

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Mécanismes d'immunosuppression de la protéine V
du virus de la maladie de Carré**

Par
Nicholas Svitek

Thèse présentée
pour l'obtention
du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Alain Lamarre
Examineurs externes	Chris Richardson (Dalhousie University) Hugo Soudeyns (Université de Montréal)
Directrice de recherche	Veronika von Messling

Janvier 2010

© Droits réservés, Nicholas Svitek, 2010

*By definition, to exist, successful viruses
must always be one step ahead
of their host.*

Enquist et al.
Principles of Virology

Les espèces qui survivent ne sont pas les plus fortes,
ni les plus intelligentes,
mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements.

Charles Darwin,
Naturaliste
(1809-1882)

L'Évolution est une adaptation aux conditions
changeantes de l'environnement et non pas un progrès.

Stephen Jay Gould,
Paléontologue
(1941-2002)

L'Évolution, en découvrant un sommet au Monde,
rend le Christ possible, tout comme le Christ,
en donnant un sens au Monde, rend possible l'Évolution.

Pierre-Teilhard de Chardin, sj
Paléontologue
(1881-1955)

RÉSUMÉ

Le virus de la maladie de Carré (*canine distemper virus*, CDV) cause une infection létale chez le furet caractérisée par une forte immunosuppression. Un des facteurs de virulence codé par le virus est la protéine V qui a été associée à cette immunosuppression. Des études précédentes au laboratoire ont démontré qu'en absence de la protéine V du CDV (CDV-Vko), ce virus ne cause pas une infection létale ni la forte immunosuppression telles qu'observées avec le virus de type sauvage. De plus, il est connu que chez le virus de la rougeole (*measles virus*, MV), un proche parent du CDV, la protéine V inhibe la réponse des interférons (IFN) au niveau cellulaire.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la protéine V inhibe l'induction d'une réponse antivirale innée appropriée. Pour tester cette hypothèse, mon doctorat poursuivait trois objectifs spécifiques. Dans un premier temps, nous avons visé la comparaison de la réponse cellulaire en générant un profil de transcription de cytokines de furets infectés avec le virus de type sauvage ainsi qu'avec le CDV-Vko. D'autre part, j'ai envisagé de cartographier la région de la protéine V qui est responsable pour son activité, et par la suite, de caractériser les interactions de la protéine V avec les protéines cellulaires impliquées dans l'établissement de l'immunité innée.


Dans le cadre de mon premier objectif, j'ai cloné plusieurs cytokines de furets impliquées dans différentes voies de la réponse immunitaire. Basé sur ces séquences, j'ai d'abord développé un essai de RT-PCR semi-quantitatif puis ensuite un essai de RT-PCR en temps réel. J'ai observé que les furets infectés avec le virus de type sauvage sont fortement inhibés dans l'induction d'une synthèse de cytokines appropriées. Par contre, les animaux infectés avec des virus atténués, tel que le CDV-Vko, induisent une bonne synthèse de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire ainsi que dans la réponse de cellules T de type T_H1 et T_H2 .


Ensuite, en générant par génétique inverse des virus recombinants portant des substitutions d'acides aminés dans des régions conservées de la partie N-terminale et C-

terminale de la protéine V, j'ai observé que la tyrosine en position 110 du domaine N-terminal, connue pour être importante chez le MV pour inhiber la signalisation des IFN, n'est pas requise pour causer une infection létale chez le furet. Par contre, les virus arborant une mutation dans une des cystéines conservées démontrent un phénotype atténué similaire au CDV-Vko.

Suite à des essais luciférase *in vitro*, j'ai découvert que la tyrosine 110 dans la protéine V du CDV est essentielle pour bloquer la voie de signalisation des IFN de type I et de type II alors que les mutants cystéines perdent la capacité de bloquer seulement la transduction cellulaire des IFN de type I. Pour identifier le mécanisme d'inhibition de l'immunité innée qui corrèle avec la virulence du virus, nous avons étudié l'effet des protéines V mutantes sur l'inhibition de l'activation des promoteurs naturels des gènes induits par les interférons (ISG), Mx1 et ISG54, ainsi que du promoteur naturel médiant la synthèse de l'IFN- β . J'ai observé que les protéines V mutantes au niveau des cystéines perdent spécifiquement leur capacité à inhiber l'activation du gène Mx1 alors que le mutant tyrosine garde la même efficacité que la protéine sauvage à inhiber l'activation de la transcription de Mx1.

Ce projet de recherche a permis de mettre en lumière les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse morbillivirale. De plus, cette étude révèle le rôle important joué par la protéine Mx dans le contrôle des infections morbillivirales.


Nicholas Svitek


Veronika von Messling,
directrice de recherche

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans la précieuse aide de ma directrice de recherche, Veronika von Messling, qui a toujours su tirer le meilleur de moi-même. Elle a été une source de stimulation intellectuelle constante et de dépassement de soi. Ces encouragements à aller de l'avant avec les nouvelles expériences à effectuer m'ont toujours réjoui. Son enthousiasme contagieux pour la recherche m'a toujours stimulé et fasciné. Elle m'a aussi encouragé à entreprendre les projets qui m'inspiraient, que ça soit dans le laboratoire ou à l'extérieur du travail, pour la recherche en virologie, la microbiologie clinique ou la coopération internationale. C'est pourquoi, je veux exprimer toute ma gratitude envers elle.

J'ai été soutenu tout au long de ce projet par plusieurs autres personnes, notamment Penny Ann Rudd qui partage ma surface de travail depuis la maîtrise et qui a su me donner de bons conseils pendant mon doctorat. Elle a été d'une oreille attentive lors de ma formation. J'aimerais saluer François Bonami que j'ai côtoyé durant la première moitié de mon doctorat et qui a su apporter sa touche d'humour. Mes remerciements vont aussi envers Karola Obojes et Stéphane Pillet sans qui plusieurs problèmes techniques n'auraient été résolus. Je remercie particulièrement Stéphane pour avoir bien voulu s'aventurer dans le texte de ma thèse. J'aimerais exprimer ma reconnaissance envers tous les nouveaux membres du laboratoire qui ont agrandi la famille et qui ont apporté leur soutien et leur touche d'humour. À mes disciples bien aimés, Louis-Étienne Bastien et Christophe Goncalves, je veux vous exprimer la joie de vous avoir côtoyé et formé. Continuez dans la voie qui vous a été tracée.

J'aimerais finalement remercier tous les membres de ma famille qui m'ont encouragé et soutenu durant mes études universitaires. Mes remerciements vont spécialement envers ma mère Marie-Rose Chammah ainsi qu'à celle qui habite mon cœur, Farah Gayama, pour sa compréhension, sa patience et son sourire radieux. Merci à mon ami de longue date, Michel Hecheima, pour ses encouragements. Mes remerciements vont aussi envers les pères Lucien Coutu, csc et Antoine-Emmanuel, fmj pour leur soutien et leurs conseils tout au long de ce doctorat.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
TABLE DES ILLUSTRATIONS	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. Les morbillivirus	2
1.1 Phylogénie	2
1.2 Structure du virion	2
1.3 Organisation génomique	4
1.4 Fonction sommaire des protéines virales	6
2. Pathogenèse morbillivirale	9
2.1 Cinétique d'infection	10
2.2 L'immunosuppression	12
2.2.1 Infection des cellules immunitaires	12
2.2.2 Altération de la réponse de cytokines	13
2.2.3 Impact de l'infection sur les lymphocytes	14
2.2.5 Altération des organes lymphoïdes	14
2.3 Mécanismes d'immunosuppression	15
2.3.1 Facteur soluble	15
2.3.2 Nucléoprotéine	16
2.3.3 Les glycoprotéines	17
2.3.4 La protéine C	18
3. La protéine V	20
3.1 Structure de V	20
3.2 Activité de V	22
3.3 Domaines fonctionnels de la protéine V des morbillivirus	24
4. L'interféron	27
4.1 Signalisation intracellulaire des interférons	28
5. Modèles d'infection morbillivirale	30

5.1 Le furet comme modèle d'immunosuppression morbillivirale ..	31
6. Hypothèse et objectifs de travail	34
CHAPITRE 2 : PUBLICATIONS	36
Publication no. 1	37
<i>Receptor (SLAM [CD150]) Recognition and the V Protein Sustain Swift Lymphocyte-Based Invasion of Mucosal Tissue and Lymphatic Organs by a Morbillivirus</i>	<i>37</i>
Résumé	38
Abstract	39
Introduction	40
Materials and methods	43
Results	48
Discussion	61
Acknowledgments	65
References	66
Publication no. 2	71
<i>Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets</i>	<i>71</i>
Résumé	72
Abstract	73
Introduction	74
Results	76
Discussion	84
Materials and methods	87
Acknowledgments	91
References	92
Publication no. 3	95
<i>V Protein-Mediated Block of Mx Transcription is Essential for Morbillivirus Virulence</i>	<i>95</i>
Résumé	96
Abstract	97

Introduction	98
Results	100
Discussion	109
Materials and methods	114
Acknowledgments	118
References	119
CHAPITRE 3 : DISCUSSION	124
CONCLUSION	139
BIBLIOGRAPHIE	140
ANNEXE I : SÉQUENCE DES GÈNES DE FURET CLONÉS	164
ANNEXE II : CONTRIBUTIONS COMPLÉMENTAIRES	189
Une infection grippale saisonnière sévère chez le furet corrèle avec une induction réduite d'interféron et une augmentation de l'induction d'IL-6	190
Résumé	191
Un virus de la rougeole chimérique contenant l'enveloppe du virus de la maladie de Carré (CDV) protège les furets d'un défi léthal par le CDV	199
Résumé	200

TABLE DES ILLUSTRATIONS

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1 : Classification phylogénétique des morbillivirus.	3
Figure 2 : Schéma du virion de la rougeole et organisation génomique des morbillivirus.	5
Figure 3 : Synthèse des protéines P, V et C à partir du gène P.	7
Figure 4 : Région conservée dans l'extrémité C-terminale de la protéine V.	21
Figure 5 : Structure de la protéine V du virus SV5 (PIV5) avec un schéma du domaine de liaison au zinc.	23
Figure 6 : Domaines de liaison à STAT1 et STAT2 des protéines P et V.	26
Figure 7 : Récepteurs des IFN de type I et II et voie classique de signalisation JAK-STAT.	29

CHAPITRE 2 : PUBLICATIONS

Publication no. 1

Figure 1 : Recombinant CDVs.	49
Figure 2 : Virulence and immunosuppressive activity of recombinant CDVs in ferrets.	52
Figure 3 : Replication of Cko ^{green} and Vko ^{green} in thymus and intestinal Peyer's patches.	55
Figure 4 : Cell type specificity of CDV replication and cytokine response.	58

Publication no. 2

Tableau 1 : Comparison of ferret cytokines with the respective canine and feline protein sequences available in GenBank.	77
Figure 1 : Clinical parameters in animals infected with lethal or non-lethal CDV strains.	79
Figure 2 : Extent and PBMC subtype specificity of lethal and non-lethal CDV infection.	81
Figure 3 : Comparison of cytokine responses in animals infected with lethal or non-lethal CDV strains.	83

Tableau 2 : Primer pairs used in the cytokine real-time PCR assays	89
Publication no. 3	
Figure 1 : In vitro characterization of P/V mutant viruses.	101
Figure 2 : Virulence assessment of P/V mutant viruses.	103
Figure 3 : The V-unique region of CDV V protein is not required for interferon signalling blockade.	105
Figure 4 : The Y110H and cysteine mutant CDV fails to control the type I interferon response.	108
Figure 5 : The V-unique region of CDV V protein is required for Mx1 promoter activation blockade.	110

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

Figure 8 : Voies de signalisation par les <i>mitogen-activated protein kinase</i> (MAPK) par les IFN de type I.	133
Figure 9 : Mécanisme d'action de la protéine MxA.	136

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μg : microgramme

μl : microlitre

aa : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

AIDS : Acquired immune deficiency syndrome

AP-1 : activated protein-1

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATCC : American Type Culture Collection

C : Celsius

C255 : cystéine 255

C272 : cystéine 272

CD : cluster of differentiation

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

CDV : canine distemper virus

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CNS : central nervous system

C-terminal : carboxy-terminal

CTR : control

D : acide aspartique

DMV : dolphin morbillivirus

DTH : delayed type hypersensitivity

EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique

eGFP : enhanced green fluorescent protein

F : protéine de fusion

FACS : Fluorescence-activated cell sorter

Fc : fragment cristallisable

Fc γ RII : Fc-gamma-receptor II

FITC : fluorescéine isothiocyanate

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GAS : interferon gamma activated sequence
GEF : guanine-nucleotide-exchange factors
GTPase : guanosine triphosphatase
H : hémagglutinine
H1 : hinge 1
H2 : hinge 2
HIV : human immunodeficiency virus
IFN : interféron
IFNAR : interferon alpha receptor
IFNGR : interferon gamma receptor
IgG : immunoglobuline G
IgM : immunoglobuline M
IL : interleukine
IPS-1 : interferon promoter stimulator 1
IRF : interferon regulatory factor
ISG : interferon stimulated gene
ISGF3 : interferon-stimulated gene factor 3
ISRE : interferon stimulated response elements
JAK1 : Janus activated kinase 1
kb : kilobase
kDa : kilodalton
L : protéine large
M : protéine de la matrice
MALT : mucosa-associated lymphoid tissue
MDA-5 : melanoma differentiation-associated gene-5
MDCK : Madin–Darby Canine Kidney cells
mg : milligramme
ml : millilitre
mM : millimolaire
MOI : multiplicity of infection

MuV : Mumps virus
MV : measles virus
Mx : orthomyxovirus resistance gene
N : nucléocapside
NDV : New Castle disease virus
NFκB : nuclear factor-kappa-B
ng : nanogramme
NR : nucleoprotein receptor
N-terminal : amino-terminal
P : phosphoprotéine
PAMPs : pathogen-associated molecular patterns
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
PBS : phosphate buffered saline
PDV : phocine distemper virus
PE : phycoérythrine
pH: potential hydrogène
PHA : phytohémagglutinine
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PIV5 : parainfluenza virus 5
PKR : protein kinase R
PPRV : peste-des-petits-ruminants virus
R : arginine
RdRp : RNA dependent RNA polymerase
RIG-I : retinoic acid inducible gene I
RNA : ribonucleic acid
RPV : rinderpest virus
RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SARS : severe acute respiratory syndrome
SEM : standard error of the mean
SeV : Sendai virus
SGP : small G-proteins

SIV : simian immunodeficiency virus
SLAM : signaling lymphocytic activation molecule
SRAS : syndrome respiratoire aigu sévère
STAT : signal transducer and activator of transcription
SV5 : simian virus 5
TCID₅₀ : tissue culture 50% infectious dose
TCR : T-cell receptor
TGF : transforming growth factor
T_H : T-helper
TLR : Toll-like receptor
TNF : tumour necrosis factor
Tyk2 : tyrosine kinase 2
U : unité internationale
VHC : virus de l'hépatite C
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VIP : V-interacting proteins
Vko : V knock out
VRE : virus responsive element
VSV : Vesicular stomatitis virus
W : tryptophane
WT : wild type
Y110 : tyrosine 110

À ma grand-mère Clarisse

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Les morbillivirus

1.1 Phylogénie

Le virus de la maladie de Carré (*canine distemper virus*, CDV), fait partie de l'ordre des *Mononegavirales*, de la famille des *Paramyxoviridae*, de la sous-famille des *Paramyxovirinae* et du genre *Morbillivirus* (figure 1). On retrouve dans ce genre plusieurs agents pathogènes de mammifères dont le virus de la rougeole (*measles virus*, MV) infectant les humains et causant à ce jour beaucoup de mortalité chez les enfants dans les pays en voie de développement (Grais et al. 2007; Moss et Griffin 2006). Parmi les virus touchant les animaux, on y répertorie le *phocine distemper virus* (PDV), le *dolphin morbillivirus* (DMV), le *rinderpest virus* (RPV) ou virus de la peste bovine qui est un important agent pathogène ayant décimé de nombreux cheptels dans l'histoire de l'agriculture (Normile 2008) et le virus de la peste-des-petits-ruminants (PPRV). Le CDV, quant à lui, va infecter plusieurs espèces de l'ordre *Carnivora*, dont le chien et le furet. Il est suggéré que le RPV serait l'ancêtre du MV et du CDV (Norrby et al. 1985) et que, suite à la domestication des animaux, les humains auraient acquis le MV. Le CDV aurait émergé plus tard puisqu'il est plus proche du MV que du RPV (Norrby et al. 1985).

1.2 Structure du virion

La particule virale est constituée d'une bicouche lipidique empruntée à la cellule hôte qu'elle infecte (Choppin, Scheid, et Mountcastle 1975), dans laquelle sont insérées les glycoprotéines virales de l'hémagglutinine (H) et de fusion (F) et qui contient la protéine de la matrice (M) en dessous de sa couche interne (figure 2). Le virion possède une forme sphérique ou pléomorphe d'un diamètre de 150-250 nm (ICTVdB 2006). À l'intérieur du virion se retrouve le complexe ribonucléoprotéique composé de l'ARN génomique auquel est lié la protéine de la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P) et la

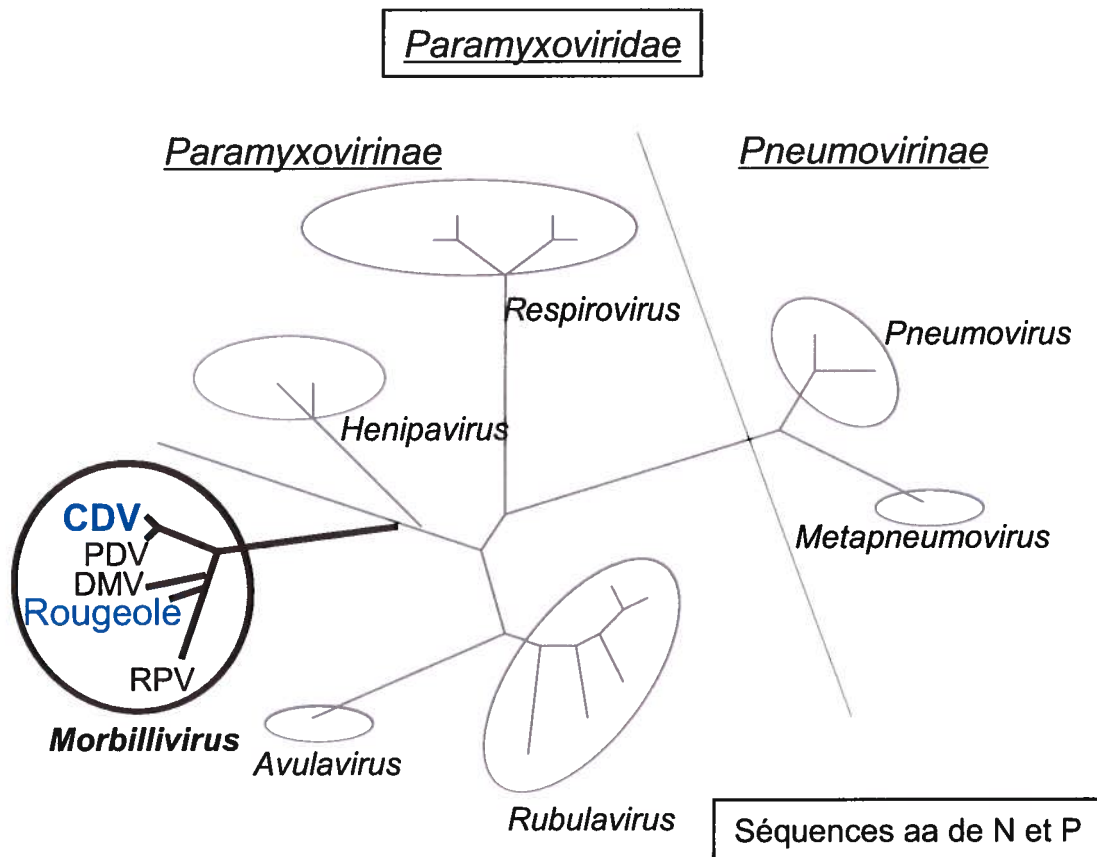


Figure 1. Classification phylogénétique des morbillivirus (adaptée de : Tidona et al., 1999).

