Université du Québec
INRS – Institut Armand-Frappier

PLASTICITÉ DE LA RÉGION HYPERVARIABLE ENTRE LES GÈNES DE LA MATRICE ET DE LA FUSION DU VIRUS DE LA MALADIE DE CARRÉ

Par
Alexandre Castan

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

Jury d'évaluation

Examinateur interne	Patrick Labonté, Ph. D. INRS – Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Guy Lemay, Ph. D. Département de microbiologie, Université de Montréal
Directeur de recherche	Veronika von Messling, Dr. Med. Vet. INRS – Institut Armand-Frappier

Droits réservés de Alexandre Castan, 2010

Remerciements

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

- Ma directrice de recherche, Dre Veronika von Messling, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Aussi, pour m'avoir donné l'opportunité de partager le fruit de mes recherches lors de congrès scientifique.

- Tous les membres du laboratoire présents et passés, pour le support technique ainsi que l'appréciation de mon travail. J'aimerais adresser un remerciement spécial au Dre Danielle Anderson qui a contribué de proche à ma formation scientifique. Dr Bevan Sawatsky pour l'aide avec les expérimentations animales. Christophe Goncalves pour son aide avec les ordinateurs.

- Ma famille et mes amis pour leur encouragement et leur appui.

Liste des abréviations

aa : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

CDV : Virus de la maladie de Carré

CeMV : Morbillivirus des cétacés

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique

eGFP : Protéine fluorescente verte

F : Protéine de la fusion

FBS : Sérum bovin fœtal

g : Force centrifuge

h : Heure

H : Hémagglutinine

L : Protéine de la polymérase

LB : Milieu Luria-Bertani

Min : Minute

mL : Millilitre

M : Protéine de la matrice

MOI : Multiplicité d'infection

MeV : Virus de la rougeole

N : Nucléoprotéine

P : Phosphoprotéine

pb : Paire de base

PBMC : Cellule mononucléaire du sang périphérique

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Réaction en chaîne de la polymérase

PDV : Morbillivirus des phoques

p.i. : Post infection

PPRV : Virus de la peste des petits ruminants

RNP : Ribonucléoprotéine

RPV : Virus de la peste bovine

RSV : Virus respiratoire syncytial

SLAM : Molécule du signalement de l'activation lymphocytaire

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

vRdRp : ARN polymérase virale ARN dépendante

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

µg : microgramme

µL : microlitre

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Phylogénie 13

Figure 2 : Organisation du génome des morbillivirus et structure du virion 15

Figure 3 : Région M-F des morbillivirus 16

Figure 4 : Hypervariabilité de la région M-F du CDV 17

Figure 5 : Récupération de virus par génétique inverse 22

Figure 6 : Éruptions cutanées chez les furets infectés par le CDV 28

Figure 7 : Titrage des stocks viraux 31

Figure 8 : Clonage du virus recombinant 58hvMeV 35

Figure 9 : Résultat de digestion enzymatique 37

Figure 10 : Schéma du génome viral et de la région M-F des virus recombinants 44

Figure 11 : Cinétiques de réplications virales 47

Figure 12 : Survie des furets infectés et virémie 48

Figure 13 : Évaluation des signes cliniques 49

Figure 14 : Évaluation de la leucopénie et de l'infection des PBMC 51

Figure 15 : Évaluation de la réponse immunitaire chez les furets infectés par 58hvMeV 52

Figure 16 : Schéma comparatif de la région M-F des virus recombinants 5804PeH et 58hvMeV 54

Figure 17 : Schéma du génome et de la région M-F des virus recombinants 58hv3'MeV et 58hv5'MeV 54

Figure 18 : Cinétiques de réplications virales 55

Figure 19 : Survie des furets infectés et virémie 56

Figure 20 : Évaluation de la leucopénie 58

Figure 21 : Schéma des virus recombinants 58utrMF-NPΔF_{106} et 58utrMF-NP 60

Figure 22 : Schéma du génome et de la région M-F des virus recombinants 58ΔF_{106}-3'Md_{1-174}, 58ΔF_{106}-3'$Md_{175-396}$, 58ΔF_{106}-3'Md_{1-335} et 58ΔF_{106}-3'Md_{1-336}GFP ...61

Figure 23A : Cinétiques de réplications virales 62

Figure 23B : Évaluation du phénotype syncytial 63

Figure 24 : Survie des furets infectés et virémie 66

Figure 25 : Évaluation de l'infection des PBMC 67
Figure 26 : Variabilité entre M 3' et N 3' 69
Tableau I : Amorces utilisées pour le clonage des virus recombinants 34

Résumé

Le virus de la maladie de Carré (CDV) qui infecte de nombreux carnivores appartient au genre *Morbillivirus*. Ce dernier, comprend entre autres le virus de la rougeole (MeV) qui tue encore à nos jours environ 200 000 personnes par année. Le génome des morbillivirus est constitué d'un ARN de polarité négative qui possède six unités transcriptionnelles codant pour huit protéines. Chaque gène est séparé par une région non traduite qui contient les signaux d'initiation et d'arrêt de la transcription. La région M-F située entre les gènes de la matrice et de la fusion est jusqu'à cinq fois plus longue que les autres régions intergéniques. De plus, elle est hypervariable chez le CDV. Récemment, il a été démontré que cette région est essentielle pour la virulence de ce dernier. L'infection des furets par le CDV reproduit la maladie observée chez les humains infectés par le MeV avec une forte fièvre, des rougeurs de peau, des signes gastro-intestinaux et l'immunosuppression. Grâce à ce modèle d'étude, nous avons été en mesure d'identifier les déterminants de la virulence dans la région M-F du CDV.

Par génétique inverse, nous avons produit des virus recombinants à partir d'une souche virulente du CDV dans laquelle la région M-F a été échangée avec celle d'une autre souche virulente ou vaccinale ainsi que celle d'une souche du MeV. *In vitro* et chez le furet les virus recombinants possédant les différentes régions M-F du CDV se sont comportés comme la souche parentale, indiquant ainsi que l'hypervariabilité n'a pas d'impact sur la fonctionnalité de la région. Par contre, l'insertion de la région du MeV a entraîné une légère prolongation de la maladie démontrant que des éléments importants dans le maintien de la virulence sont spécifiques au CDV. De plus, ces éléments ont été localisés dans la portion M 3' de la région M-F puisque l'insertion de cette dernière seule a mené à une prolongation de la maladie.

Des délétions de la région M-F ont permis de souligner l'importance de la longueur de cette dernière dans le maintien de la virulence étant donné que les virus possédant ces délétions ont mené une légère prolongation de la maladie. Toutefois, il a été démontré que ce sont des éléments conservés dans la portion M 3' qui sont responsables du contrôle de la virulence par la région M-F. En effet, le remplacement de la portion M 3' par une séquence aléatoire a entraîné l'atténuation du CDV.

En résumé, cette étude a identifié des éléments conservés dans la région M 3' comme déterminants principaux de la fonction régulatrice de la région M-F. En plus d'augmenter nos connaissances de la biologie morbillivirale, nos résultats suggèrent aussi une nouvelle approche de production des virus atténués.

Table des matières

Remerciement ii
Liste des abréviations iii
Liste des figures et tableaux v
Résumé vii
Table des matières ix
Chapitre 1 : Revue de la littérature 12
1.1 Les Morbillivirus 12
1.1.1 Taxonomie 12
1.1.1.1 La famille des *Paramyxoviridae* 12
1.1.1.2 Le genre Morbillivirus 12
1.2 Génome morbillivirale 14
1.2.1 Organisation génomique et protéines 14
1.2.2 Régions non traduites (UTR) 15
1.3 Cycle de réplication 18
1.3.1 Attachement et fusion 18
1.3.2 Cycle de réplication viral 18
1.3.2.1 Transcription des ARNm 19
1.3.2.2 Réplication du génome 19
1.3.3 Assemblage et relâche des virions 20
1.3.4 Génétique inverse 20
1.4 Pathogenèse morbillivirale 23
1.4.1 Route d'infection 23
1.4.2 Immunosuppression 24
1.4.3 Réponse immunitaire 24
1.4.4 Complications 25
1.4.4.1 Complications neurologiques associées à la rougeole 25
1.4.4.2 Complications neurologiques associées au CDV 25
1.5 Modèles d'étude animaux 26
1.5.1 Modèles animaux pour l'étude de la pathogenèse morbillivirale 26

1.5.2 Modèles animaux pour l'étude de la pathogenèse du CDV 27
Chapitre 2 : Objectifs du projet 29
Chapitre 3 : Matériel et méthodes 30
3.1 Cellules et virus 30
3.1.1 Lignées cellulaires et leur entretien 30
3.1.2 Souches virales et préparation des stocks viraux 30
3.1.3 Titrage des stocks viraux 31
3.2 Production des virus recombinants 32
3.2.1 Stratégie de clonage 32
3.2.1.1 Clonage du virus recombinant 58hvMeV 33
3.2.1.2 Récupération des virus recombinants 37
3.3 Caractérisation *in vitro* des virus recombinants 38
3.4 Caractérisation *in vivo* des virus recombinant 39
3.4.1 Infection et prélèvement du sang 39
3.4.2 Suivi clinique 40
3.4.3 Évaluation de la virémie 40
3.4.4 Évaluation des paramètres immunologiques 41
3.4.4.1 Comptes des leucocytes 41
3.4.4.2 Analyse des PBMC par cytométrie en flux 41
3.4.4.3 Test de neutralisation 42
Chapitre 4 : Résultats 43
4.1 Échange de la région M-F entre différentes souches de CDV et de MeV 43
4.1.1 Caractérisation des virus recombinants *in vitro* 43
4.1.1.1 Évaluation de l'efficacité de réplication des virus recombinants 44
4.1.1.2 Évaluation du phénotype syncytial des virus recombinants 45
4.1.2 Évaluation du phénotype viral chez le furet 45
4.1.2.1 Virulence des virus recombinants 45
4.1.2.2 Leucopénie induite par le virus possédant la région M-F de MeV 50
4.1.2.3 Réponse immunitaire des furets infectés par 58hvMeV 50
4.2 Introduction de la portion M 3' ou F 5' de MeV dans la région M-F de CDV 53
4.2.1 Caractérisation des virus recombinants *in vitro* 53

4.2.2 Évaluation de la virulence chez le furet 53
4.2.2.1 Leucopénie induite par 58hv3'MeV 57
4.3 Délétions de la portion M 3' de la région M-F du CDV ou remplacement par une séquence aléatoire 59
4.3.1 Caractérisation des virus recombinants *in vitro* 59
4.3.2 Évaluation du phénotype viral chez le furet 64
4.3.3 Évaluation de l'infection des PBMC par les différents virus recombinants 65
Chapitre 5 : Discussion 68
5.1 Des éléments conservés dans l'UTR M 3' sont responsables du contrôle de la virulence exercé par la région M-F chez le CDV 68
5.2 Importance de la longueur de la région M-F dans le maintien de la virulence 72
5.3 Approche rationnelle pour le développement de nouveaux vaccins morbillivirals 73
5.4 Perspectives 75
Liste des références 77

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1.1 Les Morbillivirus

1.1.1 Taxonomie

1.1.1.1 La famille des *Paramyxoviridae*

L'ordre des *Mononegavirales* regroupe les virus enveloppés dont le génome non segmenté est composé d'un ARN simple brin de polarité négative. Selon le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV), cet ordre se divise en quatre familles : *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* et *Rhabdoviridae*. La famille des *Paramyxoviridae* se divise en deux sous-familles, les *Paramyxovirinae* et les *Pneumovirinae* qui possèdent une nucléocapside plus petite et une protéine d'attachement différente (Pringle, 2005). La sous-famille *Paramyovirinae* comprend cinq genres : *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* et *Rubulavirus*. Cette classification est basée sur leur morphologie, l'organisation génomique, l'activité biologique des protéines et l'homologie des séquences des protéines codées (Lamb et Parks, 2007).

1.1.1.2 Le genre Morbillivirus

Six espèces sont retrouvées au sein du genre *Morbillivirus* (Fig. 1). Des études immunologiques comparatives suggèrent que le virus de la peste bovine (*rinderpest virus*, RPV) représente l'archétype du genre *Morbillivirus* (Norrby et al., 1985). Le RPV infecte les gros ruminants de l'ordre Artiodactyla, plus particulièrement le bétail, ainsi que certaines espèces sauvages telles que le buffle, le cerf et la girafe (Hamdy et al., 1975; Kock et al., 1999; Plowright, 1982). En traversant la barrière d'espèces, le spectre d'hôte se serait étendu à l'ordre Carnivora menant à l'apparition du virus de la maladie de Carré (*canine distemper virus*, CDV) (Wild et al., 1995). Plusieurs espèces de carnivores sont infectées par ce virus comme le chien, le furet, le raton laveur, le lion ainsi que le phoque

(Appel et al., 1994; Lyons et al., 1993; Svansson et al., 1993; Williams et al., 1988). Plus tard, lorsque l'homme commença à vivre en communauté, le RPV se serait adapté à ce dernier donnant naissance au virus de la rougeole (*measles virus*, MeV) (Barrett, 1999; Wild et al., 1995). Selon l'OMS, MeV est responsable du décès de 197 000 personnes par année (Santé, 2009). Le virus de la peste des petits ruminants (*peste des petits ruminants virus*, PPRV) dont les hôtes appartiennent à l'ordre Artiodactyla comme pour le RPV, infecte majoritairement les petits ruminants que sont le mouton et la chèvre (Taylor, 1984). Plus récemment, il a été démontré que les morbillivirus infectent certains mammifères marins. Le morbillivirus des cétacés (*cetacean morbillivirus*, CeMV) infecte les dauphins et les marsouins (Blixenkrone-Moller et al., 1994; Kennedy et al., 1991) et le morbillivirus du phoque (*phocine distemper virus*, PDV) infecte les phoques (Cosby et al., 1988). Des études immunologiques ont démontré une forte proximité entre le CDV et le PDV (Örvell et al., 1990) suggérant que le PDV dériverait du CDV (Barrett, 1999).

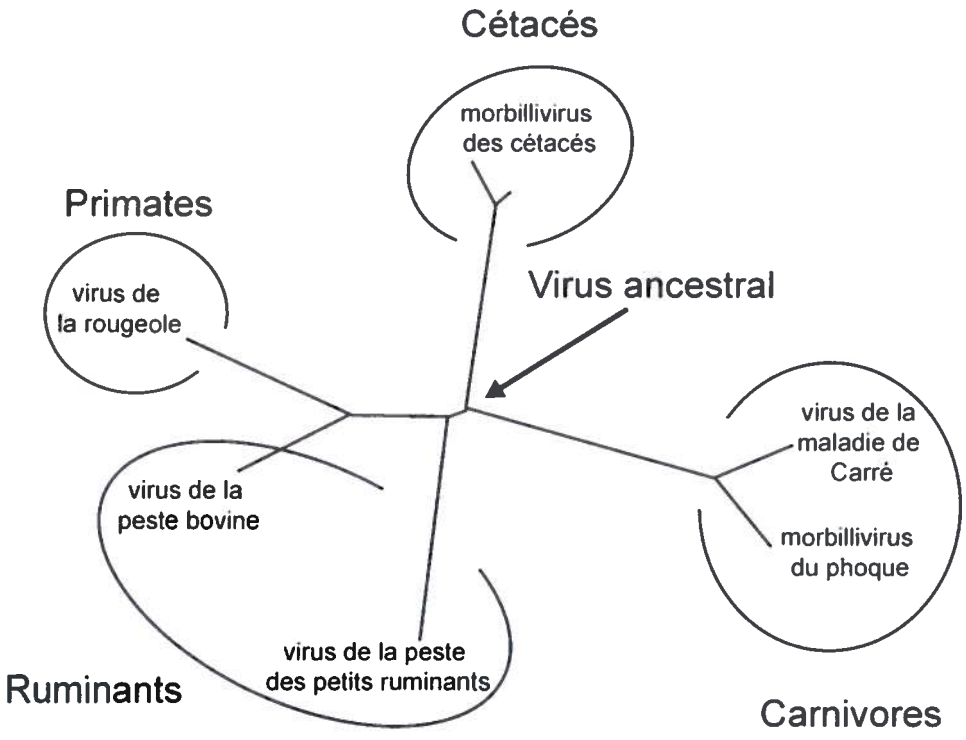


Figure 1 : Phylogénie. Arbre phylogénétique des morbillivirus basé sur la séquence partielle du gène P. Adaptée de Barrett, 1999.

1.2 Génome morbillivirale

1.2.1 Organisation génomique et protéines

Le génome à ARN des morbillivirus varie en taille, allant de 15 à 16 kilobases et comprend six unités transcriptionnelles. Il débute par une région 3' extracistronique nommée « leader » et se termine par une région 5' extracistronique nommée « trailer ». Ces régions sont essentielles dans le contrôle de la transcription et de la réplication virale (Lamb et Parks, 2007). Des régions non traduites (*untranslated regions*, UTR) encadrent chaque gène et possèdent le signal d'activation de la transcription ainsi que le signal de polyadénylation qui marque la fin de la transcription. Un triplet de nucléotides formant la région intergénique sépare chaque gène (Fig. 2).

Les six gènes codent pour huit protéines. Dans l'ordre, le premier gène code pour la nucléocapside (N) qui enveloppe le génome viral grâce à sa capacité de lier l'ARN viral (Liston et al., 1997). L'association de la nucléocapside avec l'ARN viral forme une structure hélicoïdale dont différentes fonctions ont été proposées telles que la protection contre la digestion par les nucléases (Compans et Choppin, 1968). Le gène de la phosphoprotéine (P) code pour trois protéines soient P, V et C. La protéine P joue un rôle essentiel dans la synthèse d'ARN viral en tant que cofacteur de l'ARN polymérase virale (Hamaguchi et al., 1983; Horikami et al., 1992). La protéine V est codée par le cadre de lecture de P altéré par l'addition d'un résidu G via un mécanisme de « RNA editing » alors que la protéine C est codée par un cadre de lecture alternatif (Haas et al., 1995). Les protéines V et C sont dites accessoires, car elles ne sont pas essentielles pour la réplication virale (Radecke et Billeter, 1996; Schneider, Kaelin, et Billeter, 1997). Toutefois, elles interfèrent avec les mécanismes antiviraux de l'immunité innée (Palosaari et al., 2003; Shaffer, Bellini, et Rota, 2003). Le gène de la matrice (M) code pour la protéine M qui joue un rôle important dans l'assemblage des virus. En effet, la protéine M s'associe avec la membrane plasmique (Riedl et al., 2002) ainsi qu'avec la queue cytoplasmique des glycoprotéines d'hémagglutinine (H) et de la fusion (F) (Cathomen, Naim, et Cattaneo, 1998; Tahara, Takeda, et Yanagi, 2007). Ces protéines codées par les gènes H et F sont respectivement nécessaires à l'attachement du virus à la cellule hôte et à la fusion pH indépendante des membranes (Lamb et Parks, 2007). La protéine de la

polymérase (L) représente la sous-unité catalytique qui, avec la protéine P forme l'ARN polymérase virale ARN dépendante (vRdRp) (Hercyk, Horikami, et Moyer, 1988; Ogino et al., 2005). Ensemble, les protéines N, P, L et l'ARN génomique forment le complexe ribonucléoprotéique (RNP) qui est l'unité réplicative (Rima et Duprex, 2009).

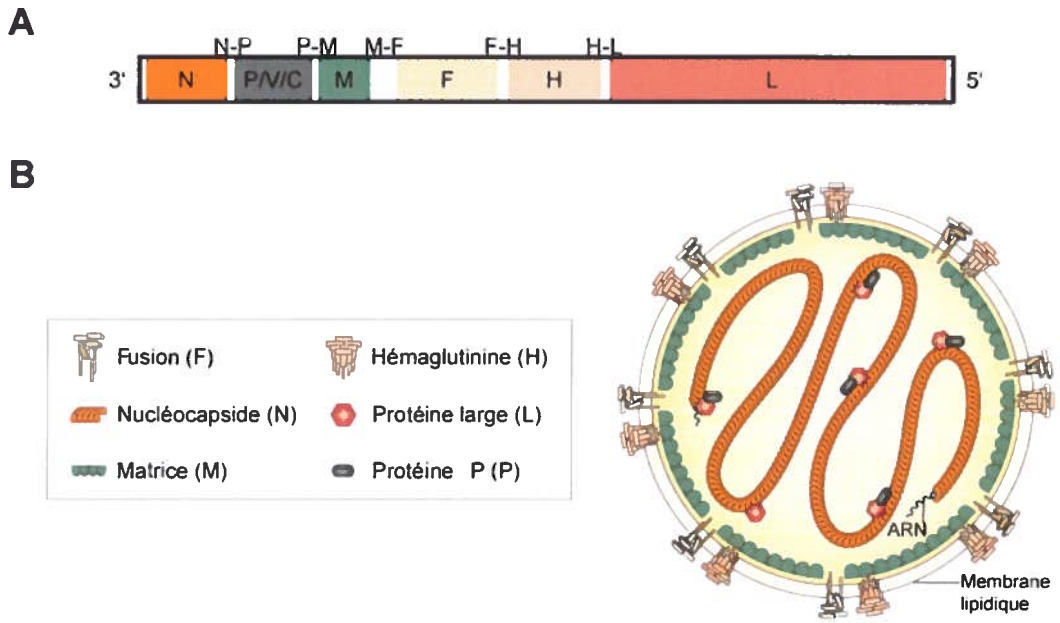


Figure 2 : Organisation du génome des morbillivirus et structure du virion. (**A**) Génome des morbillivirus avec les six gènes en couleur et les régions non traduites (*untranslated regions*, UTR) en blanc. (**B**) Structure du virion. Le complexe ribonucléoprotéique (RNP) est formé par l'ARN génomique associé à la nucléocapside, la protéine large et la protéine P. Le RNP est envelopé par une membrane lipidique à laquelle est associée la protéine de la matrice. Les protéines de fusion et hémaglutinine sont insérées dans la membrane. Figure adaptée de Moss et Griffin, 2008.

1.2.2 Régions non traduites (UTR)

Entre chaque gène se trouve un UTR qui comprend les régions 3' non traduite, 5' non traduite et le triplet intergénique. Les UTR des morbillivirus sont généralement de 100 à 200 bases de long à l'exception de l'UTR entre les gènes M et F qui varient entre 0,8 et 1 kilobases (Fig. 3). De plus, cette région est hypervariable chez le CDV (Liermann et al., 1998) (Fig. 4). Chez le MeV, l'UTR M-F contrôle la réplication et la

cytopathogénicité du virus en augmentant la production de la protéine M et en diminuant la production de la protéine F, respectivement (Hasel et al., 1987; Takeda et al., 2005). De même, il a été suggéré que l'UTR M-F du CDV et du RPV contrôle l'expression de F (Evans, Belsham, et Barrett, 1990), et plus récemment il a été démontré pour le CDV que ce contrôle se fait au niveau transcriptionel et module la virulence (Anderson et von Messling, 2008).

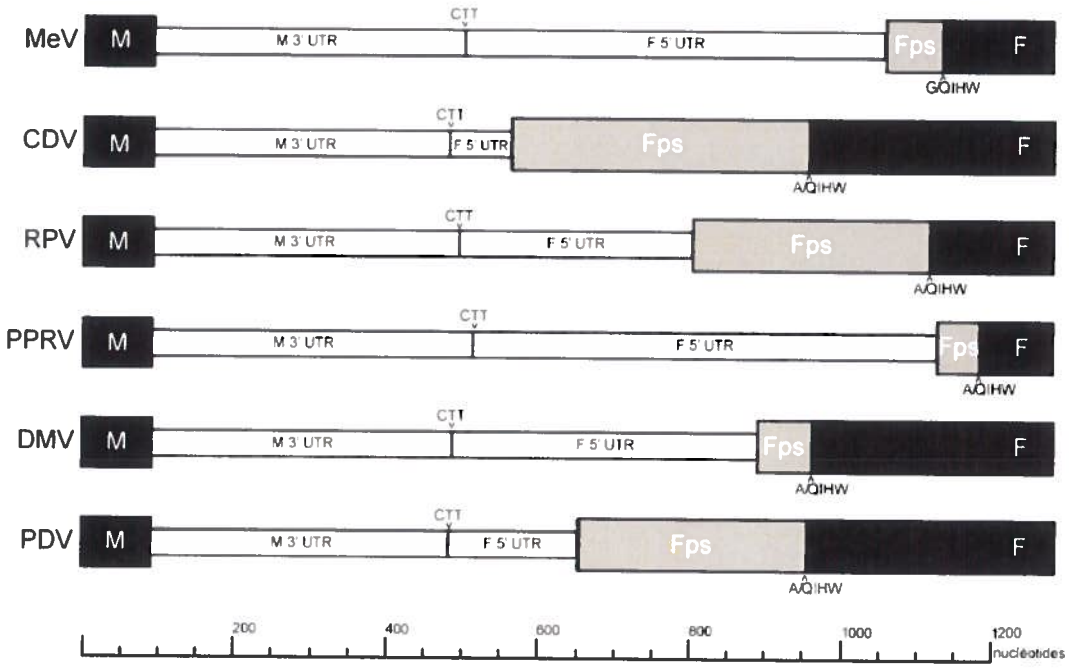
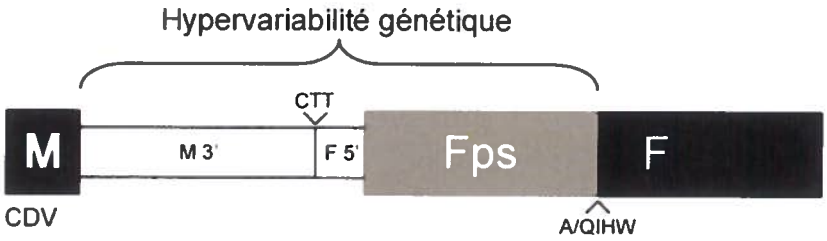


Figure 3 : Régions M-F des morbillivirus. La région M-F est composée d'une région non traduite (*untranslated region,* UTR) séparée en M 3' et F 5' par le triplet intergénique CTT. Le peptide signal de la glycoprotéine F (Fps) fait partie de la région M-F. Modifiée de Anderson et von Messling, 2008.

A



B

Souches	Région N-P	Gène M	Région M-F	Gène F mature
5804P/A75	4%	3%	8%	3%
5804P/OS	4%	6%	17%	6%
A75/OS	5%	5%	17%	5%

Figure 4 : Hypervariabilité de la région M-F du CDV. (**A**) La séquence de la région M-F du CDV entre la fin du gène M et le site de clivage de la glycoprotéine F marqué par la séquence en aa A/QIHW a été analysée. (**B**) La comparaison de la séquence en acides nucléiques de cette région entre les souches virulentes 5804P et A75 à d'autres régions du génome montre une variabilité deux fois plus élevée. Cette variabilité est trois fois plus importante entre les souches virulentes et la souche vaccinale OS.

1.3 Cycle de réplication

1.3.1 Attachement et fusion

L'infection d'une cellule par un morbillivirus débute par l'attachement de ce dernier à la surface cellulaire médié par la protéine H (Navaratnarajah et al., 2008). La molécule du signalement de l'activation lymphocytaire (SLAM, CD150) a été identifiée comme récepteur général des morbillivirus (Baron, 2005; Tatsuo et al., 2000; Tatsuo, Ono, et Yanagi, 2001). Elle se retrouve sur les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques ainsi que les macrophages (Cocks et al., 1995; Wang et al., 2004). De plus, il a été montré que la molécule CD46, qui est un cofacteur du complément, sert de récepteur pour la souche vaccinale de MeV (Naniche et al., 1993). D'autres récepteurs existeraient au niveau des cellules épithéliales puisqu'il a été démontré que MeV est capable d'infecter ces dernières indépendamment de la présence des récepteurs SLAM et CD46 (Andres et al., 2003; Hashimoto et al., 2002).

