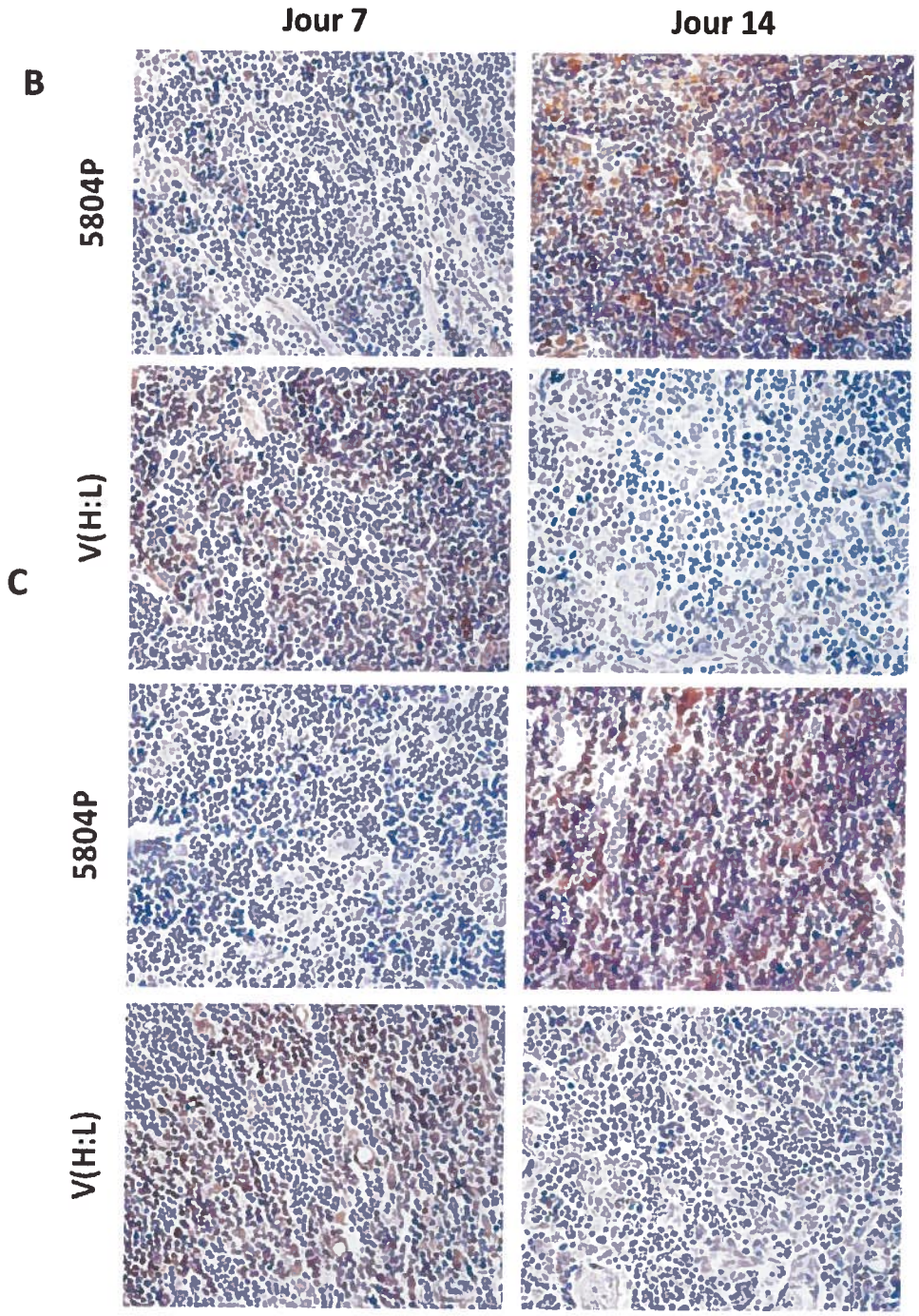


Figure 13 : Coloration par immunohistochimie des cytokines dans le nodule lymphatique. Détection des cellules positives pour (**A**) l'IFN-γ, (**B**) IL-2 et (**C**) IL-4 dans le nodule lymphatique d'animaux infectés par la souche létale 5804P ou la souche atténuée V(H:L).

4.2.2.2 Tissus épithélial (poumons)

Le tableau V montre l'ensemble des résultats obtenus dans les poumons représentant les tissus épithéliaux ciblés par le virus. Lors de l'infection par les deux souches de CDV, une expression à la hausse des cytokines de l'immunité innée a été observée dans les tissus épithéliaux. Par contre, l'expression des cytokines de l'immunité innée était particulièrement robuste lors de l'infection létale, avec des niveaux élevés d'IFNs de type I et II, ainsi que de la cytokine proinflammatoire TNF-α (Fig. 14). Le CDV ne peut donc pas inhiber l'expression des cytokines chez les cellules épithéliales, leur niveau d'expression corrélant dans les poumons avec la virulence et le taux de réplication du virus en question.

Tableau V : Profils de cytokines obtenus dans les tissus épithéliaux. Le niveau d'expression de plusieurs cytokines de l'immunité innée a été évalué par immunohistochimie dans les poumons d'animaux infectés par la souche létale et atténuée de CDV en utilisant les Ac produits chez le lapin; les résultats sont présentés selon l'index suivant : négatif -, faible (+), fort + et très fort ++.