Relation évolutionnaire entre les différents virus de la famille des *Paramyxoviridae* basé sur l'alignement de séquence en acides aminés de la nucléocapside et de la phosphoprotéine. CDV: *canine distemper virus* ou virus de la maladie de Carré, PDV: *phocine distemper virus*, DMV: *dolphin morbillivirus*, RPV: *rinderpest virus* ou virus de la peste bovine.

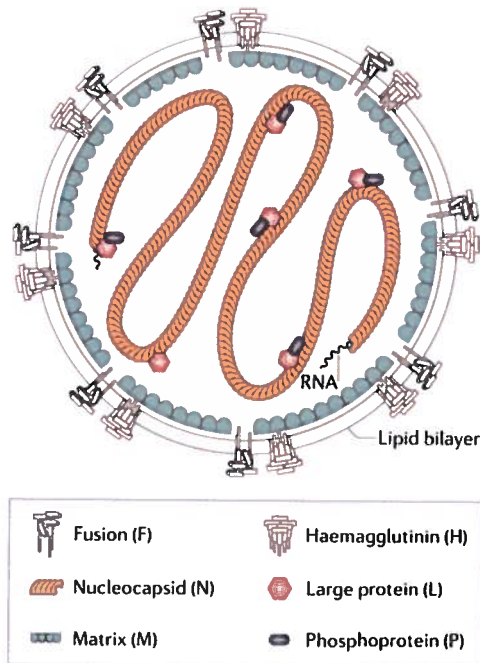
polymérase virale (L) (Lamb 2001). Ce complexe est suggéré comme étant l'unité infectieuse minimale possédant la capacité de transcrire des ARNm viraux *in vitro*.

1.3 Organisation génomique

Les morbillivirus sont composé d'un génome à ARN simple brin de polarité négative d'une longueur d'environ 16 kilobases (kb). Dans le cas du MV et du CDV, il existe plusieurs génotypes du virus mais un seul sérotype pour chacun. Le génome morbilliviral obéit à la « règle de six » où la taille du génome est obligatoirement un multiple de six, la protéine de la nucléocapside n'ayant la capacité que de lier six nucléotides lors des différentes étapes de la réplication virale (Calain et Roux 1993; Egelman et al. 1989; Kolakofsky et al. 2005). Les extrémités 3' et 5' du génome contiennent chacune une région extracistronique conservée qu'on appelle *leader* et *trailer* respectivement. Ces deux régions jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la transcription et de la réplication. Le génome des morbillivirus contient six gènes qui codent pour huit protéines. Tous les gènes sont monocistroniques à l'exception du gène P, qui code en plus pour deux protéines accessoires, les protéines V et C. La protéine V est synthétisée par l'ajout d'une guanosine non appariée, à un même site précis, lors de la transcription de l'ARNm (Cattaneo et al. 1989; Thomas, Lamb, et Paterson 1988) (figure 3). La protéine C quant à elle est codée à partir d'un autre cadre de lecture ouvert présent dans le gène P.

Au début ainsi qu'à la fin de chaque gène se trouvent des séquences conservées jouant un rôle de régulateur de la transcription. Par ailleurs, il existe entre chaque gène une région intergénique de trois nucléotides qui contribue aussi au contrôle de la transcription. La fréquence avec laquelle le complexe de réplication réinitie la synthèse de l'ARNm suivant diminue au fur et à mesure que la transcription se déroule. Il se trouve que le gène au début du génome est transcrit en plus grande quantité que le suivant et donc que le nombre de molécules d'ARNm produites diminue d'après la distance du

A)



B)

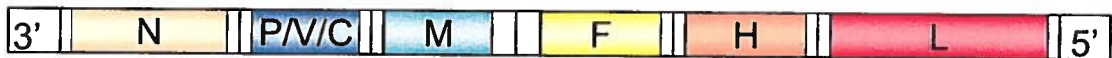


Figure 2. Schéma du virion de la rougeole et organisation génomique des morbillivirus (Moss et Griffin 2006).

A) Représentation schématique de la particule virale du virus de la rougeole. La bicouche lipidique est illustrée par les deux traits minces entourant la particule virale. Juste en dessous se trouve la protéine de la matrice en vert. Insérées aux travers de la bicouche lipidique sont les protéines d'attachement (H) et de fusion (F). L'ARN génomique se retrouve enroulé par la nucléocapside (N) en orange, sur lequel sont présentes la polymérase (L) associée à la phosphoprotéine (P), en rouge et bleu respectivement.

B) Organisation génomique des morbillivirus. Les gènes de la nucléocapside (N), de la phosphoprotéine (P), de la matrice (M), de fusion (F), de l'hémagglutinine (H) et de la polymérase (L) sont illustrés dans leur position respective. Les carrés blancs représentent les régions inter-géniques régulatrices et non-traduites du génome ainsi que la région *leader* à l'extrémité 3' et la région *trailer* à l'extrémité 5' du génome viral.

gène par rapport à l'extrémité 3' du génome (Cattaneo et al. 1987; Homann, Hofschneider, et Neubert 1990).

1.4 Fonction sommaire des protéines virales

La protéine N est responsable de l'encapsulation de l'ARN génomique ainsi que du contrôle de la transcription des ARNm viraux et de la réplication du génome viral (Blumberg et Kolakofsky 1981; Blumberg, Leppert, et Kolakofsky 1981). Elle joue un rôle protecteur de l'ARN génomique rendant cette dernière molécule résistante à l'action des ribonucléases.

La protéine P sert comme cofacteur de la polymérase virale (Curran, Marq, et Kolakofsky 1992) et a été reliée à la propriété du virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte en inhibant la voie de signalisation des IFN (Devaux et al. 2007; Yokota et al. 2008). Elle se retrouve sous forme tétramérique. Elle est requise pour la synthèse d'ARN, ce qui en fait une composante essentielle du complexe de réplication (Curran 1996; Horikami et al. 1992; Tarbouriech et al. 2000). En effet, c'est la protéine P qui permet à la protéine L, qui contient à elle seule l'activité catalytique, de lier le complexe ARN:N (Horikami et al. 1992; Poch et al. 1990).

La protéine M est la protéine la plus abondante dans les particules virales et se trouve juste en-dessous de la bicouche lipidique (Lamb 2001). Elle a la propriété naturelle de s'associer aux membranes plasmiques (Faaberg et Peeples 1988; Lamb et Choppin 1977; Nagai, Ogura, et Klenk 1976). Elle est impliquée dans la morphogénèse et l'assemblage des virus naissants à la surface intracellulaire de la bicouche lipidique. En effet, en plus d'avoir la propriété de se lier aux membranes contenant les glycoprotéines virales, la protéine M a la capacité d'interagir avec les nucléocapsides (Blumberg et al. 1984; Stricker, Mottet, et Roux 1994; Yoshida et al. 1986). De plus, des MV mutants dont les glycoprotéines ne possèdent pas de queue cytoplasmique démontrent une redistribution cellulaire de leur protéine M (Cathomen, Naim, et Cattaneo 1998). Donc,

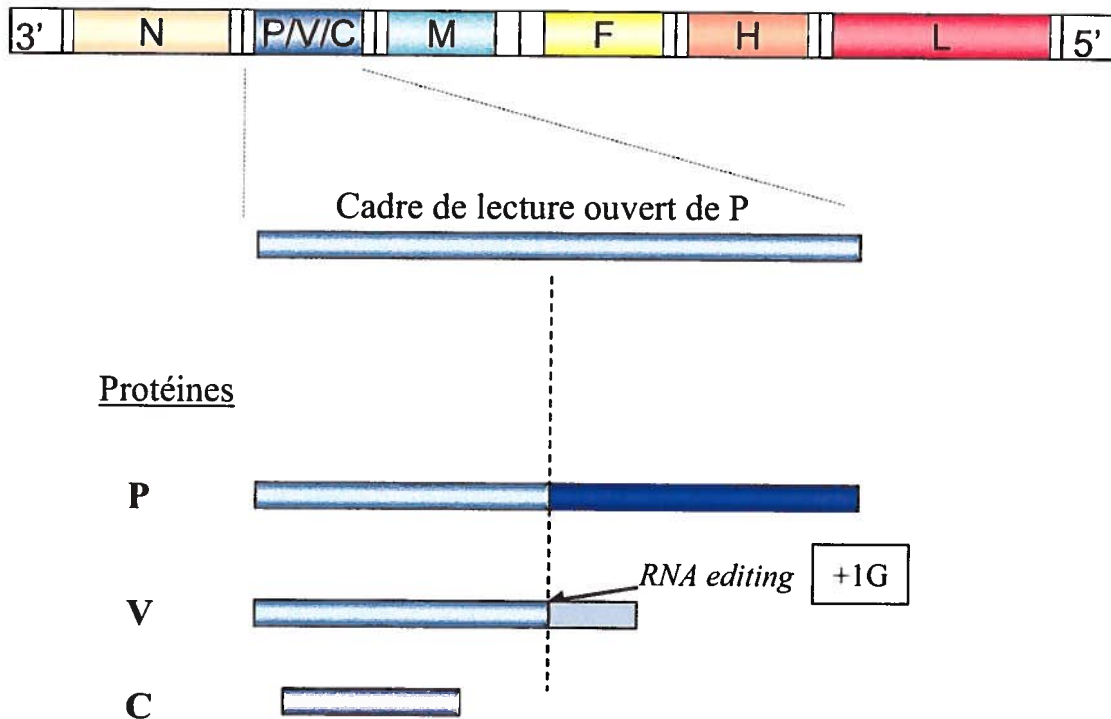


Figure 3. Synthèse des protéines P, V et C à partir du gène P.

Le cadre de lecture ouvert de P correspond exactement à la séquence complémentaire du gène P. L'ARNm de V partage la région 5' avec l'ARNm de P jusqu'au nucléotide 689 où l'ARN polymérase virale va ajouter, dans environ 50% des transcrits, une guanosine non appariée changeant la séquence nucléotidique dans la région 3' de l'ARNm de V et introduisant un codon stop. L'ARNm de C est synthétisé à partir d'un autre cadre de lecture ouvert dans le gène P.

l'assemblage de la protéine M à la membrane cytoplasmique où sont présentes les glycoprotéines virales et sa liaison avec la protéine N seront les forces motrices permettant au virus de bourgeonner.

Les morbillivirus contiennent deux glycoprotéines de surfaces insérées dans leur bicouche lipidique (Lamb 2001). Une des deux, la protéine H, une protéine membranaire glycosylée de type II qui ne s'insère qu'une seule fois dans l'enveloppe virale, médie l'attachement viral permettant au virus de se lier au récepteur cellulaire. Chez les morbillivirus, incluant le MV, le CDV et le virus de la peste bovine, la molécule *signaling lymphocytic activation molecule* (SLAM) ou CD150 est le récepteur cellulaire de haute affinité (Baron 2005; Hahm, Arbour, et Oldstone 2004; Hsu et al. 2001; Navaratnarajah et al. 2008; Tatsuo et al. 2000; Tatsuo, Ono, et Yanagi 2001; von Messling et al. 2005; von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006). Les souches vaccinales du MV peuvent aussi lier la molécule CD46 qui est un cofacteur membranaire du complément (Dorig et al. 1993; Nanche et al. 1993) mais le récepteur sur les cellules épithéliales et neuronales reste à être identifié.

La seconde des deux glycoprotéines est la protéine de fusion synthétisée à partir du gène F. Elle joue un rôle essentiel dans la fusion de la particule virale avec la cellule hôte. C'est une glycoprotéine membranaire de type I qui ne s'insère, elle aussi, qu'une seule fois dans l'enveloppe virale. Elle se retrouve sous forme homotrimérique (Calain et Roux 1988; Russell, Paterson, et Lamb 1994). Elle est synthétisée comme un précurseur non fonctionnel (F₀) et est clivée par des protéases cellulaires pour former deux chaînes F₁ et F₂ liées par des ponts disulfures (Homma et Tamagawa 1973; Scheid et Choppin 1974; von Messling et al. 2004), dont seulement la sous-unité F₂ est glycosylée (Alkhatib et al. 1994). La protéine F doit être en présence de H pour effectuer la fusion de l'enveloppe virale aux membranes cellulaires (Wild, Malvoisin, et Buckland 1991) qui se fait à la surface cellulaire à pH neutre (Lamb 2001).

Finalement, le gène L va coder pour la polymérase virale ARN-dépendante (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRp) (Poch et al. 1990). Cette dernière est responsable

autant de la transcription que de la réplication, possédant comme activité enzymatique, la polymérisation des nucléotides ainsi que l'ajout de la coiffe et de la queue poly-A sur les ARNm (Bourhis, Canard, et Longhi 2006; Lamb 2001). Des analyses bioinformatiques ont démontré la présence d'un domaine méthyltransférase dans la région C-terminale de la protéine (Ferron et al. 2002). La polymérase contient trois domaines conservés (I, II et III) avec des régions charnières flexibles (*hinge* (H)1 et H2) entre chaque domaine (McIlhatton, Curran, et Rima 1997). Une étude démontre que la déstabilisation du domaine H1 abolit l'activité de la polymérase alors que la déstabilisation du domaine H2 n'a aucun effet (Duprex, Collins, et Rima 2002). La cinétique de transcription et de réplication a été bien caractérisée chez le MV et démontre que la synthèse des ARNm viraux se fait de façon linéaire jusqu'à ce que de nouvelles polymérases virales soient synthétisées, moment auquel se déroulera l'accumulation des ARNm de façon exponentielle (Plumet, Duprex, et Gerlier 2005). C'est l'expression de la protéine N qui module la transition de la transcription vers la réplication du génome viral (Plumet, Duprex, et Gerlier 2005).

Les protéines V et C des morbillivirus ne sont pas requises pour la propagation *in vitro* mais sont impliquées dans la pathogenèse *in vivo* (Devaux et al. 2008; Radecke et Billeter 1996; von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006). Il a été suggéré, par ailleurs, que la protéine C du MV est un facteur d'infectivité (Devaux et Cattaneo 2004). Le rôle des protéines C et V dans l'évasion du virus à la réponse immunitaire sera discuté plus loin.

2. Pathogenèse morbillivirale

Le MV et le PPRV vont majoritairement conduire à des infections non létales (Krakowka 1982; Krakowka, Cockerell, et Koestner 1975; Moss et Griffin 2006; Yanagi, Takeda, et Ohno 2006). Il en est de même pour le CDV chez le chien. Par contre, le CDV chez le furet ainsi que chez des espèces sauvages, ainsi que le PDV et le RPV vont causer des infections mortelles chez leurs hôtes respectifs (Beineke et al. 2009; Heaney, Cosby, et Barrett 2005; Normile 2008; Stephensen et al. 1997; von Messling et al. 2003). Le MV

et le CDV sont transmis par voie respiratoire, par inhalation d'aérosols ou de virus présent dans des liquides biologiques (Krakowka, Higgins, et Koestner 1980; Moss et Griffin 2006).

Tous les morbillivirus vont causer une maladie similaire chez leurs hôtes respectifs. L'infection est caractérisée par une forte fièvre accompagnée de rougeurs cutanées ainsi que des signes gastro-entériques et respiratoires. Les premiers signes cliniques peuvent inclure de la déshydratation, de l'anorexie et une perte de poids prononcée (Wright et al. 1974). Une première fièvre transitoire qui coïncidera avec le début de la leucopénie sera observée dans les sept premiers jours de l'infection (Krakowka, Higgins, et Koestner 1980). En plus de la forte leucopénie, une inhibition de la prolifération lymphocytaire ainsi qu'une perte de la réaction d'hypersensibilité de type retardé débutent une semaine après l'infection (Heaney, Cosby, et Barrett 2005; Kauffman, Bergman, et O'Connor 1982; Krakowka 1982; Moss et Griffin 2006; von Messling et al. 2003). Cette immunosuppression se développera et sera maintenue chez les survivants, et ce, bien après l'élimination du virus chez l'hôte.

2.1 Cinétique d'infection

Il est suggéré que la primo infection se déroulera à partir des cellules immunitaires présentes dans les tissus épithéliaux et lymphoïdes nasopharyngés et une première réplication se déroulera dans les tissus lymphoïdes des voies respiratoires (Iwatsuki et al. 1995; Sakaguchi et al. 1986; Zhu et al. 1997). Grâce à la génération de MV et CDV recombinants exprimant la protéine verte fluorescente (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) dans les cellules infectées, il a été possible d'observer séquentiellement la progression d'une infection morbillivirale (de Swart et al. 2007; von Messling, Milosevic, et Cattaneo 2004). Dans des furets infectés par un CDVeGFP, les premières cellules à être infectées sont les cellules de type lymphocytaire. En effet les lymphocytes B et T seront les premières cellules à démontrer de la fluorescence dans les premières étapes de l'infection, autant avec le CDV qu'avec le MV, dans les cellules circulant dans le sang

(von Messling, Milosevic, et Cattaneo 2004; de Swart et al. 2007). Malgré le fait qu'initialement les monocytes et les macrophages localisés dans l'épithélium respiratoire avaient été identifiés comme les premières cellules à propager les virus (Appel 1970), les monocytes et macrophages sont faiblement infectés par le CDV et le MV exprimant la eGFP (de Swart et al. 2007; von Messling, Milosevic, et Cattaneo 2004; von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006).