Suite à l'attachement de H au récepteur viral, la protéine F subit un changement conformationnel permettant ainsi la fusion des membranes virale et cellulaire (Navaratnarajah, Leonard, et Cattaneo, 2009). La présence des deux glycoprotéines est donc nécessaire pour initier la fusion (Wild, Malvoisin, et Buckland, 1991). Toutefois, afin que la protéine F possède son activité fusogénique elle doit être clivée (Scheid et Choppin, 1977). Dans le cas des morbillivirus, le précurseur F_0 inactif est clivé au niveau de l'appareil de Golgi par la furine (Bolt et Pedersen, 1998; Watanabe et al., 1995), résultant en la forme active qui comprend les sous-unités F_1 et F_2 liées par un pont disulfure (Dutch et al., 2001; Scheid et Choppin, 1977).

1.3.2 Cycle de réplication viral

La plupart des connaissances sur le cycle de réplication des morbillivirus sont dérivées des observations effectuées chez d'autres paramyxovirus ainsi que du virus de la stomatite vésiculaire qui appartient à l'ordre des *Mononegavirales*.

1.3.2.1 Transcription des ARNm

Suite à l'entrée du RNP dans le cytoplasme, ce dernier est utilisé comme matrice pour la production des ARNm de chaque gène. La vRdRp accéderait aux gènes à partir de l'extrémité 3' du génome afin d'initier la transcription en débutant avec le gène N. Pour chaque gène la transcription commence au niveau du GS (*gene start*) et se termine au GE (*gene end*) (Lamb et Parks, 2007). Les ARN messagers possèdent une coiffe 5' et une queue poly-A (Hall et ter Meulen, 1977; Yoshikawa, Mizumoto, et Yamanouchi, 1986). Lorsque la vRdRp termine la transcription d'un gène, elle reste attachée au génome tout en traversant la région intergénique et réinitie la transcription du prochain gène au GS en aval. Toutefois, la fréquence de réinitiation diminue plus la vRdRp s'éloigne de l'extrémité 3' (Cattaneo et al., 1987). Il en résulte un gradient de transcription des ARNm avec le gène N étant le plus transcrit et le gène L le moins transcrit.

1.3.2.2 Réplication du génome

La synthèse de nouveaux génomes de polarité négative, requiert la production d'intermédiaire que sont les antigènomes de polarité positive. Ces derniers servent alors de matrices pour la formation de génomes. Contrairement à la transcription, la vRdRp ignore les signaux GS et GE lors de la réplication (Lamb et Parks, 2007). La transition de la vRdRp du mode transcription au mode réplication serait contrôlée par la quantité de protéine N non assemblée (Blumberg, Leppert, et Kolakofsky, 1981; Vidal et Kolakofsky, 1989). Cela concorde avec le fait que la réplication et l'encapsidation des molécules d'ARN (génome et antigénome) nouvellement formées s'effectuent simultanément (Gubbay, Curran, et Kolakofsky, 2001). De plus, l'inhibition de la synthèse protéique à l'aide de cycloheximide empêche la réplication, mais pas la transcription d'ARNm (Hall, Genius, et ter Meulen, 1977; Vidal et Kolakofsky, 1989).

Les polymérases virales sont recrutées au niveau des génomes nouvellement formés grâce à l'interaction entre P et N, ce qui permet la formation des RNP (Kingston, Baase, et Gay, 2004). Ces RNPs sont ensuite utilisés pour l'assemblage des virions.

1.3.3 Assemblage et relâche des virions

La production des nouveaux virions nécessite l'assemblage des différentes composantes virales au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. La protéine M joue un role clé dans ce processus, car elle permet le transport des RNP à la membrane plasmique (Iwasaki et al., 2009; Runkler et al., 2007). De plus, son association avec les queues cytoplasmiques des glycoprotéines de surface F et H (Cathomen, Naim, et Cattaneo, 1998; Tahara, Takeda, et Yanagi, 2007) permet le rassemblement des éléments nécessaires à la production des virions. Avant d'être transporté à la membrane plasmique F et H doivent être glycosylées ainsi qu'oligomérisées en trimère et dimère, respectivement, au niveau du réticulum endoplasmique (Hu et al., 1995; Plemper, Hammond, et Cattaneo, 2001; Sato, Kohama, et Sugiura, 1988). De plus, la protéine F doit être clivée dans l'appareil de Golgi (Bolt et Pedersen, 1998) résultant en sa forme active F_1 + F_2 lié par un pont disulfure (Scheid et Choppin, 1977). Lorsque toutes les composantes virales sont assemblées, les virions sont relâchés par bourgeonnement (Lamb et Parks, 2007).

1.3.4 Génétique inverse

La génétique inverse permet la production de virus recombinants. Comme les virus à ARN de polarité négative nécessitent leur propre complexe de réplication, la production de virus recombinants implique la transcription du génome d'ARN en présence du complexe de réplication dans la même cellule. Le premier système de récupération pour le MeV consistait en l'utilisation de cellules 293 exprimant l'ARN polymérase du bactériophage T7 et les protéines N et P de MeV (Fig. 5A) (Radecke et al., 1995). Ces cellules sont ensuite transfectées avec des plasmides codant pour l'antigénome et la protéine L de MeV, sous le contrôle du promoteur T7. L'ARN polymérase T7 permet alors la transcription de l'antigénome qui est encapsidé par N et sert de matrice pour la transcription du génome par la vRdRp formée par P et L. Le génome sert ensuite à la transcription des ARNm menant à l'assemblage et à la relâche des virions. Une variation de ce système utilisant un virus de la vaccine recombinant codant pour l'ARN polymérase T7 a été ensuite utilisé (Schneider et al., 1997). Récemment, un système de

récupération du MeV a été établi, dans lequel cinq plasmides codant pour l'ARN polymérase T7, les protéines N, P et L et l'antigénome sont transfectés dans des cellules 293T (Fig. 5B) (Martin, Staeheli, et Schneider, 2006). Outre le MeV, des systèmes de génétique inverse existent aussi pour le RPV et le CDV (Baron et Barrett, 1997; Gassen et al., 2000).

La récupération de virus ARN à brin négatif à partir d'ADNc est utile dans la compréhension de leur biologie puisqu'il est possible de modifier le génome via des mutations, des délétions et l'insertion de fragments (Billeter, Naim, et Udem, 2009). Toutefois, lorsque des modifications sont apportées au génome, la règle de six doit être satisfaite afin que l'efficacité de réplication ne soit pas perturbée (Calain et Roux, 1993). Cette règle stipule que le nombre total de bases du génome doit être un multiple de six. Ceci découle du fait que la protéine N interagit avec le génome viral de telle manière que chaque molécule recouvre une longueur de six bases (Egelman et al., 1989).

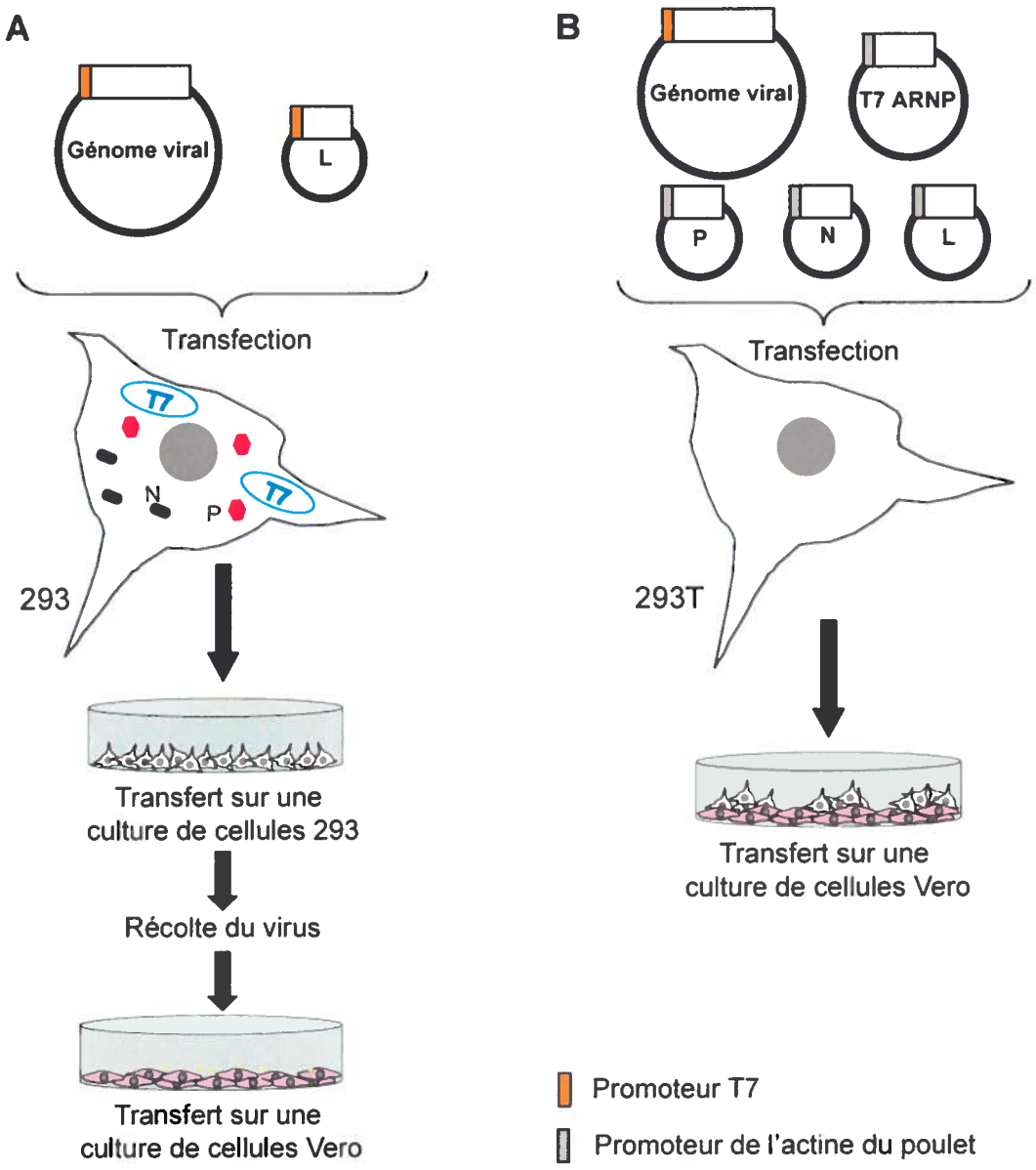


Figure 5 : Récupération de virus par génétique inverse. **(A)** Modèle de Radecke et al. Des cellules 293 exprimant les protéines N, P et l'ARN polymérase du bactériophage T7 (T7) sont transfectées avec deux plasmides codant pour l'antigénome virale et la polymérase L. Ces cellules sont par la suite transférées sur une culture de 293 afin de propager le virus. Les cellules sont récoltées puis le virus présent dans le surnageant est utilisé pour l'infection de cellules Vero pour une meilleure propagation du virus. **(B)** Modèle de Martin et al. Des cellules 293T sont transfectées avec le plasmide codant pour l'antigénome sous le contrôle du promoteur T7, et les plasmides codant pour T7, N, P et L sous le contrôle du promoteur hautement efficace de l'actine du poulet. Les 293T sont transférées sur une culture de cellules Vero pour une meilleur propagation du virus.

1.4 Pathogenèse morbillivirale

Les morbillivirus induisent une maladie similaire chez leurs hôtes respectifs. Les caractéristiques d'une infection morbillivirale sont une forte fièvre se déclarant durant la première semaine de l'infection, suivi par l'apparition de rougeurs de peau, des signes gastro-intestinaux et respiratoires (Appel, 1969; Bundza et al., 1988; Duignan et al., 1993; Griffin, 2007; Plowright, 1968). De plus, les morbillivirus engendrent une immunosuppression ce qui laisse place à des infections bactériennes secondaires (Beckford, Kaschula, et Stephen, 1985; Heaney, Barrett, et Cosby, 2002; Krakowka, Higgins, et Koestner, 1980). La mortalité associée aux morbillivirus varie dépendamment de l'espèce. Le MeV est généralement non létal et les cas de mortalité sont souvent liés à des infections secondaires (Moss et Griffin, 2006). Une mortalité d'environ 50 % est observée chez les chiens infectés par le CDV alors qu'elle peut atteindre 90 à 100 % chez le furet (Appel, 1969; Dunkin et Laidlaw, 1926). Le RPV chez les bovins est létal dans la majorité des cas alors que pour le PPRV la mortalité varie entre 20 et 90 % (Barrett et Rossiter, 1999; Roeder et Obi, 1999). La mort de millier de phoques en Europe du Nord en 1988 souligne la létalité du PDV (Kennedy, 1990).

1.4.1 Route d'infection

Hautement contagieux, les morbillivirus se transmettent par aérosols (Appel, 1969; Griffin, 2007). Jusqu'à récemment, il était considéré qu'une infection primaire s'établit au niveau du tractus respiratoire supérieur où la réplication virale s'effectue dans les cellules épithéliales, suivi par une infection secondaire des tissus lymphoïdes (Griffin, 2001; Sakaguchi et al., 1986). Des études récentes suggèrent que l'infection primaire prendrait plutôt place dans les tissus lymphoïdes situés au niveau du tractus respiratoire supérieur (de Swart et al., 2007; von Messling, Milosevic, et Cattaneo, 2004). Puis, les lymphocytes infectés et circulant dans le sang propageraient l'infection aux autres tissus lymphoïdes du corps ainsi qu'aux cellules épithéliales de divers organes tels que les poumons et la vessie (Leonard et al., 2008).

1.4.2 Immunosuppression

C'est en 1908 que l'immunosuppression morbillivirale fut observée pour la première fois. von Pirquet remarqua que la réponse d'hypersensibilité de type retardé (*delayed-type hypersensitivity*, DTH) à la tuberculine est supprimée chez les personnes atteintes de MeV (von Pirquet, 1908). Plus tard, il a été démontré que les lymphocytes des patients ont une activité proliférative fortement supprimée, lorsque stimulée par des mitogènes (Hirsch et al., 1984). Les patients atteints de MeV subissent une lymphopénie marquée par une diminution des lymphocytes T CD8+ et CD4+ (Ryon et al., 2002). Ces différents aspects de l'immunosuppression sont aussi observés chez le chien et le furet infectés par le CDV ainsi que chez le lapin qui sert de modèle expérimental pour le RPV (Krakowka, Higgins, et Koestner, 1980; von Messling et al., 2003; Yamanouchi, Chino et al., 1974; Yamanouchi, Fukuda et al., 1974). L'immunosuppression peut se prolonger au-delà de la maladie bien que le virus ne soit plus détecté (Hirsch et al., 1984; Krakowka, Higgins, et Koestner, 1980; Okada et al., 2000). Par contre, les mécanismes de l'immunosuppression sont peu connus.

1.4.3 Réponse immunitaire

La réponse immunitaire lors d'une infection morbillivirale détermine l'éfficacité d'élimination du virus et la survie (Appel, 1969; Moss et Griffin, 2006). Elle est caractérisée par la production d'anticorps dirigés contre le virus qui coïncide avec l'apparition des rougeurs de peau (Griffin, 2007; von Messling et al., 2003). Les IgM sont les premiers à être produits et les IgG apparaissent par la suite (Helfand et al., 1997; Isa et al., 2001). Les anticorps dirigés contre la protéine N sont fortement et rapidement produits, et ceux dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe apparaissent par la suite (Graves et al., 1984; Miele et Krakowka, 1983; Norrby et Gollmar, 1972). Ces derniers ont une activité neutralisante et sont donc particulièrement important dans la survie à l'infection (Appel, Mendelson, et Hall, 1984; Malvoisin et Wild, 1990). La réponse immunitaire cellulaire est moins bien caractérisée. Par contre, une contribution des lymphocytes T cytotoxiques a été rapporté pour l'élimination du virus (Jaye et al., 1998; Mitra-Kaushik, Nayak, et Shaila, 2001).

1.4.4 Complications

1.4.4.1 Complications neurologiques associées à la rougeole

Après la diarrhée et la pneumonie bactérienne secondaire, les complications neurologiques associées au MeV sont les plus importantes, représentant 0,1% des cas (Moss et Griffin, 2009). Trois complications neurologiques distinctes existent : l'encéphalite postinfectieuse (*postinfectious encephalomyelitis*, PIE) qui touche environ une personne sur 1000 avec un taux de mortalité de 10 à 20 % se déclare généralement durant la première semaine suivant l'apparition des éruptions cutanées et est associée avec une réponse immunitaire contre la protéine basique de la myéline (Johnson et al., 1984; Young et Rall, 2009). L'encéphalite aiguë à inclusions (*measles inclusion body encephalitis*, MIBE) et la panencéphalite sclérosante subaiguë (*subacute sclerosing panencephalitis*, SSPE) sont des complications plus rares affectant les personnes immunodéprimées et les enfants ayant contracté le MeV avant deux ans, respectivement (Griffin, 2007).

1.4.4.2 Complications neurologiques associées au CDV

Comme le MeV, le CDV est capable d'infecter le système nerveux central. Deux types de complications neurologiques sont retrouvés chez le chien (Beineke et al., 2009). La polioencéphalite se présente sous trois formes : l'encéphalite post vaccinale (*post-vaccinal encephalitis,* PVE) se déclare chez les chiens 1 à 3 semaines suite à la vaccination par un virus vivant modifié (Bestetti, Fatzer, et Frankhauser, 1978), l'encéphalite du vieux chien (*old dog encephalitis*, ODE) qui affecte comme son nom l'indique les vieux chiens est caractérisée par des corps d'inclusion retrouvés dans les neurones et les cellules gliales (Lincoln et al., 1973), et la polioencéphalite à corps d'inclusions (*inclusion body polioencephalitis*, IBP) pour laquelle il est suggéré que la faible expression des protéines du virus favoriserait la persistance virale par l'absence de grande quantité d'antigènes viraux (Nesseler et al., 1997; Nesseler et al., 1999). Le deuxième type de complication neurologique est la leucoencéphalite démyélinisante (*demyelinating leukoencephamyelitis*, DL) qui affecte majoritairement le cervelet (Baumgärtner, Örvell, et Reinacher, 1989).

Chez le furet, il est également possible d'observer une infection du système nerveux central par le CDV (Rudd, Cattaneo, et von Messling, 2006). Une corrélation a été démontré entre la durée de la maladie et la neurovirulence du CDV. En effet, la neuroinvasion résulte d'une maladie prolongée (Bonami, Rudd, et von Messling, 2007).

1.5 Modèles d'étude animaux

1.5.1 Modèles animaux pour l'étude de la pathogenèse morbillivirale

Parmi les animaux utilisés pour l'étude de la pathogenèse morbillivirale, les macaques ont grandement permis l'avancée des connaissances sur le MeV. C'est grâce aux macaques que le MeV a été identifié comme étant l'agent causal de la rougeole en 1911 (Goldberger et Anderson, 1911). Les espèces rhésus et cynomolgus sont les plus souvent utilisées comme modèles (El Mubarak et al., 2007). Les signes cliniques de la maladie chez les macaques ressemblent à ceux retrouvés chez l'homme avec des éruptions cutanées et la conjonctivite (Auwaerter et al., 1999; McChesney et al., 1997). De plus, plusieurs similarités peuvent être observées au niveau de la pathologie telle que la présence de cellules géantes dans les tissus lymphoïdes (McChesney et al., 1997). Les macaques se sont avérés particulièrement intéressants pour le développement des vaccins (Zhu et al., 2000). De plus, ils ont été utilisés pour étudier l'effet de la présence d'anticorps maternels sur l'efficacité de la vaccination (van Binnendijk et al., 1997).

Les rats cotonniers peuvent être infectés par les souches vaccinales de MeV ainsi que par les souches sauvages avec une plus faible efficacité (Wyde et al., 1992). Toutefois, la réplication des virus est majoritairement limitée aux tissus pulmonaires (Pfeuffer et al., 2003). Ce modèle, contrairement aux macaques, ne reproduit pas aussi bien la maladie observée chez les humains. Néanmoins, les rats cotonniers ont servis à étudier le rôle de la protéine V de MeV ainsi qu'à caractériser l'immunosuppression typique du MeV (Niewiesk, Götzelmann, et ter Meulen, 2000; Tober et al., 1998).

Grâce à la découverte des récepteurs de MeV, il est possible de générer des souris transgéniques exprimant ces récepteurs ce qui les rends susceptible à l'infection par le virus. Des souris transgéniques exprimant le CD46 humain de manière ubiquitaire ont été produites, mais elles ne développent pas de maladie suite à l'infection (Niewiesk et al.,

1997). Toutefois, certaines cellules isolées de différents tissus de ces souris telles que les lymphocytes T et des cellules pulmonaires, supportent la réplication du virus (Horvat et al., 1996). L'injection intracérébrale de MeV chez des souris transgéniques exprimant le CD46 dans les neurones entraîne des neuropathologies (Evlashev et al., 2000; Rall et al., 1997). Une immunosuppression a pu être observée chez des souris transgéniques CD46 constituant ainsi un modèle pour l'étude des mécanismes de l'immunosuppression de MeV (Oldstone et al., 1999). Des souris exprimant le CD150 humain ont été aussi produites et constituent un modèle pour l'étude de l'interaction du MeV avec les cellules immunitaires (Welstead et al., 2005).

1.5.2 Modèles animaux pour l'étude de la pathogenèse du CDV

Le chien sert de modèle animal pour l'étude de la pathogenèse du CDV puisqu'il fait partie des hôtes naturels du virus. Le chien développe une maladie similaire au MeV avec une fièvre, des rougeurs de peau, une immunosuppression, des signes gastro-intestinaux et respiratoires ainsi que des complications neurologiques dans certains cas (Appel, 1969; Krakowka, 1982; Krakowka, Cockerell, et Koestner, 1975). Cet animal a été utilisé dans l'étude des complications neurologiques associées au MeV mais aussi dans le développement de nouveaux vaccins (Cherpillod et al., 2000; Higgins et al., 1982; Vandevelde et al., 1982). L'utilisation du chien comme modèle est limitée par la variabilité de la sévérité de la maladie chez ces derniers (Appel, 1969).

Le furet, est un hôte hautement susceptible au CDV (Dunkin et Laidlaw, 1926). En effet, l'infection de furets par des souches létales du CDV entraîne une maladie dont les signes cliniques sont similaires à ceux de la rougeole. L'apparition d'éruptions cutanées (Fig. 6), la fièvre, l'immunosuppression incluant une sévère leucopénie et des troubles gastro-intestinaux et respiratoires sont observées chez les furets malades (Kauffman, Bergman, et O'Connor, 1982; von Messling, Milosevic, et Cattaneo, 2004; von Messling et al., 2003). De plus, certaines souches dites neurotropes entraînent une infection du système nerveux central vers la fin de la maladie ce qui permet l'étude de la neuroinvasion des morbillivirus (Bonami, Rudd, et von Messling, 2007; Rudd, Cattaneo, et von Messling, 2006). L'infection intracérébrale de furets avec des isolats humains provenant de patients atteints de SSPE a permis d'approfondir les connaissances sur cette

complication neurologique associée au MeV (Brown et al., 1985; Thormar et al., 1985). Le furet constitue aussi un modèle pour l'essai de nouveaux vaccins contre le CDV (Stephensen et al., 1997), et il s'est avéré utile dans l'étude de l'effet des anticorps maternels sur l'efficacité de différents vaccins (Griot et al., 2004; Welter et al., 2000).

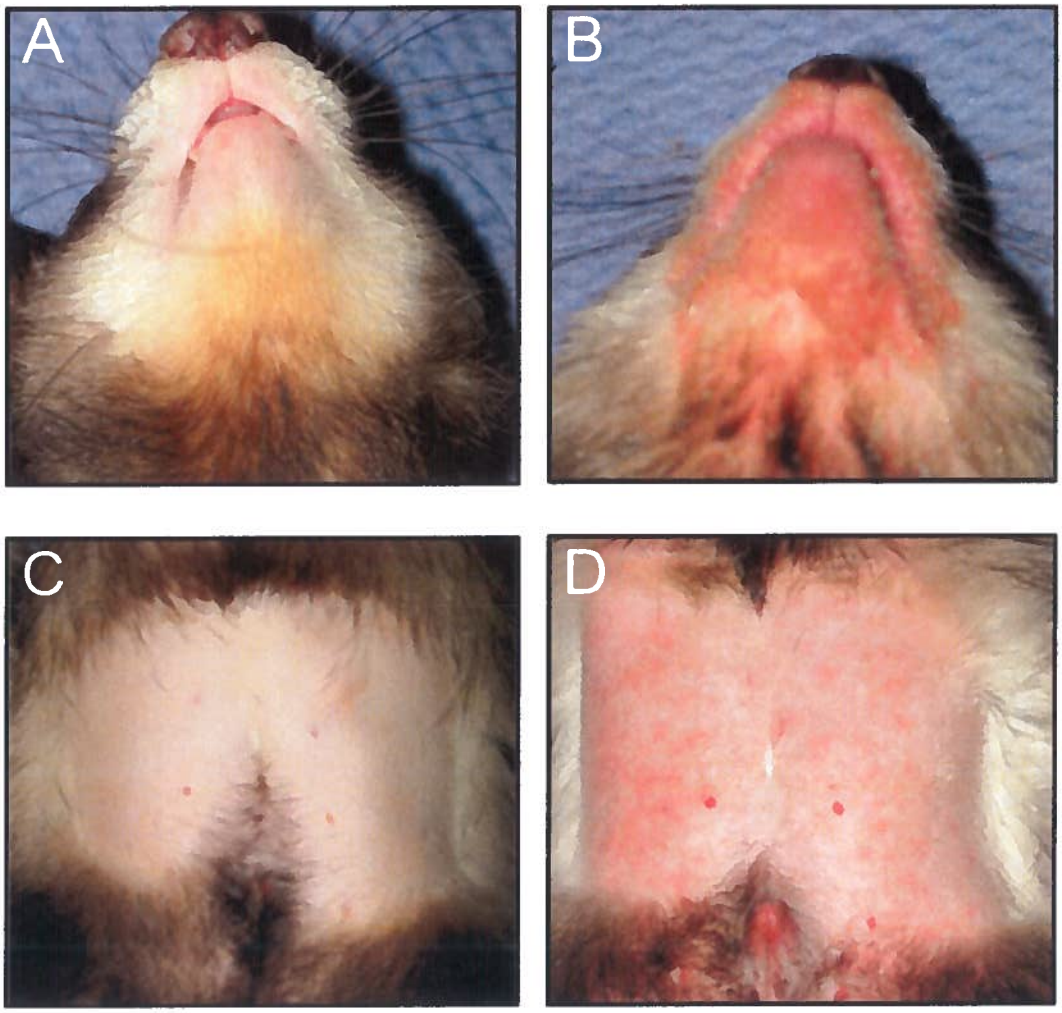


Figure 6 : Éruptions cutanées chez les furets infectés par le CDV. Photographie de furets infectés avec une souche atténué (A et C) ou létale (B et D) du CDV. Éruptions cutanées au niveau du menton et de la bouche (A et C) et au niveau de l'abdomen (C et D). D'après von Messling, Springfeld et Devaux, 2003.