	5804P Jour 7		**5804P Jour 14**		**V(H:L) Jour 7**		**V(H:L) Jour 14**	
	958	**971**	**732**	**725**	**375**	**353**	**380**	**383**
IFN-β	++	+	++	-	+	+	-	+
IFN-γ	++	++	+	-	(+)	+	+	(+)
TNF-α	++	++	++	-	-	+	-	-

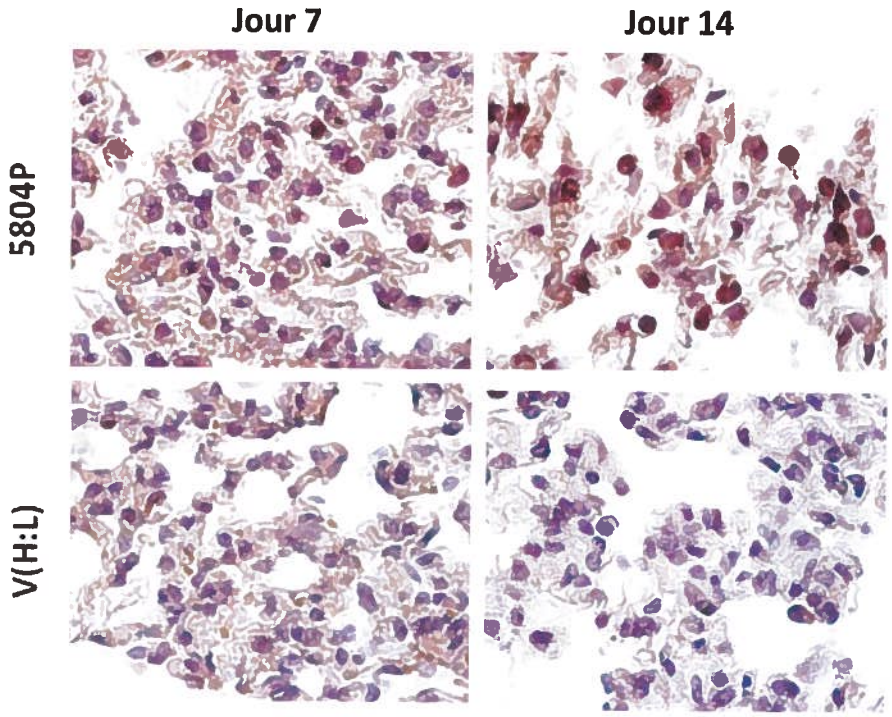


Figure 14 : Coloration par immunohistochimie de TNF-α dans les tissus épithéliaux. Détection des cellules positives pour TNF-α dans les poumons d'animaux infectés par la souche létale 5804P ou par la souche atténuée V(H:L).

4.3 Développement de tests ELISAs indirects en sandwich

Les Ac produits dans le cadre de ce projet seront utilisés prochainement dans notre laboratoire dans plusieurs applications, notamment en immunohistochimie, en immunobuvardage de type Western et en ELISA. Cette dernière section porte sur le développement de tests ELISAs indirects en sandwich. Pour cet essai, les dilutions optimales doivent d'abord être déterminées pour les trois Ac, soit de capture, de détection et conjugué. Puisqu'uniquement deux paramètres d'un ELISA peuvent être optimisés simultanément, l'optimisation doit se faire en deux étapes, nécessitant donc un temps considérable. Dans le cadre de ma maîtrise, un test ELISA a été élaboré avec succès pour le moment, soit pour l'IFN-β.

4.3.1 Quantification de protéines de cellules 293

Dans un premier temps, nous avons produit l'IFN-β dans un système d'expression mammifère pour s'assurer du repliement approprié de la protéine témoin. Les protéines produites suite à la transfection avec le vecteur pCG-IFN-β étaient quantifiées par immunobuvardage de type Western en utilisant comme standard les protéines bactériennes, dont les concentrations sont connues. La quantification de cette façon des trois lysats eucaryotes présentés dans la figure 15 a donné respectivement des concentrations de 1,9 µg/ml, > 10 µg/ml et 7,9 µg/ml. Leur expression différait pour certains paramètres (durée et densité), ce qui explique les différences de concentration obtenues.

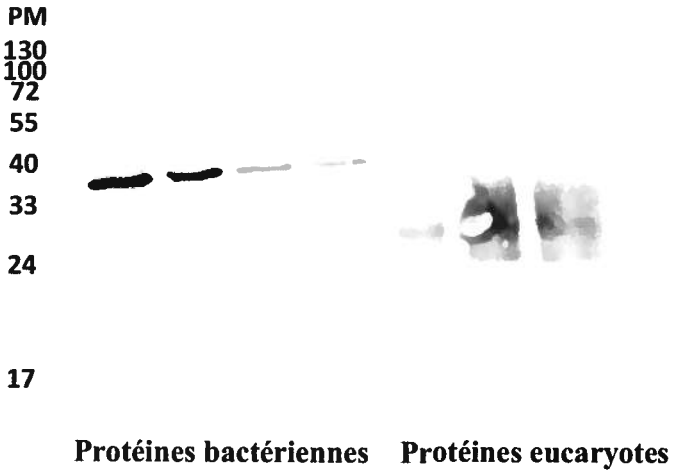


Figure 15 : Quantification des protéines eucaryotes par immunobuvardage de type Western. Des dilutions en série entre 1:50 et 1:400 de protéines bactériennes de concentration connue ont permis d'évaluer la concentration en IFN-β de trois lysats de cellules 293 transfectées, en utilisant du sérum de poulet comme Ac primaire.

4.3.2 Développement d'un test ELISA pour l'IFN-β

Après avoir testé les deux combinaisons d'Ac de poulet et de lapin, nous avons choisi d'utiliser le lapin comme Ac de capture et le poulet pour la détection. Un premier essai a d'abord été tenté avec l'IFN-β produit dans les cellules 293 en utilisant des concentrations d'Ac non optimisées, soit de 1 :500 pour l'Ac de capture, de 1 :1000 pour l'Ac de détection et

de 1 :5000 pour l'Ac conjugué (α-poulet). Ce test menait à une sensibilité d'environ 30 ng/ml (résultats non montrés).