On peut observer par la suite la présence d'une forte infection des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et la rate (von Messling, Milosevic, et Cattaneo 2004). La conséquence de ces infections résulte en une altération de l'intégrité des organes lymphoïdes secondaires. De plus, une forte infection est observée dans les plaques de Peyer et dans les amygdales, suggérant par le fait même une interférence avec l'établissement d'une immunité mucoale. La première virémie favorisera une infection généralisée de tous les tissus lymphoïdes incluant la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, les tissus lymphatiques associés aux muqueuses (*mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT), ainsi que les cellules monocytaires du système gastro-intestinal et les cellules de Kupffer du foie (Appel 1970; von Messling, Milosevic, et Cattaneo 2004; Wright et al. 1974).

Les signes cliniques coïncident avec le début de l'infection des tissus épithéliaux. Une étude récente a démontré qu'un MV ne reconnaissant plus un récepteur épithélial hypothétique au côté basolatéral des cellules des voies respiratoires est toujours capable de produire des signes cliniques comme le virus de type sauvage (Leonard et al. 2008). Par contre, la relâche du virus de l'hôte est altérée. Ceci confirme que c'est par les cellules exprimant SLAM que l'infection morbillivirale est initiée. Par la suite, le virus sera disséminé par les tissus lymphatiques et le sang aux tissus épithéliaux et, dans certains cas, neuronaux (Beineke et al. 2009; Rudd, Cattaneo, et von Messling 2006).

2.2 L'immunosuppression

Les morbillivirus sont reconnus pour leurs propriétés immunosuppressives chez les hôtes qu'ils infectent. L'immunosuppression morbillivirale repose essentiellement sur leur tropisme leucocytaire. Le prototype des morbillivirus humain, le MV, a causé et cause toujours des infections amenant une immunosuppression chez les hôtes infectés, principalement dans les pays en voie de développement. Cette immunosuppression ouvre la porte à d'autres pathogènes, menant à des infections secondaires souvent mortelles.

2.2.1 Infection des cellules immunitaires

Le tropisme leucocytaire du CDV repose sur le fait que la protéine H se lie à la molécule CD150 ou SLAM (*signalling lymphocyte activation molecule*) qui se retrouve sur les thymocytes immatures, les lymphocytes T mémoires, les lymphocytes B et T activés, les monocytes et cellules dendritiques matures activées. Il a été démontré que des virus ne pouvant pas lier SLAM perdent totalement leur capacité à infecter les lymphocytes et à causer une immunosuppression (von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006). L'infection des lymphocytes T, frôlant les 60% à partir du jour sept post infection, est plus importante que ceux des lymphocytes B lors d'une infection par le CDV chez le furet. Dans le cas du MV, bien que les lymphocytes T soient un site de réplication virale privilégié, les lymphocytes B démontrent un plus grand taux d'infection. Ceci a été mis en évidence autant dans des études *in vitro* (Condack et al. 2007) que dans le modèle macaque avec des virus exprimant la eGFP (de Swart et al. 2007). Une très faible infection, voir nulle, caractérise la lignée cellulaire des monocytes/macrophages lors d'une infection par ces deux virus. Des études récentes démontrent aussi une infection significative des cellules dendritiques par le MV, ce qui peut fortement contribuer à l'altération de la réponse immunitaire (de Swart et al. 2007; de Witte et al. 2006; Fugier-Vivier et al. 1997; Grosjean et al. 1997; Hahm, Arbour, et Oldstone 2004). En effet, puisque SLAM est présent sur les cellules dendritiques matures ainsi que sur les

monocytes activés, la présentation antigénique pourrait aussi être affectée (Lan et al. 2005; Tatsuo, Ono, et Yanagi 2001; Yanagi et al. 2002).

2.2.2 Altération de la réponse de cytokines

L'altération de la synthèse de cytokines par le MV est bien connue. Des études démontrent une polarisation de la synthèse de cytokines vers une réponse de type T-*auxiliaires* (T_H) 2, notamment une régulation à la baisse de l'interleukine (IL)-12, ainsi qu'une régulation à la hausse de l'IL-4 et de l'IL-10. Cette dernière est même maintenue longtemps après l'infection (Carsillo, Klapproth, et Niewiesk 2009; Moss et al. 2002). Il avait été observé que même le vaccin du MV, possédant encore quelques propriétés immunosuppressives, favorise la synthèse de l'IL-4 ainsi qu'une réduction de l'IFN- γ chez les personnes vaccinées (Ward et Griffin 1993). De plus, la régulation à la hausse de l'IL-4 est vue chez certains patients et ceci corrèle avec l'inhibition de la prolifération lymphocytaire puisque les cellules recouvrent leur capacité mitogénique suite à la neutralisation de l'IL-4 (Griffin et Ward 1993). Des chercheurs ont remarqué que l'IL-12 provenant des monocytes était régulée à la baisse lorsque ceux-ci étaient infectés avec le MV (Karp et al. 1996). Les auteurs suggèrent que cet effet est le résultat de la liaison du MV avec la molécule CD46. Bien qu'en général, ce sont les souches vaccinales qui ont la propriété de lier la molécule CD46, des isolats cliniques du MV ont aussi démontré la capacité de s'y lier (Manchester et al. 2000). Plus récemment, une étude effectuée chez des patients atteints d'une infection naturelle au MV démontre que ceux-ci présentent une production d'IL-12 altérée comparativement à des personnes saines (Atabani et al. 2001). Par ailleurs, dans une étude effectuée chez un autre groupe de patients, une augmentation de l'IL-10 est mesurée pendant et après l'infection (Moss et al. 2002). L'augmentation de cette cytokine pourrait expliquer en partie plusieurs manifestations de l'immunosuppression morbillivirale. En effet, la suppression de la réaction d'hypersensibilité de type retardé a été attribuée à l'IL-10 (Powrie, Menon, et Coffman 1993; Rivas et Ullrich 1992). De plus, il a clairement été démontré que cette cytokine contribue à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (Taga, Mostowski, et

Tosato 1993; Taga et Tosato 1992). D'autre part, une augmentation de l'IL-10 corrèle avec une augmentation de l'incidence d'infections, ce qui pourrait expliquer les infections secondaires suite à une infection par le MV (Oswald et al. 1992; Steinhäuser et al. 1999; van der Poll et al. 1996). Une caractérisation moléculaire de l'interaction du MV avec les cellules dendritiques, dans un modèle murin d'infection morbillivirale, explique que la diminution de l'IL-12 est le résultat de l'interaction du virus avec la molécule SLAM et d'une signalisation cellulaire défectueuse du *Toll-like receptor* (TLR)-4 (Hahm, Cho, et Oldstone 2007).

2.2.3 Impact de l'infection sur les lymphocytes

Une des caractéristiques communes des morbillivirus est la leucopénie observée après la première semaine d'infection (Baron et al. 2005; Nahmias et al. 1967; Okada et al. 2000; von Messling et al. 2003; Yamanouchi et al. 1974). Pour expliquer cet effet, plusieurs hypothèses ont été émises qui ne sont pas mutuellement exclusives. La destruction sélective des lymphocytes, l'arrêt de la division cellulaire et de la genèse de nouvelles cellules, ainsi qu'une redistribution des cellules immunitaires dans les organes infectés ont été énoncés (Pillet et von Messling 2009; Schnorr et al. 1997). Il est aussi connu que les lymphocytes isolés des hôtes infectés par les morbillivirus ne répondent pas à une stimulation mitogénique et perdent toute capacité à proliférer (Heaney, Barrett, et Cosby 2002; Heaney, Cosby, et Barrett 2005; von Messling et al. 2003; von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006).

2.2.5 Altération des organes lymphoïdes

Une infection par le CDV va causer des altérations macroscopiques dans plusieurs tissus lymphoïdes (Beineke et al. 2009). En effet, une hypertrophie des ganglions lymphatiques, une diminution de la taille du thymus ainsi qu'une déplétion du MALT sont observés chez les animaux infectés. Au niveau microscopique, les lésions sont

caractérisées par une déplétion du compartiment des lymphocytes T et B dans la rate, dans des ganglions lymphatiques ainsi que dans des amygdales. Une augmentation de la formation de syncytia et de la mort des cellules du système immunitaire est observé dans les follicules lymphoïdes (Iwatsuki et al. 1995). Ceci mène à une perte complète des follicules secondaires chez les chiens infectés (Iwatsuki et al. 1995; Jacoby et Griesemer 1970; Krakowka et Koestner 1977). Il y a une forte corrélation entre la déplétion des tissus lymphoïdes et de la quantité d'antigène du CDV présent dans les tissus (Kumagai et al. 2004; Wunschmann et al. 1999). Bien que les différentes sous-populations lymphocytaires et monocytaires peuvent être infectées par le CDV, les cellules démontrant une plus grande susceptibilité à l'infection sont les cellules CD4 positives (+) (Iwatsuki et al. 1995). En effet, l'infection mène à la déplétion des cellules CD4+ dans les organes lymphoïdes d'une façon plus prononcée et plus précoce que pour les cellules CD8+ (Wunschmann, Kremmer, et Baumgartner 2000).

2.3 Mécanismes d'immunosuppression

2.3.1 Facteur soluble

Il a été suggéré que la sécrétion d'un facteur soluble à partir des cellules infectées pouvait contribuer à l'immunosuppression. En effet, un groupe de chercheurs a remarqué qu'une population de lymphocytes infectés avec aussi peu qu'une particule virale par 2×10^3 lymphocytes T ne répond plus à une stimulation par un antigène spécifique à cette population (Fujinami et al. 1998; Sun et al. 1998). Ils ont émis l'hypothèse qu'un facteur soluble, soit d'origine virale ou cellulaire, devait être sécrété par les cellules infectées et inhiber par là, toute la population cellulaire. Pour vérifier cette affirmation, ils ont démontré que le surnageant provenant de lymphocytes infectés avec une faible quantité de virus pouvait inhiber la prolifération d'une population lymphocytaire suite à une stimulation. Cette suppression de l'activation lymphocytaire n'était pas dépendante de la présence de virus infectieux (Sun et al. 1998) et était sensible à une température de plus de 56 degrés Celsius (C). Le poids moléculaire de ce facteur a été estimé à plus de 100

kDa grâce à l'utilisation de filtre d'exclusion. Par ailleurs, il est clair que le facteur soluble n'est pas l'IL-10 ni le *transforming growth factor* (TGF)- β , deux cytokines immunosuppressives, car l'effet inhibiteur du surnageant provenant de cellules infectées n'était pas altéré en présence d'anticorps contre ces deux protéines. Cette équipe a effectué des expériences similaires avec des lymphocytes B (Fujinami et al. 1998). Par contre, l'effet sur les cellules B était moins puissant. Une étude a démontré que le MV libère un facteur soluble, d'identité inconnue, qui inhibe spécifiquement les cellules B sans altérer leur profil d'expression de cytokines ni leurs molécules de surface (Wang et al. 2003).

2.3.2 Nucléoprotéine

La protéine N du MV a la capacité de se lier aux cellules épithéliales thymiques ainsi qu'aux lymphocytes T. Ceci a pour effet d'inhiber la prolifération lymphocytaire, contribuant ainsi à l'immunosuppression globale. En effet, lorsque les cellules thymiques épithéliales infectées par le MV entrent en apoptose, celles-ci relâchent dans le milieu environnant la protéine N qui ira se lier sur les récepteurs à nucléoprotéine (*nucleoprotein receptor*, NR) (Laine et al. 2003). Ce récepteur putatif possède la capacité de lier aussi les protéines N d'autres morbillivirus. Une liaison de la protéine N sur les récepteurs Fc pour les immunoglobulines G (IgG) de type II (Fc γ RII, CD32) induisant une suppression de la réponse inflammatoire a été démontrée dans un modèle murin (Laine et al. 2005). Dans ce modèle, on observe plus particulièrement une inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ ainsi qu'une diminution de la production de l'IL-12 par les cellules dendritiques suite à l'injection de grandes quantités de protéine N. Cet effet a par la suite été observé *in vitro* où la protéine N inhibe la production d'IL-12 par les cellules dendritiques activées ainsi que la production d'anticorps par les lymphocytes B (Marie et al. 2001; Kerdiles et al. 2006). Deux études mettent en lumière une capacité de la protéine N à inhiber la production d'Ig par les lymphocytes B (Marie et al. 2001; Ravel et al. 1997). Une étude plus détaillée démontre que la région *N-tail* (acides aminés 401-525) est la région responsable de la liaison sur le récepteur NR qui induit un arrêt du cycle

cellulaire en phase G0/G1. Plus spécifiquement, c'est la région conservée chez les morbillivirus, entre les acides aminés 401 et 420, qui est responsable pour la liaison sur le récepteur NR et de ce fait, pour l'arrêt du cycle cellulaire. La région N-core (acides aminés 1-400), quant à elle, induit l'activation de la caspase 3 lorsque cette première est liée sur le récepteur FcγRIIB1 (Laine et al. 2005), une iso-forme du récepteur, ce qui régule à la baisse l'activité des cellules B (Malbec, Fridman, et Daeron 1999). Bien que ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme d'immunosuppression supplémentaire pour le MV, la concentration de protéine N utilisée dans ces expériences met en question l'importance d'un tel effet dans le contexte d'une infection naturelle.

2.3.3 Les glycoprotéines

Il a été suggéré que les glycoprotéines de surface du virus pouvaient induire une inhibition de l'activité lymphocytaire. Cette suggestion est basée sur l'observation selon laquelle des lymphocytes cultivés *in vitro* ne répondent plus à un mitogène lorsqu'ils sont cocultivés avec le MV alors que, cette anergie n'est plus présente dans les cellules infectées avec un virus recombinant portant la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) à la place de F et H (Schlender et al. 1996). La coexpression de F et H semble induire une plus forte immunosuppression que lorsque chacune de ces glycoprotéines est exprimée seule avec la protéine G. Des résultats similaires ont été reproduits *in vivo* dans un modèle de rat de coton où ce virus recombinant n'induisait plus l'immunosuppression observée avec le virus de type sauvage (Niewiesk et al. 1997). De plus, l'immunosuppression observée chez le rat de coton n'est pas due à une réplication active, suggérant par là le rôle direct des glycoprotéines de surface. Par ailleurs, des cellules exprimant les glycoprotéines de façon transitoire par transfection, lorsqu'injectées dans les rats de coton, provoquent aussi l'immunosuppression observée avec le virus (Niewiesk et al. 1997).

Un examen plus approfondi a démontré que l'inhibition de la prolifération des lymphocytes n'est pas due à l'apoptose ou à la présence de facteurs solubles relâchés,

mais bien à un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Schnorr et al. 1997; Weidmann, Fischer et al. 2000). De plus, cette étude a mis en évidence que la glycosylation de ces protéines n'est pas requise, mais que c'est bien le clivage de la protéine F en ses deux sous-unités, F₁ et F₂, qui confère la propriété immunosuppressive observée alors que la fusion médiée par le complexe F/H n'est pas responsable du phénomène. Ces résultats suggèrent que ce contact direct entre les glycoprotéines et les cellules non-infectées contribue à l'immunosuppression (Weidmann, Maisner et al. 2000).

Des auteurs ont par la suite tenté de caractériser les voies de signalisation cellulaires engagées dans l'anergie des lymphocytes suite au contact des glycoprotéines du MV. Il était déjà connu qu'une fois inhibés par le MV, les lymphocytes ne répondent pas à une stimulation par l'IL-2 (Niewiesk et al. 1999). En étudiant la signalisation du récepteur de l'IL-2 (IL-2R) dans des lymphocytes T humains ainsi que des cellules surexprimant l'IL-2R (Kit-225), ils ont découvert que la kinase Akt perd son activation suite au contact avec le MV (Avota et al. 2001). Ils ont par la suite démontré que l'expression d'une forme stable constitutivement active d'Akt empêche la signalisation induite par les glycoprotéines du MV conduisant à l'anergie des cellules T. Cette même équipe a montré que le MV interagit avec les radeaux lipidiques et altère par le fait même le recrutement de molécules impliquées dans la signalisation des cellules T et l'activation du récepteur des cellules T (*T-cell receptor*, TCR) tel que Akt, Vav et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) p85 (Avota et al. 2004). Une récente étude démontre que c'est par l'expression de SIP110, une phosphatase lipidique que le MV va inhiber la molécule PI3K, qui ne sera alors plus disponible pour permettre aux cellules T de proliférer (Avota, Harms, et Schneider-Schaulies 2006).

2.3.4 La protéine C

La protéine C du MV est synthétisée à partir du gène P d'un codon d'initiation alternatif de celui utilisé pour la protéine P (Bellini et al. 1985). Elle est impliquée, d'une part, dans la modulation de la synthèse des ARN viraux. En effet, certaines mutations au

sein de la protéine C, ou l'abolition de son expression dans une souche virale, permettent une régulation à la hausse de la production d'ARN viral (Reutter et al. 2001; Bankamp, Fontana et al. 2008). La région conservée entre les acides aminés 46 et 167 de la protéine est requise pour son activité inhibitrice de la polymérase virale (Bankamp et al. 2005). Cette propriété de la protéine C lui permet de contribuer dans l'inhibition de la synthèse d'IFN en agissant non pas sur la signalisation qui mène à la synthèse d'IFN, mais bien en modulant à la baisse la présence de molécules d'ARN virales inductrices de la production d'IFN. Ainsi, la protéine C contribuerait à maintenir un équilibre entre le niveau d'ARN viral requis pour la réplication et un niveau qui ne stimulerait pas trop fortement les molécules reconnaissant ces ARN viraux (Nakatsu et al. 2008).

D'autre part, la protéine C est aussi impliquée de façon directe dans l'interférence avec la réponse immunitaire innée. En effet, la présence de la protéine C est importante pour la réplication efficace du MV dans les PBMC puisqu'un MV n'exprimant pas C se réplique à des niveaux moindres que le virus de type sauvage (Shaffer, Bellini, et Rota 2003). Cette diminution de la capacité répliquative du virus est contrée par l'ajout d'anticorps neutralisants spécifiques envers les IFN- α et - β (Shaffer, Bellini, et Rota 2003). De plus, la protéine C possède la capacité d'inhiber la signalisation intracellulaire des IFN de type I et, à un niveau moindre, de l'IFN- γ (Shaffer, Bellini, et Rota 2003). Un MV n'exprimant pas C (MV Δ C) démontre une production virale atténuée dans les cellules humaines A549/hSLAM ayant un système d'IFN fonctionnel (Nakatsu et al. 2006) et une synthèse d'IFN à la hausse est observée dans ces cellules comparativement aux cellules infectées avec le MV de type sauvage. Fait intéressant, l'ajout de la protéine NS1 du virus de l'influenza, connue pour interférer avec le système IFN, complémente le défaut de réplication du MV Δ C dans ces cellules (Nakatsu et al. 2006).