Chapitre 2 : Objectifs du projet

Le but de mon projet de recherche était d'identifier les éléments dans la région M-F du CDV importants dans le maintien de la virulence. Des études précédentes avaient démontré que l'échange de la région M-F avec la région N-P qui est une région intergénique de longueur standard avait mené à l'atténuation de la souche virulente 5804PeH (Anderson et von Messling, 2008). Ceci indique que la région M-F est essentielle pour la virulence du CDV.

La région M-F des morbillivirus se caractérise par le fait qu'elle est plus longue que les autres régions intergéniques du génome. De plus, chez le CDV il est observé une hypervariabilité génétique dans cette région. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la séquence de la région M-F plus que la longueur est importante pour le maintien de la virulence.

Dans un premier objectif, nous avons évalué l'impact de l'hypervariabilité de la région M-F sur le maintien de la virulence. Nous avons échangé la région M-F d'une souche virulente du CDV avec celle d'une autre souche virulente et d'une souche vaccinale ainsi qu'avec celle d'une souche du MeV. Après avoir évalué l'efficacité de réplication des virus recombinants *in vitro*, le phénotype de la maladie a été caractérisé chez le furet grâce au suivi des signes cliniques, l'évaluation de la virémie, de la leucopénie et de la réponse immunitaire.

Le second objectif consistait à identifier les déterminants du maintien de la virulence dans la région M 3'. Des délétions ont été effectuées dans la région ainsi que le remplacement par une séquence aléatoire. Les virus recombinants ont été caractérisés *in vitro* et chez le furet tel que décrit ci-dessus.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1 Cellules et virus

3.1.1 Lignées cellulaires et leur entretien

Des cellules VerodogSLAMtag (von Messling et al., 2003) dérivées des cellules Vero (ATCC CCL-81) exprimant de manière constitutive la molécule SLAM du chien, et des cellules 293T (ATCC CRL-1573) ont été cultivées dans le milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) complémenté avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS, Invitrogen). Un passage cellulaire est effectué lorsque les cellules atteignent une confluence de 90%. Pour ce faire, le milieu est retiré du flacon et 0,25% Trypsine-EDTA (acide éthylène diamine tétracétique, Invitrogen) est ajouté permettant ainsi de détacher les cellules du flacon. Après une incubation de 7 min à 37°C et 5% CO_2, du DMEM 5% FBS est rajouté pour détacher les dernières cellules et une centrifugation de 5 min à 800 g permet de récupérer les cellules. Le culot est resuspendu dans un volume approprié de DMEM 5% FBS puis 10% des cellules sont remises dans le flacon.

3.1.2 Souches virales et préparation des stocks viraux

La souche sauvage 5804PeH du CDV et la souche recombinante $58\Delta F_{106}$ ont été utilisées (Anderson et von Messling, 2008; von Messling, Milosevic, et Cattaneo, 2004). Elles possèdent dans leur génome un cadre de lecture additionnel codant pour la protéine fluorescente verte (eGFP) entre les gènes H et L. La production des stocks viraux s'effectue en infectant des cellules VerodogSLAMtag confluentes à 90% avec une multiplicité d'infection (*multiplicity of infection*, MOI) de 0,01. Le flacon est incubé à 32°C et 5% CO_2 jusqu'à ce que 80% des cellules soient affectées par l'apparition de syncytium. Les cellules sont alors récoltées dans leur milieu à l'aide d'un grattoir, aliquotées et conservées à – 80°C.

3.1.3 Titrage des stocks viraux

Le titrage des stocks viraux nécessite la préparation d'une plaque de 96 puits à fond plat contenant des cellules VerodogSLAMtag à raison de 20 000 cellules/puits dans 50 µl de DMEM 5% FBS. La plaque est incubée pendant la nuit à 37°C et 5% CO_2 afin que les cellules adhèrent au fond des puits. Par la suite, huit dilutions en série du virus allant de 10^{-1} à 10^{-8} sont préparées dans du DMEM 5% FBS. Cent microlitres de chaque dilution est transférée dans huit puits de la plaque (Fig. 7). Trois autres colonnes de huit puits sont infectées afin d'obtenir un quadruplicata. La plaque est ensuite incubée à 37°C et 5% CO_2. Cinq jours post infection la plaque est observée au microscope à contraste de phase afin de détecter la présence de syncytium. Pour chaque virus, le titrage est répétée une deuxième fois.

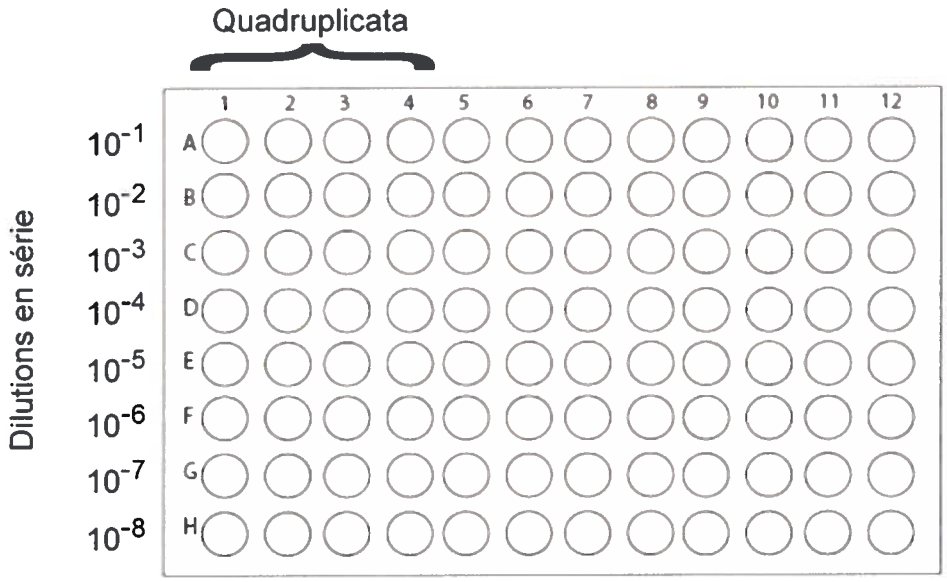


Figure 7 : Titrage des stocks viraux. Plaque de 96 puits à fond plat utilisée pour le titrage des stock viraux. Huit dilutions en série d'un stock viral allant de 10^{-1} à 10^{-8} sont effectuées dans du DMEM 5% FBS. Dans les colonnes 1 à 4, 100 µl de chaque dilution sont transférées dans les puits A à H.

3.2 Production des virus recombinants

3.2.1 Stratégie de clonage

Pour générer les virus recombinants, le plasmide pBR5804PeH qui contient le génome complet de la souche sauvage du CDV est utilisé comme base pour la construction des génomes recombinants. La région entre les gènes M et F de 5804PeH a été remplacée par celles des souches A75 et OS du CDV ainsi que par celle du MeV qui proviennent de plasmides possédant les régions M-F respectives. Ces derniers ont servi de matrice lors de PCR combinatoire, qui a permis de lier des séquences provenant de différents génomes. De plus, des délétions dans la région M-F ont pu être réalisées à l'aide de la même technique. Cette technique est basée sur le principe qu'il est possible de générer par PCR un fragment d'ADN avec des séquences désirées aux extrémités qui n'étaient pas présentes dans la matrice d'origine. Ainsi, deux fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir de matrices différentes peuvent être liés ensemble lors d'une seconde PCR pourvu qu'ils aient des extrémités complémentaires (Horton, 1995). Ainsi, la PCR combinatoire a permis de créer des séquences chimères M-F constituées en partie des séquences des gènes M et F de la souche parentale 5804PeH et de la séquence de la région M-F des différents virus à tester. Le choix des séquences à amplifier par PCR s'est effectué en fonction des sites de restrictions uniques les plus proches entourant la région M-F. Ainsi en effectuant une digestion des produits de PCR obtenus avec les enzymes appropriées, il a été possible de les insérer dans le plasmide pBR5804PeH par ligation avec une ADN ligase.

La stratégie de clonage étant similaire pour la construction des différents génomes recombinants, seule la stratégie employée pour le virus 58hvMeV est présentée. Les amorces utilisées pour le clonage des virus recombinants sont présentées dans le Tableau I. Les virus recombinants 58hvA75, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-335} et $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-336}GFP ont été produit par Dre Danielle Anderson.

3.2.1.1 Clonage du virus recombinant 58hvMeV

Afin d'insérer la région M-F de la souche vaccinale Moraten du MeV dans le génome de 5804PeH, une première série de PCR amplifiant les fragments A1 à A4 a été effectuée (Fig. 8A). Ces fragments couvrent la région M-F de MeV ainsi que les gènes P, M et F de 5804PeH délimités par les sites de restriction *Sal*I et *Bsr*GI. Les fragments A1 et A4 sont amplifiés à partir du plasmide pBR5804PeH. Les fragments A2 et A3 sont amplifiés à partir du plasmide pBRMo. L'amplification par PCR s'effectue selon le cycle suivant : une étape de dénaturation à 94°C suivie de l'hybridation à 55°C et l'élongation à 72°C. Ce cycle est répété 32 fois. Pour s'assurer que les bons fragments ont été amplifiés, les produits PCR sont migrés sur gel d'agarose 1% afin de vérifier leur taille. Une fois les bandes désirées obtenues, chaque réaction est digérée 1 h à 37°C avec 1 µL de l'enzyme de restriction *Dpn*I afin d'éliminer les matrices ayant servis pour l'amplification des fragments A1 à A4.

Par la suite, ces fragments sont utilisés dans une deuxième série de PCR, dite combinatoire, qui permet de lier les fragments deux à deux, soit A1 avec A2 et A3 avec A4 (Fig. 8B). Par exemple, l'amplification du fragment A1 s'est effectuée avec une amorce antisens dont l'extrémité 5' est complémentaire de l'extrémité 3' de l'amorce sens du fragment A2. Les fragments A1 et A2 ont donc des extrémités qui se chevauchent, ce qui permet de lier les fragments par PCR. Le cycle d'amplification de la PCR combinatoire diffère de la PCR conventionnelle. Une première étape de dénaturation sépare les fragments A1 à A4 qui sont ensuite hybridés à 40°C au niveau de leur région complémentaire et il y a une étape d'élongation à 68°C. Les amorces sont alors rajoutées et s'ensuit le cycle suivant : une dénaturation à 94°C suivie de l'hybridation à 56°C (avec diminution de – 0,2°C par cycle) et l'élongation à 68°C. Ce cycle est répété 25 fois. Le fragment A5 est alors formé.

Une fois les fragments A5 et A6 obtenus, ils sont purifiés avec la trousse QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) et digérés pendant 3 h à 37°C avec *Sal*I et *Bsr*GI, respectivement. Suite à la digestion, les fragments sont à nouveau purifiés puis digérés avec *Apa*I pendant 3 h à 25°C. Le fragment A5 de 2090 pb et le fragment A6 de 1911 pb sont extraits sur gel d'agarose puis purifiés.

Tableau I : Amorces utilisées pour le clonage des virus recombinants.

Virus	Fragment	Amorce sens	Amorce antisens
58hvOS	A1	5'-AGATTCAGGAAGAGCACTGGCGGAAGTTCTC-3'	5'-ATGAACTGATTAGAGAATTTTGAAAAGACCCTG-3'
	A2	5'-AAAATTCTCTAAATCATCAGTTCATGAACTAAAAAGC-3'	5'-ATGGATAGTCATAGTTCCGTGAAACAGGAC-3'
	A3	5'-CTATCACTAGTAGTCCTGTTTCACG-3'	5'-ATTATTCCAATGTATCTGAGCCTTGGAACACAGAAAG-3'
	A4	5'-GTGTTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTC-3'	5'-GAAACAACAAAGCCAGGGCT-3'
	A5	5'-AGATTCAGGAAGAGCACTGGCGGAAGTTCTC-3'	5'-ATGGATAGTCATAGTTCCGTGAAACAGGAC-3'
	A6	5'-CTATCACTAGTAGTCCTGTTTCACG-3'	5'-GAAACAACAAAGCCAGGGCT-3'
58hvMeV	A1	5'-TGGAGACCCTACGGCAAATG-3'	5'-GCTGGGCACTACGGTTAGAGAATTTTGAAAAGACCCTGATCATCGC-3'
	A2	5'-CAAAATTCTCTAACCGTAGTGCCCAGCAATGCCCG-3'	5'-CTGGTTTGGTTGCCGTGGTC-3'
	A3	5'-GCACCCAACCATCGACAATC-3'	5'-ATTCCAATGTATCTGACCGGTGGGTGTTTGGAG-3'
	A4	5'-CCCACCGGTCAGATACATTGGAATAATTTGTC-3'	5'-GAAACAACAAAGCCAGGGCT-3'
	A5	5'-TGGAGACCCTACGGCAAATG-3'	5'-CTGGTTTGGTTGCCGTGGTC-3'
	A6	5'-GCACCCAACCATCGACAATC-3'	5'-GAAACAACAAAGCCAGGGCT-3'
58hv3'MeV	A1	5'-CAAAATTCTCTAACCGTAGTGCCCAGCAATGCCCG-3'	5'-TACGTCCTGGACCCTAAGTTTTGTTTAGTTTGCCGGGG-3'
	A2	5'-CAAACTAAACAAAACTTAGGGTCCAGGACGTAGCAAGC-3'	5'-CGGGCCAAATATCGACAACAAC-3'
	A3	5'-CAAAATTCTCTAACCGTAGTGCCCAGCAATGCCCG-3'	5'-CGGGCCAAATATCGACAACAAC-3'
58hv5'MeV	A1	5'-AGATTCAGGAAGAGCACTGGCGGAAGTTCTC-3'	5'-TATGTTCCTTGGCCCTAAGTTTTGATTAATTATTAACG-3'
	A2	5'-ATAATTAATCAAAACTTAGGGCCAAGGAACATACACACCC-3'	5'-CTGGTTTGGTTGCCGTGGTC-3'
	A3	5'-AGATTCAGGAAGAGCACTGGCGGAAGTTCTC-3'	5'-CTGGTTTGGTTGCCGTGGTC-3'
$58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-174}	A1	5'-CCGCCCTATAATAGGGAGAG-3'	5'-TCATATTGCAGATTAGAGAATTTTGAAAAGAC-3'
	A2	5'-CAAAATTCTCTAATCTGCAATATGAAGACAGC-3'	5'-GTGAAACAGGACTACTAGTGATAG-3'
	A3	5'-CCGCCCTATAATAGGGAGAG-3'	5'-GTGAAACAGGACTACTAGTGATAG-3'
$58\Delta F_{106}$-3'$Md_{175-396}$	A1	5'-GAATTCCGCTCTAGGAATGC-3'	5'-TAAGTTTTGATTAATGCCACCAGAGTAGTAGGC-3'
	A2	5'-TACTCTGGTGGCATTAATCAAAACTTAGGGTCC-3'	5'-CGGGCCAAATATCGACAACAAC-3'
	A3	5'-GAATTCCGCTCTAGGAATGC-3'	5'-CGGGCCAAATATCGACAACAAC-3'
$58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-336}	A1	5'-CCGCCCTATAATAGGGAGAG-3'	5'-TCGTGAAACAGGACTACTAGTTTAGAGAATTTTGAAAAGACCC-3'
$58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-336}GFP	A1	5'-ACCATTACTAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC-3'	5'-TCGCGGCACTAGTGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTC-3'

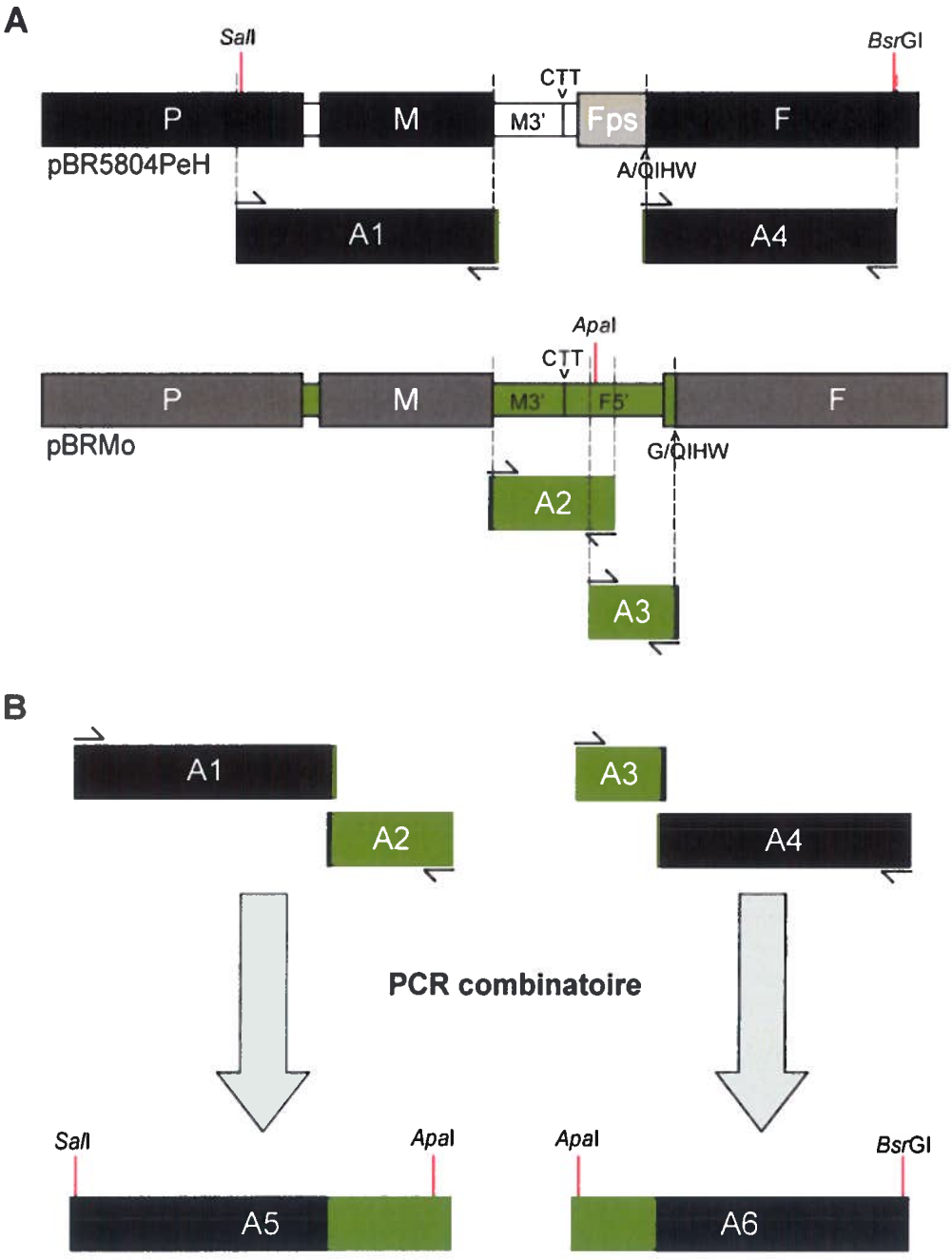


Figure 8 : Clonage du virus recombinant 58hvMeV. (**A**) Amplification par PCR des fragments A1 à A4 à partir de plasmides contenants le génome du CDV (pBR5804PeH) ou du MeV (pBRMo). Les fragments A1 et A4 couvrent les gènes P, M et F de 5804PeH délimités par les sites de restrictions de *Sal*I et *Bsr*GI. Les fragments A2 et A3 couvrent la région M-F de MeV. (**B**) Amplification des fragments A5 et A6 par PCR combinatoire. Les fragments A1 et A2 ainsi que A3 et A4 possèdent des extrémités complémentaires, respectivement.

Pour former le plasmide pBR58hvMeV, deux digestions enzymatiques séquentielles du plasmide pBR5804PeH sont effectuées. Une première digestion à 37°C pendant 1 h avec *Sal*I. Le plasmide digéré est ensuite purifié avec la trousse QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) et digéré avec *Asc*I pendant 1 h à 37°C. Le fragment de 14053 pb résultant de la digestion est extrait sur gel d'agarose puis purifié. Une deuxième digestion de 4 h à 37°C avec *Asc*I et *Bsr*GI est effectuée. Le fragment de 2225 pb résultant de la digestion est extrait sur gel d'agarose puis purifié. Ces deux fragments ainsi que les fragments A5 et A6 sont liés en utilisant une trousse de ligation (Roche). Pour ce faire, le fragment de 14053 pb est déphosphorylé avec la Phosphatase Alcaline de Crevette pendant 1 h à 37 °C suivie de 15 min à 65°C nécessaires à l'inactivation de l'enzyme. Par la suite, le vecteur déphosphorylé est combiné avec les trois autres fragments dans un ratio 1 : 3 et sont incubés pendant 1 h à température pièce après ajout de ligase. Le produit de ligation est ensuite mélangé à 50 µL de bactéries compétentes *E. coli* One Shot TOP10F' (Invitrogen) puis incubé 30 min sur glace. Un choc thermique à 42°C pendant 35 sec permet de faire entrer le produit de la ligation dans les bactéries. L'échantillon est ensuite placé sur glace durant 1 min puis 200 µL de milieu S.O.C (Invitrogen) sont rajoutés. Une incubation de 1 h à 37°C avec agitation s'en suit, après quoi l'échantillon est étalé sur une gélose d'agar Luria-Bertani (LB, Novagen) additionnée d'ampicilline (0,1 mg / mL). La gélose est incubée pendant la nuit à 37°C.

Les colonies sont utilisées pour inoculer des volumes de 5 mL de milieu de culture LB additionné d'ampicilline qui sont incubés pendant la nuit à 37°C. Les plasmides sont ensuite extraits des bactéries avec la trousse QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) et une digestion de contrôle avec *Pvu*II permet de s'assurer qu'il s'agit bien du vecteur pBR58hvMeV (Fig. 9). Cette digestion inclut le plasmide parental pBR5804PeH dont le profil de digestion diffère de pBR58hvOS. Les clones positifs sont ensuite envoyés au séquençage pour vérifier qu'aucune mutation ne s'est insérée dans le génome. Les clones exempts de mutations sont amplifiés afin d'obtenir de plus grande quantité d'ADN qui est extrait à l'aide de la trousse QIAfilter Midi (Qiagen).

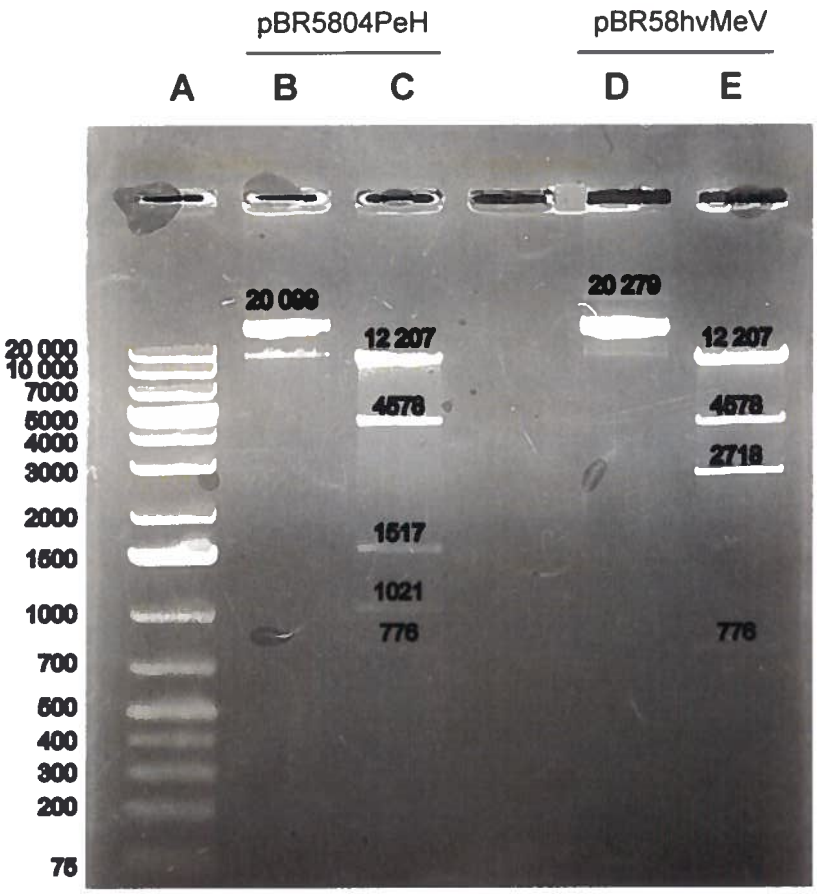


Figure 9 : Résultat de digestion enzymatique. Gel d'agarose 1 %. Le puit A correspond à l'échelle de poids moléculaire dont les poids sont exrprimés en paires de bases. Les puits B et D correspondent aux plasmides pBR5804PeH et pBR58hvMeV non digérés. Les puits C et E correspondent aux deux plasmides digérés par PvuII. Le poids moléculaire de chaque fragment est indiqué au dessus de ces derniers.

3.2.1.2 Récupération des virus recombinants

La récupération des virus recombinants s'effectue selon un système utilisant l'ARN polymérase du bactériophage T7 (Martin, Staeheli, et Schneider, 2006). Des cellules 293T sont mises en culture dans une plaque à 6 puits à raison de $5x10^5$ cellules / puits dans un volume de 3 mL OPTIMEM (Invitrogen) par puits. Elles sont incubées à 37°C et 5% CO_2. Huit µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen) sont dilués dans 200 µl de OPTIMEM. Le mélange est incubé 5 min à température pièce. Pendant ce temps un second mélange est préparé. Ce dernier contient : 200 µl de OPTIMEM, 4 µg d'un plasmide codant pour un génome viral, 0,5, 0,1, 0,5 µg des plasmides codant pour les

gènes N, P et L du virus de la rougeole, respectivement, et 0,7 µg d'un plasmide codant pour la polymérase T7. Les deux mélanges sont réunis, et après 1 h d'incubation à température pièce le mélange de transfection est distribué en fine gouttelette dans un puit contenant les cellules 293T à l'aide d'une pipette. Ces cellules sont ensuite incubées à 37°C et 5% CO_2 pendant la nuit. Le lendemain matin le milieu de croissance est changé pour 3 mL de DMEM 5 % FBS.

Deux jours après la transfection, les cellules 293T sont transférées dans un pétri de 100 cm^2 contenant $4x10^6$ cellules VerodogSLAMtag qui est ensuite incubé à 37°C et 5% CO_2. Les cellules sont observées quotidiennement jusqu'à l'apparition de syncytium. Les syncytium sont alors piqués à l'aide d'une pipette et transférés à raison de trois syncytium par puits dans une plaque à 6 puits avec $5x10^5$ VerodogSLAMtag par puits. La plaque est incubée à 37°C et 5% CO_2 jusqu'à ce que 80% des cellules soient affectées par l'apparition de syncytium. Les cellules sont alors détachées avec la 0,25% Trypsine-EDTA et sont transférées dans un flacon de 75 cm^2 contenant $2x10^6$ cellules VerodogSLAMtag. Le flacon est incubé à 32°C et 5% CO_2 jusqu'à ce que 80% des cellules soient affectées par l'apparition de syncytium. Les cellules sont alors récoltées dans leur milieu à l'aide d'un grattoir puis sont aliquotées et congelées à – 80°C. Le virus est ensuite titré selon la manière décrite dans la section 3.1.3.