Nous avons ensuite procédé à l'optimisation des différentes concentrations d'Ac afin d'obtenir une meilleure sensibilité. Un test ELISA en sandwich indirect comporte quatre variables, soit l'Ac de capture, l'Ag, l'Ac de détection et l'Ac conjugué. Deux paramètres sont optimisés à la fois par une dilution sérielle dans une plaque de 96 puits, soit de gauche à droite pour le premier et de haut en bas pour le deuxième, en gardant les deux autres variables constantes. La concentration optimale consiste à la dilution la plus faible à laquelle un signal maximal est obtenu, tout en s'assurant d'obtenir peu de signal non spécifique. L'Ac de capture a d'abord été optimisé en présence de différentes concentrations d'Ag. Les Ac de détection et conjugué ont par la suite été optimisés en utilisant la concentration optimale d'Ac de capture à une dilution d'Ag appropriée. Afin de s'assurer que les variations de signal observées étaient toujours spécifiques, les mêmes manipulations étaient effectuées en parallèle en utilisant comme Ag des lysats de cellules 293 non transfectées. Nous avons obtenus des concentrations optimales de 1 :2500 pour l'Ac de capture, de 1 :500 pour l'Ac de détection et de 1 :1000 pour l'Ac conjugué. L'optimisation a permis la quantification des protéines jusqu'à des concentrations de 2 ng/ml (Fig. 16; Tableau VI), ce qui représente une amélioration d'environ 10 fois de la sensibilité du test.

Les tests ELISA pour les autres cytokines devront être optimisés prochainement de la même manière. L'optimisation du test pour l'IL-6 a également été tentée, mais la sensibilité obtenue était faible. Il est donc possible que l'obtention d'ELISA en sandwich indirect contre toutes les cytokines d'intérêt nécessite l'immunisation de d'autres animaux et possiblement la production d'Ac monoclonaux.

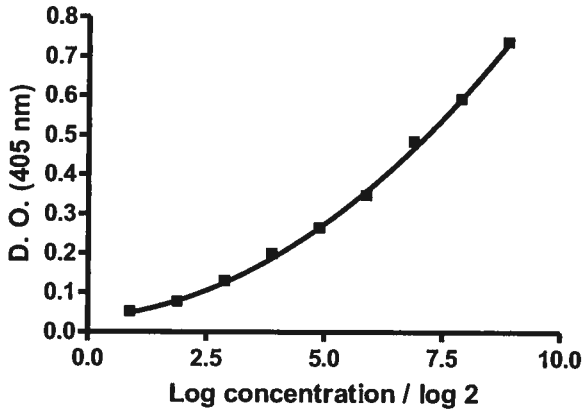


Figure 16 : Courbe standard pour l'ELISA indirect en sandwich d'IFN-β. La concentration en IFN-β de différentes dilutions d'un lysat de cellules 293 transfectées a été obtenue par ELISA. La formule $y = 0{,}0079x^2 + 0{,}0083x + 0{,}0357$ a été obtenue avec un coefficient de corrélation de 0,9989.

Tableau VI : Valeurs obtenues en ELISA indirect en sanwich pour l'IFN-β. La concentration en IFN-β de différentes dilutions d'un lysat de cellules 293 transfectées a été obtenue par ELISA.

ng/ml	D.O. (405 nm)
120,2063	0,483
60,10313	0,346
30,05156	0,263
15,02578	0,198
7,512891	0,128
3,756445	0,076
1,878223	0,050

Chapitre 5 : Discussion

5.1 Solubilisation des protéines bactériennes

L'expression des cytokines de manière soluble chez *E. coli* est un aspect du projet ayant nécessité l'investissement d'un temps considérable. Même si les protéines ont finalement été purifiées sous leur forme insoluble, leur production de manière soluble pourra être effectuée, si nécessaire, cette fois de manière relativement rapide. En effet, la composition en acides aminés d'une protéine pourra être utilisée afin d'estimer les conditions les plus favorables à son expression de manière soluble.

Premièrement, l'usage de la souche Origami2 s'impose afin d'obtenir un repliement adéquat si une protéine possède un ou plusieurs ponts disulfures. Les ponts disulfures chez les bactéries sont habituellement formés dans l'espace périplasmique, car le cytoplasme bactérien consiste en un milieu fortement réducteur qui ne permet pas la formation appropriée des ponts disulfures. Les protéines mal repliées sont alors dégradées ou se retrouvent dans les corps d'inclusion. La souche Origami2 possède deux mutations, soit pour la glutathione réductase (gor) et pour la thiorédoxine réductase, qui favorisent l'oxydation dans le cytoplasme et donc la formation de ponts disulfures (révisé dans Aslund et al., 1999; Novagen, 2006). La plus grande solubilité du TNF-α et de l'IL-4 (Fig. 6) obtenue chez Origami2 est probablement due à la présence chez ces cytokines de ponts disulfures (Davis et al., 1987; Kruse et al., 1991). Toutefois, cette souche bactérienne a également été utile pour l'expression de manière soluble de l'IFN-γ, une cytokine ne possédant pas de ponts disulfures (Ealick et al., 1991).