Par ailleurs, l'importance de la protéine C dans la réplication du virus *in vivo* a été démontré puisqu'elle favorise la réplication du MV dans un système d'implant de thymus/foie dans des souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) (Valsamakis et al. 1998). Le rôle de C dans la virulence du MV a été confirmé lors d'une étude chez les macaques. En effet, les animaux infectés avec le MV défectueux quant à l'expression de

C ne développent pas d'éruptions cutanées et synthétisent plus d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires que le virus de type sauvage (Devaux et al. 2008). Par contre, un CDV n'exprimant pas de C se propage efficacement dans les tissus lymphoïdes et épithéliaux et maintient son phénotype létal (von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006). Néanmoins, dans ce modèle, la protéine C semble quand même faciliter les étapes tardives de l'infection puisqu'un double mutant du CDV n'exprimant ni C ni V est complètement atténué tandis qu'un CDV muté seulement quant à son expression de V développe des signes cliniques légers.

3. La protéine V

3.1 Structure de V

Un facteur de virulence commun des morbillivirus est la protéine V. Cette dernière a été associée de façon très étroite à l'interférence morbillivirale avec la réponse immunitaire déclenchée par ces virus. La protéine V est synthétisée à partir du cadre de lecture ouvert de P par un mécanisme d'édition de l'ARN (figure 3). Une séquence riche en guanosine et adénosine dans le gène P permet à l'ARN polymérase ARN dépendante, la protéine L, de « bégayer » sur cette séquence et d'insérer une guanosine non appariée dans l'ARNm naissant. Ceci a pour effet de changer la séquence nucléotidique dans la région 3' de la molécule. Ainsi, la protéine V partage sa séquence en acides aminés avec celle de la protéine P jusqu'à la position 230. Par contre, la protéine V contient une région unique jusqu'à l'acide aminé 299 en position C-terminale, menant à un poids moléculaire total d'environ 40 kDa. La région C-terminale est conservée à 50% parmi tous les *Paramyxoviridae* (Horvath 2004; Lamb 2001). Elle représente une région riche en cystéines ayant la capacité de lier deux atomes de zinc (figure 4) (Liston et Briedis 1994; Paterson et al. 1995). Des études récentes ont caractérisé la structure de cette région dans laquelle un nouveau modèle de liaison au zinc a été défini, modèle qui ne se retrouve pas dans les protéines cellulaires connues liant le zinc (Li et al. 2006). La figure 5 illustre

SV5 (PIV5)	169-GF <u>HRREYS</u> ...VKVTEW <u>CN</u> <u>PS</u> <u>CS</u> ...E <u>CT</u> <u>CHQ</u> <u>CPVT</u> <u>CSE</u> <u>CE</u> -219
Rubéole	168-GC <u>HRREW</u> ...VRVFEW <u>CN</u> <u>PI</u> <u>CS</u> ...S <u>CK</u> <u>CGN</u> <u>CPAK</u> <u>CDQ</u> <u>CE</u> -218
Nipah	406-KG <u>HRREID</u> ...VFIDEW <u>CN</u> <u>PAC</u> <u>CS</u> ...K <u>CI</u> <u>CGE</u> <u>CPRV</u> <u>CEQ</u> <u>CG</u> -456
Sendai	316-KG <u>HRREHS</u> .VFIDSW <u>CN</u> <u>PV</u> <u>CS</u> ...K <u>CT</u> <u>CGE</u> <u>CPPV</u> <u>CDE</u> <u>CR</u> -366
Rougeole	230-KG <u>HRREIS</u> ...VFIDRW <u>CN</u> <u>PM</u> <u>CS</u> ...R <u>CT</u> <u>CGE</u> <u>CPRV</u> <u>CEQ</u> <u>CR</u> -280
CDV	230-KG <u>HRREVS</u> .CWIDKW <u>CN</u> <u>PI</u> <u>CT</u> ...K <u>CF</u> <u>CGE</u> <u>CPPT</u> <u>CNE</u> <u>CK</u> -280

Figure 4. Région conservée dans l'extrémité C-terminale de la protéine V.

Alignement de plusieurs séquences en acides aminés de la région C-terminale de la protéine V de différents Paramyxovirus. Les régions conservées sont soulignées, l'histidine conservée participant dans la liaison au zinc est en bleu. Les sept cystéines conservées formant les deux domaines de liaison au zinc sont en rouge. Les nombres indiquent la position des acides aminés dans les protéines respectives.

les sept cystéines conservées, formant avec l'histidine en position 171 de la protéine V du *Parainfluenza virus* (PIV)5 (anciennement nommé *Simian virus* (SV)5), les deux domaines de liaison au zinc.

3.1 Activité de V

Des études *in vitro* effectuées avec la protéine V de différents paramyxovirus ont identifié les domaines importants de la protéine qui entrent en jeu dans le contrôle d'une réponse antivirale innée. Par contre, la stratégie employée et les domaines fonctionnels varient d'un paramyxovirus à l'autre (Fontana, Bankamp, et Rota 2008; Horvath 2004). Chez les morbillivirus, les études ont principalement été effectuées avec la protéine V du MV (Caignard et al. 2009; Caignard et al. 2007; Fontana et al. 2008; Nakatsu et al. 2008; Ohno et al. 2004; Palosaari et al. 2003; Ramachandran, Parisien, et Horvath 2008; Takeuchi et al. 2003). Une première étude avait d'abord démontré que le MV inhibait la voie de signalisation des IFN de types I et II, mais sans identifier les protéines virales impliquées (Yokota et al. 2003). Les auteurs ont démontré que la phosphorylation de Jak1 induite par l'IFN- α est affectée alors que la phosphorylation de Jak1 induite par l'IFN- γ ne l'est pas. En faisant des études d'immunoprécipitation du récepteur des IFN de type I, ils ont observé que les protéines accessoires V et C y sont associées. Des études subséquentes ont démontré que la protéine V inhibait seulement la voie de signalisation des IFN de type I et non la voie de signalisation de l'IFN de type II. Les protéines impliquées dans les voies de signalisation, les *signal transducers and activators of transcription* (STAT)1 et STAT2, n'étaient pas dégradées mais perdaient leur capacité d'être phosphorylées et donc d'être activées (Takeuchi et al. 2003).

Par contre, il a été observé, dans une autre étude, que la protéine V inhibe la voie de signalisation cellulaire induite par les IFN de type I et II ainsi que par l'IL-6 (Palosaari et al. 2003). En effet, les auteurs ont démontré que la protéine V du MV se lie à plusieurs protéines cellulaires qu'ils nommèrent les *V-interacting proteins* (VIP). Par immunobuvardage de type Western, ils ont mis en évidence que V interagit avec les

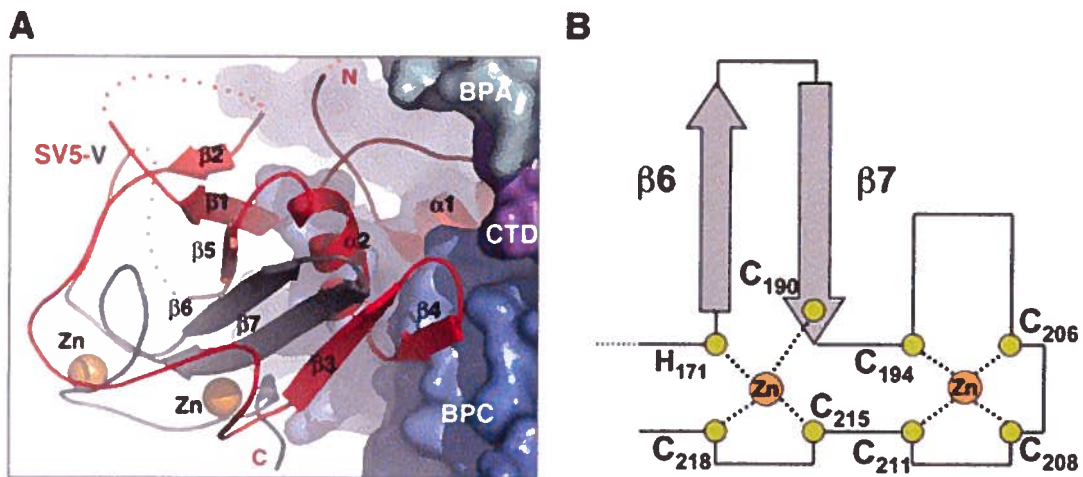


Figure 5. Structure de la protéine V du virus SV5 (PIV5) avec un schéma du domaine de liaison au zinc (Li et al. 2006).

A) Structure globale de la protéine V du virus SV5 en association avec la molécule DDB1. La partie N-terminale de la protéine V est colorée en rouge. Le reste de la protéine, incluant le domaine C-terminal de liaison au zinc, est en gris. Les deux sphères oranges représentent les atomes de zinc.

B) Un repliement schématique du domaine de liaison au zinc incluant l'histidine et les sept cystéines conservées. Cette représentation n'évoque aucune ressemblance avec le repliement connu de protéines liant le zinc.

molécules de signalisation de l'IFN, soit STAT1, STAT2 et STAT3. De plus, ils ont confirmé que V n'inhibe pas la phosphorylation de STAT1 ou STAT2 lorsque ceux-ci sont stimulés avec l'IFN- α ou l'IFN- γ . Par contre, il est clair, d'après cette étude, qu'il y a inhibition de la translocation nucléaire de STAT1 et STAT2 suite à la stimulation par l'IFN et que ceci ne dépend pas de la protéine Crm1 impliquée dans l'export nucléaire. Cette dernière étude avait été menée dans une lignée cellulaire différente (les cellules humaines embryonnaires de rein 293 ainsi que les cellules humaines 2fTGH, contrairement à des cellules HeLa provenant d'un cancer de l'utérus humain pour la précédente étude), ce qui pourrait expliquer en partie la différence de résultats pour l'IFN de type II. De plus, les protéines V utilisées dans ces études provenaient de différentes souches du MV (Palosaari et al. 2003; Ohno et al. 2004; Takeuchi et al. 2003).

Bien que la principale activité de la protéine V semble être le contrôle de l'activation de l'immunité innée, il a été démontré que V joue un rôle substantiel dans le contrôle de la synthèse des ARN viraux. En effet, dans des cellules infectées avec la souche vaccinale Edmonston n'exprimant pas la protéine V, une augmentation considérable de l'ARN des autres protéines virales est observée. Par contre, une souche sur-exprimant la protéine V diminue l'expression des gènes du MV. Il semble même que la protéine V coordonne en partie la distribution cellulaire de la protéine N (Tober et al. 1998), ce qui pourrait expliquer l'implication de V dans la synthèse des ARN viraux.

3.3 Domaines fonctionnels de la protéine V des morbillivirus

Il a été clairement démontré que la protéine V du MV possède plusieurs domaines fonctionnels agissant à différentes étapes dans l'inhibition de la signalisation cellulaire suite à l'induction d'une réponse IFN. En effet, il est maintenant accepté que la région N-terminale, qui est partagée avec la protéine P, interagit avec la molécule STAT1 (Bankamp, Fontana et al. 2008; Bankamp, Hodge et al. 2008; Caignard et al. 2009; Devaux et al. 2007; Nakatsu et al. 2008; Ohno et al. 2004; Ramachandran, Parisien, et Horvath 2008). À l'intérieur de cette région, la tyrosine en position 110 de la protéine est

importante car une seule mutation remplaçant cette tyrosine par une histidine occasionne une perte complète de son activité inhibitrice. En effet, une étude a d'abord montré que la souche vaccinale Edmonston-tag recombinante est sensible à l'IFN alors que la souche originale Edmonston provenant de l'ATCC ou la souche sauvage IC-B ne le sont pas (Ohno et al. 2004). Or, ils ont remarqué que la seule différence entre les souches Edmonston-ATCC et Edmonston-tag réside dans la protéine V. Des expériences d'inhibition de la signalisation de l'IFN avec la luciférase comme gène rapporteur ont démontré que les acides aminés Y110 et C272 étaient importants pour l'inhibition car une protéine arborant les deux mutations perd son activité dans les cellules 293. L'expression de la région N-terminale de la protéine V démontre bien qu'elle est capable, à elle seule, d'inhiber la transduction du signal, et qu'en mutant la tyrosine 110 pour une histidine, ce domaine perd son activité. Une étude plus récente démontre que la protéine P du MV seule possède également une activité anti-IFN qui a été liée à la tyrosine 110 (Devaux et al. 2007).

En utilisant un virus n'exprimant plus les protéines accessoires V et C, une inhibition de la translocation nucléaire ainsi que de la phosphorylation de STAT1 est encore présente. Cette activité inhibitrice est attribuée à la protéine P, car lorsqu'une mutation est introduite dans le motif de six acides aminés Y(Y/H)VYDH, conservé parmi tous les morbillivirus dans la région partagée avec V, sa perte est observée (Devaux et al. 2007). Un rôle dans l'inhibition de la signalisation de l'IFN attribué à P a aussi été observé avec le RPV (Nanda et Baron 2006). D'autre part, la région C-terminale a été ciblée comme étant importante pour l'inhibition de la signalisation par STAT2 (Caignard et al. 2009; Ramachandran, Parisien, et Horvath 2008), plus particulièrement l'acide aspartique (D) 248. Un groupe de chercheurs ont découvert que les tryptophanes en position 240 et 250 jouent un rôle important dans la liaison de STAT2 quoiqu'à un niveau moindre que l'acide aspartique 248 (figure 6). En effet, lorsque chacun des acides aminés sont mutés individuellement sur un peptide correspondant à la partie C-terminale de V, la protéine perd complètement sa capacité de lier STAT2 comparativement au peptide sauvage alors que sur la forme totale de la protéine, la substitution de ces deux acides aminés ne génère qu'une atténuation de la liaison à STAT2 quoique pas totalement

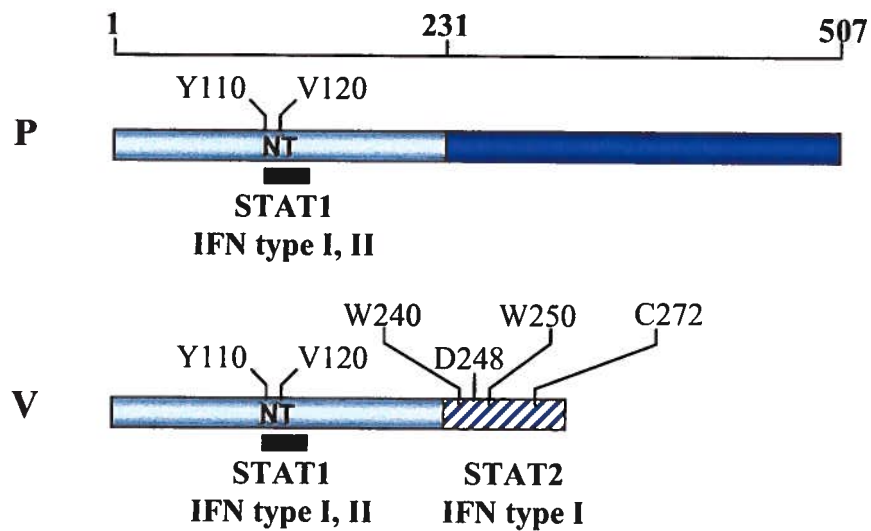


Figure 6. Domaines de liaison à STAT1 et STAT2 des protéines P et V.

Le domaine N-terminal partagé de P et de V est en bleu pâle. Le domaine C-terminale de P est en bleu foncé. La région unique de V est illustrée par les lignes diagonales bleu/blanc. Les acides aminés important pour la liaison des molécules STAT1 ou STAT2 sont indiqués. Une échelle du nombre d'acides aminés est positionnée au-dessus des protéines.

(Caignard et al. 2009). Grâce à la génétique inverse permettant la génération de virus recombinants n'exprimant pas la protéine V, il a été possible d'apprécier son rôle dans la pathogenèse *in vivo* (Devaux et al. 2008; Fukuhara et al. 2002; Kato et al. 1997). Chez une souche du CDV létale pour le furet, lorsque l'expression de V est empêchée par mutagenèse au niveau du génome viral, le virus ne cause qu'une infection atténuée ne conduisant pas à la forte immunosuppression observée avec le virus de type sauvage (von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006).

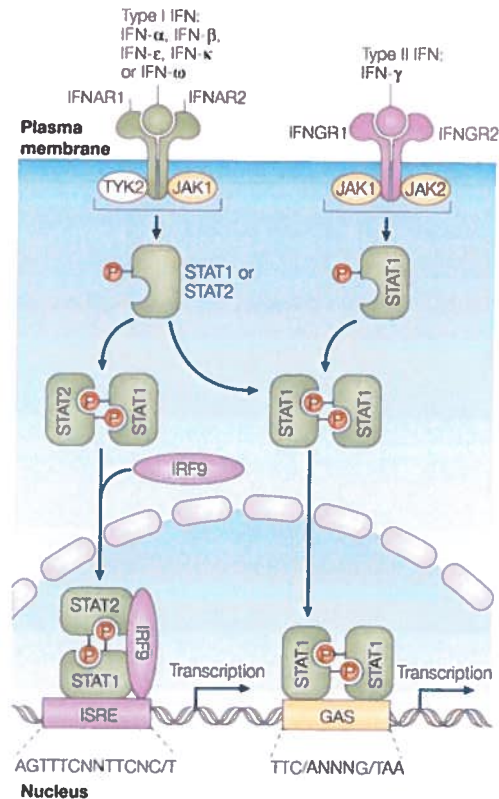
4. L'interféron

La protéine V exerce son activité immunosuppressive principalement en limitant ou inhibant complètement l'activation de la réponse immunitaire innée. Une des premières réponses antivirales mises en place est la synthèse des IFN de type I. Ceux-ci incluent l'IFN- β , - δ , - ε , - κ , - λ , - ω , - τ , ainsi que plusieurs sous-type d'IFN- α (Foster et Finter 1998; Plataniias 2005). Ces derniers sont principalement synthétisés par les leucocytes, alors que l'IFN- β est synthétisé par toutes les cellules nucléées. La présence de particules virales dans la cellule est l'élément déclencheur d'une nouvelle biogenèse d'IFN. Des molécules spécialisées dans la reconnaissance de motifs moléculaires viraux (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), comme l'ARN double brin et le groupement triphosphate présent dans l'extrémité 5' de certaines molécules d'ARN simple brin génomique viral, vont être activées et vont initier une cascade d'activation menant à la synthèse d'IFN- β . Ces molécules prenant part à la reconnaissance de virus sont les TLR-3, -7 et -9, ainsi que PKR, MDA-5 et RIG-I (Yoneyama et al. 2004). Récemment, ces deux dernières molécules ont fait l'objet d'intenses études portant sur les mécanismes d'immunosuppression par la protéine V de paramyxovirus. La région 5' des gènes IFNA et IFNB contient un domaine de liaison aux IRF appelé *virus responsive element* (VRE) (Weidle et Weissmann 1983) qui contient plusieurs séquences GAAANN. En plus de cette séquence, le promoteur de l'IFN- β contient un site de liaison aux facteurs de transcription NF κ B et Rel (Thanos et Maniatis 1995). La synthèse de l'IFN- β

s'effectue lorsqu'un complexe de NF κ B, d'IRFs et de l'*activated protein 1* (AP-1) est recruté au site VRE du promoteur de l'IFN (Du, Thanos, et Maniatis 1993; Merika et al. 1998; Thanos et Maniatis 1995). Chaque gène IFN- α est contrôlé par un promoteur spécifique distinct qui régule son expression (Bisat, Raj, et Pitha 1988). Contrairement à l'IFN- β , le promoteur du gène IFNA ne contient pas de séquences de liaison à NF κ B. Par contre, sa région promotrice contient plusieurs séquences répétées AANNNGAA qui permettent la liaison des IRFs activés.