3.3 Caractérisation *in vitro* des virus recombinants

Afin de comparer la capacité de réplication et le phénotype syncytial des virus recombinants à ceux des virus parentaux, des cinétiques virales ont été effectuées. Pour ce faire, $6x10^6$ cellules VerodogSLAMtag ont été infectées avec le virus à tester à une MOI de 0,01 dans un volume de 12 mL de DMEM 5% FBS. Ces cellules sont mises en cultures dans une plaque à 12 puits à raison de $5x10^5$ cellules par puits. Après 1 h d'incubation à 37°C et 5% CO_2 le milieu est aspiré de chaque puits et est remplacé par 500 µL de DMEM 5% FBS excepté dans les deux derniers puits où 500 µL de DMEM 10% FBS additionné de methyl cellulose (Sigma) 0,5% sont déposés. Les cellules sont ensuite incubées à 32°C et 5% CO_2. Durant les jours un à cinq post infection (p.i.) le surnageant et les cellules de deux puits sont récoltés. Le surnageant est récolté en premier

suivi par l'ajout de 500 µL de DMEM 5% FBS afin de récolter les cellules. Pour chaque virus l'expérience en duplicata est répétée une seconde fois. Les échantillons sont conservés à -80°C. Une fois tous les échantillons récoltés, leur titre viral est évalué selon la même méthode décrite dans la section 3.1.3. Pour le jour un p.i. les dilutions en séries vont de 10^0 à 10^{-5}. Pour les autres jours, elles vont de 10^{-1} à 10^{-6}. Ainsi, les moyennes des quatre valeurs obtenues pour chaque jour sont calculées afin de tracer la courbe de réplication virale. Les écarts types sont annotés par des barres d'erreur. Pour l'évaluation du phénotype syncytial des photos des cellules dans le milieu DMEM 5% FBS avec 0,5% de methyl cellulose sont prises en lumière normale à l'objectif 10 X avec un microscope Nikon ECLIPSE TE2000-V muni d'une caméra Nikon digital camera DXM-1200F.

3.4 Caractérisation *in vivo* des virus recombinant

Afin d'évaluer la virulence et l'immunosuppression induite par les virus recombinants, des échantillons sanguins sont prélevés chez des furets infectés. Des groupes de trois à six furets sont infectés sous anesthésie. Un premier prélèvement de sang s'effectue au jour zéro. Les prélèvements subséquents se font aux jours trois, sept, dix et quatorze p.i. Par la suite les échantillons sont prélevés une fois par semaine jusqu'à l'euthanasie des furets.

Les résultats des furets infectés par 5804PeH proviennent du Dre Veronika von Messling. Ceux des animaux infectés par 58hvA75, 58ΔF_{106}-3'$Md_{1\text{-}335}$ et 58ΔF_{106}-3'$Md_{1\text{-}336}$GFP proviennent du Dre Danielle Anderson.

3.4.1 Infection et prélèvement du sang

Avant de procéder à l'infection des furets, ces derniers sont anesthésiés avec un mélange de 0,4 mL de kétamine (Bioniche Animal Health) et 0,4 mL de midazolam (Sandoz). Les furets sont alors infectés par voie intranasale avec 10^5 $TCID_{50}$ du virus à tester. A l'aide d'une pipette, des gouttelettes sont déposées dans chaque narine de l'animal. Les anesthésies effectuées lors des prélèvements sanguins au jour trois p.i. et subséquent, s'effectuent à l'aide de 0,3 mL de chaque drogue pour les mâles et 0,2 mL pour les femelles.

Pour les prélèvements sanguins, 3 mL de sang sont prélevés dans un tube contenant de l'EDTA et 3 mL dans un tube héparinisé.

3.4.2 Suivi clinique

Le suivi clinique implique la prise de température quotidienne des animaux ainsi que la prise de poids deux fois par semaine. De plus, une observation détaillée des animaux permet d'évaluer l'apparition de rougeurs de peau, une conjonctivite, une diarrhée ainsi qu'une déshydratation. Afin de respecter les règles d'éthique du CCAC (*conseil canadien de protection des animaux*), les animaux sont euthanasiés lorsqu'ils atteignent les points limites suivants : fièvre de plus de 40°C pendant trois jours consécutifs, perte de poids de 15 %, l'animal cesse de s'alimenter pendant plus de 96 h ou le développement d'un état moribond avant la fin du protocole. L'euthanasie s'effectue en anesthésiant les furets (voir 3.4.1) suivi par une injection intracardiaque ou intrapéritonéale de 1 mL d'Euthanyl (Bimeda-MTC).

3.4.3 Évaluation de la virémie

Pour évaluer la virémie, des PBMC sont isolés à partir de l'échantillon de sang avec EDTA. Le sang est incubé pendant 10 min avec 10 mL de tampon ACK (150 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0,1 mM Na_2EDTA [pH 7,2 à 7,4]) à température pièce, ce qui permet de lyser les globules rouges. La suspension est ensuite centrifugée durant 5 min à 800 g et les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS sans calcium ni potassium (Invitrogen) à température pièce. Après une seconde centrifugation les cellules sont resuspendues dans 1 mL de DMEM 5% FBS à température pièce. Dix µL sont prélevés afin d'effectuer un compte dans le bleu de trypan (CellPro, Mediatech Inc) à l'aide d'un hémacytomètre. Le résultat s'exprime en PBMC / mm^3. Le titrage du virus dans les PBMC s'effectue comme indiqué à la section 3.3. Les dilutions en séries vont de 10^{-1} à 10^{-6} excepté pour le jour 3 p.i. pour lequel elles vont de 10^{0} à 10^{-5}.

3.4.4 Évaluation des paramètres immunologiques

L'évaluation des paramètres immunologiques nécessite l'isolation du plasma et des PBMC présents dans l'échantillon de sang avec héparine. Pour ce faire, le sang est centrifugé à 1200 g pendant 15 min. Le plasma est récolté et conservé à – 20°C. Un volume de 4,5 mL de PBS sans calcium ni potassium à température pièce est rajouté au sang. La suspension est ensuite étalée délicatement sur un gradient de Ficoll (Amersham Biosciences) et centrifugée pendant 40 min à 400 g. Les PBMC se trouvant à l'interface Ficoll/sang sont recueillis à l'aide d'une pipette Pasteur et lavés trois fois avec le PBS sans calcium ni potassium. Finalement, les PBMC sont resuspendus dans 1 mL de RPMI 10% FBS à température pièce. Dix microlitres de la suspension de PBMC sont prélevés afin d'effectuer un compte dans le tampon ACK à l'aide d'un hémacytomètre.

3.4.4.1 Comptes des leucocytes

Afin d'effectuer un compte leucocytaire, 10 µL de l'échantillon de sang avec EDTA sont prélevés et dilués dans 990 µL d'acide acétique 3% (CH_3COOH). Le compte est effectué à l'aide d'un hémacytomètre et le résultat s'exprime en leucocytes / mm^3.

3.4.4.2 Analyse des PBMC par cytofluorométrie en flux

Afin de suivre l'infection des PBMC, ces derniers sont centrifugés pour 5 min à 800 g, resuspendues dans 200 µL de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) et divisés entre 4 puits d'une plaque 96 puits à fond coniques contenant 100 µL du tampon Perm/Wash 1X (BD Biosciences). Cinquante microlitres des PBMC sont déposés dans chacun des puits. La plaque est centrifugée 5 min à 800 g et les PBMC sont resuspendus dans 50 µL de Perm/Wash 1X et une seconde centrifugation est effectuée. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 200 µL d'une solution de paraformaldéhyde 1% (Sigma) et tous les échantillons sont transférés dans des tubes destinés à la cytofluorométrie en flux. Les échantillons sont alors analysés. L'infection des PBMC totaux est suivie tout au long de l'étude animale grâce à l'expression de la GFP par les virus.

Les résultats pour le virus 5804PeH proviennent du Dr Bevan Sawatsky.

3.4.4.3 Test de neutralisation

Le test de neutralisation permet de suivre l'évolution du titre des anticorps neutralisants tout au long de l'infection chez les furets. Dans une plaque 96 puits à fond plat, 90 µL de DMEM 5% FBS sont mis dans la première rangée et 50 µL dans les rangées suivantes. Dix µL d'un échantillon de plasma à tester est déposé dans le premier puits de la première rangé de la plaque afin d'obtenir une dilution 1 : 10. Par la suite, sept dilutions 1 : 2 sont effectuées dans les puits des rangés suivantes donnant ainsi des dilutions allant de 1 : 10 à 1 : 1280. Chaque dilution d'un échantillon de plasma est effectuée en quadrupiclata. Par la suite 50 µL d'une suspension du virus 5804PeH à la concentration de $2x10^3$ $TCID_{50}$ / mL est rajoutée dans chaque puits. Pour s'assurer une qualité stable des tests effectués à différentes journées, le contrôle suivant est inclut : Cent µL de DMEM 5% FBS sont pipettés dans quatre puits des première et dernière rangées d'une plaque 96 puits. Dans quatre puits de la seconde rangée sont mis 50 µL de DMEM 5% FBS plus 50 µL de la suspension du virus. Quatre dilutions de la suspension du virus allant de 1 : 10 à 1 : 10 000 sont effectuées et 50 µL des quatre dilutions sont transférées dans les rangées trois à sept. Les plaques sont alors incubées 15 min à température pièce afin de permettre aux anticorps d'interagirent avec les particules virales. Cinquante µL d'une suspension de cellules VerodogSLAMtag dans le milieu DMEM 5% FBS sont rajoutées par la suite dans chaque puits des plaques à raison de 20 000 cellules / puits. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C et 5% CO_2 et la lecture s'effectue après 5 jours. L'absence de syncytium dans les puits indique la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre le CDV.

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Échange de la région M-F entre différentes souches de CDV et de MeV

Afin d'évaluer l'implication de la variabilité nucléotidique de la région M-F dans le phénotype de la maladie, les virus recombinants 58hvA75, 58hvOS et 58hvMeV ont été produits (Fig. 10). Le "58" au début du nom indique que le virus 5804PeH est la base de la construction des génomes mutants. 5804PeH possède dans son génome un cadre de lecture additionnel entre les gènes H et L codant pour la protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*, GFP). Cela permet de suivre l'infection des PBMC de furet par cytofluorométrie en flux. L'introduction de la GFP dans la souche 5804P ne mène pas à une perte de virulence (von Messling, Milosevic, et Cattaneo, 2004). Le "hv" retrouvé dans le nom des virus recombinants fait référence à la région hypervariable M-F. Le "A75", "OS" et "MeV" indique la provenance de la région M-F, soit des souches A75 et OS de CDV, ou de MeV. Chez le furet, une infection par la souche 5804PeH ou A75 cause une maladie mortelle d'une durée de deux ou de trois à cinq semaines, respectivement (Rudd, Cattaneo, et von Messling, 2006; von Messling, Milosevic, et Cattaneo, 2004). La souche OS est une des souches vaccinales et ne cause pas de maladie chez le furet (Chappuis, 1995).

4.1.1 Caractérisation des virus recombinants *in vitro*

Dans un premier temps, la réplication et l'effet cytopathique des virus recombinants sont comparés à ceux du virus parental. Pour ce faire, des cellules VerodogSLAMtag sont infectées avec une MOI de 0.01. Ces cellules expriment le récepteur viral SLAM du chien afin d'assurer l'entrée efficace du virus. Les titres du virus associé aux cellules et relâché dans le surnageant sont quantifiés pendant les cinq jours post infection (p.i.). Des photos prises en microscopie à contraste de phase permettent d'évaluer les effets cytopathiques.

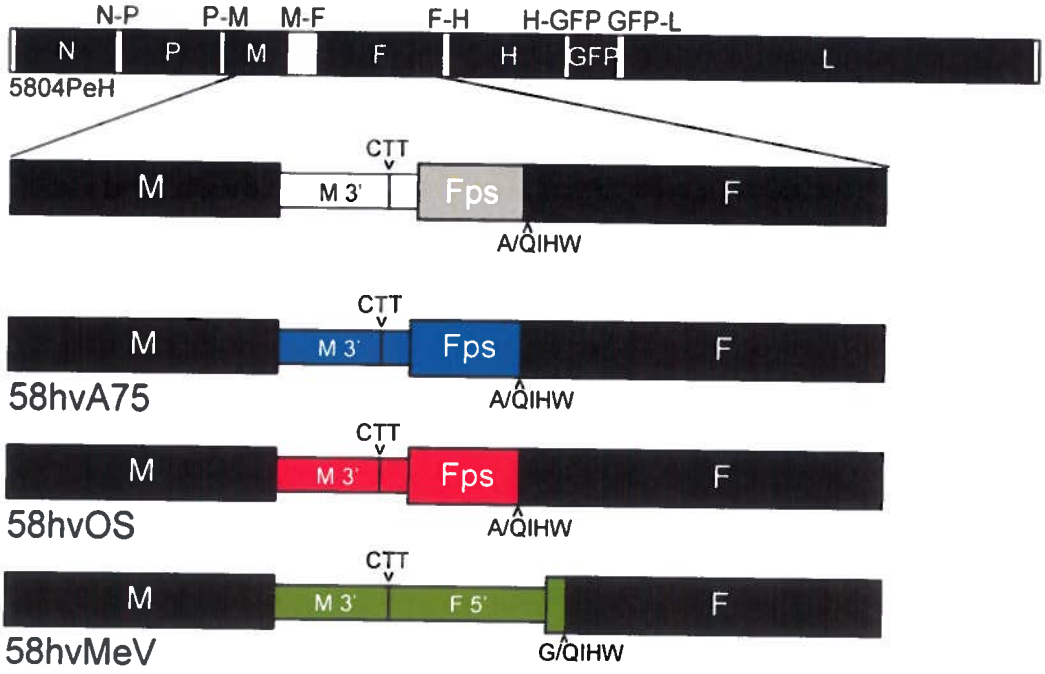


Figure 10 : Schéma du génome viral et de la région M-F des virus recombinants. Tous les virus recombinants sont fabriqués à partir du génome de la souche 5804PeH du CDV dans lequel la région M-F est remplacée par celles des souches A75 et OS ainsi que celle du MeV. La région M-F est composé d'une portion M 3' non traduite (M 3'), la portion F 5' non traduite (F 5') et le peptide signal de la protéine F (Fps). Les deux UTR sont séparées par le triplet intergénique CTT. Le site de clivage de Fps est noté par la séquence en aa A/QIHW pour les souches de CDV et G/QIHW pour le virus MeV.

4.1.1.1 Évaluation de l'efficacité de réplication des virus recombinants

Dans les cellules VerodogSLAMtag, les virus 58hvOS et 58hvMeV se répliquent de façon similaire à la souche parentale 5804PeH (Fig. 11A, losanges rouges et rectangles verts). Toutefois, 58hvOS a un titre vingt-six fois moins élevé que 5804PeH dans le surnageant au jour deux p.i. 58hvMeV a un titre dix-neuf fois moins élevé que pour la souche parentale dans le surnageant au jour trois p.i. Pour le virus 58hvA75 le titre dans le surnageant est respectivement cent-trente-trois et trente-trois fois plus élevés que 5804PeH aux jours deux et trois p.i. (Fig. 11A, carrés verts). Cela corrèle avec le titre de 58hvA75 qui est vingt-deux fois moins élevé que celui de la souche parentale dans les cellules au jour deux p.i. Pour tous les virus le titre associé aux cellules est dix à mille fois

plus élevés que celui des virus relâchés dans le surnageant. De plus, les titres augmentent progressivement jusqu'au jour quatre p.i. pour ensuite se stabiliser, ce qui correspond à la destruction des cellules.

4.1.1.2 Évaluation du phénotype syncytial des virus recombinants

Lorsqu'une cellule est infectée par un morbillivirus, l'expression des glycoprotéines F et H à sa surface engendre la fusion de la membrane cellulaire avec celles des cellules adjacentes non infectées. Les cellules géantes résultantes de ce processus sont nommées syncytium (Lamb et Parks, 2007). Les virus 58hvA75, 58hvOS et 58hvMeV forment des syncytium similaires à ceux formés par la souche parentale 5804PeH à deux jours p.i. (Fig. 11B). Ainsi, le phénotype syncytial des virus recombinants reste inchangé.

4.1.2 Évaluation du phénotype viral chez le furet

Pour déterminer l'importance de la région M-F dans la pathogenèse, des groupes de trois à quatre furets sont infectés par voie intranasale avec 10^5 doses infectieuses du virus parental 5804PeH ou les virus recombinants 58hvA75, 58hvOS et 58hvMeV. Les signes cliniques des furets sont relevés de manière quotidienne et la température corporelle est mesurée. De plus, une prise de sang une à deux fois par semaine permet de suivre la virémie par le titrage des virus présents dans les PBMC ainsi que par la cytofluorométrie en flux. La leucopénie est aussi évaluée.

4.1.2.1 Virulence des virus recombinants

Comme rapporté précédemment (von Messling, Milosevic, et Cattaneo, 2004), les furets décèdent deux semaines après le début de l'infection avec 5804PeH (Fig. 12A, cercles noirs). Les animaux des groupes infectés par 58hvA75 et 58hvOS mourraient aussi autour de 14 jours p.i., ce qui indique que ces virus recombinants ont conservé la virulence de la souche parentale (Fig. 12A, triangles bleus et losanges rouges). Les rougeurs de peau apparaissent aux jours six et sept p.i. pour les furets infectés par 58hvA75 et 58hvOS et une augmentation de la température corporelle est observée à partir du jour six et huit p.i., respectivement (données non montrées). Ces signes cliniques

sont similaires à ceux observés chez les furets infectés par 5804PeH. La région M-F du CDV est donc interchangeable entre les différentes souches sans modification du phénotype de la maladie.

Au contraire, deux des six furets infectés par 58hvMeV ont survécu à l'infection (Fig. 12A, carrés verts) et une prolongation de la maladie a été observée chez deux autres furets qui sont décédés aux jours 17 et 19 p.i. Les deux furets restants sont morts au jour 15 p.i. donc à un temps similaire à ceux infectés par la souche parentale 5804PeH. Les rougeurs de peaux sont apparues aux jours neuf à dix p.i., c'est-à-dire deux à trois jours plus tard que chez les furets infectés par le virus parental (Fig. 13A). Pour les animaux ayant survécus, une fièvre est observé aux jours 11 et 12 p.i. puis la température revient à la normale (Fig. 13B, courbe verte pleine). Contrairement aux furets infectés par 5804PeH qui deviennent fiévreux à partir du jour neuf p.i., les furets ayant succombé à l'infection par 58hvMeV ont présenté une augmentation de température à partir du jour 11 p.i. (Fig. 13B, courbe verte pointillée). Chez les deux animaux qui étaient moribonds une chute de température a été observé au jour 15 p.i. (von Messling et al., 2003).

Le suivi de la virémie dans les animaux démontre que les trois virus recombinants se répliquent de manière similaire dans les PBMC. Des cellules infectées sont détectées à partir du jour trois p.i. suivi d'un pic de réplication au jour sept p.i. (Fig. 12B). Par contre, l'élimination du virus 58hvMeV est observée à partir du jour 21 p.i. chez les deux furets ayant survécus à l'infection.

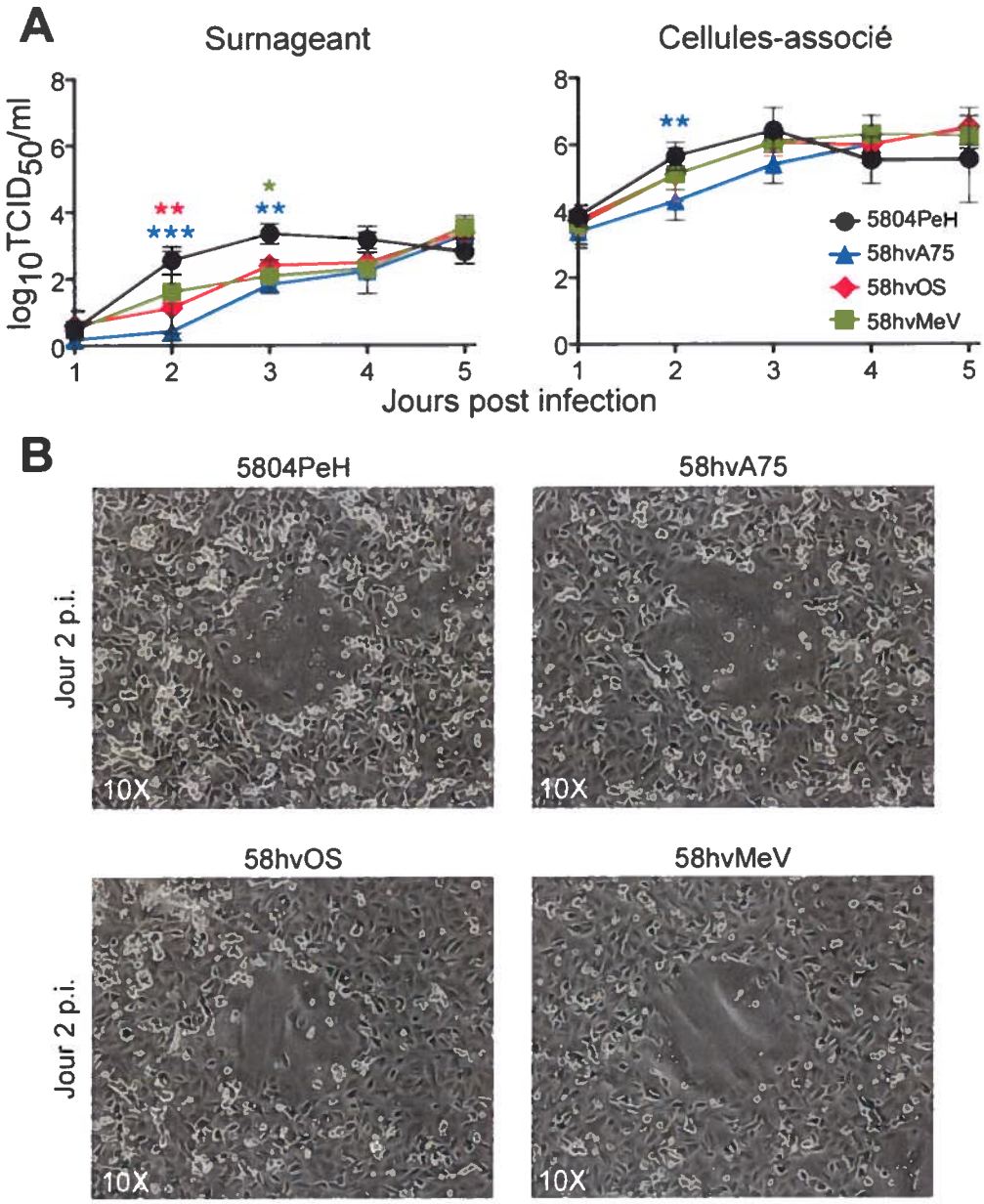


Figure 11 : Cinétiques de réplications virales. **(A)** Des cellules VerodogSLAMtag sont infectées par les virus 5804PeH, 58hvA75, 58hvOS et 58hvMeV. Le titre des virus présents dans le surnageant où dans les cellules est évalué durant les 5 jours suivants et est exprimé en $log_{10}TCID_{50}$/ml. Les titres des virus recombinants étant significativement différents de ceux de 5804PeH sont annotés par des astérisques indiquant la valeur P calculée à l'aide d'un test ANOVA à deux facteurs avec correction de Bonferroni. * : P<0.05;** : P<0.01; *** : P<0.001 **(B)** Évaluation du phénotype syncytial par la prise de photos des cellules infectées au jour 2 p.i. par microscopie à contraste de phase.

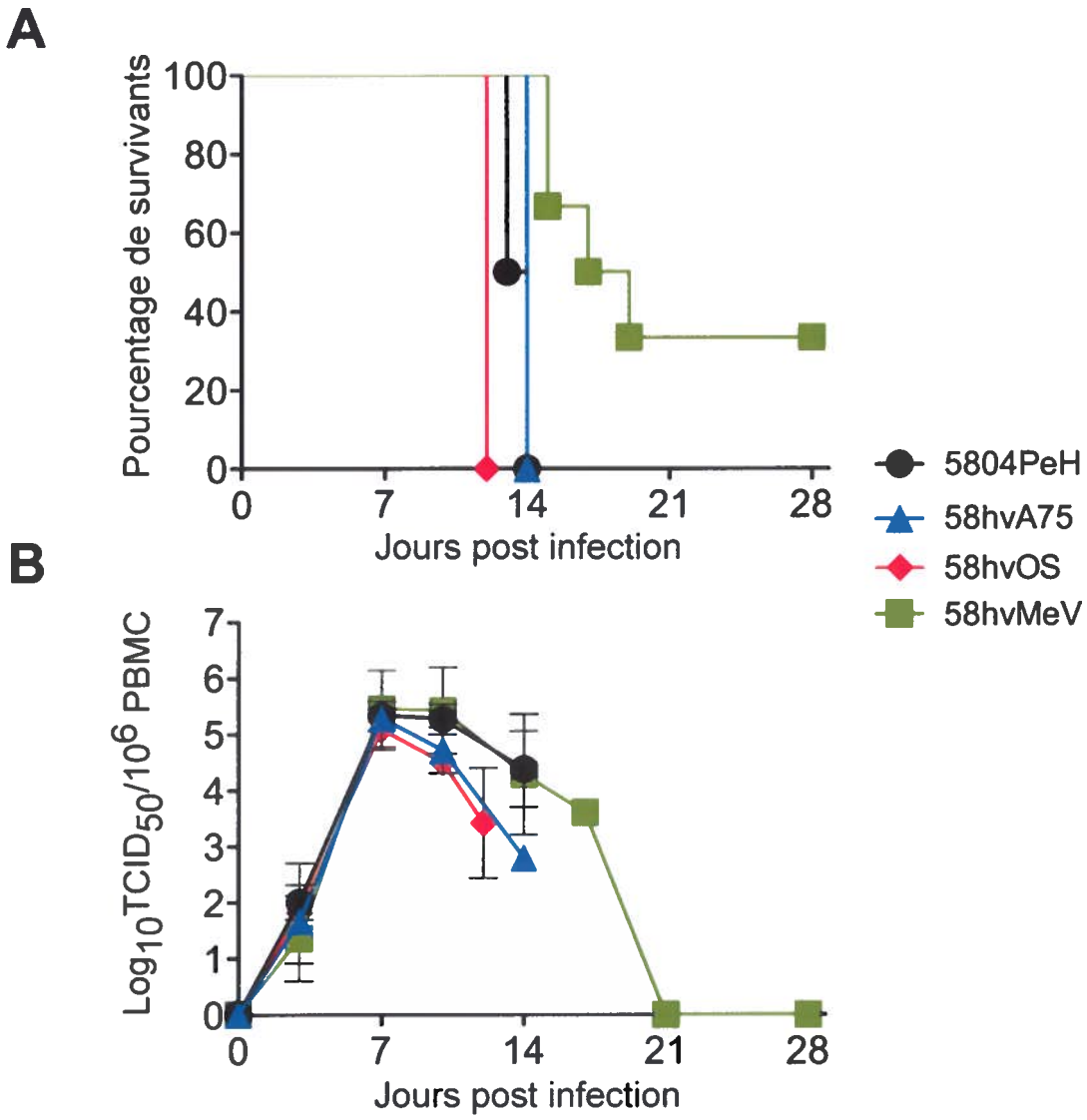


Figure 12 : Survie des furets infectés et virémie. (**A**) Courbe de survie représentant le pourcentage de furets survivants à l'infection par le virus parental 5804PeH et les virus recombinants 58hvA75, 58hvOS, 58hvMeV. (**B**) Évaluation du titre viral dans les PBMC isolés du sang des furets infectés. Le titrage est effectué sur des cellules VerodogSLAMtag et le titre est exprimé en $log_{10}TCID_{50}/10^6$PBMC.