Ensuite, le modèle de Wilkinson-Harrison peut être utile pour prédire si une protéine sera exprimée de manière soluble d'après sa teneur en certains résidus. Ce modèle tient compte de deux paramètres critiques pour la solubilité d'une protéine, i.e. sa charge moyenne et la présence de résidus induisant un coude dans la structure (Asn, Gly, Pro, Ser) (Wilkinson and Harrison, 1991). NusA, une protéine bactérienne connue pour sa très haute solubilité, est exprimée par le vecteur pET43.1 (révisé dans Harrison, 2000). D'après le modèle de Wilkinson-Harrison, l'usage de ce vecteur permettrait d'augmenter en général la solubilité des protéines recombinantes comparé au vecteur pET32 (Tableau I).

Tableau VII : Probabilité de solubilité selon le modèle de Wilkinson-Harrison lors de l'expression de certaines cytokines dans les vecteur pET32 ou pET43.1. Des résultats inférieurs à 50% signifient que la protéine devrait être produite sous sa forme insoluble.

	pET32	pET43.1
IFN-β	65 %	85 %
IL-2	70 %	87 %
IL-6	49 %	82 %

5.2 Profils de cytokines dans les tissus épithéliaux

5.2.1 L'importance des cellules épithéliales dans le contrôle de l'infection

Nos résultats suggèrent que le CDV inhibe la réponse de cytokines spécifiquement chez les cellules immunitaires, mais n'est pas capable de bloquer celle-ci dans les tissus épithéliaux. On savait déjà que le CDV pouvait influencer l'expression de certaines cytokines de manière spécifique au type cellulaire (Grone et al., 2002). Par exemple, l'infection de cellules immunitaires par MV entraîne chez celles-ci une forte inhibition de l'expression de la chimiokine IL-8 et du facteur de transcription NFκB, impliqué dans l'expression de plusieurs cytokines, ce qui n'est pas observé lors de l'infection de cellules épithéliales (Indoh et al., 2007). Naniche et al., 2000 ont observé qu'une souche sauvage de MV inhibait l'expression des IFNs de type I chez les PBMCs, alors qu'une forte expression de ces derniers était observée avec une souche virale adaptée aux cellules Vero (cellules épithéliales). Les furets infectés par la souche atténuée V(H:L) sont tout de même fortement immunosupprimés, puisque l'on observe chez eux une sévère leucopénie (Fig. 12C) et une inhibition importante de la prolifération lymphocytaire (données non montrées); pourtant, ils parviennent à contrôler et à survivre à l'infection. Le CDV ne semble pas inhiber l'expression des cytokines chez les tissus épithéliaux, ce qui suggère donc une contribution importante des cellules épithéliales au développement d'une réponse immunitaire appropriée et à la résolution de l'infection par une souche atténuée.

5.2.2 Une forte réponse innée pourrait contribuer à la pathogénèse

Par contre, l'induction très robuste de certaines cytokines de l'immunité innée dans les tissus épithéliaux, soit de l'IFN-β, de l'IFN-γ et du TNF-α, pourrait contribuer de manière importante à la pathogénèse et à la morbidité associées à la souche sauvage 5804P. Chez certaines infections virales, on sait qu'une trop forte expression à la hausse de ces cytokines corrèle avec l'apparition de complications sévères, notamment pour l'influenza A et les coronavirus (Deng et al., 2008; Reghunathan et al., 2005). En effet, des niveaux anormalement élevés ont été observés notamment pour l'IFN-β, l'IFN-γ, l'IL-6 et le TNF-α lors d'un épisode fatal de grippe aviaire de type H5N1 (Deng et al., 2008; Salomon et al., 2007; Uiprasertkul et al., 2007). Les cellules positives pour ces cytokines consistaient principalement en des macrophages, sauf pour l'IFN-β qui était exprimé par plusieurs types cellulaires, dont les cellules épithéliales et endothéliales (Deng et al., 2008). Quoi que son importance ait récemment été remise en question (Salomon et al., 2007), la tempête de cytokines semble contribuer à la pathogénèse associée aux cas sévères d'influenza de type A. Le syndrôme respiratoire aigu sévère causé par le coronavirus (SRAS-CoV) est également associé à une forte expression des cytokines innées proinflammatoires plus qu'au développement d'une réponse spécifique contre l'agent viral (Reghunathan et al., 2005). L'observation chez les patients de hauts niveaux en cytokines proinflammatoires corrèle finalement avec un mauvais pronostic (Reghunathan et al., 2005; Zhang et al., 2004). Nos résultats, pour le moment préliminaires, suggèrent néanmoins que le haut niveau de certaines cytokines de l'immunité innée pourrait ainsi venir compliquer la résolution de l'infection par des souches virulentes de CDV. En effet, l'expression soutenue de cytokines dans les tissus épithéliaux semble corréler avec la sévérité du score clinique observé et pourrait finalement empirer l'immunosuppression déjà importante.

5.3 Profil de cytokines dans les tissus immunitaires

Nos résultats montrent que l'expression de certaines cytokines majeures de la réponse adaptative est inhibée lors de l'infection létale, ce qui a également été observé lors d'infections ayant un lymphotropisme élevé, tel que celle par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le VIH est également associé à une immunosuppression importante qui favorise l'apparition d'infections opportunistes. L'infection par le VIH entraîne entre autres une perte