4.1 Signalisation intracellulaire des interférons

Une fois que l'IFN- β ou - α se lie sur son récepteur (hétérodimère d'IFNAR1 et IFNAR2), une cascade de signalisation cellulaire s'initie. Les tyrosine kinases JAK1 et Tyk2 s'activent par autophosphorylation, recrutant par la suite la molécule STAT2 qui sera phosphorylée. Cette dernière, une fois activée suite à la phosphorylation, recrutera la molécule STAT1 et, une fois phosphorylée, l'hétérodimère STAT1/2 se détachera de la chaîne cytoplasmique du récepteur des IFN de type I pour se retrouver dans le cytoplasme où il pourra s'associer avec la molécule IRF9 (p48), formant le complexe *Interferon Stimulated Gene Factor* (ISGF)3. Après la formation de ce complexe, une translocation nucléaire se déroule pour permettre à ces facteurs de transcription de se lier aux promoteurs des gènes induits par les IFN (ISG, *interferon stimulated genes*), au niveau de séquences spécifiques, les *Interferon Stimulated Response Elements* (ISRE). Il y aura à ce moment synthèse de protéines qui possèdent une activité antivirale (figure 7). Pour ce qui est de l'IFN de type II, l'IFN- γ se lie à son récepteur composé des sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 ce qui aura pour conséquence d'activer les kinases JAK1 et JAK2. Celles-ci phosphorylent la molécule STAT1 qui vont former des homodimères de STAT1, appelés *gamma-activated factor* (GAF). Ce complexe ira se lier sur une séquence *IFN- γ activated sequence* (GAS) dans le promoteur de certains ISG.



Nature Reviews | Immunology

Figure 7. Récepteurs des IFN de type I et II et voie classique de signalisation JAK-STAT (Platanias 2005).

Tous les interférons de type I lient un récepteur commun. Le récepteur des interférons de type I est formé d'hétérodimères IFNAR1 et IFNAR2 qui sont respectivement associés au *Janus activated kinases* (JAKs) TYK2 (*tyrosine kinase 2*) et JAK1. Il existe un seul type d'IFN de type II, l'IFN-γ, qui se lie sur un récepteur distinct. Ce dernier est formé des sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 qui sont respectivement associées à JAK1 et JAK2 respectivement. La liaison des IFN de type I active généralement les molécules *signal transducers and activators of transcription* (STAT) 1 et 2 qui se lient à l'*IFN-regulatory factor* (IRF)9 pour former l'*IFN stimulated gene factor* (ISGF)3. Ce complexe se lie sur la séquence *IFN-stimulated response elements* (ISRE). Les IFNs de type I et II induisent l'activation d'homodimères de STAT1 qui se lient sur les séquences *IFN-γ-activated sequence* (GAS). Les séquences consensus ISRE et GAS sont illustrées.

5. Modèles d'infection morbillivirale

Il existe actuellement plusieurs modèles animaux permettant l'étude de la pathogenèse morbillivirale et de l'immunosuppression (de Swart 2009; Niewiesk 2009; Pillet, Svitek, et von Messling 2009; Sellin et Horvat 2009). Par contre, aucun de ces modèles ne reproduit tous les paramètres d'une infection naturelle par le MV chez l'humain. Ainsi, chez le macaque rhésus, les signes cliniques de la maladie sont plus prononcés que chez les singes *Cynomolgus* bien que, chez les deux espèces, ont rapporte un taux similaire de réplication virale (Auwaerter et al. 1999; El Mubarak et al. 2007; McChesney et al. 1997). Néanmoins, ces modèles ne sont pas tout à fait représentatifs de la pathogenèse naturelle du MV, puisque les signes cliniques sont plus discrets (de Swart 2009; Moss et Griffin 2006). Chez le rat de coton, la plupart des souches du MV vont se répliquer dans les voies respiratoires, alors que seulement certaines souches vont pouvoir se propager dans les cellules immunitaires. Par contre, ce n'est que l'ARN viral qui a pu être détecté dans ces populations et non des particules virales infectieuses (Niewiesk et al. 1997; Pfeuffer et al. 2003)). Par ailleurs, des lignées de souris transgéniques exprimant les récepteurs du MV, CD46 et/ou CD150, ont été développées mais ne reproduisent que certains paramètres d'une infection naturelle. Le modèle de furet, quant à lui, démontre le déroulement normal d'une infection morbillivirale grave (Pillet, Svitek, et von Messling 2009). D'une part, il reproduit tous les signes cliniques de la maladie (von Messling et al. 2003), ainsi que tous les paramètres classiques de l'immunosuppression morbillivirale (Pillet, Svitek, et von Messling 2009). Bien que la sévérité de l'infection du chien avec le CDV soit plus représentative d'une infection naturelle au MV, le fait que le furet soit tellement sensible et qu'il meure d'une infection avec des souches sauvages donne à ce modèle un grand avantage pour identifier les déterminants viraux importants pour la pathogenèse. Par contre, une limitation s'impose dans ce modèle en raison d'une pénurie importante de réactifs commerciaux pour caractériser l'interaction de l'hôte avec le CDV (Pillet, Svitek, et von Messling 2009).

Pour ce qui en est des modèles d'immunosuppression, les macaques présentent beaucoup d'avantages. Des études chez le macaque ont pu démontrer que la réponse

immunitaire cellulaire, notamment celle des cellules CD8+, est plus importante que la réponse humorale pour l'élimination du virus chez un hôte infecté (Hicks, Sullivan, et Albrecht 1977; Permar et al. 2004; Permar et al. 2003). Malgré le fait que ce modèle soit coûteux et pose certains problèmes éthiques, il a néanmoins permis l'investigation des stratégies immunosuppressives du MV, incluant l'altération de la réponse de cytokine et l'infection de cellules T mémoires (Devaux et al. 2008; Hoffman et al. 2003; Polack et al. 2002). La propriété immunosuppressive du MV face aux splénocytes ainsi qu'envers les cellules B et cellules T a été caractérisée chez le rat de coton (Niewiesk et al. 1997; Niewiesk, Gotzelmann, et ter Meulen 2000; Pfeuffer et al. 2003; Streif et al. 2004). Encore une fois, ce modèle démontre que l'élimination du MV est dépendante de l'action des cellules T, notamment des cellules CD4+ (Niewiesk 2009).

5.1 Le furet comme modèle d'immunosuppression morbillivirale

Le furet avait déjà été utilisé comme modèle pour étudier la réponse vaccinale contre les *Morbillivirus*. En effet, des études ont été menées chez cet animal pour étudier et caractériser le lien entre les anticorps maternels et l'administration du vaccin atténué. Des études ont été menées autant avec le CDV que le MV pour étudier l'immunité contre des virus atténués ou contre des nouveaux vaccins candidats recombinants (Pillet, Svitek, et von Messling 2009). Certaines études avaient pour but de déterminer le rôle des anticorps maternels dans la protection et la vaccination des animaux (Appel et Harris 1988). Puisque le MV n'infecte que les humains ainsi que certains primates, il était impératif de développer un modèle animal qui reproduise les signes cliniques d'une infection morbillivirale. Bien que certains modèles d'infections soient basés sur des animaux transgéniques exprimant le récepteur du MV, ceci n'illustre pas exactement ce qui se passe chez l'hôte naturel (Sellin et Horvat 2009). Des modèles utilisant le CDV ont donc été développés. Le CDV pouvant infecter les chiens, certains groupes ont caractérisé l'immunosuppression chez cette espèce (Krakowka 1982; Krakowka, Cockerell, et Koestner 1975; McCullough, Krakowka, et Koestner 1974). Cependant, le fait que les animaux survivent à l'infection fait de ce modèle un mauvais choix pour caractériser la

pathogénèse morbillivirale. Par contre, cette espèce reproduit une caractéristique de l'infection de la rougeole chez l'humain, soit l'immunosuppression prolongée pendant plusieurs semaines malgré la clairance du virus de l'hôte (McCullough, Krakowka, et Koestner 1974; Schobesberger et al. 2005).

Pour pouvoir caractériser de façon détaillée l'immunosuppression causée par un morbillivirus, une souche du CDV a été sélectionnée pour sa capacité à induire une forte immunosuppression et à être létale chez le furet. Ainsi, une caractérisation fine au niveau moléculaire devenait possible pour déterminer quelle protéine est importante pour induire la maladie. Pour ce faire, la souche 5804 a été passée successivement trois fois chez le furet. Cette nouvelle souche, dénommée 5804P, est fortement virulente chez le furet et est responsable de la forte immunosuppression caractérisée par une leucopénie, une inhibition de la prolifération lymphocytaire ainsi que par une perte de la réponse d'hypersensibilité de type retardé (von Messling et al. 2003). L'infection culmine vers la nécessité d'une euthanasie des furets qui atteignent les points limites de la maladie entre 12 et 14 jours post-infection. La génération d'un virus recombinant contenant le génome de la souche 5804P ainsi qu'une unité transcriptionnelle additionnelle menant à l'expression de la eGFP a permis de caractériser plus en détail la cinétique d'une infection *in vivo* (von Messling, Milosevic, et Cattaneo 2004). Comme il a déjà été mentionné, la cinétique d'infection démontre une infection initiale des tissus lymphatiques où les lymphocytes T et B sont les premières cibles.

Ces observations ont été confirmées récemment chez le macaque avec une souche du MV recombinante exprimant aussi la eGFP (de Swart 2009; de Swart et al. 2007). On a pu observer chez le furet que les signes cliniques, dont les rougeurs, coïncident avec l'invasion des tissus épithéliaux par le virus. Grâce à ce modèle, le rôle de la molécule SLAM dans le tropisme viral a pu clairement être confirmé puisqu'un virus recombinant ne reconnaissant plus la molécule SLAM était complètement atténué (von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006). Puisque la souche sauvage était hautement virulente, une détermination du rôle de certaines protéines virales importantes pour l'immunosuppression a pu clairement être établie. Ainsi, il a été mis en lumière que la

protéine V joue un rôle clé dans l'immunosuppression puisque une souche virale ne l'exprimant plus était complètement atténuée (von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006). Une explication ou une conséquence de cette atténuation est la faible infection des lymphocytes par les virus n'exprimant pas la protéine V comparativement au virus de type sauvage. Par contre, la protéine C, une autre protéine participant potentiellement à la pathogenèse morbillivirale, ne semblait pas requise pour causer la maladie. Des études de la rougeole chez le macaque ont démontré que des souches virales n'exprimant pas soit la protéine V, soit la protéine C, étaient atténuées dans leur immunosuppression (Devaux et al. 2008).

6. Hypothèse et objectifs de travail

Chaque Paramyxovirus a développé un mécanisme particulier pour altérer la réponse aux IFN. Malgré les données *in vitro* disponibles sur la protéine V du MV, le rôle de cette dernière dans l'immunosuppression lors d'une infection chez un hôte naturel reste à être élucidé.

Dans notre laboratoire, un modèle d'infection morbillivirale a été développé basé sur l'infection des furets par le CDV. Ce modèle reproduit toutes les caractéristiques d'une infection morbillivirale telles que les signes gastro-intestinaux et respiratoires, une forte fièvre et les rougeurs typiques. Une importante immunosuppression caractérisée par une leucopénie et une inhibition de la prolifération lymphocytaire est aussi observée dans ce modèle.

Pour déterminer l'importance de la protéine V dans l'immunosuppression, nous utilisons la souche CDV 5804P. Les furets infectés par cette souche développent des signes cliniques à partir du jour sept post-infection et succombent une semaine plus tard. Par contre, ceux infectés avec une souche mutante déficiente pour l'expression de la protéine V (Vko) survivent et ne démontrent pas d'immunosuppression.

Basé sur ces observations et sur des rapports publiés portant sur la protéine V de virus apparentés, nous avons émis l'hypothèse que la protéine V du CDV inhibe l'induction d'une réponse antivirale innée appropriée. Afin de tester cette hypothèse, mon projet de doctorat a été divisé en trois objectifs spécifiques :

- 1) Comparer la réponse cellulaire en générant le profil d'expression de cytokines de furets infectés avec le virus sauvage et le virus Vko;
- 2) Cartographier la région de la protéine V responsable pour cette activité;
- 3) Caractériser les interactions entre la protéine V et l'immunité innée;

Pour répondre à mon premier objectif j'ai entrepris le clonage des cytokines de furets suivantes : IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , et TNF- α .

Pour quantifier les niveaux de transcription des cytokines pendant l'infection, j'ai développé un test de RT-PCR semi-quantitatif et par la suite un test de PCR en temps réel.

Dans le contexte de mon deuxième objectif, j'ai généré, par génétique inverse, des virus portant des substitutions d'acides aminés dans des régions conservées de la partie N-terminale et C-terminale de la protéine V. J'ai remplacé la cystéine 255 liant le zinc par une sérine sans changer le cadre de lecture de P. La cystéine 272 a été remplacée par une arginine pour reproduire une mutation précédemment étudiée chez le MV. J'ai aussi remplacé la tyrosine 110 par une histidine comme cela avait été fait dans les études avec le MV. La structure publiée de V du virus PIV5 (SV5), un autre Paramyxovirus, a servi de repère pour le choix des cystéines. J'ai évalué la virulence de ces virus recombinants *in vivo*.

Dans le cadre de mon troisième objectif, j'ai construit des vecteurs d'expression eucaryotes codant pour les protéines V sauvage ou portant les mêmes mutations choisies dans mon deuxième objectif. Avec ces vecteurs, j'ai mené des études *in vitro* pour investiguer le rôle de V du CDV dans l'inhibition de la transcription de gènes induits par les IFN. J'ai étudié la capacité de V à inhiber l'activation d'un gène rapporteur (la luciférase) possédant le promoteur des gènes induits par les IFN (ISG), soient l'ISRE ou une séquence GAS synthétique; ou bien, possédant le promoteur naturel des ISG Mx1 et ISG54. J'ai généré un anticorps contre un peptide de la protéine V pour déterminer, par immunofluorescence, sa capacité à bloquer la translocation nucléaire des molécules STAT1 et STAT2 et dans quel compartiment cellulaire la protéine V se retrouve.

Les résultats de ce projet de recherche ont permis de mieux comprendre le mécanisme fondamental par lequel la protéine V permet au virus d'échapper au système immunitaire. De plus, cette étude contribuera à caractériser le mécanisme sous-jacent de l'interaction de la protéine V avec des protéines cellulaires chez les autres Paramyxovirus.

CHAPITRE 2

PUBLICATIONS

Publication no.1

**Receptor (SLAM [CD150]) Recognition and the V Protein Sustain Swift
Lymphocyte-Based Invasion of Mucosal Tissue and Lymphatic Organs by a
Morbillivirus**

Veronika von Messling,^{1,2} Nicholas Svitek,² and Roberto Cattaneo^{1*}

Virology and Gene Therapy Graduate Track, Mayo Clinic College of Medicine,
Rochester, Minnesota 55902,¹ INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec,
Laval, Quebec, Canada²

Received 20 February 2006/ Accepted 29 March 2006

Journal of Virology

Juin 2006, p. 6084-6092, Vol. 80, No. 12

Dans cet article, j'ai participé aux études animales. J'ai effectué l'isolation des leucocytes sanguins et à l'extraction de leur ARNm en vue des analyses de PCR semi-quantitatif. J'ai contribué au clonage des cytokines de furet et j'ai mis au point l'essai de PCR semi-quantitatif que j'ai utilisé pour quantifier la transcription de cytokines chez les furets infectés avec le CDV wt et Vko.

FOOTNOTES

* Corresponding author. Mailing address: Mayo Clinic Rochester, Molecular Medicine Program, Guggenheim 1838, 200 First Street SW, Rochester, MN 55902. Phone: (507) 284-0171. Fax: (507) 266-2122. E-mail: Cattaneo.Roberto@mayo.edu.

RÉSUMÉ

L'infection expérimentale des furets avec le virus de la maladie de Carré (CDV) récapitule plusieurs caractéristiques de la rougeole : rougeurs cutanées, forte fièvre, virémie, diminution de la réponse d'hypersensibilité de type retardé, faible compte leucocytaire et réduction de la prolifération lymphocytaire. Pour comprendre comment un morbillivirus envahit son hôte et cause une immunosuppression, nous avons généré des CDV incapables soit de reconnaître un des récepteurs, soit d'exprimer l'une ou l'autre ou les deux protéines candidates, V et C, ayant une activité antagoniste des interférons. Des clones de ces virus exprimant la protéine verte fluorescente ont aussi été générés. D'étonnantes similarités entre une infection des furets par le CDV et l'invasion de l'hôte par le virus de l'immunodéficience humaine ont été documentées : premièrement, une réplication massive précoce dans le tissu lymphatique associé au tube digestif, incluant les plaques de Peyer intestinales, suivie de la vaste infection des organes lymphatiques, incluant le thymus et les lymphocytes circulants. De plus, les cellules T ont été sélectivement déplétées. Donc, le CDV prend avantage de la surface des muqueuses pour l'invasion ainsi que des lymphocytes pour la dissémination rapide. Un CDV incapable de reconnaître la molécule d'activation de la signalisation lymphocytaire (SLAM [CD150], qui est exprimée sur les lymphocytes ainsi que sur d'autres cellules immunitaires, ne s'est pas propagé. Un CDV défectueux dans l'expression de V s'est multiplié avec une efficacité réduite dans les lymphocytes et n'a pas inhibé l'interféron et l'induction de cytokines. La protéine C a affecté la sévérité des rougeurs cutanées ainsi que les symptômes digestifs suscités par les CDV défectueux dans l'expression de V, mais elle n'était pas requise pour l'invasion des organes lymphatiques. Ces découvertes prouvent formellement que la reconnaissance de SLAM est nécessaire pour la virulence morbillivirale. Elles révèlent aussi comment deux protéines virales affectent la pathogenèse : V soutient l'invasion rapide des lymphocytes des muqueuses ainsi que des organes lymphatiques, alors que C soutient les phases subséquentes de l'infection.