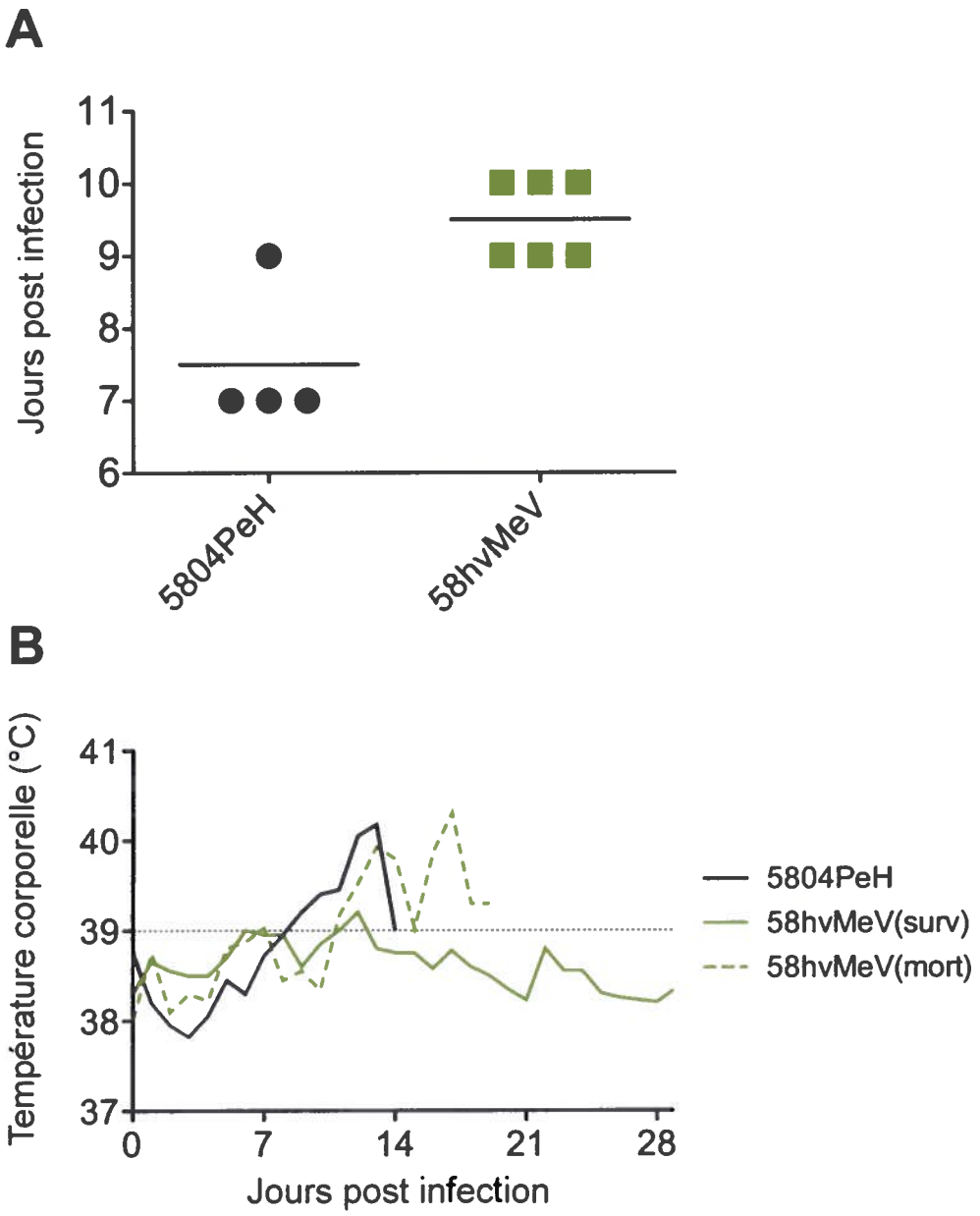


Figure 13 : Évaluation des signes cliniques. (**A**) Apparition des rougeurs de peau chez les furets infectés par le virus parental 5804PeH et le virus recombinant 58hvMeV. Chaque symbole représente un furet. (**B**) Température corporelle des furets. La courbe verte pleine représente les furets infectés par 58hvMeV ayant survécus alors que la courbe verte pointillée représente ceux étant décédés. Les furets sont considérés comme étant fiévreux lorsqu'ils atteignent 39°C (ligne pointillé noire).

4.1.2.2 Leucopénie induite par le virus possédant la région M-F de MeV

Une diminution du nombre de leucocytes est observée chez les furets infectés par des souches létales du CDV (von Messling, Milosevic, et Cattaneo, 2004). Puisque 58hvMeV a mené à une atténuation partielle, nous avons évalué la leucopénie plus en détails. Autant les furets survivants que morts ont subi une chute du nombre de leucocytes dans la première semaine après l'infection pour ensuite se stabiliser à de faibles niveaux (Fig. 14A). Étant donné que les virus produisent la GFP, il a été possible d'analyser par cytofluorométrie en flux le pourcentage des PBMC de furets infectés par 58hvMeV. Au jour trois p.i. les PBMC ne sont pas infectées alors qu'au jour sept p.i. 57 % le sont. Une diminution à 47 % est observée au jour dix p.i. (Fig. 14B). Un test *t* de Student non apparié a permis de déterminer que les différences de 11 % entre 58hvMeV et 5804PeH aux jours sept et dix p.i. ne sont pas significatives. L'évolution du pourcentage de PBMC infectés par 58hvMeV est donc similaire à celle du virus parental.

4.1.2.3 Réponse immunitaire des furets infectés par 58hvMeV

Bien qu'une immunosuppression ait été observée chez les furets survivants à l'infection de 58hvMeV nous avons mesuré la réponse en anticorps neutralisants afin d'expliquer l'élimination du virus. Les anticorps neutralisants sont détectés à partir du jour sept p.i. pour les furets ayant survécus alors que pour ceux ayant succombés à la maladie ils sont détectés au jour dix p.i. (Fig. 15). Le titre des anticorps neutralisants augmente progressivement chez les furets survivants jusqu'au jour 21 p.i. où il atteint le seuil de protection (Fig. 15). Par contre, le titre d'anticorps des animaux morts ne progresse pas au-delà du jour dix p.i. Chez les furets survivants à une infection par le CDV un titre en anticorps neutralisant égal ou supérieur à 100 est observé (von Messling et al., 2003). Le test de neutralisation a permis de déterminer que les furets ayant survécus à l'infection de 58hvMeV ont été en mesure de produire des titres d'anticorps neutralisants protecteurs contrairement à ceux étant décédés.

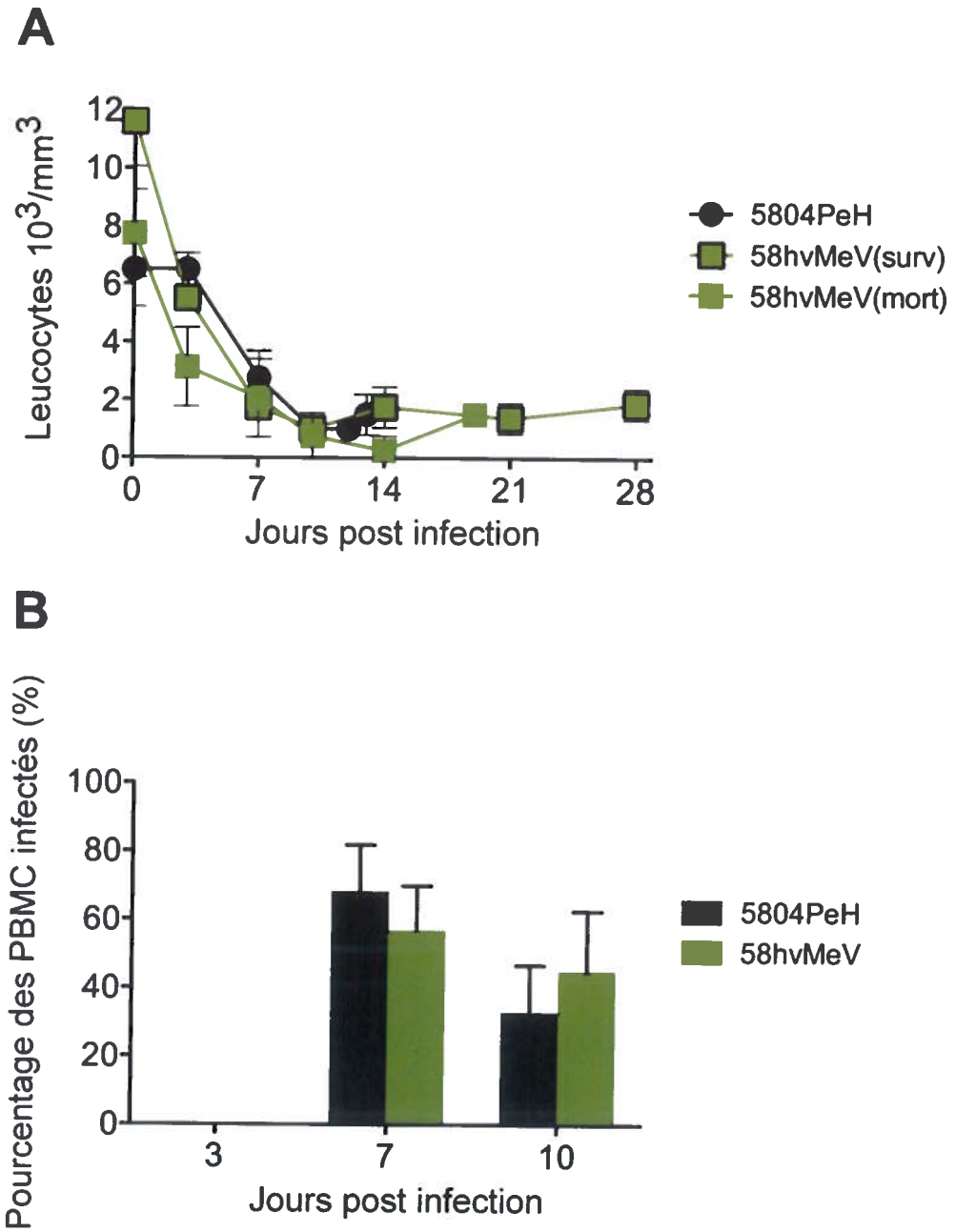


Figure 14 : Évaluation de la leucopénie et de l'infection des PBMC. (**A**) Compte des leucocytes isolés du sang des furets infectés par le virus parental 5804PeH et le virus recombinant 58hvMeV. Le nombre de leucocytes des furets infectés par le virus 58hvMeV est représenté par un carré vert avec ou sans bordure noire pour les furets ayant survécus à l'infection ou étant décédés, respectivement. (**B**) Évaluation du pourcentage de PBMC infectés par 5804PeH ou 58hvMeV à l'aide de la cytofluorométrie en flux.

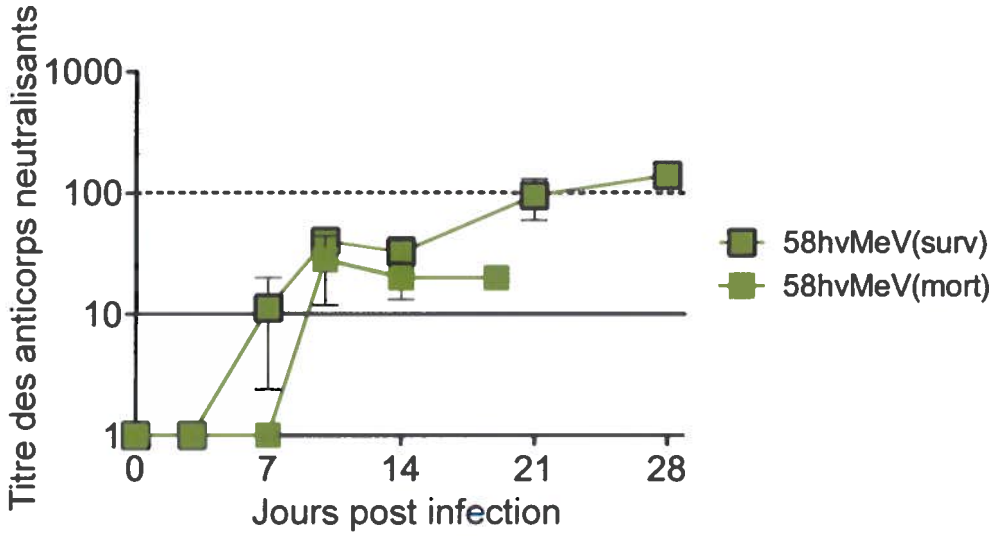


Figure 15 : Évaluation de la réponse immunitaire chez les furets infectés par 58hvMeV. Le titre d'anticorps neutralisants des furets est représenté par un carré vert avec ou sans bordure noire pour les furets ayant survécus à l'infection ou étant décédés, respectivement. Les lignes noires à 10 et 100 représentent respectivement le seuil de détection et le seuil de protection.

4.2 Introduction de la portion M 3' ou F 5' de MeV dans la région M-F de CDV

La région M-F de MeV se différencie par la présence d'une portion F 5' longue et d'un peptide signal de F de longueur standard (Fig. 16). De plus, M-F est 181 nucléotides plus longue que celles de CDV dont 19 nucléotides s'ajoutent à la portion M 3' de MeV. Entre MeV et CDV, 76 % de variabilité est observé au niveau des séquences nucléotidiques de M 3' et 69 % pour F 5'. Par contre, entre des souches du CDV seulement 8-19 % de variabilité est observé pour M 3' et 9-16 % pour F 5'. Ainsi, pour caractériser la base de la prolongation de la maladie observée chez les furets infectés avec 58hvMeV nous avons construit deux virus recombinants, soit 58hv3'MeV et 58hv5'MeV, qui possèdent respectivement la portion M 3' ou F 5' de MeV (Fig. 17).

4.2.1 Caractérisation des virus recombinants *in vitro*

L'efficacité de réplication ainsi que les effets cytophatiques des virus recombinants 58hv3'MeV et 58hv5'MeV ont été comparés à celle du virus parental 5804PeH et du virus 58hvMeV dans les cellules VerodogSLAMtag (Fig. 18A). Les virus 58hv3'MeV et 58hv5'MeV se répliquent de façon similaire à 5804PeH, ne démontrant pas l'augmentation du titre associé aux cellules observé pour 58hvMeV. L'introduction des portions M 3' et F 5' de MeV dans le CDV n'a donc aucun impact sur l'efficacité de réplication. Toutefois au niveau du phénotype syncytial, ces virus recombinants forment des syncytium plus grands que ceux de la souche parentale et 58hvMeV tel qu'observé au jour deux p.i. (Fig. 18B).

4.2.2 Évaluation de la virulence chez le furet

Afin d'évaluer l'impact de l'insertion des portions de la région M-F de MeV dans le CDV sur la pathogenèse, des groupes de trois furets ont été infectés avec 58hv3'MeV ou 58hv5'MeV. L'insertion de la portion M 3' de la région M-F de MeV est associée avec une prolongation de la maladie puisque deux furets infectés par 58hv3'MeV sont morts au jour 16 p.i. et le troisième au jour 17 p.i. (Fig. 19A, losanges verts).

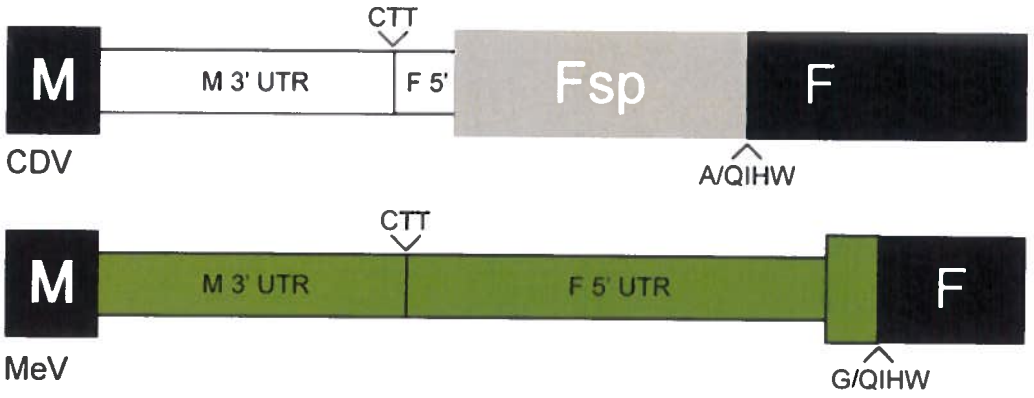


Figure 16 : Schéma comparatif de la région M-F des virus recombinants 5804PeH et 58hvMeV. La région M-F de MeV est 181 nucléotides plus longue que celle de CDV et se différencie par une portion F 5' longue et un peptide signal de F (Fps) standard. La portion M 3' de MeV possède 19 nucléotides de plus que celle de CDV et la portion F 5' en possède 162 de plus. Le site de clivage du Fps est noté par la séquence en aa A/QIHW pour le CDV et G/QIHW pour le MeV.

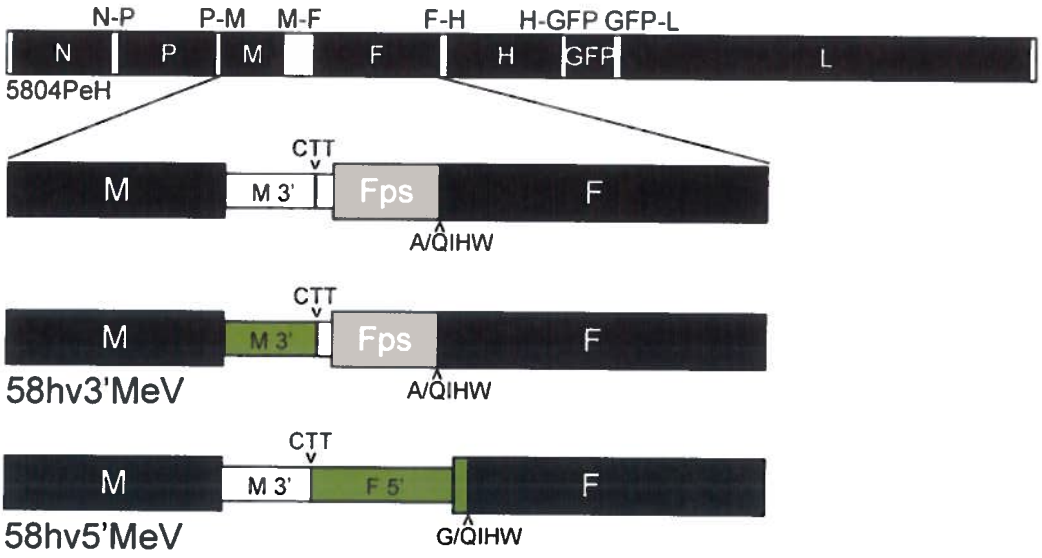


Figure 17 : Schéma du génome et de la région M-F des virus recombinants 58hv3'MeV et 58hv5'MeV. Tous les virus recombinants sont fabriqués à partir du génome de la souche 5804PeH du CDV dans lequel la région M-F est modifiée. Les virus recombinants 58hv3'MeV et 58hv5'MeV possèdent les portions M 3' et F 5' du virus MeV, respectivement. La région M-F est composé d'une portion M 3' non traduite suivie de la portion F 5' non traduite. Ces deux portions sont séparées par le triplet intergénique CTT, suivi du peptide signal (Fps) de la protéine F. Le site de clivage de Fps est noté par la séquence en aa A/QIHW pour les souches de CDV et G/QIHW pour le virus MeV.

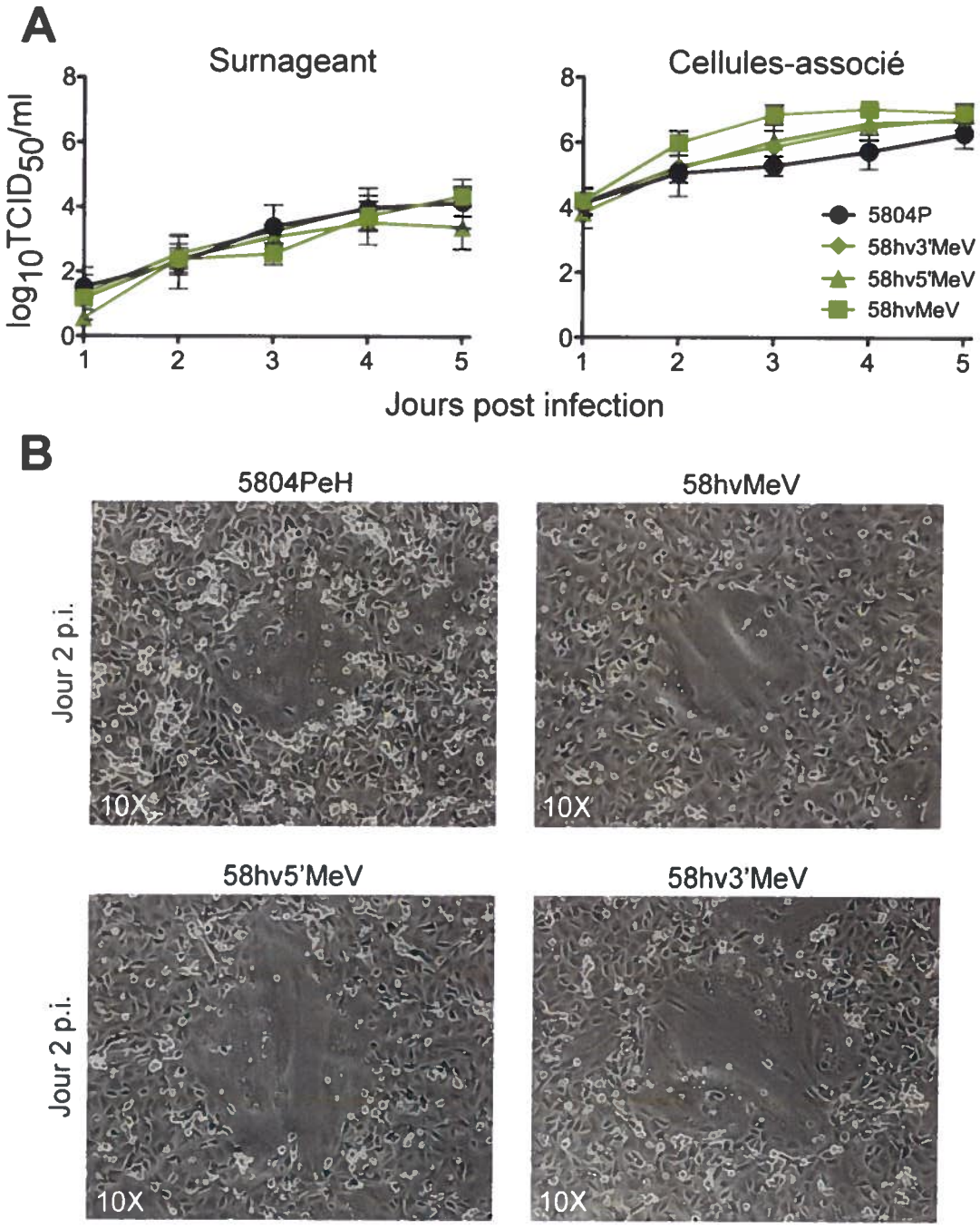


Figure 18 : Cinétiques de réplications virales. (**A**) Des cellules VerodogSLAMtag sont infectées par les virus 5804PeH, 58hv3'MeV, 58hv5'MeV et 58hvMeV. Le titre des virus présents dans le surnageant où dans les cellules est évalué durant les 5 jours suivants et est exprimé en $log_{10}TCID_{50}$/ml. (**B**) Évaluation du phénotype syncytial par la prise de photos des cellules infectées au jour 2 p.i. par microscopie à contraste de phase.

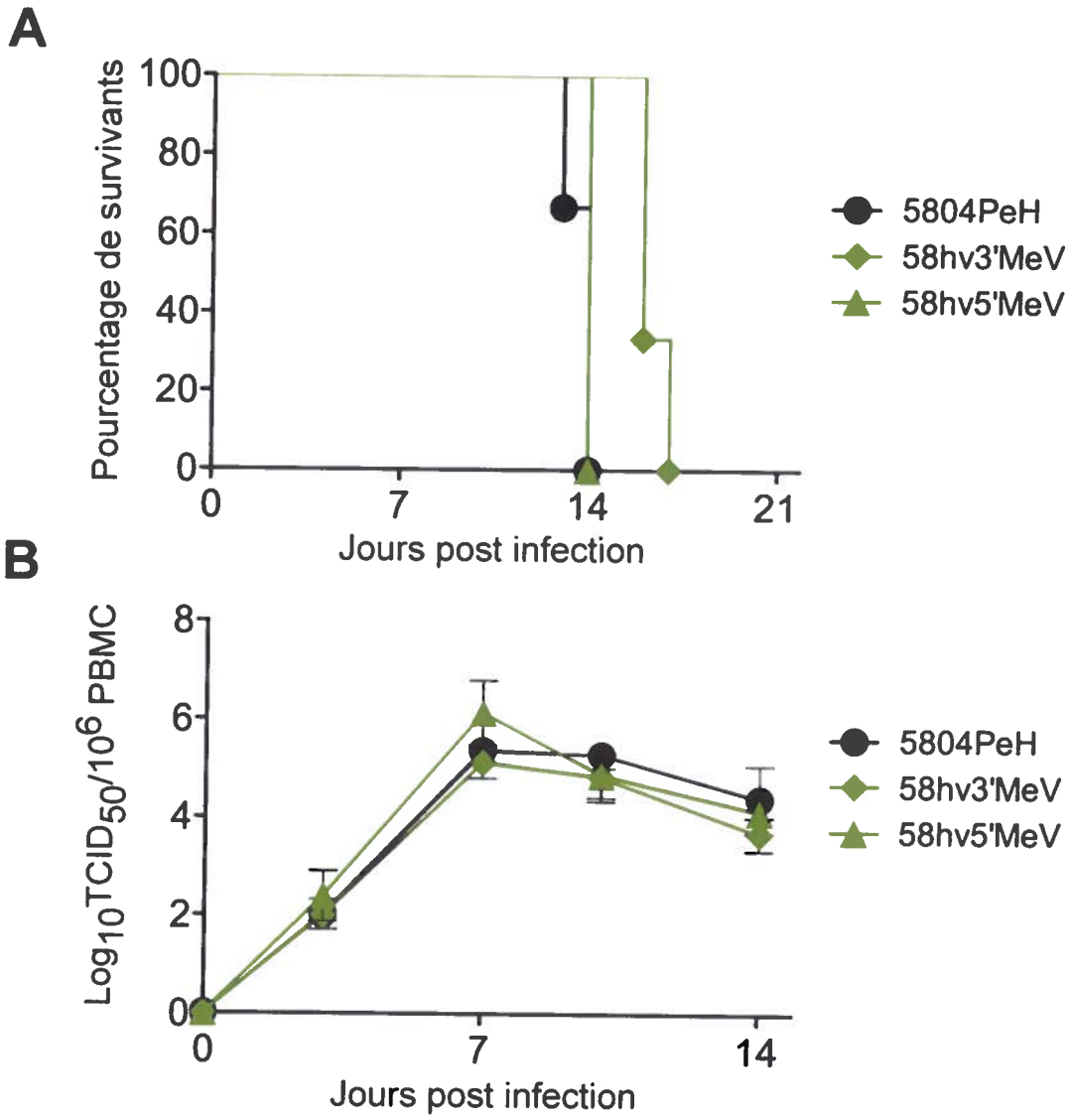


Figure 19 : Survie des furets infectés et virémie. (**A**) Courbe de survie représentant le pourcentage de furets survivants à l'infection par le virus parental 5804PeH et les virus recombinants 58hv3'MeV, 58hv5'MeV. (**B**) Évaluation du titre viral dans les PBMC isolés du sang des furets infectés. Le titrage est effectué sur des cellules VerodogSLAMtag.