importante du nombre et de la fonction des cellules T, perturbant ainsi le fonctionnement normal du système immunitaire (Douek et al., 2003). Les personnes infectées deviennent alors très sensibles à de multiples infections secondaires. De plus, une diminution de la réponse T_H1, telle qu'observée et décrite chez VIH (Kedzierska and Crowe, 2001), peut également nuire à l'élimination du CDV. Des études cliniques en phase III récemment complétées ont montrées que l'administration exogène d'IL-2 à des patients infectés par le VIH permet une augmentation significative de leur nombre de cellules T, même si aucun bénéfice clinique important n'a été rapporté (Abrams et al., 2009). Les résultats d'une autre étude clinique récente suggèrent que l'administration d'IL-7, une cytokine importante pour la survie des cellules T, pourrait rétablir certaines fonctions des cellules T, notamment au niveau de la production d'IL-2 et d'IFN-γ (Levy et al., 2009). Nos résultats proposent donc qu'une déficience importante en cytokines de type T_H1 chez les furets infectés par la souche 5804P pourrait nuire à leur rétablissement, en favorisant la progression de l'infection ainsi que l'apparition d'infections opportunistes. En effet, la majorité des complications subséquentes à la rougeole chez l'homme consistent en des infections secondaires à l'infection dans les voies respiratoires; celles-ci se manifestent par l'apparition de pneumonies et de bronchites dont la sévérité peut être importante et même mortelle (Beckford et al., 1985; Miller, 1964). Les souches virulentes de CDV, dont la souche sauvage 5804P, entraînent souvent chez le furet l'apparition d'infections secondaires sévères.

5.4 Perspectives

Le projet initial incluait l'immunisation par des protéines bactériennes de souris Balb/c en vue de produire des Ac monoclonaux pour l'élaboration des tests ELISAs. Les différentes étapes du processus ont été optimisées avec succès, mais la production d'Ac monoclonaux contre les sept cytokines d'intérêt aurait finalement demandé beaucoup trop de temps. Tel que mentionné dans la partie résultat, les Ac de poulet ne permettront pas l'élaboration de tous les tests ELISAs. Lorsque nécessaire, la production d'Ac monoclonaux consistera donc en une alternative envisageable aux Ac de poulet.

Les résultats obtenus par immunohistochimie seront prochainement confirmés par immunobuvardage de type Western et par PCR en temps réel à partir d'homogénats des tissus

récoltés. De plus, des différences ayant parfois été observées dans l'expression des cytokines entre les animaux de mêmes groupes (Tableau IV et V), un animal supplémentaire sera inclus dans chaque groupe temps/virus.

En somme, les résultats de ce projet suggèrent que les cellules épithéliales joueraient un rôle important dans la résolution de l'infection morbillivirale. La production de cytokines de l'immunité innée chez celles-ci permettrait un certain contrôle de l'infection durant la période quand il y a une forte suppression de l'immunité adaptative. En effet, les cytokines pro-inflammatoires peuvent induire un état antiviral chez les cellules et ainsi limiter la réplication virale (révisé dans McFadden et al., 2009). Afin d'avoir une meilleure perception du rôle des cellules épithéliales dans le contrôle de l'infection, il faudra prochainement comparer l'expression des cytokines dans les tissus épithéliaux plus tôt dans l'infection. Les résultats obtenus viennent également confirmer au niveau protéique des résultats obtenus par PCR lors d'études antérieures dans notre laboratoire, i.e. une forte inhibition de l'expression des cytokines chez les cellules immunitaires. Les outils immunologiques développés lors de ce projet seront très utiles prochainement pour poursuivre l'analyse de la réponse immunitaire lors de l'infection du furet par le CDV ainsi que d'autres agents pathogènes.

Liste des références

Abrams, D., Levy, Y., Losso, M. H., Babiker, A., Collins, G., Cooper, D. A., Darbyshire, J., Emery, S., Fox, L., Gordin, F., Lane, H. C., Lundgren, J. D., Mitsuyasu, R., Neaton, J. D., Phillips, A., Routy, J. P., Tambussi, G. and Wentworth, D. (2009) Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *N Engl J Med* **361,** 1548-59.

Appel, M. J. (1970) Distemper pathogenesis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* **156,** 1681-4.

Appel, M. J., Shek, W. R. and Summers, B. A. (1982) Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect Immun* **37,** 592-600.

Appel, M. J., Yates, R. A., Foley, G. L., Bernstein, J. J., Santinelli, S., Spelman, L. H., Miller, L. D., Arp, L. H., Anderson, M., Barr, M. and et al. (1994) Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest* **6,** 277-88.

Aslund, F., Bessette, P. H., Georgiou, G. and Beckwith, J. (1999) Efficient production of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of "oxidizing" mutants of *E. coli. inNovations* **10,** 11-12.

Auwaerter, P. G., Kaneshima, H., McCune, J. M., Wiegand, G. and Griffin, D. E. (1996) Measles virus infection of thymic epithelium in the SCID-hu mouse leads to thymocyte apoptosis. *J Virol* **70,** 3734-40.

Auwaerter, P. G., Rota, P. A., Elkins, W. R., Adams, R. J., DeLozier, T., Shi, Y., Bellini, W. J., Murphy, B. R. and Griffin, D. E. (1999) Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J Infect Dis* **180,** 950-8.

Bech, V. (1959) Studies on the development of complement fixing antibodies in measles patients. Observations during a measles epidemic in Greenland. *J Immunol* **83,** 267-75.

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., Rozenblatt, S., Arnheiter, H. and Richardson, C. D. (1985) Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* **53,** 908-19.

Bellini, W. J. and Rota, P. A. (1998) Genetic diversity of wild-type measles viruses: implications for global measles elimination programs. *Emerg Infect Dis* **4,** 29-35.

Bieback, K., Lien, E., Klagge, I. M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W. P., Wagner, H., Kirschning, C. J., Ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. (2002) Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* **76,** 8729-36.

Biron, C., Dalod, M. and Salazar-Mather, T. (2002) Innate immunity and viral infections. In *Immunology of infectious diseases.*, pp. 139-160, ASM Press.

Biron, C. A. and Brossay, L. (2001) NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* **13,** 458-64.