ABSTRACT

Experimental infections of ferrets with canine distemper virus (CDV) recapitulate many hallmarks of measles: rash, high fever, viremia, depression of delayed-type hypersensitivity responses, lowered leukocyte counts, and reduced lymphocyte proliferation activity. To understand how a morbillivirus invades the host and causes immunosuppression, we generated CDV either unable to recognize one of the receptors or incapable of expressing either one or both of the candidate interferon antagonist proteins V and C. Variants of these viruses expressing green fluorescent protein were also generated. Striking similarities between CDV infection of ferrets and human immunodeficiency virus host invasion were documented: first, massive early replication in the gut-associated lymphatic tissue, including intestinal Peyer's patches, followed by extensive infection of lymphatic organs, including thymus and circulating lymphocytes. Moreover, T cells were selectively depleted. Thus, CDV takes advantage of mucosal surfaces for host invasion and lymphocytes for swift dissemination. A CDV unable to recognize the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM [CD150]) that is expressed in lymphocytes and other immune cells did not spread. A V-defective CDV multiplied with reduced efficiency in lymphocytes and did not inhibit the interferon and cytokine responses. Protein C affected the severity of rash and digestive symptoms elicited by V-defective CDV, but it was dispensable for the invasion of the lymphatic organs. These findings prove formally that SLAM recognition is necessary for morbillivirus virulence. They also reveal how two viral proteins affect pathogenesis: V sustains the swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs, whereas C sustains subsequent infection phases.

INTRODUCTION

Measles virus (MV) infection is a major cause of child mortality that is most often due to severe suppression of immune responses (Schneider-Schaulies, Klagge, and ter Meulen 2003; Griffin 2001; Moss, Ota, and Griffin 2004; von Pirquet 1908). Therefore MV, the human member of the Morbillivirus genus, has been targeted by the World Health Organization for eradication. Animal morbilliviruses are also important pathogens; these include a virus that has a major economic impact on domestic livestock (rinderpest) and one that has a broad and expanding host range in small carnivores (canine distemper virus [CDV]) (Harder and Osterhaus 1997; Roelke-Parker et al. 1996). All of these viruses have 16-kb, nonsegmented, negative-strand RNA genomes with six genes arranged in nonoverlapping transcription units. One of these genes codes for three proteins, a polymerase cofactor (phosphoprotein [P]) and two candidate interferon antagonists, V and C. All of the other genes code for a single product.

The lack of a small animal model has limited studies of morbillivirus immunosuppression. Mice expressing the two candidate primary MV receptors membrane cofactor protein (CD46) or signaling lymphocytic activation molecule (SLAM [CD150]) have been used to study MV host invasion (Mrkic et al. 1998; Oldstone et al. 1999; Shingai et al. 2005; Welstead et al. 2005), even if no classical immunosuppression symptoms were reported. Thus, macaques remain the best model for measles (Auwaerter et al. 1999; Zhu et al. 1997); however, these primates are expensive and in short supply. Not being in the position of designing a completely humanized mouse to study measles pathogenesis, we developed reverse genetics for CDV, a morbillivirus that naturally infects a laboratory animal, the ferret (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004; von Messling et al. 2003).

CDV infection of ferrets recapitulates many MV-induced immunosuppression hallmarks: depression of tuberculin/delayed-type hypersensitivity (DTH) test responses, lowered leukocyte counts and antibody titers, and reduced *in vitro* lymphocyte proliferation activity. CDV-infected ferrets develop rash, high fever, and viremia and die within 2 to 3 weeks of intranasal inoculation. CDV infection of ferrets

has consequences similar to those of rinderpest infection of Bovidae (Barrett and Rossiter 1999) and is more severe than MV infection of humans or other primates, appearing ideal to characterize pathogenic mechanisms. Studies of the morbilliviruses have identified three shared candidate pathogenesis determinants: SLAM recognition (Tatsuo, Ono, and Yanagi 2001) and two candidate interferon antagonist proteins.

The nature of the principal morbillivirus receptor has been contentious: the ubiquitous regulator of complement activation CD46 can act as a port of cell entry for MV of the vaccine lineage (Dorig et al. 1993; Naniche et al. 1993), but wild-type as well as vaccine-lineage MV strains also interact with SLAM (Erlenhoefer et al. 2001; Hsu et al. 2001; Tatsuo et al. 2000), an immune cell-specific protein. SLAM is constitutively expressed on immature thymocytes, CD45RO^{high} memory T cells, and a proportion of B cells; it is rapidly induced on a wide range of immune cells, including T and B cells after activation, and is involved in immune regulation (Cocks et al. 1995; Sidorenko and Clark 2003; Veillette 2006).

The observations that different morbilliviruses use SLAM as a cellular receptor (Baron 2005; Tatsuo, Ono, and Yanagi 2001), while human CD46 may interact with only vaccine-lineage MV (Galbraith et al. 1998), are consistent with a central role for SLAM in morbillivirus virulence. To generate a CDV incapable of recognizing SLAM while maintaining entry into epithelial cells, we mutagenized the CDV hemagglutinin (H), identified residues that sustain SLAM-dependent cell fusion, and combined them in an infectious CDV cDNA (von Messling et al. 2005). This SLAM-blind (SLAMblind) CDV infected primary ferret epithelial cells as efficiently as did the parental wild-type 5804P strain but was incapable of entering ferret peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Here we assay the virulence of the SLAMblind CDV in ferrets.

Viral pathogenesis is also influenced by intracellular events downstream of receptor binding, in particular by viral proteins counteracting host innate immune responses. Morbilliviruses and other members of the subfamily Paramyxovirinae inhibit interferon signaling using diverse strategies. These strategies always emanate from the P gene and involve interactions with STAT proteins (Andrejeva et al. 2004; Garcin et al. 2004; Ohno et al. 2004; Palosaari et al. 2003; Shaffer, Bellini, and Rota

2003; Ulane et al. 2005). In certain Paramyxovirinae, the P gene gives rise to many polypeptides (Lamb 2001) but, in morbilliviruses, P codes for only P, V, and C, simplifying the analysis of potential virulence determinants. The V and C proteins are dispensable for viral growth in cultivated cells but necessary for host invasion (Nagai and Kato 2004). They have multiple functions: for example, the Sendai virus C protein facilitates particle assembly (Sakaguchi et al. 2005).

To assess the relevance of the V and C proteins for host invasion and pathogenesis, we produced (by reverse genetics) viruses in which these proteins were inactivated: C knockout (Cko), V knockout (Vko), and V and C knockout (VCko) CDV. We here document how the V protein fuels an infection that is lymphocyte based and blazes through the mucosal tissue and lymphatic organs. The C protein has a more subtle effect on subsequent infection phases. This work sheds new light on the role of the proteins previously known as "accessory" for morbillivirus pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses.

VerodogSLAMtag cells (von Messling et al. 2003), primary ferret epithelial cells (von Messling et al. 2005), and 293 cells (ATCC CRL-1573) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) with 5% fetal calf serum (Invitrogen). One mg/ml Zeocin (Invitrogen) was added to the VerodogSLAMtag cells to maintain selection of canine SLAM expression. Aside from the SLAMblind strain (von Messling et al. 2005) that was propagated on primary ferret epithelial cells, all other viruses were grown on VerodogSLAMtag cells.

Generation of recombinant viruses.

The combination of mutations described below and in the legend for Fig. 1A were introduced in a subcloned P gene fragment flanked by the unique restriction sites PshAI and Sall and transferred into the 5804P genomic cDNA using these restriction sites (von Messling et al. 2003). To construct derivatives of Vko and Cko expressing green fluorescent protein (GFP), the mutated P genes were transferred to the 5804P^{green} genomic cDNA (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004). Recombinant viruses were recovered using a reverse genetics system based on B cells and expanded on VerodogSLAMtag cells basically as outlined previously (von Messling et al. 2003). Kinetic analyses of virus growth were performed as described previously (von Messling et al. 2001). To determine viral growth kinetics, cells (8×10^5 /well) were seeded into six-well plates and infected at a MOI of 0.01 with the respective viruses. All analyses were performed in duplicate. After 2 h of adsorption, the inoculum was removed and the cells were washed twice with medium and further incubated at 32°C. At various times after infection, supernatant and cell-associated virus were recovered separately and stored at -70°C. The 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) of the samples was determined in Vero cells.

CDV V- and C-specific antisera.

To assess V and C protein expression, we raised (in rabbits) antisera against two peptides: SAKGWNASKPSEILC, corresponding to amino acids 1 to 16 of the C protein, and ALRENPPDIEEIQEVSSLRDQT(C), corresponding to amino acids 18 to 39 of the P and V proteins with an added carboxyl-terminal cysteine. Methods for antibody production and immunoblotting were as described previously (von Messling et al. 2004). Briefly, cells were infected with the respective viruses, and incubated at 37°C until profound cytopathic effect was observed. For the analysis of cellular proteins, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS; Invitrogen) before adding 100 µl of lysis buffer (150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) with complete protease inhibitor (Roche Biochemicals). After incubation for 20 min at 4°C, the lysates were cleared by centrifugation at 5,000 x g for 15 min at 4°C, and the supernatant was mixed with an equal amount of 2x Laemmli sample buffer (Bio-Rad) containing 100 mM DTT. Samples were incubated for 10 min at 95°C, followed by migration on a SDS-15% polyacrylamide gel (Bio-Rad) and blotting on polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). After blocking with 1% blocking reagent (Roche Biochemicals) overnight, the membranes were incubated with the antibody recognizing the epitope of interest. Following incubation with a peroxidase-conjugated secondary antiserum, the membranes were subjected to enhanced chemiluminescence (ECL) detection (Amersham Pharmacia Biotech).

Animal experiments and assessment of virulence.

Experiments with unvaccinated male ferrets (*Mustela putorius furo*) were performed as described previously (von Messling et al. 2003) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Mayo Foundation and the INRS-Institut Armand Frappier. Prior to infection, animals were vaccinated against tetanus to allow subsequent assays of the DTH response. Groups of four animals (12 weeks and older) were infected intranasally with 10^4 the 50% tissue culture infective dose of each virus. Three parameters of virulence were measured and graded. For rash, grading was 0 (no rash), 1 (localized rash), 2 (generalized rash), or 3 (extensive rash with dermatitis). For fever (body temperature above 39°C), grading was a function of duration: no fever, 0; fever for less than 7 days, 1; fever for 7 days or more, 2; and

fever until sacrifice, 3. For stools, grading was normal, 0; soft, 1; occasional diarrhea, 2; and severe diarrhea, 3. All three parameters had equivalent weight in the virulence index. The index was calculated by adding the values determined for each parameter in each animal and dividing the total by 12 (four animals with three parameters).

Assessment of immunosuppressive activity.

Five parameters (leukocyte number, *in vitro* proliferation activity of lymphocytes, levels of neutralizing antibodies, viremia, and DTH response) were analyzed using methods described previously (von Messling et al. 2003). These parameters were graded on a 0/1/2 scale and given equivalent weights to establish the immunosuppression index. The index was calculated by the addition of the individual values and division of the total by 20 (four animals with five parameters). For each parameter, the maximum grade was defined as that induced by the fully virulent CDV strain 5804P (von Messling et al. 2003), the intermediate grade reflected the virulence of the attenuated strain 5804 (von Messling et al. 2003), and the lowest grade corresponded to no or minimal immunosuppression.

The threshold values used (0, 1, and 2) were as follows: leukocyte number, always above 5,000/mm³, always above 2,000/mm³, and at least once below 2,000/mm³; lymphocyte proliferation activity, always close to initial activity, three or more values below 80% initial activity, and one or more values below 25% initial activity; neutralizing antibody titers, above 100 at week 2, above 100 at week 3 or later, and never above 100; viremia (cell-associated), none, cleared after 3 weeks, and positive for more than 3 weeks or at death; and DTH response, always positive, temporarily negative, and negative at death.

Viremia was quantified by measuring the fraction of infected PBMC. PBMC were separated from erythrocytes in EDTA-treated blood by lysing the red cells in ACK lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.01 mM EDTA, pH 7.2 to 7.4), counted, and cocultivated with VerodogSLAMtag cells in quadruplicates of 10-fold dilutions. Wells were evaluated for syncytia formation after 3 days, and results were expressed as tissue culture infectious doses per 10⁶ cells. The remaining cells were resuspended in RNAlater (QIAGEN, Valencia, CA) and stored at -20°C.

Fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis and imaging were basically as described previously (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004).

Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) Analysis.

For FACS (Becton Dickinson) analysis, Ficoll gradient centrifugation-purified peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), were incubated with Alexa 647-labeled monoclonal antibodies against CD3 (sc-20047, Santa Cruz Biotechnology), CD79 α (DAKO), or CD14 (Veterinary Medical Research and Development, Pullman, WA), or a corresponding isotype control for 1 h then fixed in 1% paraformaldehyde. Alexa 647 and eGFP expression of each sample was assessed by using a FACScan instrument (Becton Dickinson).

Cytokine mRNA: cloning of cDNAs and quantification.

Since cDNAs from ferret cytokines were not available, to be in the position of quantifying expression of their mRNAs, we cloned them. For this, oligonucleotide primers were synthesized based on conserved regions of the homologous canine and feline genes. These primers were used to reverse transcribe and amplify mRNA from phytohemagglutinin-stimulated ferret PBMC. The amplified fragments were sequenced, and other sets of primers entirely homologous to the ferret sequences were synthesized. The homologous primers were used for semiquantitative reverse transcription-PCR. The sequences of these primers are available on request.

To quantify changes in cytokine mRNA expression levels, RNA from ferret PBMC stored at -20°C in RNAlater was isolated using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) and quantified by UV spectrophotometry. For each time point, 100 ng RNA was reverse transcribed using an oligo(T) primer and Superscript RT-III (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the different genes were PCR amplified in a 10- μl reaction mixture using the respective gene-specific primers in combination with *Taq* polymerase (NEB, Ipswich, MA). The melting temperature of all primers was close to 60°C , allowing the use of a two-step protocol that consisted of a denaturation step of 2 min at 94°C , followed by 35 cycles between 1 min at 60°C and 10 s at 94°C . Optical densities of the resulting PCR products were measured after migration in a 1% agarose gel using the Chemigenius² XE imaging system and analyzed with the

accompanying GeneTools software (Syngene, Frederick, MD). The relative amount of cytokine mRNA was expressed as the ratio of cytokine to the housekeeping gene aldolase, and the upregulation of gene expression was calculated as an increase (*n*-fold) relative to the cytokine/aldolase ratio of the respective animal prior to infection. Final values for each cytokine and time point were calculated as the means from two separate amplifications based on different cDNA syntheses, and a third reaction was added if the two values differed by more than 15%.

RESULTS

Recombinant viruses that do not express the candidate interferon antagonists.

We generated recombinant CDV unable to express the V and C proteins, both encoded by the P gene. V has a cysteine-rich, zinc-binding, RING-finger-type domain accessed by RNA editing (Fig. 1A) (Cattaneo et al. 1989). C is encoded in an alternative reading frame accessed by ribosomal frameshifting (Fig. 1A) (Bellini et al. 1985). We introduced into the P gene combinations of mutations interfering with RNA editing, C protein translation initiation, or both as well as early stop codons in the appropriate reading frames (Fig. 1A, bottom panel). These mutations did not interfere with P protein expression, and all three viruses (Cko, Vko, and VCko) were rescued. They replicated efficiently in Vero cells, producing the expected sets of proteins as documented in Fig. 1B. The kinetics of intracellular virus production (Fig. 1C) and particle release (Fig. 1D) were also analyzed. Cko growth kinetics were equivalent to those of wild-type 5804P, whereas Vko and VCko grew to slightly lower titers (Fig. 1D). We also previously generated and characterized a selectively receptor-blind CDV (von Messling et al. 2005); the sequence of the mutated segment of its H gene is shown in Fig. 1A, top panel. The Vko, Cko, and VCko viruses retain SLAM binding.

A SLAMblind CDV is completely attenuated.