Les rougeurs de peaux apparaissent aux jours huit p.i. pour deux furets et neuf p.i. pour le troisième. De plus, la fièvre débute seulement au jour 13 p.i. et se maintient jusqu'à leur décès (données non montrées). Par contre, l'insertion de la portion F 5' n'a aucun effet sur la virulence puisque les furets décèdent au jour 14 p.i., c'est-à-dire au même moment

que ceux infectés par la souche parentale 5804PeH (Fig. 19A, triangles verts). Les rougeurs de peaux apparaissent aux jours huit à dix p.i. et une fièvre débute au jour 11 p.i. (données non montrées). Étant donné qu'une prolongation de la maladie a été observée uniquement avec 58hv3'MeV, il semble que la portion M 3' est importante pour le maintien de la virulence.

Le titrage des deux virus recombinants présent dans les PBMC des furets a démontré que ces derniers suivent une cinétique similaire à celle engendrée par la souche parentale (Fig. 19B). La légère prolongation de la maladie chez les furets infectés par 58hv3'MeV ne peut donc pas être attribuée à un défaut de réplication *in vivo*.

4.2.2.1 Leucopénie induite par 58hv3'MeV

Une prolongation de la maladie chez les furets infectés par 58hv3'MeV ayant été observée, il était intéressant d'évaluer l'immunosuppression. Ce virus entraîne une diminution du nombre de leucocytes dans la première semaine après l'infection pour ensuite se stabiliser à de faibles niveaux ce qui est similaire aux observations effectuées chez les furets infectés par 5804PeH et 58hv5'MeV (Fig. 20). Ces résultats sont aussi similaires à ceux observés chez les furets infectés par 58hvMeV (Fig. 14A).

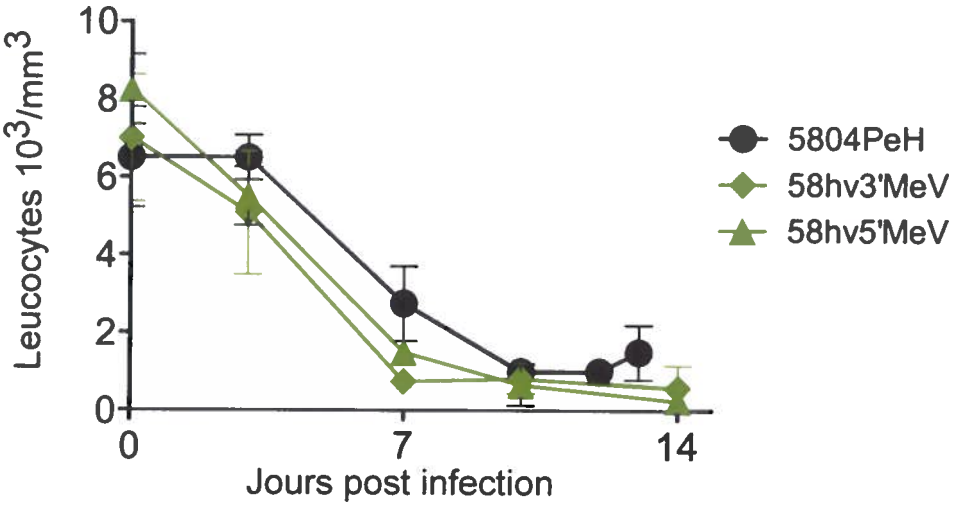


Figure 20 : Évaluation de la leucopénie. Compte des leucocytes isolés du sang des furets infectés par le virus parental 5804PeH et les virus recombinants 58hv3'MeV et 58hv5'MeV.

4.3 Délétions de la portion M 3' de la région M-F du CDV ou remplacement par une séquence aléatoire

Précédemment, des études ont démontré que le remplacement de la région M-F avec la région intergénique N-P de longueur standard menait à une atténuation de la souche 5804PeH du CDV (Fig. 21, virus 58utrMF-NPΔF_{106}) (Anderson et von Messling, 2008). Toutefois, la délétion de la portion F 5' n'entraînait aucune modification puisque tous les furets infectés décédaient au même temps que ceux infectés par la souche 5804PeH (Fig. 21, virus 58ΔF_{106}). Cela, en combinaison avec notre observation que le remplacement de la portion M 3' avec celle de MeV menait à une légère prolongation de la maladie (Fig. 19A, losanges verts), suggère que la portion M 3' est la plus importante pour le maintien de la virulence. Nous avons donc décidé de concentrer les analyses subséquentes sur la portion M 3' afin d'identifier les déterminants de la virulence dans cette portion. Nous avons effectué la délétion de la première et seconde moitié de M 3' ainsi que de la portion entière pour obtenir les virus recombinants : 58ΔF_{106}-Md_{1-174}, 58ΔF_{106}-$Md_{175-396}$ et 58ΔF_{106}-Md_{1-335} (Fig. 22). De plus, nous avons produit le virus 58ΔF_{106}-Md_{1-336}GFP dont les 336 premiers nucléotides de M 3' sont remplacés par la séquence partielle de la GFP. Le génome de la souche 58ΔF_{106} dans lequel la portion F 5' est absente (Fig. 21, virus 58ΔF_{106}) a été utilisé permettant ainsi d'éviter toute contribution de cette dernière.

4.3.1 Caractérisation des virus recombinants *in vitro*

La cinétique de réplication et les effets cytopathiques des virus recombinants 58ΔF_{106}-Md_{1-174}, 58ΔF_{106}-$Md_{175-396}$, 58ΔF_{106}-Md_{1-335} et 58ΔF_{106}-Md_{1-336}GFP ont été comparés à ceux de la souche parentale 58ΔF_{106} dans les cellules VerodogSLAMtag. Dans les cellules le titre de 58ΔF_{106}-Md_{1-174} et 58ΔF_{106}-$Md_{175-396}$ est huit et six fois plus élevé aux jours trois et quatre p.i., respectivement, comparé au virus parental (Fig. 23A, triangles bleus et rouges). Pour 58ΔF_{106}-Md_{1-335} le titre associé aux cellules est quatorze et vingt-deux fois plus élevé aux jours trois et cinq p.i., respectivement, que ceux de la souche parentale (Fig. 23A, carrés verts). Une augmentation de cinquante et cinquante-six fois sont observée aux jours deux et trois p.i. pour le titre de 58ΔF_{106}-Md_{1-336}GFP dans les

cellules (Fig. 23A, losanges violets). La cinétique de relâche des différents virus dans le surnageant est similaire à celle de la souche parentale à l'exception d'un titre vingt-huit fois plus élevé au jour quatre p.i. pour 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP (Fig. 23A, losanges violets).

Au niveau du phénotype syncytial, 58ΔF$_{106}$-Md$_{175-396}$ forme des syncytium de taille similaire à ceux de la souche parentale 58ΔF$_{106}$ alors que 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-174}$, 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-335}$ et 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP forment des syncytium légèrement plus grands (Fig. 23B).

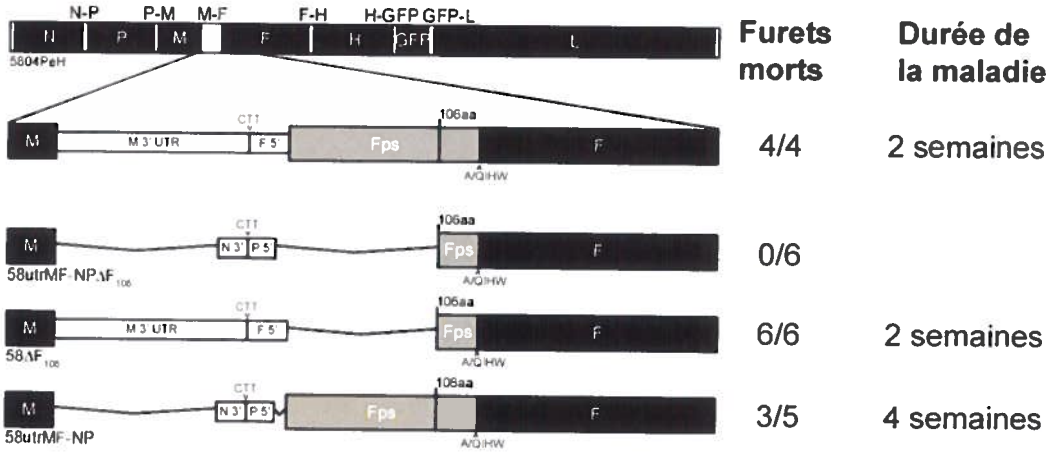


Figure 21 : Schéma des virus recombinants 58utrMF-NPΔF$_{106}$, 58ΔF$_{106}$ et 58utrMF-NP. Les virus sont produits à partir du génome de la souche 5804PeH dans lequel la région M-F a été remplacée par la région N-P pour 58utrMF-NPΔF$_{106}$. Pour 58ΔF$_{106}$ les 106 premiers acides aminés du peptide signal de F (Fps) ont été supprimés. La région M-F a été remplacée par la région N-P sans supprimer le Fps pour 58utrMF-NP. À droite du schéma est indiqué le nombre de furets morts suite à l'infection par les différents virus ainsi que la durée de la maladie. Modifiée de Anderson et von Messling, 2008.

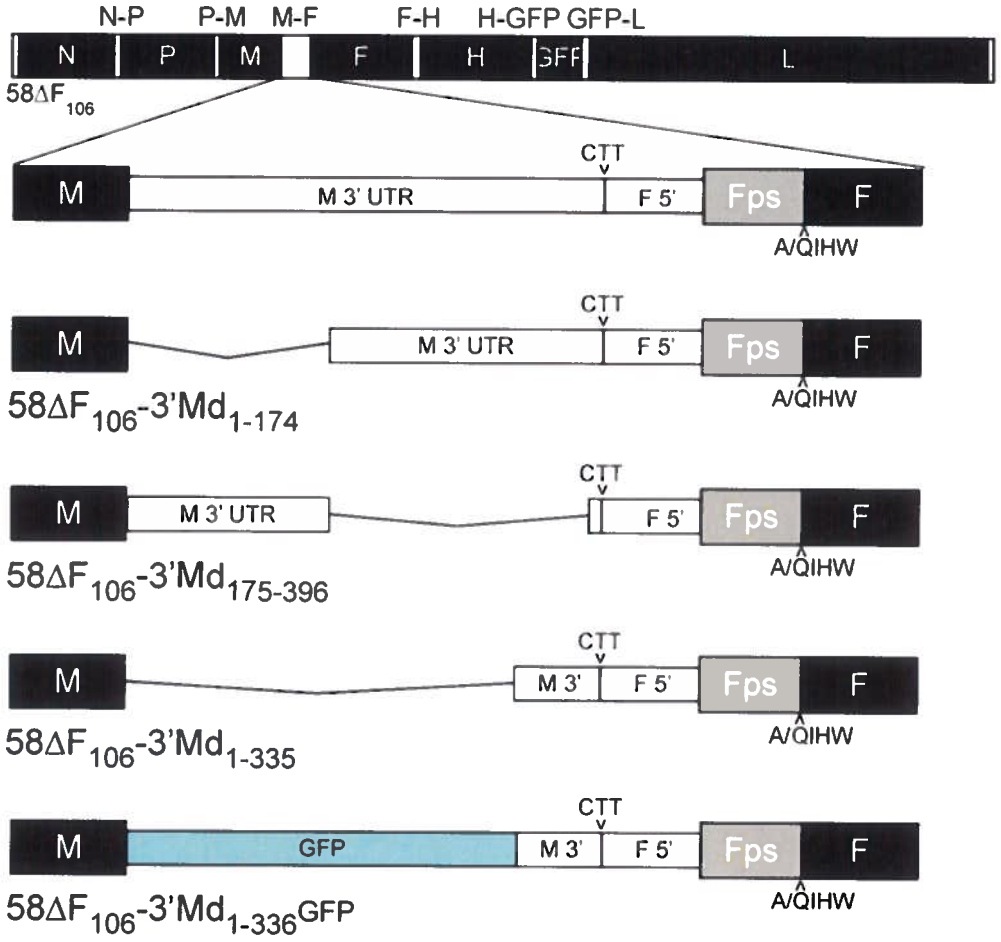


Figure 22 : Schéma du génome et de la région M-F des virus recombinants $58\Delta F_{106}$-$3'Md_{1-174}$, $58\Delta F_{106}$-$3'Md_{175-396}$, $58\Delta F_{106}$-$3'Md_{1-335}$ et $58\Delta F_{106}$-$3'Md_{1-336}$GFP. Tous les virus recombinants sont fabriqués à partir du génome de la souche 5804PeH du CDV dans lequel la région M-F est modifié tels que les 106 premières résidus du peptide signal Fsp de la protéine F sont délétés ($58\Delta F_{106}$). Un codon start artificiel est inséré en position 107 afin d'initier la traduction du gène F. En plus de cette délétion dans le gène F, les 174 premières bases, les bases 175 à 396 ou les 335 premières bases de la portion M3' sont délétées pour les virus $58\Delta F_{106}$-$3'Md_{1-174}$, $58\Delta F_{106}$-$3'Md_{175-396}$ et $58\Delta F_{106}$-$3'Md_{1-335}$, respectivement. Pour le virus $58\Delta F_{106}$-$3'Md1_{-336}$GFP les nucléotides 1 à 336 sont remplacés par la séquence partielle de la GFP. La région M-F est composée d'une portion M 3' non traduite suivie de la portion F 5' non traduite. Ces deux portions sont séparées par le triplet intergénique CTT, suivi du peptide signal Fps de la protéine F. Le site de clivage du Fps est noté par la séquence en aa A/QIHW.

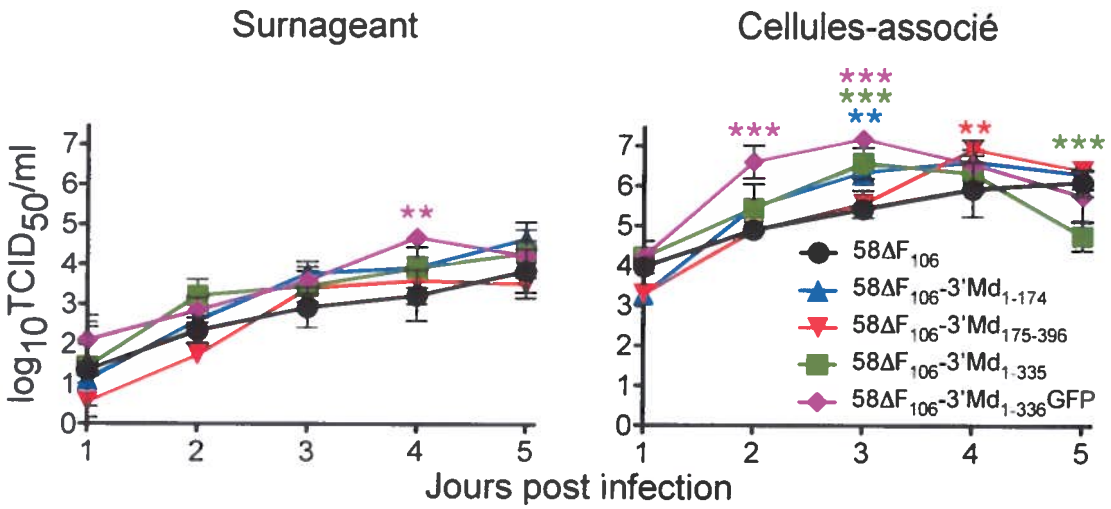


Figure 23A : Cinétiques de réplications virales. Des cellules VerodogSLAMtag sont infectées par les virus $58\Delta F_{106}$, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-174}, $58\Delta F_{106}$-3'$Md_{175-396}$, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-335} et $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-336}GFP. Le titre des virus présents dans le surnageant où dans les cellules est évalué durant les 5 jours p.i. et est exprimé en $log_{10}TCID_{50}$/ml. Les titres des virus recombinants étant significativement différent de ceux de 5804PeH sont annotés par des astérisques indiquant la valeur P calculée à l'aide d'un test ANOVA à deux facteurs avec correction de Bonferroni. * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$; *** : $P<0.001$.

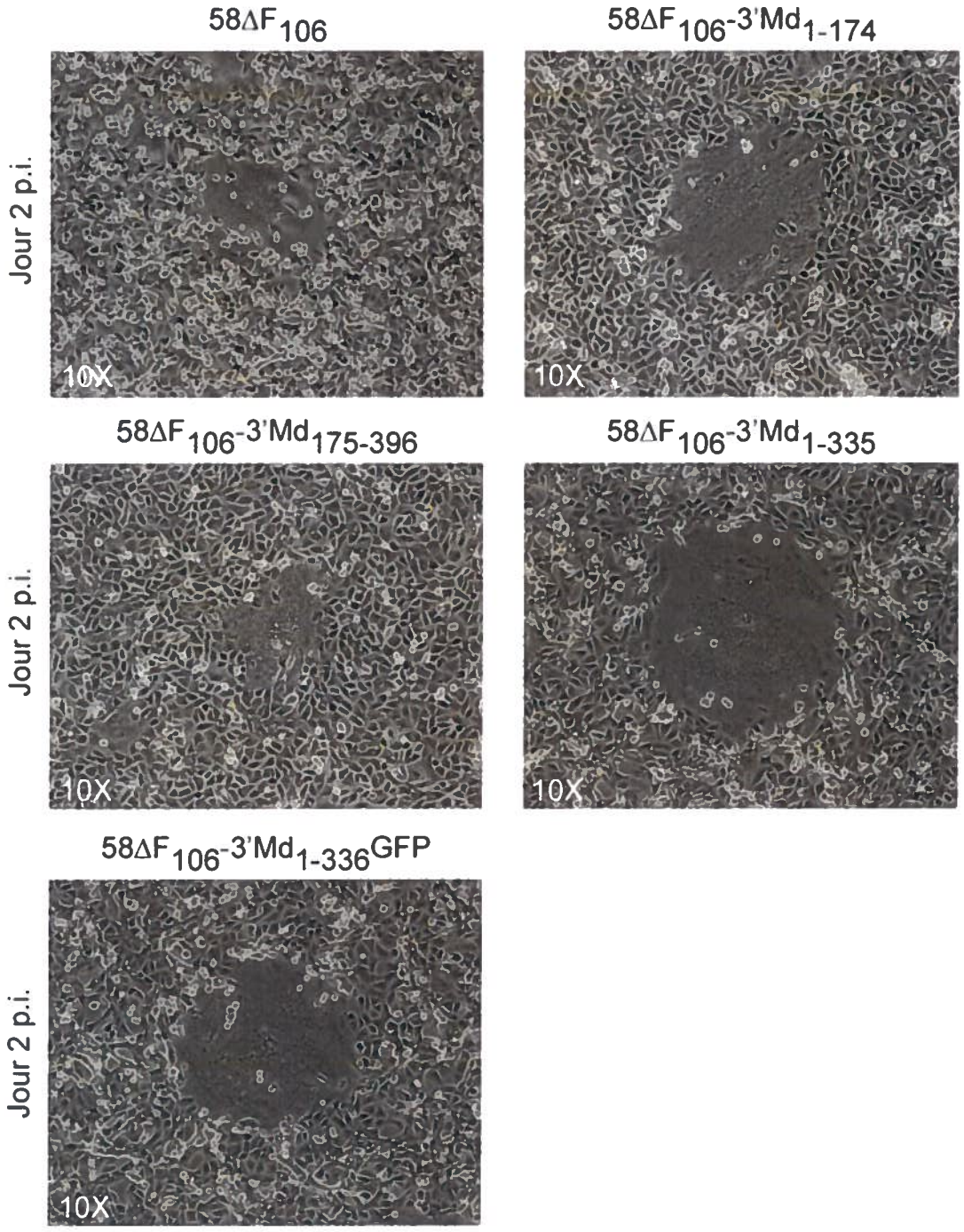


Figure 23B : Évaluation du phénotype syncytial. Photos des cellules VerodogSLAMtag infectées par les virus $58\Delta F_{106}$, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-174}, $58\Delta F_{106}$-3'$Md_{175-396}$, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-335} et $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-336}GFP au jour 2 p.i. prises en microscopie à contraste de phase.

4.3.2 Évaluation du phénotype viral chez le furet

Pour évaluer l'implication de différentes portions de M 3' ainsi que la longueur de la région M-F dans la pathogenèse, des groupes de quatre furets ont été infectés avec les virus recombinants 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-174}$, 58ΔF$_{106}$-Md$_{175-396}$, 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-335}$. Pour évaluer la spécificité de la séquence un groupe de furet a été infecté avec 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP. Les trois délétions de la portion M 3' mènent à une légère prolongation de la maladie. En effet, un furet infecté par 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-174}$ est mort au jour 18 p.i. et un autre a survécu à l'infection (Fig. 24A, triangles rouges). Des rougeurs de peau sont apparues au jour 12 p.i. et une fièvre a débuté au jour neuf p.i. pour l'animal étant décédé au jour 18 p.i. (données non montrées). Pour l'animal ayant survécu, de faibles rougeurs ont été observées entre les jours 11 à 13 p.i. et une fièvre seulement au jour 23 p.i. (données non montrées). Les deux autres furets du groupe sont décédés au jour 15 p.i.(Fig. 24A, triangles rouges) et présentaient des signes cliniques similaires à ceux engendrés par 5804PeH. Parmi les furets infectés par 58ΔF$_{106}$-Md$_{175-396}$ deux sont morts aux jours 16 et 18 p.i., respectivement (Fig. 24A, triangles bleus). Des rougeurs de peaux sont apparues aux jours huit et neuf p.i. et une fièvre a débuté aux jours sept et huit p.i. pour ces derniers ce qui est similaire chez les furets infectés par 5804PeH (données non montrées). Les deux autres furets sont décédés aux jours 12 et 15 p.i., ce qui est similaire à ce qui est observé avec 5804PeH (Fig. 24A, triangles bleus). Le furet mort au jour 15 p.i. débute une fièvre au jour 11 p.i. avec l'apparition des rougeurs (données non montrées). Celui décédé au jour 12 p.i. débute une fièvre au jour cinq p.i. et des rougeurs apparaissent au jour neuf p.i. (données non montrées). Chez les furets infectés par 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-335}$, deux sont mort au jour 16 p.i., un au jour 18 p.i. et le dernier au jour 24 p.i. Une fièvre apparaît aux jours 12-13 p.i. et des rougeurs de peau aux jours sept à huit p.i. pour ces furets. Toutefois, les rougeurs du furet étant mort au jour 24 était faibles jusqu'au jour 21 p.i. comparées à celles des autres animaux. Au jour 21 p.i., elles ont augmenté. Tous les furets infectés par 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP ont survécu (Fig. 24A, losanges violets), sans aucune fièvre et seulement de légères rougeurs de peau transitoires ont été observées aux jours neuf à dix p.i. Contrairement aux virus avec des délétions, la leucopénie entraînée par le virus atténué n'est que transitoire (donnée non montrée).

L'évaluation de la virémie dans les PBMC pour 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-174}$, 58ΔF$_{106}$-Md$_{175-396}$, 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-335}$ et 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP démontre une cinétique similaire à celle de 58ΔF$_{106}$ avec un pic de réplication au jour sept p.i. Toutefois, les virus 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-335}$ et 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP ne sont pas détectés au jour trois p.i., indiquant un délai dans l'infection des PBMC. L'élimination de 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-174}$ est observée à partir du jour 21 p.i. chez les furets ayant survécus à l'infection par 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-174}$ et 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP (Fig. 24B, triangles rouges et losanges violets). De plus, chez le furet décédé au jour 24 p.i. suite à l'infection par 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-335}$ une augmentation de la virémie est observée entre les jours 14 et 21 p.i. ce qui corrèle avec l'aggravation de l'état clinique observé au jour 21 p.i.

4.3.3 Évaluation de l'infection des PBMC par les différents virus recombinants

Grâce à la cytofluorométrie en flux nous avons comparé l'étendue de l'infection des PBMC des différents virus recombinants avec celle du virus parental. Il a été observé que pour tous les virus recombinants, excepté 58ΔF$_{106}$-Md$_{175-396}$, un moins grand nombre de PBMC étaient infectés aux jours sept et 14 p.i.. Respectivement, 56 et 46 % moins de PBMC sont infectés par 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-174}$ et 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-335}$ comparé à la souche parentale au jour sept p.i. ainsi que 95 et 93 % de moins au jour 14 p.i. (Fig. 25). Pour 58ΔF$_{106}$-Md$_{1-336}$GFP, 94% de moins de PBMC sont infectés au jour sept p.i. et 95% de moins au jour 14 p.i comparé au virus parental (Fig. 25).

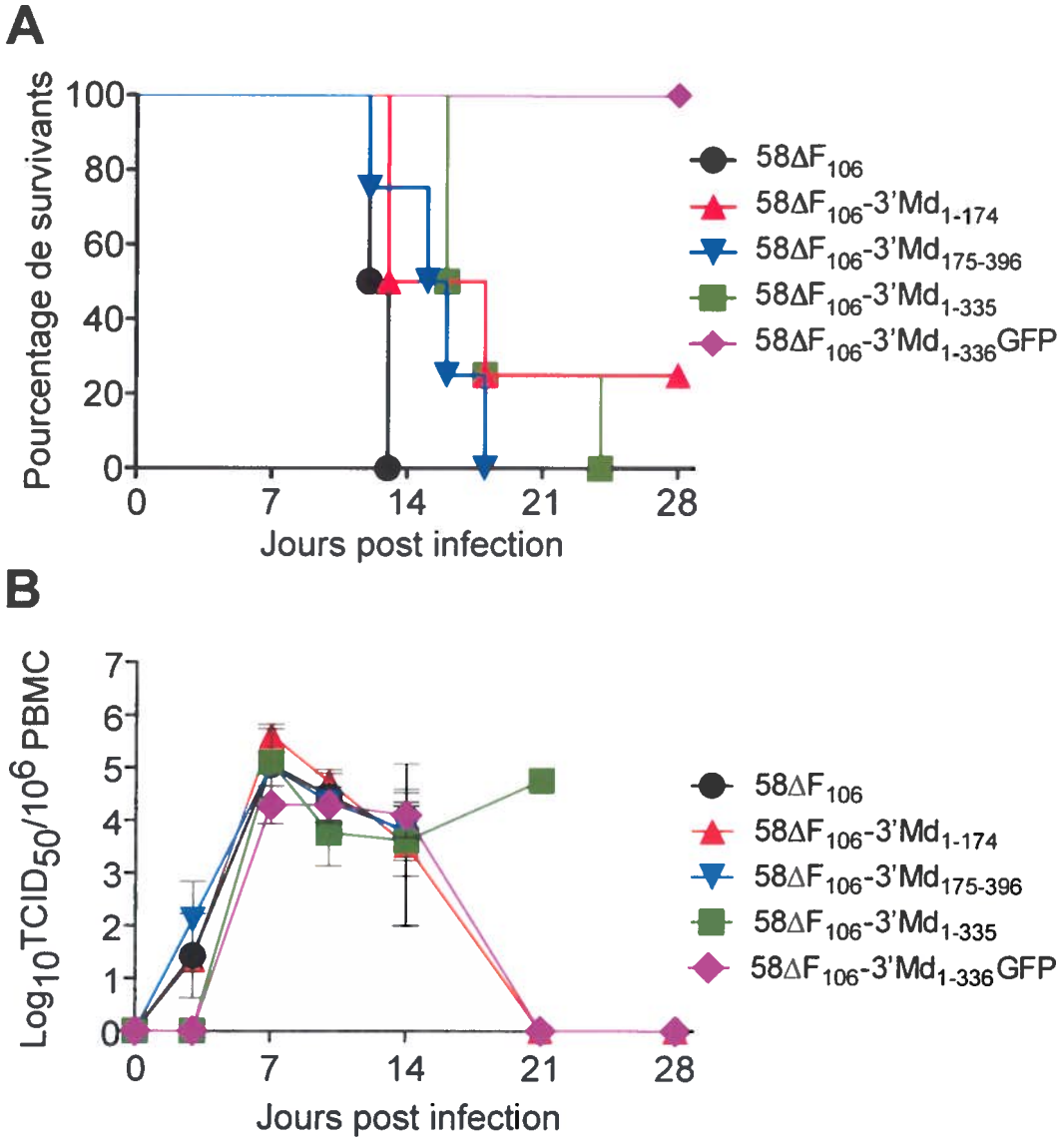


Figure 24 : Survie des furets infectés et virémie. (**A**) Courbe de survie représentant le pourcentage de furets survivants à l'infection par le virus parental $58\Delta F_{106}$ et les virus recombinants $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-174}, $58\Delta F_{106}$-3'$Md_{175-396}$, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-335} et $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-336}GFP. (**B**) Évaluation du titre viral dans les PBMC isolés du sang des furets infectés. Le titrage est effectué sur des cellules VerodogSLAMtag.