Bleharski, J. R., Niazi, K. R., Sieling, P. A., Cheng, G. and Modlin, R. L. (2001) Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* **167,** 3174-81.

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.

Burnet, F. M. (1968) Measles as an index of immunological function. *Lancet* **2,** 610-3.

Caignard, G., Guerbois, M., Labernardiere, J. L., Jacob, Y., Jones, L. M., Wild, F., Tangy, F. and Vidalain, P. O. (2007) Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* **368,** 351-62.

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

Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V. and Billeter, M. A. (1987) Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* **6,** 681-8.

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.

Davis, J. M., Narachi, M. A., Alton, N. K. and Arakawa, T. (1987) Structure of human tumor necrosis factor alpha derived from recombinant DNA. *Biochemistry* **26,** 1322-6.

Deng, R., Lu, M., Korteweg, C., Gao, Z., McNutt, M. A., Ye, J., Zhang, T. and Gu, J. (2008) Distinctly different expression of cytokines and chemokines in the lungs of two H5N1 avian influenza patients. *J Pathol* **216,** 328-36.

Devaux, P., von Messling, V., Songsungthong, W., Springfeld, C. and Cattaneo, R. (2007) Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* **360,** 72-83.

Douek, D. C., Picker, L. J. and Koup, R. A. (2003) T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* **21,** 265-304.

Ealick, S. E., Cook, W. J., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T. L., Trotta, P. P. and Bugg, C. E. (1991) Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science* **252,** 698-702.

Ebihara, T., Masuda, H., Akazawa, T., Shingai, M., Kikuta, H., Ariga, T., Matsumoto, M. and Seya, T. (2007) Induction of NKG2D ligands on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int Immunol* **19,** 1145-55.

Esolen, L. M., Ward, B. J., Moench, T. R. and Griffin, D. E. (1993) Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* **168,** 47-52.

Fahnert, B., Lilie, H. and Neubauer, P. (2004) Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89,** 93-142.

Finke, D., Brinckmann, U. G., ter Meulen, V. and Liebert, U. G. (1995) Gamma interferon is a major mediator of antiviral defense in experimental measles virus-induced encephalitis. *J Virol* **69,** 5469-74.

Fontana, J. M., Bankamp, B. and Rota, P. A. (2008) Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol Rev* **225,** 46-67.

Forthal, D. N., Aarnaes, S., Blanding, J., de la Maza, L. and Tilles, J. G. (1992) Degree and length of viremia in adults with measles. *J Infect Dis* **166,** 421-4.

Gans, H., Yasukawa, L., Rinki, M., DeHovitz, R., Forghani, B., Beeler, J., Audet, S., Maldonado, Y. and Arvin, A. M. (2001) Immune responses to measles and mumps vaccination of infants at 6, 9, and 12 months. *J Infect Dis* **184,** 817-26.

Garcia-Sastre, A., Durbin, R. K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D. E. and Durbin, J. E. (1998) The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol* **72,** 8550-8.

Good, R. A. and Zak, S. J. (1956) Disturbances in gamma globulin synthesis as experiments of nature. *Pediatrics* **18,** 109-49.

Griffin, D. E. (2001) Measles virus. In *Fields of Virology.*, (eds. D. M. Knipe and P. M. Kowley), pp. 1401-1441, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.

Grone, A., Fonfara, S. and Baumgartner, W. (2002) Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection. *Viral Immunol* **15,** 493-505.

Gutierrez-Ramos, J. C. and Bluethmann, H. (1997) Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol Today* **18,** 329-34.

Hahm, B., Trifilo, M. J., Zuniga, E. I. and Oldstone, M. B. (2005) Viruses evade the immune system through type I interferon-mediated STAT2-dependent, but STAT1-independent, signaling. *Immunity* **22,** 247-57.

Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies : A laboratory manual., Cold Spring Harbor.

Harrison, R. (2000) Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. *InNovations* **11,** 4-7.

Hirano, A., Yang, Z., Katayama, Y., Korte-Sarfaty, J. and Wong, T. C. (1999) Human CD46 enhances nitric oxide production in mouse macrophages in response to measles virus infection in the presence of gamma interferon: dependence on the CD46 cytoplasmic domains. *J Virol* **73,** 4776-85.

Hirsch, R. L., Griffin, D. E., Johnson, R. T., Cooper, S. J., Lindo de Soriano, I., Roedenbeck, S. and Vaisberg, A. (1984) Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin Immunol Immunopathol* **31,** 1-12.

Imagawa, D. T. (1968) Relationships among measles, canine distemper and rinderpest viruses. *Prog Med Virol* **10,** 160-93.

Indoh, T., Yokota, S., Okabayashi, T., Yokosawa, N. and Fujii, N. (2007) Suppression of NF-kappaB and AP-1 activation in monocytic cells persistently infected with measles virus. *Virology* **361,** 294-303.

Ivanov, II, Zhou, L. and Littman, D. R. (2007) Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* **19,** 409-17.

Jameson, B. A. and Wolf, H. (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci* **4,** 181-6.

Jaye, A., Magnusen, A. F., Sadiq, A. D., Corrah, T. and Whittle, H. C. (1998) Ex vivo analysis of cytotoxic T lymphocytes to measles antigens during infection and after vaccination in Gambian children. *J Clin Invest* **102,** 1969-77.

Karp, C. L., Wysocka, M., Wahl, L. M., Ahearn, J. M., Cuomo, P. J., Sherry, B., Trinchieri, G. and Griffin, D. E. (1996) Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* **273,** 228-31.

Katze, M. G., He, Y. and Gale, M., Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* **2,** 675-87.