We inoculated groups of four ferrets intranasally with 10^4 infectious units of the SLAMblind, Vko, Cko, and VCko viruses. We scored virulence and immunosuppressive activity of these viruses and compared these results with those previously published for infections of four ferrets with the parental wild-type strain 5804P (von Messling et al. 2003). The extent of rash, duration of fever, and onset and severity of diarrhea were measured; values measured for individual ferrets are reported by the shades of the squares (Fig. 2A). The average severity of these symptoms is expressed as the virulence index (Fig. 2A). White blood cell count, in vitro lymphocyte proliferation activity, neutralizing antibody titers, cell-associated viremia, and DTH response were also assessed, and an immunosuppression index was calculated based on the average magnitude of these parameters (Fig. 2B). The means and standard

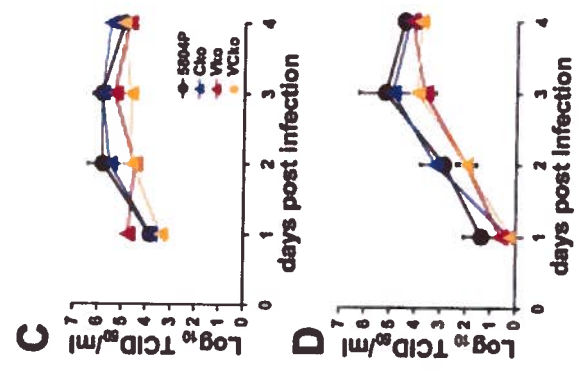
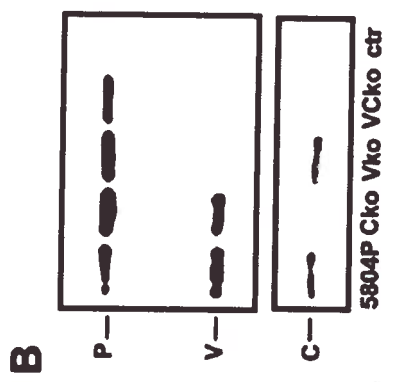
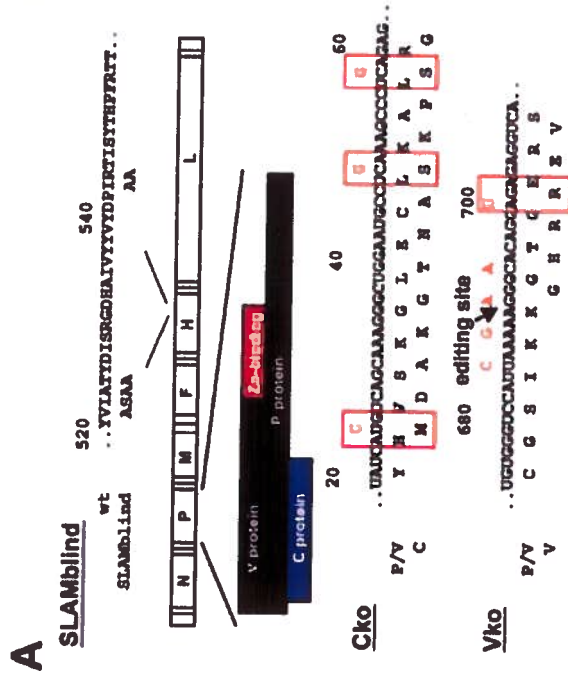


FIG. 1. Recombinant CDVs. (A) CDV genome and mutations introduced. The genome is shown as a white elongated box. The genes are indicated with the letters N (nucleocapsid), P (phosphoprotein), M (matrix), F (fusion), H (hemagglutinin), and L (large or polymerase). Above the genome, a segment of the H protein amino acid sequence is shown, and the six residues mutated to alanine or serine (A or S, one-letter amino acid code) are indicated. These mutations make this virus selectively receptor blind (SLAMblind). Below the genome, a schematic drawing illustrates the three proteins (V, P, and C from the top) generated by the P gene. The three mutations selectively ablating C protein expression (elimination of the start codon by mutation to ACG and introduction of two stop codons, UGA and UGA) are indicated in red above the P gene nucleotide sequence (nucleotides 20 to 60 covering the beginning of the C reading frame, Cko). The five mutations selectively ablating V protein expression (four mutations in the editing sequence, C, G, A, A, and introduction of a stop codon, UGA) are indicated in red above the P gene sequence (nucleotides 670 to 710, Vko). The VCko virus has all eight mutations (not shown). (B) Immunoblot analysis of the P gene products expressed by the wild-type virus 5804P and its three derivatives, Cko, Vko, and VCko. Antisera against the common amino-terminal end of the P and V proteins (upper panel) or against the C protein (lower panel) were used. ctr, uninfected cell control. (C and D) Growth curves of the four viruses on VerodogSLAMtag cells. The multiplicity of infection was 0.01. The titers of virus released in the supernatant are shown in panel D; those of cell-associated virus are shown in panel C. TCID₅₀, tissue culture 50% infective dose.

deviations of the results obtained in each animal's group are indicated in Fig. 2D through F for selected parameters.

The SLAMblind virus was completely avirulent in four ferrets (each animal is represented in Fig. 2A, second row); infection with this virus caused a small but statistically significant, short-lived decrease in blood leukocyte count (Fig. 2E). Nevertheless, this virus induced protecting levels of neutralizing antibodies, which appeared with slow kinetics (Fig. 2B, third column, and data not shown), providing evidence that it replicates at a minimal level *in vivo*. In contrast, SLAMblind replicates with kinetics equivalent to those of the parental strain in primary ferret epithelial cells (von Messling et al. 2005).

A C-defective CDV is fully immunosuppressive.

The Cko virus replicated efficiently and was as virulent and immunosuppressive as wild-type 5804P (Fig. 2A and B, compare first and third rows, and Fig. 2C to F, compare results for 5804P and Cko). All animals infected with Cko succumbed to the disease with kinetics equivalent to those of animals infected with 5804P (Fig. 2C) and had similar levels of viremia (Fig. 2D).

To reveal the sites of preferential viral replication in the host, we previously generated a wild-type derivative expressing GFP (5804P^{green}) (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004). Similarly, we generated a Cko^{green} derivative expressing GFP from an additional transcription unit inserted after the H gene. Seven days postinoculation (p.i.) all of the lymphatic organs of hosts infected with Cko^{green} emitted green fluorescence. Fluorescence was particularly intense in the intestinal Peyer's patches (Fig. 3B and C). The intensities of the signals were similar to those documented for 5804P at this early time point (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004), demonstrating strong replication in the gut-associated lymphatic tissue. Seven days p.i., fluorescence was also very strong in the thymus (Fig. 3H and I), similar to previous observations with the wild-type derivative 5804P^{green} (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004).

To assess whether mutations selected during replication resulted in reversion to C protein expression, we isolated CDV from PBMC of two Cko-infected ferrets and

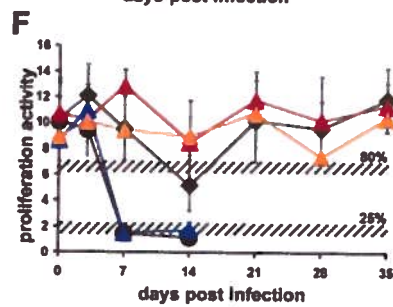
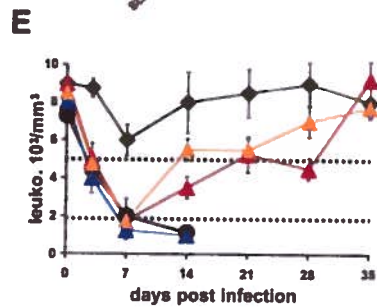
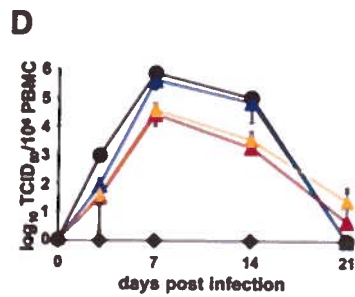
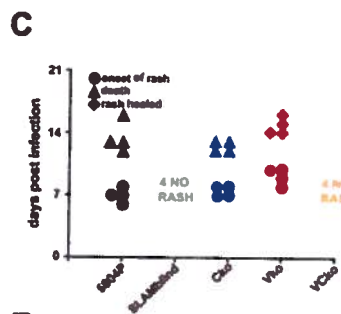
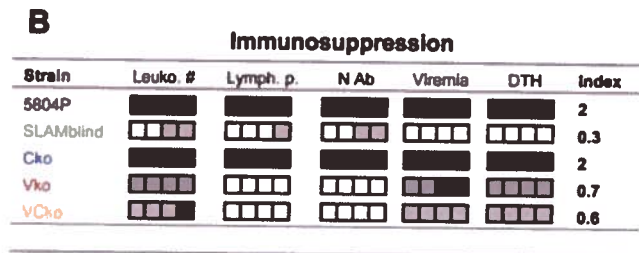
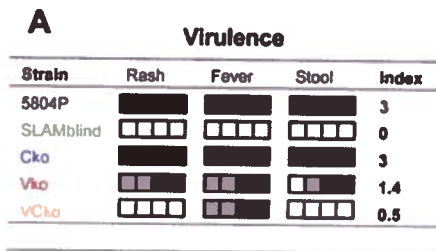


FIG. 2. Virulence and immunosuppressive activity of recombinant CDVs in ferrets. The five viruses are color coded: 5804P, black; SLAMblind, green; Cko, blue; Vko, red; VCko, orange. (A and B) Each box represents one animal, each experimental group consisted of four animals, and results from each individual animal are always shown in the same sequence from left to right. For the virulence index (A), black represents the highest score (3), white represents the lowest score (0), and intermediate shades of gray represent a score of 2 or 1. For the immunosuppressive index (B), black is 2, gray is 1, and white is 0. Leuko. #, leukocyte number. Lymph. p., lymphocyte proliferation. N Ab, neutralizing antibodies. (C to F) Dots indicate the onset of rash. In animals euthanized for humane reasons, the time of death is indicated by a triangle. In animals that recovered, the time of rash healing is indicated by a diamond. The time course of infection (each pair of symbols represents one animal) and number of animals without rash (C), number of CDV-infected cells per million PBMC (D), leukocyte number (E), and in vitro proliferation activity of lymphocytes from infected animals (F) are shown. Days p.i. are indicated on the x axes, and the number of CDV-infected cells per million PBMC, leukocyte number, or proliferation activity is indicated on the y axis. Dotted lines or broad gray lines indicate threshold levels used for determination of the immunosuppressive index value. Error bars indicate standard deviations. TCID₅₀, tissue culture 50% infective dose; leuko, leukocyte.

verified their protein expression profile and P gene sequences. Since no revertants were selected (data not shown), we conclude that the C protein is not essential for CDV-elicited immunosuppression in ferrets.

A V-defective CDV is attenuated.

The Vko virus caused only mild signs of disease (Fig. 2A, fourth row), was mildly immunosuppressive (Fig. 2B, fourth row), and caused limited viremia (Fig. 2D), and all infected animals survived (Fig. 2C). Vko caused transient leukopenia, but the leukocyte number rebounded 2 weeks p.i. and reached normal levels 4 to 5 weeks p.i. (Fig. 2E). Moreover, Vko was incapable of inhibiting lymphocyte proliferation (Fig. 2F). The Vko virulence index (1.4) was intermediate between full virulence (3.0) and complete attenuation (0), reflecting intermediate values for all three parameters, rash, fever, and diarrhea.

To visualize the spread of a V-defective virus, we constructed a Vko^{green} derivative expressing GFP, infected ferrets, and monitored green light emission in animals that were euthanized 7 days p.i. In Vko^{green}-infected hosts, fluorescence was reduced compared to that in Cko^{green} infected hosts. Fluorescence was only slightly greater than background levels in the thymus (Fig. 3K and L). The strongest fluorescence was observed in segments of the intestine and had a pattern characteristic of Peyer's patches (Fig. 3E and F). Thus, gut-associated lymphatic tissue may be the major site of viral multiplication at early infection times.

The C protein sustains the rash and digestive symptoms in a V-defective background.

The virus defective for both V and C expression (VCko) had an immunosuppression index very similar to that of Vko (0.6 versus 0.7, respectively) (Fig. 2B, fifth and fourth rows, respectively), reflecting equivalent levels of viremia, leukopenia, and lymphocyte proliferation inhibition (Fig. 2D to F, compare results for VCko and Vko). However, an attenuating effect of C protein ablation was documented, as evidenced by a virulence index that was 0.5 for VCko and 1.4 for Vko (Fig. 2A, fifth and fourth rows, respectively). This difference was due to the absence of rash and diarrhea in VCko-infected hosts.

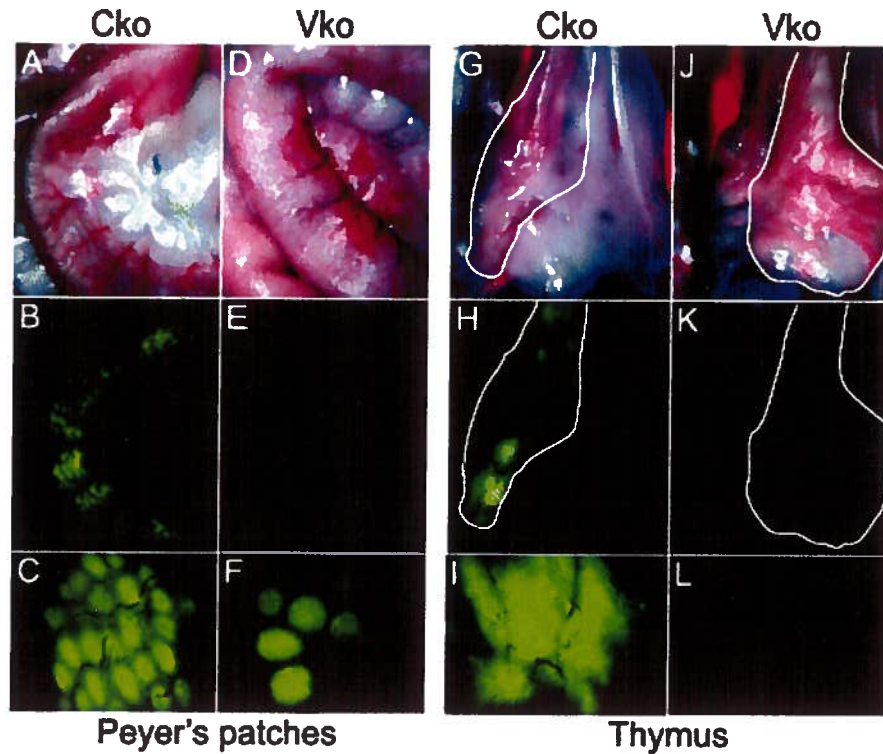


FIG. 3. Replication of Cko^{grccn} and Vko^{grccn} in thymus and intestinal Peyer's patches. Visualization of infection in Peyer's patches or thymus in a typical infection of hosts inoculated with Cko^{grccn} (A to C and G to I) or Vko^{grccn} (D to F and J to L). (A and D) Photographs of the peritoneal cavity. (G and J) Photographs of the thymus, which contours an outlined white line. (B, E, H, and K) Same organs as above, but photographed after GFP fluorescence excitation. (C, F, I, and L) Microscopic analysis of the same tissues as the second-row panels.

Leukopenia is associated with virus spread that is extensive only upon SLAM recognition.

All viruses recognizing SLAM caused a significant drop in leukocyte number, which was halved 3 days p.i. and halved again 7 days p.i. (Fig. 2E), suggesting emigration of these short-lived cells from the blood, probably to sites of infection and inflammation. The fact that Vko and VCko induced a steep drop in leukocyte numbers equivalent to that of the wild-type or Cko is consistent with initial productive infection by these viruses. Transient and mild leukopenia in SLAMblind-infected animals (Fig. 2E) is consistent with SLAM recognition being essential for robust replication in the initial infection phase.

Viral load in PBMC correlates with virus spread in lymphatic organs.

Having shown that infection of the lymphoid organs by CDV is rapid and massive, we assessed viral load in PBMC 3 to 14 days p.i. (Fig. 4A). In animals inoculated intranasally with the virulent strain 5804P or Cko, no infected PBMC were detected 3 days p.i. However, 7 to 14 days p.i., 40 to 50% of PBMC were infected (Fig. 4A). Vko-inoculated animals demonstrated similar kinetics of infection, but the fraction of infected PBMC was 6 to 20 times reduced (Fig. 4A) and cell-associated viremia was about 100-fold reduced relative to the wild-type or Cko (Fig. 2D, compare results for Vko with results for 5804P). PBMC infection was below detection levels in SLAMblind-infected animals (Fig. 2D). Thus, viral load in PBMC correlates with the extent of virus spread to lymphatic organs; virus is detected first in lymphatic organs and later in blood.

V sustains viral replication in lymphocytes and T-cell depletion.

To gain insight into the cell types supporting viral spread, we analyzed virus replication separately for B cells, T cells, and monocytes. We used pan-species antibodies that cross-react with ferret CD3 (T cells), CD79 α (B cells), or CD14 (cells of the monocytic lineage). Figure 4B presents representative FACS data obtained 7 days p.i. from two ferrets. One animal was infected with wild-type CDV (5804P, upper row) and the other with Vko (lower row). Figure 4C and D present the average measurements from groups of three animals infected either with 5804P or with Vko.

About half (30 to 60%) of the T and B cells of the ferrets inoculated with 5804P were infected 7 to 14 days p.i. (Fig. 4B, top row, second and third panels, compare upper left and right quadrants; and Fig. 4C, compare lengths of the CDV⁻ and CDV⁺ segments of columns). Infection with 5804P resulted in selective T-cell depletion: T cells represented 60% of total PBMC at 0 to 7 days p.i., about 40% 10 days p.i., and less than 40% 14 days p.i. shortly before the animals were euthanized (Fig. 4C, add lengths of the CDV⁻ and CDV⁺ segments of the columns). Infection of B lymphocytes by 5804P was similarly efficient (Fig. 4C) but did not cause their depletion. In the context of the leukopenia documented at day 7, we conclude that the increase in B-cell percentage reflects T lymphocyte depletion.

Vko infected the same cell types as 5804P did but with 5 to 10 times reduced efficiency (Fig. 4B, bottom row, second and third panel, upper quadrants; and Fig. 4D). The V-defective virus did not deplete the T-cell fraction of PBMC (Fig. 4D, Vko D7 segments in the bars). Thus, V sustains massive lymphocyte infection and their subsequent depletion.

Cytokine responses are depressed in wild-type but not in Vko infections.

Since the paramyxoviral V protein inhibits interferon signaling (Conzelmann 2005; Horvath 2004), we compared the expression of alpha interferon and five other cytokines in hosts infected with wild-type and Vko CDV. Since antibodies recognizing ferret cytokines are not available, we cloned their cDNAs and established reverse transcription-PCR assays to measure the levels of the respective mRNAs in PBMC. We then inoculated ferrets with wild-type or Vko CDV, obtained PBMC 3 and 7 days p.i., and measured the cytokine response.