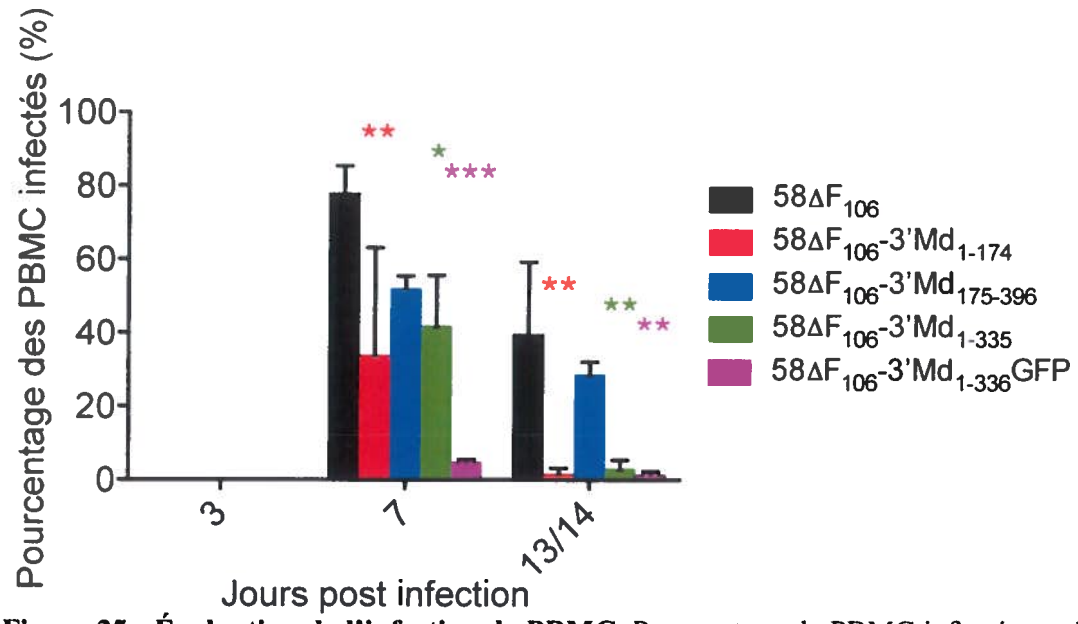


Figure 25 : Évaluation de l'infection de PBMC. Pourcentage de PBMC infectés par les virus $58\Delta F_{106}$, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-174}, $58\Delta F_{106}$-3'$Md_{175-396}$, $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-335} et $58\Delta F_{106}$-3'Md_{1-336}GFP déterminé à l'aide de la cytofluorométrie en flux. Les pourcentages dont la valeur est significativement différente de celles de la souche parentale $58\Delta F_{106}$ sont annotés par des astérisques indiquant la valeur P calculée à l'aide d'un test ANOVA à un facteur avec un post-test Tukey. * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$; *** : $P<0.001$.

Chapitre 5 : Discussion

Le but de mon projet était l'identification des éléments de la région M-F responsables pour le maintien de la virulence du CDV. L'UTR entre les gènes M et F est trois à cinq fois plus longue que les autres UTR du génome. De plus, la région M-F du CDV est génétiquement deux à trois fois plus variable que d'autres régions du génome. Pour déterminer la contribution de ces deux éléments au maintien de la virulence du CDV nous avons effectués des échanges de la région M-F entre différentes souches du CDV et du MeV ainsi que des délétions de cette région.

L'échange de la région M-F entre différentes souches de CDV ne modifie pas la pathogenèse, démontrant ainsi que l'hypervariabilité génétique n'a pas d'impact sur la fonctionnalité. L'insertion de la région M-F du MeV mène à une légère prolongation de la maladie ainsi qu'a la survie d'un tiers des furets, indiquant que les éléments essentiels au maintien de la virulence sont en partie conservés chez MeV. L'insertion de la portion M 3' de MeV nous a permis de localiser ces éléments dans cette dernière. Le remplacement de M 3' par une séquence aléatoire menant à une atténuation, a permis de confirmer la présence de ces éléments dans cette portion de la région M-F. De plus, il a été démontré que la longueur de la région M-F joue un rôle dans le maintien de la virulence puisque des délétions de la portion M 3' ont entrainé une légère prolongation de la maladie.

5.1 Des éléments conservés dans l'UTR M 3' sont responsables du contrôle de la virulence exercé par la région M-F chez le CDV

La région M-F est essentielle au maintien de la virulence du CDV (Anderson et von Messling, 2008). Alors que l'échange de cette région entre différentes souches du CDV ne modifie pas la pathogenèse, l'insertion de la région M-F du MeV provoque une légère prolongation de la maladie et la survie d'un tiers des furets. Ces animaux étant hautement susceptibles au virus (von Messling et al., 2003), la modification de la maladie, bien que

légère, démontre que des éléments essentiels au maintien de la virulence du CDV sont absents de la région M-F du MeV. Récemment, il a été démontré qu'une séquence d'une centaine de nucléotides située dans la portion M 3' est conservée entre différentes souches virulentes du CDV mais est absente chez MeV (Wiener et al., 2010). L'infection par le virus recombinant 58hv3'MeV ayant menée à une légère prolongation de la maladie, cela démontre que des éléments contribuant à la virulence sont situés dans la portion M 3'. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par *Anderson et al.* qui ont démontré que la région M 3' permet le maintien de la virulence en absence de la portion F 5' (Fig. 21, 58ΔF_{106}). Lorsque les 336 premiers nucléotides de M 3' sont remplacés par la séquence partielle de la GFP qui n'est pas d'origine virale, le virus 58ΔF_{106}-3'Md_{1-336}GFP est atténué, ce qui confirme la présence d'éléments nécessaires au maintien de la virulence dans cette région. De plus, le remplaçement de la portion M 3' avec celle de N 3' avait aussi mené à un virus atténué (Fig. 21, 58utrMF-NPΔF_{106}) (Anderson et von Messling, 2008). Une comparaison entre la séquence de N 3' avec les séquences de M 3' de différentes souches du CDV démontre une variabilité de 37-42% (Fig. 26). Il est donc probable que les éléments permettant le maintien de la virulence soient spécifiques à la région M 3' des morbillivirus.

A

B

	OS M 3'	A75 M 3'	5804PeH M 3'
5804PeH N 3'	42 %	37 %	41 %

Figure 26 : Variabilité entre M 3' et N 3'. (**A**) Alignement des séquences M 3' de la région M-F des souches OS, A75 et 5804PeH du CDV avec la séquence N 3' de la région N-P de 5804PeH. Le rouge indique une conservation entre toutes les séquences. Le vert, une conservation entre les séquences de M 3' des trois souches de CDV. Le bleu, une conservation entre les séquences de M 3' de deux souches du CDV. (**B**) Pourcentage de variabilité entre les différentes séquences.

L'atténuation de 58utrMF-NPΔF$_{106}$ corrèle avec la hausse du niveau d'expression de l'ARNm de F (Anderson et von Messling, 2008), représentant le premier mécanisme de régulation de la transcription connue chez les morbillivirus. Par contre, d'autres mécanismes sont connus pour certains paramyxovirus. Par exemple, une terminaison inefficace de la transcription de M au niveau de l'UTR M-F du virus parainfluenza humain 1 entraîne la transcription d'une grande quantité d'ARNm bicistronique M-F au détriment de la transcription monocistronique de F ce qui diminue son expression (Bousse et al., 2002). La terminaison inefficace de M est liée à la présence de certains nucléotides dans le triplet intergénique et le site d'initiation de la transcription. Au contraire, la grande quantité d'ARNm bicistronique M-F observée chez le virus simian 5 est associé à une terminaison inefficace de la transcription de M due à la présence d'un nucléotide dans le site de terminaison de la transcription qui affaiblit le signal de terminaison (Rassa et Parks, 1998). Pour le virus sendai, ce sont plutot des variations au niveau de la séquence du site d'initiation de la transcription du gène F qui diminuent la capacité à réinitier la transcription comparé à la réinitiation associée aux sites correspondants des gènes N, P et L (Kato et al., 1999).

Lorsque la polymérase virale termine la transcription d'un gène au niveau d'une région intergénique elle reste généralement attachée à la matrice pour réinitier la transcription du gène en aval. Or, le gradient de transcription observé chez les paramyxovirus reflète l'imperfection de cette réinitiation (Cattaneo et al., 1987; Lamb et Parks, 2007). Il est présumé que la polymérase puisse se détacher de la matrice. Ainsi, elle ne peut réinitier la transcription au prochain gène puisqu'il est suggéré que la transcription débute à l'extrémité 3' du génome (Sedlmeier et Neubert, 1998). Chez le MeV, la région M-F est deuxième en importance après N-P quant à l'atténuation de la transcription avec 69 % d'atténuation (Plumet, Duprex, et Gerlier, 2005). Toutefois, le mécanisme de l'atténuation n'est pas connu. Des études effectuées chez le virus respiratoire syncytial et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ont démontré que la réinitiation de la transcription d'un gène est dépendante de la terminaison du gène en amont (Harmon et Wertz, 2002; Hwang, Englund, et Pattnaik, 1998). De plus, il a été démontré pour le VSV que la polymérase virale effectue des pauses au niveau des régions

intergéniques dont la durée augmente plus la polymérase s'éloigne de l'extrémité 3' du génome (Iverson et Rose, 1981). *Iverson et al.* suggère un lien entre l'atténuation de la transcription et les temps de pause puisque qu'elle augmente elle aussi en fonction de l'extrémité 3'. De plus, il stipule que les pauses qu'effectue la polymérase la soumet à la possibilité de se détacher de la matrice. Le mécanisme et la fonction de ces pauses sont peu connus. Chez les Eukaryotes et les Prokaryotes, des pauses de la transcription engendrées par les interactions entre les brins d'acides nucléiques et l'ARN polymérase surviennent, et sont prolongées la majorité du temps par un mouvement de recul de l'enzyme sur la matrice (backtracking) (Landick, 2006). Ce mouvement de recul a été proposé chez le RSV pour expliquer la transcription du gène L dont le site d'initiation de la transcription chevauche celui de la terminaison du gène M2 (Fearns et Collins, 1999). Ces pauses transcriptionnelles peuvent être impliquées dans la régulation de l'expression de certain gènes comme il a été démontré chez *Bacillus subtilis* (Yakhnin, Yakhnin, et Babitzke, 2006). Une pause de l'ARN polymérase au niveau de l'opéron *trp*, permet le recrutement de TRAP qui inhibe la traduction de *trpE*. Il est suggéré qu'une pause effectuée par l'ARN polymérase II agirait au niveau de la régulation de la transcription médié par Tat chez le HIV-1 (Palangat et al., 1998). Ainsi, en supposant que ces événements de pauses surviennent lors de la transcription chez le CDV, comme la réinitiation dépend de la terminaison, le détachement de la polymérase au niveau de la portion M 3' de la région M-F procurerait un mécanisme de régulation de la transcription du gène F.

La glycoprotéine F est essentielle à la propagation du virus car elle médie la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes cellulaires lors de l'entrée ainsi que la fusion des cellules infectées et avoisinantes (Lamb et Parks, 2007). Le remplacement de la portion M 3' de la région M-F du CDV par la portion N 3' augmente l'efficacité de réplication qui se traduit *in vitro* par des titres 10 à 100 fois plus élevés dans les cellules et le surnageant, respectivement, en comparaison avec le virus sauvage. De plus, des syncytium plus larges sont formés (Anderson et von Messling, 2008). Nous avons observé des résultats similaires avec le virus $58\Delta F_{106}$-$Md_{1-336}GFP$ dont les titres sont plus élevés dans les cellules et le surnageant et les syncitium sont plus large en comparaison au virus parental (Fig. 23A et B).

5.2 Importance de la longueur de la région M-F dans le maintien de la virulence

Il a été démontré précédemment que la diminution de longueur de la région M-F par l'échange de cette dernière avec l'UTR N-P mène à une atténuation de la souche 5804PeH du CDV soulignant ainsi l'importance de cette région dans le maintien de la virulence (Anderson et von Messling, 2008). Le rôle de la longueur dans la virulence est confirmé par la prolongation de la maladie que nous avons observé lors de l'infection de furets avec les virus recombinants $58\Delta F_{106}$-Md_{1-174}, $58\Delta F_{106}$-$Md_{175-396}$ et $58\Delta F_{106}$-Md_{1-335} (Fig. 24A) dont la première, et deuxième moitié ainsi que de la portion M 3' entière de la région M-F ont été supprimées, respectivement. Une corrélation entre l'atténuation du CDV par la diminution de la longueur de M-F et l'augmentation de la transcription et la traduction de la protéine F, a été démontré par *Anderson et al.* La région M-F agit donc en tant que régulateur négatif de la transcription de F. Cette régulation à la baisse de la transcription de F associée à la région M-F avait déjà été démontrée chez MeV puisque des délétions effectuées dans cette dernière avaient mené à l'augmentation de l'expression de F (Takeda et al., 2005). Chez le virus de la maladie de Newcastle, un autre paramyxovirus, l'augmentation de la longueur des régions intergéniques F-HN ou HN-L entraîne une diminution de la transcription du gène en aval (Yan et Samal, 2008). Aucun mécanisme permettant d'expliquer la modulation de la transcription de F n'a encore été découvert pour ces virus. Toutefois, chez le virus parainfluenza humain 1, un paramyxovirus, la délétion de 264 nucléotides de l'UTR F 5' entraîne une diminution de la quantité d'ARNm bicistronique M-F ce qui suggère un rôle de la longueur dans la terminaison de la transcription de M (Bousse et al., 2002). Lorsque la polymérase arrive au niveau d'un site de terminaison de la transcription il arrive qu'elle ignore ce signal ce qui engendre la production d'ARNm bicistronique dont uniquement le gène à l'extrémité 3' est traduit par la suite (Lamb et Parks, 2007). Chez le MeV, une grande quantité d'ARNm bicistronique M-F est observée (Cattaneo et al., 1987). Ainsi, la formation d'ARNm bicistronique pourrait constituer un mécanisme par lequel le CDV régule l'expression de F.

Le contrôle de la transcription du gène F mène à des modifications de la réplication et du phénotype syncytial chez le CDV (Anderson et von Messling, 2008). Cette modulation de l'efficacité de réplication et du phénotype syncytial par la région M-F a aussi été observée chez MeV (Takeda et al., 2005). Nous avons observé des résultats similaires avec les virus $58\Delta F_{106}$-Md_{1-174} et $58\Delta F_{106}$-Md_{1-335} dont les titres sont plus élevés dans les cellules et le surnageant et les syncitium sont plus larges en comparaison au virus parental (Fig. 23A et B).

Comme il a été déjà suggéré, le contrôle de la transcription de F pourrait servir de mécanisme au CDV dans l'évasion de ce dernier face à la réponse immunitaire (Anderson et von Messling, 2008). Ainsi, la prolongation de la maladie observée chez les furets infectés par les virus recombinants possédant des délétions de la portion M 3' pourrait être due à une meilleure élimination de ces derniers par le système immunitaire, causée par une plus forte expression de F comparée au virus parental. Bien que la longueur participe au maintien de la virulence, son impact est moins important que celui de la séquence puisque les délétions n'engendrent qu'une légère prolongation de la maladie.

5.3 Approche rationnelle pour le développement de nouveaux vaccins morbillivirals

Parmi les vaccins disponibles contre le CDV, les vaccins vivants atténués (*modified live virus*, MLV) fabriqués à partir des souches atténuées par de multiples passages cellulaires sont les plus utilisés et procurent une protection à long terme aux chiens en plus d'être sécuritaires (Schultz et al., 2010). Toutefois, ces vaccins restent virulents pour certaines espèces sauvages hautement susceptibles telles que les furets à pattes noires, les pandas roux et les kinkajous (Bush et al., 1976; Carpenter et al., 1976; Kazacos et al., 1981). L'utilisation de vaccins inactivés est inefficace (Appel et al., 1984). Les mécanismes d'atténuation des MLV sont peu connus. Des comparaisons de séquences codantes et non codantes entre des souches sauvages et vaccinales du CDV n'ont pas permis d'associer les mutations observées avec le phénotype d'atténuation (Haas et al., 1997; Liermann et al., 1998). L'accumulation des mutations lors des passages cellulaires se faisant de manière naturelle, cela pourrait être désavantageux si elles s'accumulaient au

niveau d'épitopes des glycoprotéines F et H qui sont ciblées par les anticorps neutralisants (Merz, Scheid, et Choppin, 1980; Miele et Krakowka, 1983). Un virus recombinant canarypox exprimant les protéines F et H du CDV a été développé et protège les furets (Stephensen et al., 1997). Toutefois, ce vaccin nécessite des rappels afin de conférer une bonne protection (Larson et Schultz, 2007). De plus, comme seulement les protéines F et H sont exprimées, les autres épitopes sont manquants. Or, les protéines N et P élicitent aussi la production d'anticorps (Rima et al., 1991). Une approche utilisant un virus recombinant MeV exprimant les protéines M, F et H du CDV a été testé avec succès chez le furet (Rouxel, Svitek, et von Messling, 2009). Par contre, il manque encore certains épitopes. Le virus atténué $58\Delta F_{106}$-Md_{1-336}GFP que nous avons produit, constituerait un vaccin efficace dans la mesure où la majorité des épitopes de la souche sauvage du CDV sont conservés. De plus, le remplacement de 336 nucléotides par une séquence aléatoire diminue les chances de réversion au phénotype sauvage qui représente un problème avec les MLV (Appel, 1978). Ainsi, grâce à la génétique inverse il serait possible de produire des vaccins dont l'atténuation serait controlée (Silin et al., 2007).

Bien que le mécanisme précis d'atténuation du virus $58\Delta F_{106}$-Md_{1-336}GFP reste encore à déterminer, *Anderson et al.* suggère que l'augmentation de l'expression de F causée par l'échange de la région intergénique M-F avec N-P, est responsable de l'atténuation (Anderson et von Messling, 2008). L'immunisation de chiens avec la glycoprotéine F du CDV purifiée élicite de forts titres d'anticorps dirigés contre F qui augmentent suite à une infection suggérant ainsi un rôle important de ces derniers dans la réponse immunitaire contre le CDV (Norrby et al., 1986). De plus, une étude chez la souris suggère que la protection conférée par les anticorps monoclonaux anti-F serait liée à l'inhibition de la propagation du virus de cellule en cellule (Hirayama et al., 1991). Les anticorps dirigés contre la glycoprotéine F du virus simian 5 empêchent la formation des syncytium limitant ainsi la propagation du virus (Merz, Scheid, et Choppin, 1980). Dans l'ensemble, ces études indiquent que la production d'anticorps contre F contribue de façon importante au contrôle de la propagation du virus. Ainsi, il se pourrait que le contrôle de l'expression de F par l'UTR M-F du CDV contribue à l'évasion virale de la réponse immunitaire. Chez les furets infectés par le virus recombinant CDV dont la portion M 3' de la région M-F a été remplacée par N 3', le pic de réplication virale dans

les PBMC au jour sept p.i. se différencie par un titre moins élevé comparé au virus sauvage. De plus, le titre en anticorps IgG anti-CDV est plus élevé que chez les furets infectés par 5804PeH ce qui pourrait être expliqué par la plus grande quantité de F présente à la surface du virus recombinant (Anderson et von Messling, 2008). Des modifications de la région M 3' tels que des délétions ou insertions, permettraient donc la production des vaccins atténués sans changement de la séquence protéique et le potentiel de destruction des épitopes antigéniques. Le faible pourcentage de PBMC infectés par $58\Delta F_{106}$-Md_{1-336}GFP aux jours sept et 14 p.i. comparé à ceux infectés par le virus parental (Fig. 25) suggère qu'il y a un bon contrôle de la propagation du virus recombinant.

5.4 Perspectives

Nos travaux, qui feront prochainement l'objet d'une publication, ont permis de démontré que l'hypervariabilité de la région M-F du CDV n'a pas d'impact sur la fonctionnalité de cette dernière. En outre, les éléments importants dans le maintien de la virulence ont été localisés dans la portion M 3' de cette région. Finalement, bien que la longueur joue un rôle dans le maintien de la virulence, ce sont des éléments conservés dans la région M-F qui sont responsables du contrôle de la virulence.

Des essais de minigénomes ainsi qu'une comparaison de la quantité d'ARNm et de la protéine F produite par les différents virus permettront prochainement de vérifier que les prolongations de la maladie et l'atténuation observées, sont dus à une augmentation de l'expression de la protéine F comme il a déjà été démontré auparavant (Anderson et von Messling, 2008). De plus, des techniques d'hybridation ADN-ARN utilisées dans l'évaluation de cinétique transcriptionnelle (Iverson et Rose, 1981), permettraient de déterminer si des pauses de la polymérase virale surviennent au niveau de la région M-F. Cela constituerait un premier pas vers la détermination du mécanisme précis d'atténuation de la transcription du gène F.

L'insertion de la région M-F du MeV n'ayant mené qu'a une légère prolongation de la maladie suggère que certains éléments du maintien de la virulence sont conservés au sein des morbillivirus. Ainsi, il est probable que le mécanisme de régulation de la

transcription de la région M-F soit conservé parmi les virus de ce genre, ce qui permettrait de développer une stratégie d'atténuation commune pour ces derniers.

Liste des références

Anderson, D. E., et V. von Messling. 2008. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J Virol* 82 (21):10510-18.

Andres, O., K. Obojes, K. S. Kim, V. ter Meulen, et J. Schneider-Schaulies. 2003. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol* 84 (Pt 5):1189-97.

Appel, M. J. 1969. Pathogenesis of canine distemper. *Am J Vet Res* 30 (7):1167-82.

Appel, M. J. G. 1978. Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *J Gen Virol* 41 (2):385-93.

Appel, M. J., S. G. Mendelson, et W. W. Hall. 1984. Macrophage Fc receptors control infectivity and neutralization of canine distemper virus-antibody complexes. *J Virol* 51 (3):643-9.

Appel, M. J., W. R. Shek, H. Shesberadaran, et E. Norrby. 1984. Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch Virol* 82 (1-2):73-82.

Appel, M. J., R. A. Yates, G. L. Foley, J. J. Bernstein, S. Santinelli, L. H. Spelman, L. D. Miller, L. H. Arp, M. Anderson, M. Barr, et et al. 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest* 6 (3):277-88.

Auwaerter, P. G., P. A. Rota, W. R. Elkins, R. J. Adams, T. DeLozier, Y. Shi, W. J. Bellini, B. R. Murphy, et D. E. Griffin. 1999. Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J Infect Dis* 180 (4):950-8.

Baron, M. D. 2005. Wild-type Rinderpest virus uses SLAM (CD150) as its receptor. *J Gen Virol* 86 (Pt 6):1753-7.

Baron, M. D., et T. Barrett. 1997. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *J Virol* 71 (2):1265-71.

Barrett, T. 1999. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet Microbiol* 69 (1-2):3-13.

Barrett, T., et P. B. Rossiter. 1999. Rinderpest: the disease and its impact on humans and animals. *Adv Virus Res* 53:89-110.

Baumgärtner, W., C. Örvell, et M. Reinacher. 1989. Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathol* 78 (5):504-12.

Beckford, A. P., R. O. Kaschula, et C. Stephen. 1985. Factors associated with fatal cases of measles. A retrospective autopsy study. *S Afr Med J* 68 (12):858-63.

Beineke, A., C. Puff, F. Seehusen, et W. Baumgartner. 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 127 (1-2):1-18.

Bestetti, G., R. Fatzer, et R. Frankhauser. 1978. Encephalitis following vaccination against distemper and infectious hepatitis in the dog. An optical and ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 43 (1-2):69-75.

Billeter, M. A., H. Y. Naim, et S. A. Udem. 2009. Reverse genetics of measles virus and resulting multivalent recombinant vaccines: applications of recombinant measles viruses. In *Measles history and basic biology*, D. E. Griffin et M. B. A. Oldstone (éd.). Springer: Heidelberg.

Blixenkrone-Moller, M., G. Bolt, E. Gottschalck, et M. Kenter. 1994. Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. *J Gen Virol* 75 (Pt 10):2829-34.

Blumberg, B. M., M. Leppert, et D. Kolakofsky. 1981. Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 23 (3):837-45.

Bolt, G., et I. R. Pedersen. 1998. The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology* 252 (2):387-98.

Bonami, F., P. A. Rudd, et V. von Messling. 2007. Disease duration determines canine distemper virus neurovirulence. *J Virol* 81 (21):12066-70.

Bousse, T., T. Matrosovich, A. Portner, A. Kato, Y. Nagai, et T. Takimoto. 2002. The long noncoding region of the human parainfluenza virus type 1 f gene contributes to the read-through transcription at the m-f gene junction. *J Virol* 76 (16):8244-51.

Brown, H. R., H. Thormar, M. Barshatzky, et H. M. Wisniewski. 1985. Localization of measles virus antigens in subacute sclerosing panencephalitis in ferrets. *Lab Anim Sci* 35 (3):233-7.

Bundza, A., A. Afshar, T. W. Dukes, D. J. Myers, G. C. Dulac, et S. A. Becker. 1988. Experimental peste des petits ruminants (goat plague) in goats and sheep. *Can J Vet Res* 52 (1):46-52.

Bush, M., R. J. Montali, D. Brownstein, A. E. James, Jr., et M. J. Appel. 1976. Vaccine-induced canine distemper in a lesser panda. *J Am Vet Med Assoc* 169 (9):959-60.

Calain, P., et L. Roux. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67 (8):4822-30.

Carpenter, J. W., M. J. Appel, R. C. Erickson, et M. N. Novilla. 1976. Fatal vaccine-induced canine distemper virus infection in black-footed ferrets. *J Am Vet Med Assoc* 169 (9):961-4.