Kauffman, C. A., Bergman, A. G. and O'Connor, R. P. (1982) Distemper virus infection in ferrets: an animal model of measles-induced immunosuppression. *Clin Exp Immunol* **47,** 617-25.

Kedzierska, K. and Crowe, S. M. (2001) Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother* **12,** 133-50.

Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P. D., Deaville, R., Forsyth, M., Barrett, T., van de Bildt, M. W., Osterhaus, A. D., Eybatov, T., Duck, C., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I. and Wilson, S. (2000) Mass die-Off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerg Infect Dis* **6,** 637-9.

Kerdiles, Y. M., Sellin, C. I., Druelle, J. and Horvat, B. (2006) Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev Med Virol* **16,** 49-63.

Krakowka, S., Cockerell, G. and Koestner, A. (1975a) Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function in vitro and in vivo. *Infect Immun* **11,** 1069-78.

Krakowka, S., Olsen, R., Confer, A., Koestner, A. and McCullough, B. (1975b) Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *J Infect Dis* **132,** 384-92.

Kruse, M., Meinl, E., Henning, G., Kuhnt, C., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G. and Steinkasserer, A. (2001) Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* **167,** 1989-95.

Kruse, N., Lehrnbecher, T. and Sebald, W. (1991) Site-directed mutagenesis reveals the importance of disulfide bridges and aromatic residues for structure and proliferative activity of human interleukin-4. *FEBS Lett* **286,** 58-60.

Lamb, R. A. and Kolakofsky, D. (2001) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields of Virology.*, (eds. D. M. Knipe and P. M. Kowley), pp. 1305-1443, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia.

Lamb, R. A., Mahy, B. W. and Choppin, P. W. (1976) The synthesis of sendai virus polypeptides in infected cells. *Virology* **69,** 116-31.

Leib, D. A., Harrison, T. E., Laslo, K. M., Machalek, M. A., Moorman, N. J. and Virgin, H. W. (1999) Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. *J Exp Med* **189,** 663-72.

Leopardi, R., Vainionpaa, R., Hurme, M., Siljander, P. and Salmi, A. A. (1992) Measles virus infection enhances IL-1 beta but reduces tumor necrosis factor-alpha expression in human monocytes. *J Immunol* **149,** 2397-401.

Levy, Y., Lacabaratz, C., Weiss, L., Viard, J. P., Goujard, C., Lelievre, J. D., Boue, F., Molina, J. M., Rouzioux, C., Avettand-Fenoel, V., Croughs, T., Beq, S., Thiebaut, R., Chene, G., Morre, M. and Delfraissy, J. F. (2009) Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment. *J Clin Invest* **119,** 997-1007.

Li-Weber, M. and Krammer, P. H. (2003) Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat Rev Immunol* **3,** 534-43.

Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr Opin Biotechnol* **9,** 497-501.

Louten, J., Boniface, K. and de Waal Malefyt, R. (2009) Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* **123,** 1004-11.

Maehlen, J., Olsson, T., Love, A., Klareskog, L., Norrby, E. and Kristensson, K. (1989) Persistence of measles virus in rat brain neurons is promoted by depletion of CD8+ T cells. *J Neuroimmunol* **21,** 149-55.

Malmgaard, L. (2004) Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* **24,** 439-54.

McFadden, G., Mohamed, M. R., Rahman, M. M. and Bartee, E. (2009) Cytokine determinants of viral tropism. *Nat Rev Immunol* **9,** 645-55.

Miller, D. L. (1964) Frequency of Complications of Measles, 1963. Report on a National Inquiry by the Public Health Laboratory Service in Collaboration with the Society of Medical Officers of Health. *Br Med J* **2,** 75-8.

Minagawa, H., Tanaka, K., Ono, N., Tatsuo, H. and Yanagi, Y. (2001) Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol* **82,** 2913-7.

Montali, R. J., Bartz, C. R. and M., B. (1987) Canine distemper virus., pp. 437-443, Elsevier Science, Amsterdam.

Nakatsu, Y., Takeda, M., Ohno, S., Shirogane, Y., Iwasaki, M. and Yanagi, Y. (2008) Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol* **82,** 8296-306.

Naniche, D., Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R. M. and Oldstone, M. B. (2000) Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol* **74,** 7478-84.

Norrby, E. and Gollmar, Y. (1972) Appearance and persistence of antibodies against different virus components after regular measles infections. *Infect Immun* **6,** 240-7.

Norrby, E., Orvell, C., Vandvik, B. and Cherry, J. D. (1981) Antibodies against measles virus polypeptides in different disease conditions. *Infect Immun* **34,** 718-24.

Novagen. (2006) pET system manual., Merckbiosciences.

Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T. and Tashiro, M. (2000) Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* **145,** 905-20.

Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N. and Tashiro, M. (2001) Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* **146,** 859-74.

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.

Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C. and Murphy, K. M. (1998) Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* **9,** 745-55.

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, C. E., Lawrence, D. M., Echols, L. A. and Rall, G. F. (2002) Immune-mediated protection from measles virus-induced central nervous system disease is noncytolytic and gamma interferon dependent. *J Virol* **76,** 4497-506.

Permar, S. R., Klumpp, S. A., Mansfield, K. G., Kim, W. K., Gorgone, D. A., Lifton, M. A., Williams, K. C., Schmitz, J. E., Reimann, K. A., Axthelm, M. K., Polack, F. P., Griffin, D. E. and Letvin, N. L. (2003) Role of CD8(+) lymphocytes in control and clearance of measles virus infection of rhesus monkeys. *J Virol* **77,** 4396-400.

Perry, R. T. and Halsey, N. A. (2004) The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis* **189 Suppl 1,** S4-16.