Cathomen, T., H. Y. Naim, et R. Cattaneo. 1998. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* 72 (2):1224-34.

Cattaneo, R., G. Rebmann, A. Schmid, K. Baczko, V. ter Meulen, et M. A. Billeter. 1987. Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *EMBO J* 6 (3):681-8.

Chappuis, G. 1995. Control of canine distemper. *Vet Microbiol* 44 (2-4):351-8.

Cherpillod, P., A. Tipold, M. Griot-Wenk, C. Cardozo, I. Schmid, R. Fatzer, M. Schobesberger, R. Zurbriggen, L. Bruckner, F. Roch, M. Vandevelde, R. Wittek, et A. Zurbriggen. 2000. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine* 18 (26):2927-36.

Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, et G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376 (6537):260-3.

Compans, R. W., et P. W. Choppin. 1968. The nucleic acid of the parainfluenza virus SV5. *Virology* 35 (2):289-96.

Cosby, S. L., S. McQuaid, N. Duffy, C. Lyons, B. K. Rima, G. M. Allan, S. J. McCullough, S. Kennedy, J. A. Smyth, et F. McNeilly. 1988. Characterization of a seal morbillivirus. *Nature* 23 (1-4):351-60.

de Swart, R. L., M. Ludlow, L. de Witte, Y. Yanagi, G. van Amerongen, S. McQuaid, S. Yuksel, T. B. Geijtenbeek, W. P. Duprex, et A. D. Osterhaus. 2007. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3 (11):e178.

Duignan, P. J., S. Sadove, J. T. Saliki, et J. R. Geraci. 1993. Phocine distemper in harbor seals (Phoca vitulina) from Long Island, New York. *J Wildl Dis* 29 (3):465-9.

Dunkin, G. W., et P. P. Laidlaw. 1926. Studies in dog distemper. I. Dog distemper in the ferret. *J Comp Pathol Ther* 39:201-12.

Dutch, R. E., R. N. Hagglund, M. A. Nagel, R. G. Paterson, et R. A. Lamb. 2001. Paramyxovirus fusion (F) protein: a conformational change on cleavage activation. *Virology* 281 (1):138-50.

Egelman, E. H., S. S. Wu, M. Amrein, A. Portner, et G. Murti. 1989. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J Virol* 63 (5):2233-43.

El Mubarak, H. S., S. Yuksel, G. van Amerongen, P. G. Mulder, M. M. Mukhtar, A. D. Osterhaus, et R. L. de Swart. 2007. Infection of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) and rhesus macaques (Macaca mulatta) with different wild-type measles viruses. *J Gen Virol* 88 (Pt 7):2028-34.

Evans, S. A., G. J. Belsham, et T. Barrett. 1990. The role of the 5' nontranslated regions of the fusion protein mRNAs of canine distemper virus and rinderpest virus. *Virology* 177 (1):317-23.

Evlashev, A., E. Moyse, H. Valentin, O. Azocar, M. C. Trescol-Biemont, J. C. Marie, C. Rabourdin-Combe, et B. Horvat. 2000. Productive measles virus brain infection and apoptosis in CD46 transgenic mice. *J Virol* 74 (3):1373-82.

Fearns, R., et P. L. Collins. 1999. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol* 73 (1):388-97.

Gassen, U., F. M. Collins, W. P. Duprex, et B. K. Rima. 2000. Establishment of a rescue system for canine distemper virus. *J Virol* 74 (22):10737-44.

Goldberger, J., et J. F. Anderson. 1911. An experimental demonstration of the presence of the virus of measles in the mixed buccal and nasal secretions. *J Am Med Assoc* 57 (6):476-78.

Graves, M., D. E. Griffin, R. T. Johnson, R. L. Hirsch, I. L. de Soriano, S. Roedenbeck, et A. Vaisberg. 1984. Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections. *J Virol* 49 (2):409-12.

Griffin, D. E. 2001. Measles virus. In *Fields' Virology*, D. M. Knipe et P. M. Howley (éd.). Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

Griffin, D. E. 2007. Measles virus. In *Fields' Virology*, D. M. Knipe et P. M. Howley (éd.). Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

Griot, C., C. Moser, P. Cherpillod, L. Bruckner, R. Wittek, A. Zurbriggen, et R. Zurbriggen. 2004. Early DNA vaccination of puppies against canine distemper in the presence of maternally derived immunity. *Vaccine* 22 (5-6):650-4.

Gubbay, O., J. Curran, et D. Kolakofsky. 2001. Sendai virus genome synthesis and assembly are coupled: a possible mechanism to promote viral RNA polymerase processivity. *J Gen Virol* 82 (Pt 12):2895-903.

Haas, L., M. D. Baron, B. Liess, et T. Barrett. 1995. Editing of morbillivirus P gene transcripts in infected animals. *Vet Microbiol* 44 (2-4):299-306.

Haas, L., W. Martens, I. Greiser-Wilke, L. Mamaev, T. Butina, D. Maack, et T. Barrett. 1997. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res* 48 (2):165-71.

Hall, W. W., D. Genius, et V. ter Meulen. 1977. The effect of cycloheximide on the replication of measles virus. *J Gen Virol* 35 (3):579-82.

Hall, W. W., et V. ter Meulen. 1977. Polyadenylic acid [poly(A)] sequences associated with measles virus intracellular ribonucleic acid (RNA) species. *J Gen Virol* 35 (3):487-510.

Hamaguchi, M., T. Yoshida, K. Nishikawa, H. Naruse, et Y. Nagai. 1983. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology* 128 (1):105-17.

Hamdy, F. M., A. H. Dardiri, D. H. Ferris, et S. S. Breese, Jr. 1975. Experimental infection of white-tailed deer with rinderpest virus. *J Wildl Dis* 11 (4):508-15.

Harmon, S. B., et G. W. Wertz. 2002. Transcriptional termination modulated by nucleotides outside the characterized gene end sequence of respiratory syncytial virus. *Virology* 300 (2):304-15.

Hasel, K. W., S. Day, S. Millward, C. D. Richardson, W. J. Bellini, et P. A. Greer. 1987. Characterization of cloned measles virus mRNAs by in vitro transcription, translation, and immunoprecipitation. *Intervirology* 28 (1):26-39.

Hashimoto, K., N. Ono, H. Tatsuo, H. Minagawa, M. Takeda, K. Takeuchi, et Y. Yanagi. 2002. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* 76 (13):6743-9.

Heaney, J., T. Barrett, et S. L. Cosby. 2002. Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J Virol* 76 (7):3579-84.

Helfand, R. F., J. L. Heath, L. J. Anderson, E. F. Maes, D. Guris, et W. J. Bellini. 1997. Diagnosis of measles with an IgM capture EIA: the optimal timing of specimen collection after rash onset. *J Infect Dis* 175 (1):195-9.

Hercyk, N., S. M. Horikami, et S. A. Moyer. 1988. The vesicular stomatitis virus L protein possesses the mRNA methyltransferase activities. *Virology* 163 (1):222-5.

Higgins, R. J., S. G. Krakowka, A. E. Metzler, et A. Koestner. 1982. Experimental canine distemper encephalomyelitis in neonatal gnotobiotic dogs. A sequential ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 57 (4):287-95.

Hirayama, N., M. Senda, N. Nakashima, M. Takagi, M. Sugiyama, Y. Yoshikawa, et K. Yamanouchi. 1991. Protective effects of monoclonal antibodies against lethal canine distemper virus infection in mice. *J Gen Virol* 72 (Pt 11):2827-30.

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

Horikami, S. M., J. Curran, D. Kolakofsky, et S. A. Moyer. 1992. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* 66 (8):4901-8.

Horton, R. M. 1995. PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol* 3 (2):93-9.

Horvat, B., P. Rivailler, G. Varior-Krishnan, A. Cardoso, D. Gerlier, et C. Rabourdin-Combe. 1996. Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J Virol* 70 (10):6673-81.

Hu, A., T. Cathomen, R. Cattaneo, et E. Norrby. 1995. Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein. *J Gen Virol* 76 (Pt 3):705-10.

Hwang, L. N., N. Englund, et A. K. Pattnaik. 1998. Polyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA dictates efficient transcription termination at the intercistronic gene junctions. *J Virol* 72 (3):1805-13.

Isa, M. B., L. Martinez, M. Giordano, M. Zapata, C. Passeggi, M. C. De Wolff, et S. Nates. 2001. Measles virus-specific immunoglobulin G isotype immune response in early and late infections. *J Clin Microbiol* 39 (1):170-4.

Iverson, L. E., et J. K. Rose. 1981. Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* 23 (2):477-84.

Iwasaki, M., M. Takeda, Y. Shirogane, Y. Nakatsu, T. Nakamura, et Y. Yanagi. 2009. The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol* 83 (20):10374-83.

Jaye, A., A. F. Magnusen, A. D. Sadiq, T. Corrah, et H. C. Whittle. 1998. Ex vivo analysis of cytotoxic T lymphocytes to measles antigens during infection and after vaccination in Gambian children. *J Clin Invest* 102 (11):1969-77.

Johnson, R. T., D. E. Griffin, R. L. Hirsch, J. S. Wolinsky, S. Roedenbeck, I. Lindo de Soriano, et A. Vaisberg. 1984. Measles encephalomyelitis--clinical and immunologic studies. *N Engl J Med* 310 (3):137-41.

Kato, A., K. Kiyotani, M. K. Hasan, T. Shioda, Y. Sakai, T. Yoshida, et Y. Nagai. 1999. Sendai virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: moderation at the fusion protein gene. *J Virol* 73 (11):9237-46.

Kauffman, C. A., A. G. Bergman, et R. P. O'Connor. 1982. Distemper virus infection in ferrets: an animal model of measles-induced immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 47 (3):617-25.

Kazacos, K. R., H. L. Thacker, H. L. Shivaprasad, et P. P. Burger. 1981. Vaccination-induced distemper in kinkajous. *J Am Vet Med Assoc* 179 (11):1166-9.

Kennedy, S. 1990. A review of the 1988 European seal morbillivirus epizootic. *Vet Rec* 127 (23):563-7.

Kennedy, S., J. A. Smyth, P. F. Cush, M. McAliskey, S. J. McCullough, et B. K. Rima. 1991. Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Vet Pathol* 28 (1):1-7.

Kingston, R. L., W. A. Baase, et L. S. Gay. 2004. Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. *J Virol* 78 (16):8630-40.

Kock, R. A., J. M. Wambua, J. Mwanzia, H. Wamwayi, E. K. Ndungu, T. Barrett, N. D. Kock, et P. B. Rossiter. 1999. Rinderpest epidemic in wild ruminants in Kenya 1993-97. *Vet Rec* 145 (10):275-83.

Krakowka, S. 1982. Mechanisms of in vitro immunosuppression in canine distemper virus infection. *J Clin Lab Immunol* 8 (3):187-96.

Krakowka, S., G. Cockerell, et A. Koestner. 1975. Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function in vitro and in vivo. *Infect Immun* 11 (5):1069-78.

Krakowka, S., R. J. Higgins, et A. Koestner. 1980. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am J Vet Res* 41 (2):284-92.

Lamb, R. A., et G. D. Parks. 2007. Principles of virology. In *Fields' Virology*, D. M. Knipe et P. M. Howley (éd.). Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

Lamb, R. A., et G. D. Parks. 2007. Paramyxoviridae : the viruses and their replication. In *Fields' Virology*, D. M. Knipe et P. M. Howley (éd.). Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

Landick, R. 2006. The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem Soc Trans* 34 (Pt 6):1062-6.

Larson, L. J., et R. D. Schultz. 2007. Three-year duration of immunity in dogs vaccinated with a canarypox-vectored recombinant canine distemper virus vaccine. *Vet Ther* 8 (2):101-6.

Leonard, V. H., P. L. Sinn, G. Hodge, T. Miest, P. Devaux, N. Oezguen, W. Braun, P. B. McCray, Jr., M. B. McChesney, et R. Cattaneo. 2008. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest* 118 (7):2448-58.

Liermann, H., T. C. Harder, M. Lochelt, V. von Messling, W. Baumgartner, V. Moennig, et L. Haas. 1998. Genetic analysis of the central untranslated genome region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper morbilliviruses. *Virus Genes* 17 (3):259-70.

Lincoln, S. D., J. R. Gorham, W. C. Davis, et R. L. Ott. 1973. Studies of old dog encephalitis. II. Electron microscopic and immunohistologic findings. *Vet Pathol* 10 (2):124-9.

Liston, P., R. Batal, C. DiFlumeri, et D. J. Briedis. 1997. Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Arch Virol* 142 (2):305-21.

Lyons, C., M. J. Welsh, J. Thorsen, K. Ronald, et B. K. Rima. 1993. Canine distemper virus isolated from a captive seal. *Vet Rec* 132 (19):487-8.

Malvoisin, E., et F. Wild. 1990. Contribution of measles virus fusion protein in protective immunity: anti-F monoclonal antibodies neutralize virus infectivity and protect mice against challenge. *J Virol* 64 (10):5160-2.

Martin, A., P. Staeheli, et U. Schneider. 2006. RNA polymerase II-controlled expression of antigenomic RNA enhances the rescue efficacies of two different members of the Mononegavirales independently of the site of viral genome replication. *J Virol* 80 (12):5708-15.

McChesney, M. B., C. J. Miller, P. A. Rota, Y. D. Zhu, L. Antipa, N. W. Lerche, R. Ahmed, et W. J. Bellini. 1997. Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology* 233 (1):74-84.

Merz, D. C., A. Scheid, et P. W. Choppin. 1980. Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *J Exp Med* 151 (2):275-88.

Miele, J. A., et S. Krakowka. 1983. Antibody responses to virion polypeptides in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *Infect Immun* 41 (2):869-71.

Mitra-Kaushik, S., R. Nayak, et M. S. Shaila. 2001. Identification of a cytotoxic T-cell epitope on the recombinant nucleocapsid proteins of Rinderpest and Peste des petits ruminants viruses presented as assembled nucleocapsids. *Virology* 279 (1):210-20.

Moss, J. W., et E. D. Griffin. 2009. Measles virus. In *Clinical virology*, D. D. Richman, R. J. Whitley et F. G. Hayden (éd.). ASM Press: Washington.

Moss, W. J., et D. E. Griffin. 2006. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4 (12):900-8.

Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, et D. Gerlier. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67 (10):6025-32.

Navaratnarajah, C. K., V. H. Leonard, et R. Cattaneo. 2009. Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 329:59-76.

Navaratnarajah, C. K., S. Vongpunsawad, N. Oezguen, T. Stehle, W. Braun, T. Hashiguchi, K. Maenaka, Y. Yanagi, et R. Cattaneo. 2008. Dynamic interaction of the measles virus hemagglutinin with its receptor signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *J Biol Chem* 283 (17):11763-71.

Nesseler, A., W. Baumgartner, K. Gaedke, et A. Zurbriggen. 1997. Abundant expression of viral nucleoprotein mRNA and restricted translation of the corresponding viral protein in inclusion body polioencephalitis of canine distemper. *J Comp Pathol* 116 (3):291-301.

Nesseler, A., W. Baumgartner, A. Zurbriggen, et C. Orvell. 1999. Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body polioencephalitis. *Vet Microbiol* 69 (1-2):23-8.

Niewiesk, S., M. Götzelmann, et V. ter Meulen. 2000. Selective in vivo suppression of T lymphocyte responses in experimental measles virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (8):4251-5.

Niewiesk, S., J. Schneider-Schaulies, H. Ohnimus, C. Jassoy, S. Schneider-Schaulies, L. Diamond, J. S. Logan, et V. ter Meulen. 1997. CD46 expression does not overcome the intracellular block of measles virus replication in transgenic rats. *J Virol* 71 (10):7969-73.

Norrby, E., et Y. Gollmar. 1972. Appearance and persistence of antibodies against different virus components after regular measles infections. *Infect Immun* 6 (3):240-7.

Norrby, E., H. Sheshberadaran, K. C. McCullough, W. C. Carpenter, et C. Orvell. 1985. Is rinderpest virus the archevirus of the Morbillivirus genus? *Intervirology* 23 (4):228-32.

Norrby, E., G. Utter, C. Orvell, et M. J. Appel. 1986. Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion protein. *J Virol* 58 (2):536-41.

Ogino, T., M. Kobayashi, M. Iwama, et K. Mizumoto. 2005. Sendai virus RNA-dependent RNA polymerase L protein catalyzes cap methylation of virus-specific mRNA. *J Biol Chem* 280 (6):4429-35.

Okada, H., F. Kobune, T. A. Sato, T. Kohama, Y. Takeuchi, T. Abe, N. Takayama, T. Tsuchiya, et M. Tashiro. 2000. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 145 (5):905-20.

Oldstone, M. B., H. Lewicki, D. Thomas, A. Tishon, S. Dales, J. Patterson, M. Manchester, D. Homann, D. Naniche, et A. Holz. 1999. Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell* 98 (5):629-40.

Örvell, C., M. Blixenkrone-Moller, V. Svansson, et P. Have. 1990. Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 71 (Pt 9):2085-92.

Palangat, M., T. I. Meier, R. G. Keene, et R. Landick. 1998. Transcriptional pausing at +62 of the HIV-1 nascent RNA modulates formation of the TAR RNA structure. *Mol Cell* 1 (7):1033-42.

Palosaari, H., J. P. Parisien, J. J. Rodriguez, C. M. Ulane, et C. M. Horvath. 2003. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77 (13):7635-44.

Pfeuffer, J., K. Puschel, V. Meulen, J. Schneider-Schaulies, et S. Niewiesk. 2003. Extent of measles virus spread and immune suppression differentiates between wild-type and vaccine strains in the cotton rat model (Sigmodon hispidus). *J Virol* 77 (1):150-8.

Plemper, R. K., A. L. Hammond, et R. Cattaneo. 2001. Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276 (47):44239-46.

Plowright, W. 1982. The effects of rinderpest and rinderpest control on wildlife in Africa. Paper read at Symposium of the Zoological Society of London

Plowright, W. 1968. Rinderpest Virus. In *Virology monographs*, S. Gard, G. Hallauer et K. F. Meyer (éd.). Springer-Verlag New York INC.: Wien.

Plumet, S., W. P. Duprex, et D. Gerlier. 2005. Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol* 79 (11):6900-8.

Pringle, C. R. 2005. Virus taxonomy. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Comittee on Taxonomy of Viruses*, C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger et L. A. Ball (éd.). Elvesier Academic Press: San Diego.

Radecke, F., et M. A. Billeter. 1996. The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology* 217 (1):418-21.

Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dotsch, G. Christiansen, et M. A. Billeter. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14 (23):5773-84.

Rall, G. F., M. Manchester, L. R. Daniels, E. M. Callahan, A. R. Belman, et M. B. Oldstone. 1997. A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (9):4659-63.

Rassa, J. C., et G. D. Parks. 1998. Molecular basis for naturally occurring elevated readthrough transcription across the M-F junction of the paramyxovirus SV5. *Virology* 247 (2):274-86.

Riedl, P., M. Moll, H. D. Klenk, et A. Maisner. 2002. Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res* 83 (1-2):1-12.

Rima, B. K., N. Duffy, W. J. Mitchell, B. A. Summers, et M. J. Appel. 1991. Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. *Arch Virol* 121 (1-4):1-8.

Rima, B. K., et W. P. Duprex. 2009. The measles virus replication cycle. In *Measles History and Basic Biology*, D. E. Griffin et M. B. A. Oldstone (éd.). Springer: Heidelberg.

Roeder, P, et TU Obi. 1999. Recognizing peste des petits ruminants: a field manual. *FAO Animal Health Manual* 5:1-28.

Rouxel, R. N., N. Svitek, et V. von Messling. 2009. A chimeric measles virus with canine distemper envelope protects ferrets from lethal distemper challenge. *Vaccine* 27 (36):4961-6.

Rudd, P. A., R. Cattaneo, et V. von Messling. 2006. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol* 80 (19):9361-70.

Runkler, N., C. Pohl, S. Schneider-Schaulies, H. D. Klenk, et A. Maisner. 2007. Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* 9 (5):1203-14.

Ryon, J. J., W. J. Moss, M. Monze, et D. E. Griffin. 2002. Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (5):994-1003.

Sakaguchi, M., Y. Yoshikawa, K. Yamanouchi, T. Sata, K. Nagashima, et K. Takeda. 1986. Growth of measles virus in epithelial and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys. *Microbiol Immunol* 30 (10):1067-73.

Santé, Organisation mondiale de la. 2009. Vaccins contre la rougeole: note d'information de l'OMS. *Relevé épidémiologique hebdomadaire* (35):349-360.

Sato, T. A., T. Kohama, et A. Sugiura. 1988. Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch Virol* 98 (1-2):39-50.

Scheid, A., et P. W. Choppin. 1977. Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. *Virology* 80 (1):54-66.

Schneider, H., K. Kaelin, et M. A. Billeter. 1997. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology* 227 (2):314-22.

Schneider, H., P. Spielhofer, K. Kaelin, C. Dotsch, F. Radecke, G. Sutter, et M. A. Billeter. 1997. Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector. *J Virol Methods* 64 (1):57-64.

Schultz, R. D., B. Thiel, E. Mukhtar, P. Sharp, et L. J. Larson. 2010. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J Comp Pathol* 142 Suppl 1:S102-8.

Sedlmeier, R., et W. J. Neubert. 1998. The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv Virus Res* 50:101-39.

Shaffer, J. A., W. J. Bellini, et P. A. Rota. 2003. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315 (2):389-97.

Silin, D., O. Lyubomska, M. Ludlow, W. P. Duprex, et B. K. Rima. 2007. Development of a challenge-protective vaccine concept by modification of the viral RNA-dependent RNA polymerase of canine distemper virus. *J Virol* 81 (24):13649-58.

Stephensen, C. B., J. Welter, S. R. Thaker, J. Taylor, J. Tartaglia, et E. Paoletti. 1997. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* 71 (2):1506-13.

Svansson, V., M. Blixenkrone-Moller, K. Skirnisson, P. Have, N. I. Heje, J. Nielsen, et E. Lund. 1993. Infection studies with canine distemper virus in harbour seals. *Arch Virol* 131 (3-4):349-59.

Tahara, M., M. Takeda, et Y. Yanagi. 2007. Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol* 81 (13):6827-36.

Takeda, M., S. Ohno, F. Seki, Y. Nakatsu, M. Tahara, et Y. Yanagi. 2005. Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol* 79 (22):14346-54.

Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, et Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406 (6798):893-7.

Tatsuo, H., N. Ono, et Y. Yanagi. 2001. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 75 (13):5842-50.

Taylor, W. P. 1984. The distribution and epidemiology of peste des petits ruminants. *Preventive Veterinary Medicine* 2 (1-4):157-66.

Thormar, H., P. D. Mehta, M. R. Barshatzky, et H. R. Brown. 1985. Measles virus encephalitis in ferrets as a model for subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Anim Sci* 35 (3):229-32.

Tober, C., M. Seufert, H. Schneider, M. A. Billeter, I. C. Johnston, S. Niewiesk, V. ter Meulen, et S. Schneider-Schaulies. 1998. Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* 72 (10):8124-32.

van Binnendijk, R. S., M. C. Poelen, G. van Amerongen, P. de Vries, et A. D. Osterhaus. 1997. Protective immunity in macaques vaccinated with live attenuated, recombinant, and subunit measles vaccines in the presence of passively acquired antibodies. *J Infect Dis* 175 (3):524-32.

Vandevelde, M., R. J. Higgins, B. Kristensen, F. Kristensen, A. J. Steck, et U. Kihm. 1982. Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathologic, and immunohistological studies. *Acta Neuropathol* 56 (4):285-93.

Vidal, S., et D. Kolakofsky. 1989. Modified model for the switch from Sendai virus transcription to replication. *J Virol* 63 (5):1951-8.

von Messling, V., D. Milosevic, et R. Cattaneo. 2004. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (39):14216-21.

von Messling, V., C. Springfeld, P. Devaux, et R. Cattaneo. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77 (23):12579-91.

von Pirquet, C. 1908. Das verhalten der kutanen tuberkulin-reaktion wahrend der masern. *Dtsch. Med. Wochenschr* 34 (1297-1300):258.

Wang, N., A. Satoskar, W. Faubion, D. Howie, S. Okamoto, S. Feske, C. Gullo, K. Clarke, M. R. Sosa, A. H. Sharpe, et C. Terhorst. 2004. The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med* 199 (9):1255-64.

Watanabe, M., A. Hirano, S. Stenglein, J. Nelson, G. Thomas, et T. C. Wong. 1995. Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J Virol* 69 (5):3206-10.

Welstead, G. G., C. Iorio, R. Draker, J. Bayani, J. Squire, S. Vongpunsawad, R. Cattaneo, et C. D. Richardson. 2005. Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (45):16415-20.

Welter, J., J. Taylor, J. Tartaglia, E. Paoletti, et C. B. Stephensen. 2000. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J Virol* 74 (14):6358-67.

Wiener, D., M. Vandevelde, A. Zurbriggen, et P. Plattet. 2010. Investigation of a unique short open reading frame within the 3' untranslated region of the canine distemper virus matrix messenger RNA. *Virus Res* 153 (2):234-43.

Wild, T. F., E. Malvoisin, et R. Buckland. 1991. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* 72 (Pt 2):439-42.

Wild, T. F., D. Naniche, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, E. Malvoisin, V. Lecouturier, et R. Buckland. 1995. Mode of entry of morbilliviruses. *Vet Microbiol* 44 (2-4):267-70.

Williams, E. S., E. T. Thorne, M. J. Appel, et D. W. Belitsky. 1988. Canine distemper in black-footed ferrets (Mustela nigripes) from Wyoming. *J Wildl Dis* 24 (3):385-98.

Wyde, P. R., M. W. Ambrose, T. G. Voss, H. L. Meyer, et B. E. Gilbert. 1992. Measles virus replication in lungs of hispid cotton rats after intranasal inoculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 201 (1):80-7.

Yakhnin, A. V., H. Yakhnin, et P. Babitzke. 2006. RNA polymerase pausing regulates translation initiation by providing additional time for TRAP-RNA interaction. *Mol Cell* 24 (4):547-57.

Yamanouchi, K., F. Chino, F. Kobune, A. Fukuda, et Y. Yoshikawa. 1974. Pathogenesis of rinderpest virus infection in rabbits. I. Clinical signs, immune response, histological changes, and virus growth patterns. *Infect Immun* 9 (2):199-205.

Yamanouchi, K., A. Fukuda, F. Kobune, Y. Yoshikawa, et F. Chino. 1974. Pathogenesis of rinderpest virus infection in rabbits. II. Effect of rinderpest virus on the immune functions of rabbits. *Infect Immun* 9 (2):206-11.

Yan, Y., et S. K. Samal. 2008. Role of intergenic sequences in newcastle disease virus RNA transcription and pathogenesis. *J Virol* 82 (3):1323-31.

Yoshikawa, Y., K. Mizumoto, et K. Yamanouchi. 1986. Characterization of messenger RNAs of measles virus. *J Gen Virol* 67 (Pt 12):2807-12.

Young, V. A., et G. F. Rall. 2009. Making it to the synapse : measles virus spread in and among neurons. In *Measles pathogenesis and control*, D. E. Griffin et M. B. A. Oldstone (éd.). Springer: Heidelberg.

Zhu, Y., P. Rota, L. Wyatt, A. Tamin, S. Rozenblatt, N. Lerche, B. Moss, W. Bellini, et M. McChesney. 2000. Evaluation of recombinant vaccinia virus--measles vaccines in infant rhesus macaques with preexisting measles antibody. *Virology* 276 (1):202-13.