Plumet, S., Herschke, F., Bourhis, J. M., Valentin, H., Longhi, S. and Gerlier, D. (2007) Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS One* **2,** e279.

Pringle, C. R. (1999) Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. *Arch Virol* **144,** 2065-70.

Reghunathan, R., Jayapal, M., Hsu, L. Y., Chng, H. H., Tai, D., Leung, B. P. and Melendez, A. J. (2005) Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *BMC Immunol* **6,** 2.

Rengarajan, J., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H. (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* **21,** 479-83.

Roelke-Parker, M. E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S. J., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H. and et al. (1996) A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (Panthera leo). *Nature* **379,** 441-5.

Russell, J. H. and Ley, T. J. (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20,** 323-70.

Ryon, J. J., Moss, W. J., Monze, M. and Griffin, D. E. (2002) Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* **9,** 994-1003.

Salomon, R., Hoffmann, E. and Webster, R. G. (2007) Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104,** 12479-81.

Samb, B., Aaby, P., Whittle, H. C., Seck, A. M., Rahman, S., Bennett, J., Markowitz, L. and Simondon, F. (1995) Serologic status and measles attack rates among vaccinated and unvaccinated children in rural Senegal. *Pediatr Infect Dis J* **14,** 203-9.

Sandberg, K., Kemper, P., Stalder, A., Zhang, J., Hobbs, M. V., Whitton, J. L. and Campbell, I. L. (1994) Altered tissue distribution of viral replication and T cell spreading is pivotal in the protection against fatal lymphocytic choriomeningitis in mice after neutralization of IFN-alpha/beta. *J Immunol* **153,** 220-31.

Schneider-Schaulies, S., Kreth, H. W., Hofmann, G., Billeter, M. and Ter Meulen, V. (1991) Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* **182,** 703-11.

Servet-Delprat, C., Vidalain, P. O., Bausinger, H., Manie, S., Le Deist, F., Azocar, O., Hanau, D., Fischer, A. and Rabourdin-Combe, C. (2000) Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* **164,** 1753-60.

Sidorenko, S. P. and Clark, E. A. (1993) Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol* **151,** 4614-24.

Sun, X., Burns, J. B., Howell, J. M. and Fujinami, R. S. (1998) Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor in suppression. *Virology* **246,** 24-33.

Svitek, N. and von Messling, V. (2007) Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology* **362,** 404-10.

Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. and Glimcher, L. H. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100,** 655-69.

Szomolanyi-Tsuda, E., Brehm, M. and Welsh, R. (2002) Acquired immunity against viral infections. In *Immunology of infectious diseases.*, pp. 247-265, ASM Press.

Takeda, M. (2008) Measles virus breaks through epithelial cell barriers to achieve transmission. *J Clin Invest* **118,** 2386-2389.

Takeuchi, K., Kadota, S. I., Takeda, M., Miyajima, N. and Nagata, K. (2003) Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* **545,** 177-82.

Tato, C. M. and Cua, D. J. (2008) SnapShot: Cytokines I. *Cell* **132,** 324, 324 e1.

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

Tini, M., Jewell, U. R., Camenisch, G., Chilov, D. and Gassmann, M. (2002) Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131,** 569-74.

Uiprasertkul, M., Kitphati, R., Puthavathana, P., Kriwong, R., Kongchanagul, A., Ungchusak, K., Angkasekwinai, S., Chokephaibulkit, K., Srisook, K., Vanprapar, N. and Auewarakul, P. (2007) Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans. *Emerg Infect Dis* **13,** 708-12.

Valentin, H., Azocar, O., Horvat, B., Williems, R., Garrone, R., Evlashev, A., Toribio, M. L. and Rabourdin-Combe, C. (1999) Measles virus infection induces terminal differentiation of human thymic epithelial cells. *J Virol* **73,** 2212-21.

Vidalain, P. O., Laine, D., Zaffran, Y., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Wild, T. F., Rabourdin-Combe, C. and Valentin, H. (2002) Interferons mediate terminal differentiation of human cortical thymic epithelial cells. *J Virol* **76,** 6415-24.

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 Pirquet, C. E. (1908) Das verhalten der kutanen tuberkulinreaktion wahrend der masern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **34.**

Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W., Howie, D., Okamoto, S., Feske, S., Gullo, C., Clarke, K., Sosa, M. R., Sharpe, A. H. and Terhorst, C. (2004) The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med* **199,** 1255-64.

Ward, B. J., Boulianne, N., Ratnam, S., Guiot, M. C., Couillard, M. and De Serres, G. (1995) Cellular immunity in measles vaccine failure: demonstration of measles antigen-specific lymphoproliferative responses despite limited serum antibody production after revaccination. *J Infect Dis* **172,** 1591-5.

Wilkinson, D. L. and Harrison, R. G. (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli. *Biotechnology (N Y)* **9,** 443-8.

Williams, E. S., Thorne, E. T., Appel, M. J. and Belitsky, D. W. (1988) Canine distemper in black-footed ferrets (Mustela nigripes) from Wyoming. *J Wildl Dis* **24,** 385-98.

Wright, N. G., Cornwell, H. J., Thompson, H. and Lauder, I. M. (1974) Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *Vet Rec* **94,** 86-92.

Yanagi, Y., Cubitt, B. A. and Oldstone, M. B. (1992) Measles virus inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell. *Virology* **187,** 280-9.

Zhang, Y., Li, J., Zhan, Y., Wu, L., Yu, X., Zhang, W., Ye, L., Xu, S., Sun, R., Wang, Y. and Lou, J. (2004) Analysis of serum cytokines in patients with severe acute respiratory syndrome. *Infect Immun* **72,** 4410-5.