In animals infected with wild-type virus, levels of expression of most cytokines remained close to those monitored before infection (Fig. 4E). At days 3 and 7, we observed minimal increases or decreases in levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 (IL-6), two early-response cytokines secreted by phagocytes. The expression of the T-cell cytokine IL-2, which is responsible for T-

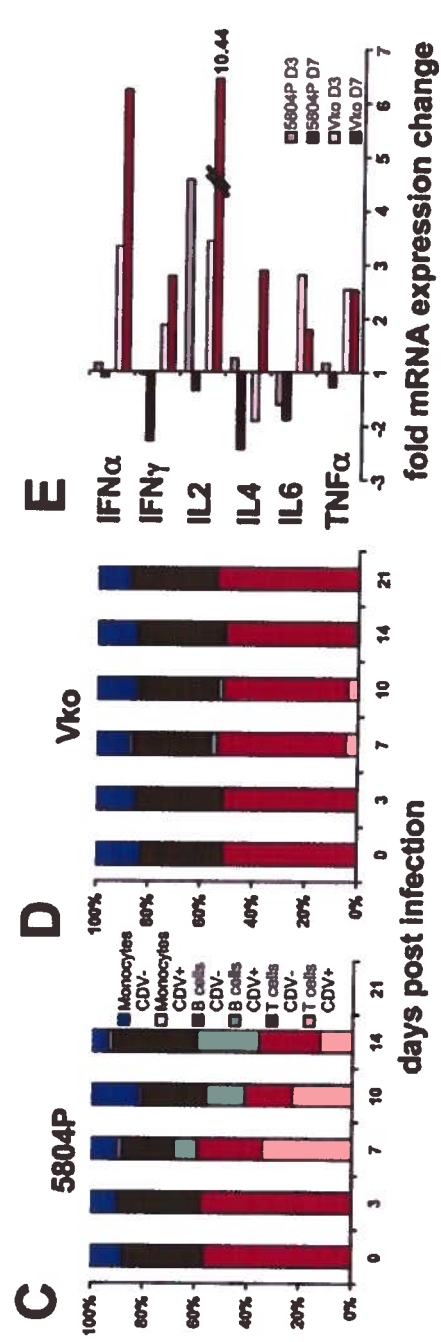
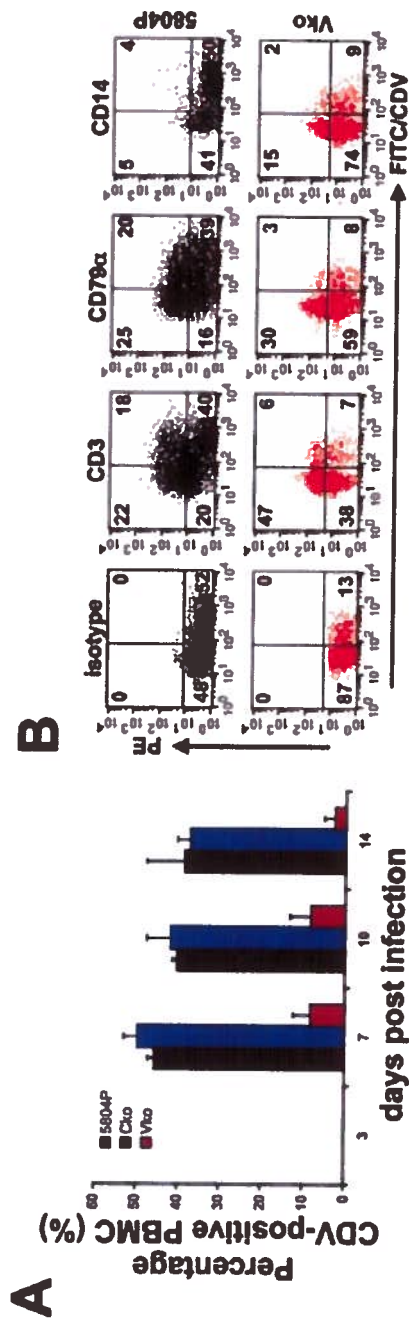


FIG. 4. Cell type specificity of CDV replication and cytokine response. (A) FACS analysis of the percentage of CDV-positive PBMC isolated from animals infected with 5804P, Cko, or Vko at 3, 7, 10, or 14 days p.i. (B) FACS analysis of CDV infection frequency in different cell types from two hosts. One ferret was infected with 5804P (upper row); the other was infected with Vko (lower row). The percentile of cells in each quadrant is indicated in the outer corners. The signal levels observed with phycoerythrin (PE)-labeled antibodies against cellular markers CD3 (T cells), CD79 α (B cells), and CD14 (monocyte lineage) were plotted on the *y* axis; those obtained with the fluorescein isothiocyanate-labeled CDV antiserum (FITC) were plotted on the *x* axis. (C and D) Percentages of different cell types infected 0 to 21 days after inoculation with 5804P or Vko. Cell type-specific markers are as described for panel B. T cells are shown in red, B cells in are shown green, and monocyte-lineage cells are shown in blue. Lighter shades represent CDV-positive cells; full shades represent CDV-negative cells. The means of the results from three animals are indicated. (E) Representative cytokine responses elicited by 5804P and Vko. Day 3 results are shown with lighter shades, day 7 results with full shades. IFN- α , alpha interferon; IFN- γ , gamma interferon; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

cell growth, was elevated only on day 3. The expression of gamma interferon, another T-cell cytokine that controls macrophage activation, remained below the preinfection level at both time points. The expression of a third T-cell cytokine, IL-4, which activates B cells and promotes the immunoglobulin M (IgM)-IgG class switch, was slightly elevated at day 3. Thus, phagocytes and T cells of animals infected with 5804P were unable to express several of the cytokines that orchestrate infection control and induce the IgM-IgG class switch required for an efficient humoral response. In addition, alpha interferon production did not increase.

In contrast, at day 3, Vko triggered upregulation of the two immediate response cytokines tumor necrosis factor alpha and IL-6. The levels of alpha interferon were also high, as were the levels of gamma interferon and IL-2, indicative of a Th1-dominated early response. IL-4 induction coincided with the onset of a neutralizing antibody response on day 7 (Fig. 4E). These observations indicate that an effective antiviral cytokine response is in place in animals infected with Vko. Thus, the V protein is instrumental for sustaining efficient viral replication in T cells, inhibiting expression of not only alpha interferon but also several cytokines, and inactivating the adaptive immune response.

DISCUSSION

Mechanisms of host invasion and immunosuppression in morbillivirus and HIV infections.

This study revealed striking similarities between the basic mechanisms of CDV host invasion and those sustaining acute phases of human immunodeficiency virus (HIV) and simian immunodeficiency virus (SIV) infection. First, massive HIV and SIV replication occurs early in lymphatic organs, including the gastrointestinal mucosal tissue (Brenchley et al. 2004; Mehandru et al. 2004; Veazey et al. 1998). Thus, acute disease in a measles model based on intranasal inoculation, an AIDS model based on intravaginal inoculation, and probably measles and AIDS is characterized by swift and massive viral replication in lymphatic organs and mucosal tissue. SIV dissemination is also rapid following oral inoculation, reflecting infection of the oral and esophageal mucosa as well as tonsils (Milush et al. 2004). CDV spreads rapidly in the tonsils after experimental intranasal infection (Appel 1969). Altogether, these observations suggest that morbilliviruses and primate lentiviruses can take advantage of any mucosal surface to enter the host and rapidly disseminate.

A second similarity between CDV and human lentivirus host invasion is massive lymphocyte infection followed by T-cell depletion. One week after inoculation, about half the lymphocytes circulating in peripheral blood or residing in lymphoid organs, including the thymus, spleen, and lymph nodes, are CDV positive (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004). Similar levels of SIV-positive cells have been recently documented in the acute phase of infection (Mattapallil et al. 2005). These levels of infection imply that the hosts may lose most T cells and suggest that virally mediated destruction is the main cause of their depletion. Nevertheless, bystander effects may be important in subsequent infection phases.

Based on the inability to detect robust viral replication in the PBMC of measles patients, immunosuppression mechanisms more complex than direct destruction and depletion of lymphocytes have been put forward (Moss, Ota, and Griffin 2004; Schneider-Schaulies, Klagge, and ter Meulen 2003). We think that MV replication in human lymphocytes may have been underestimated. In experimental infections of

macaques, MV replication is extensive about 1 week after inoculation, when up to 10% of the PBMC (Zhu et al. 1997) as well as 3 to 15% of cells in lymph nodes, spleen, and thymus (Takeuchi et al. 2005; Zhu et al. 1997) are infected. Similarly, when the PBMCs of patients with measles are examined early after rash, up to 5% of infected cells can be detected, whereas at later time points, the fraction of infected cells drops (Forthal et al. 1992). MV replication in PBMC may peak at the onset of rash, before clinical samples are taken.

V is the essential interferon antagonist and cytokine response inhibitor.

We show here that the CDV V protein is essential for rapid viral multiplication in T cells. On the other hand, the Sendai virus V protein sustains viral spread in the airway epithelium. In this tissue, replication of a V-deficient Sendai virus is efficient for 1 to 2 days but then infection is rapidly cleared (Kato et al. 1997). Similarly, the V-deficient CDV spreads in the lymphatic organs but infection is cleared.

These effects are probably due to the interferon antagonist and cytokine response inhibitor function of V: we have shown that the V-protein expressing CDV almost completely inhibits induction of alpha interferon and five other cytokines, and it is known that the V proteins of most paramyxoviruses inhibit interferon signaling and also interferon transcription. These proteins associate with STAT1/STAT2 complexes and abolish interferon JAK/STAT signaling by targeting either STAT1 or STAT2 for proteasomal degradation or by interfering with STAT phosphorylation, as reviewed in references (Conzelmann 2005) and (Horvath 2004). In addition, they interfere directly with beta interferon transcription (He et al. 2002; Poole et al. 2002).

As to the mechanisms of inhibition of the other cytokines, it was recently shown that Sendai virus V binds the cytoplasmic interferon-inducible RNA helicase mda-5 (Andrejeva et al. 2004). Mda-5 or the other helicase RIG-I then contacts an adaptor named IPS-1 (beta interferon promoter stimulator 1) (Kawai et al. 2005) or MAVS (mitochondrial antiviral signaling) (Seth et al. 2005) that activates NF- κ B and IRF3. Thus, the V protein of Sendai virus controls an essential pathway in the regulation not only of the beta interferon promoter but also of other cytokines and of innate immunity. The V protein of morbilliviruses may have an equivalent function.

C is an infectivity factor.

Lack of C protein expression resulted in reduced virulence in the V-defective genetic background. On the other hand, the CDV that was only C-defective remained fully virulent and immunosuppressive. This was surprising in view of the multiple functions of the MV and Sendai virus C proteins and since these proteins are necessary for virulence in natural hosts (Nagai and Kato 2004; Takeuchi et al. 2005). In particular, the phenotypes of a C-defective MV in macaques and a C-defective CDV in ferrets are different. In the lymphatic organs of macaques obtained 10 days after inoculation with wild-type MV, up to 15% of the cells were infected, whereas in macaques infected with a C-defective MV, about 100 times fewer cells were infected (Takeuchi et al. 2005). Thus, C is necessary for MV spread in the lymphatic organs of macaques.

It is possible that the immune system of ferrets is defective for the protein interacting with CDV C. Nevertheless, the double-knockout, VC-defective CDV lost competence to induce rash and digestive symptoms in ferrets. Knowing that one of the functions of the morbillivirus C protein is to sustain the assembly and release of stable viral particles (Devaux and Cattaneo 2004; Nagai and Kato 2004) we think that efficient transmission to epithelial cells of ferrets may be interrupted. Since replication in the lymphatics is reduced at least 100 times in infections with the V-defective CDV, particle instability may become the limiting factor for spread to the epithelia. Thus, the rash and digestive symptoms do not develop. On the other hand, the C-defective virus may be ferried by lymphocytes through the lymphoid organs, allowing the retention of full immunosuppressive activity, which results in host death.

SLAM recognition and host invasion.

Replication of the SLAMblind CDV was inferred from the detection of mild leukopenia and protective levels of neutralizing antibodies in two of four animals. However, it was not possible to identify and localize the sites of replication, even using a GFP-expressing virus (data not shown). Wild-type CDV replication was detected in epithelial cells of the respiratory tract only in late infection stages (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004), suggesting that lung epithelium infection follows rather than precedes CDV amplification in lymphatic organs. This is consistent

with the observation that MV preferentially enters well-differentiated human airway epithelia through the basolateral surface (Sinn et al. 2002). Thus, morbilliviruses may invade epithelia only in late infection phases and from the basolateral surface.

This sequence of events is fundamentally different from that considered in a current MV infection model (Griffin 2001). This textbook model implies initial infection of epithelial cells in the respiratory tract through an unknown receptor, followed by secondary replication in local lymphatic tissues. In CDV infections of ferrets, the unknown epithelial cell receptor sustains lung and bladder invasion only when massive amounts of virus are produced from infected lymphocytes and thus may have lower affinity for H than does SLAM. We suggest that similar events may sustain the spread of wild-type MV in humans after contagion: these viruses may initially target SLAM-expressing lymphocytes or tissue macrophages, possibly situated at the bottom of the crypts in the tonsils, rather than an unknown epithelial cell receptor. To assess this new model, a systematic analysis of the early phases of MV infection in the buccal cavity and the upper respiratory tract of experimentally infected macaques, quantifying the extent of MV replication in epithelial and lymphatic cells, is necessary.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dragana Milosevic for excellent technical support, Christoph Springfield, Yasuhiro Ikeda, Patricia Devaux, Leonid Margolis, Eric Poeschla, Terry Dermody, Brian Murphy, and other colleagues for comments on the manuscript and discussions.

This work was supported by the NIH (CA90636 and AI63476) and the CIHR (MOP-66989).

REFERENCES

- Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, and R. E. Randall. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49):17264-9.
- Appel, M. J. 1969. Pathogenesis of canine distemper. *Am J Vet Res* 30 (7):1167-82.
- Auwaerter, P. G., P. A. Rota, W. R. Elkins, R. J. Adams, T. DeLozier, Y. Shi, W. J. Bellini, B. R. Murphy, and 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.
- Barrett, T., and P. B. Rossiter. 1999. Rinderpest: the disease and its impact on humans and animals. *Adv Virus Res* 53:89-110.
- Bellini, W. J., G. Englund, S. Rozenblatt, H. Arnheiter, and C. D. Richardson. 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53 (3):908-19.
- Brenchley, J. M., T. W. Schacker, L. E. Ruff, D. A. Price, J. H. Taylor, G. J. Beilman, P. L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A. T. Haase, and D. C. Douek. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200 (6):749-59.
- Cattaneo, R., K. Kaelin, K. Baczko, and M. A. Billeter. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56 (5):759-64.
- Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, and G. Aversa. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376 (6537):260-3.
- Conzelmann, K. K. 2005. Transcriptional activation of alpha/beta interferon genes: interference by nonsegmented negative-strand RNA viruses. *J Virol* 79 (9):5241-8.
- Devaux, P., and R. Cattaneo. 2004. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol* 78 (21):11632-40.
- Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75 (2):295-305.
- Erlenhofer, C., W. J. Wurzer, S. Löffler, S. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 2001. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus

- but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 75 (10):4499-505.
- Forthal, D. N., S. Aarnaes, J. Blanding, L. de la Maza, and J. G. Tilles. 1992. Degree and length of viremia in adults with measles. *J Infect Dis* 166 (2):421-4.
- Galbraith, S. E., A. Tiwari, M. D. Baron, B. T. Lund, T. Barrett, and S. L. Cosby. 1998. Morbillivirus downregulation of CD46. *J Virol* 72 (12):10292-7.
- Garcin, D., J. B. Marq, F. Iseni, S. Martin, and D. Kolakofsky. 2004. A short peptide at the amino terminus of the Sendai virus C protein acts as an independent element that induces STAT1 instability. *J Virol* 78 (16):8799-811.
- Griffin, D. E. 2001. Measles virus. In *Fields Virology, 4th ed., vol. 1*, edited by B. N. F. a. D. M. Knipe. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Harder, T. C., and A. D. Osterhaus. 1997. Canine distemper virus—a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol* 5 (3):120-4.
- He, B., R. G. Paterson, N. Stock, J. E. Durbin, R. K. Durbin, S. Goodbourn, R. E. Randall, and R. A. Lamb. 2002. Recovery of paramyxovirus simian virus 5 with a V protein lacking the conserved cysteine-rich domain: the multifunctional V protein blocks both interferon-beta induction and interferon signaling. *Virology* 303 (1):15-32.
- Horvath, C. M. 2004. Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. *Eur J Biochem* 271 (23-24):4621-8.
- Hsu, E. C., C. Iorio, F. Sarangi, A. A. Khine, and C. D. Richardson. 2001. CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 279 (1):9-21.
- Kato, A., K. Kiyotani, Y. Sakai, T. Yoshida, and Y. Nagai. 1997. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J* 16 (3):578-87.
- Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6 (10):981-8.
- Lamb, R. A., et Kolakofsky, D. 2001. Paramyxoviruses: the viruses and their replication. In *Fields Virology, 4th ed., vol. 1*, edited by B. N. F. a. D. M. Knipe. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Mattapallil, J. J., D. C. Douek, B. Hill, Y. Nishimura, M. Martin, and M. Roederer. 2005. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434 (7037):1093-7.

- Mehandru, S., M. A. Poles, K. Tenner-Racz, A. Horowitz, A. Hurley, C. Hogan, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz. 2004. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4⁺ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200 (6):761-70.
- Milush, J. M., D. Kosub, M. Marthas, K. Schmidt, F. Scott, A. Wozniakowski, C. Brown, S. Westmoreland, and D. L. Sodora. 2004. Rapid dissemination of SIV following oral inoculation. *AIDS* 18 (18):2371-80.
- Moss, W. J., M. O. Ota, and D. E. Griffin. 2004. Measles: immune suppression and immune responses. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (8):1380-5.
- Mrkic, B., J. Pavlovic, T. Rulicke, P. Volpe, C. J. Buchholz, D. Hourcade, J. P. Atkinson, A. Aguzzi, and R. Cattaneo. 1998. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J Virol* 72 (9):7420-7.
- Nagai, Y., and A. Kato. 2004. Accessory genes of the paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative-strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:197-248.
- Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67 (10):6025-32.
- Ohno, S., N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi, and Y. Yanagi. 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol* 85 (Pt 10):2991-9.
- Oldstone, M. B., H. Lewicki, D. Thomas, A. Tishon, S. Dales, J. Patterson, M. Manchester, D. Homann, D. Naniche, and A. Holz. 1999. Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell* 98 (5):629-40.
- Palosaari, H., J. P. Parisien, J. J. Rodriguez, C. M. Ulane, and C. M. Horvath. 2003. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77 (13):7635-44.
- Poole, E., B. He, R. A. Lamb, R. E. Randall, and S. Goodbourn. 2002. The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. *Virology* 303 (1):33-46.
- Roelke-Parker, M. E., L. Munson, C. Packer, R. Kock, S. Cleaveland, M. Carpenter, S. J. O'Brien, A. Pospischil, R. Hofmann-Lehmann, H. Lutz, and et al. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379 (6564):441-5.
- Sakaguchi, T., A. Kato, F. Sugahara, Y. Shimazu, M. Inoue, K. Kiyotani, Y. Nagai, and T. Yoshida. 2005. AIP1/Alix is a binding partner of Sendai virus C protein and facilitates virus budding. *J Virol* 79 (14):8933-41.

- Schneider-Schaulies, S., I. M. Klagge, and V. ter Meulen. 2003. Dendritic cells and measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 276:77-101.
- Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea, and Z. J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122 (5):669-82.
- Shaffer, J. A., W. J. Bellini, and P. A. Rota. 2003. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315 (2):389-97.
- Shingai, M., N. Inoue, T. Okuno, M. Okabe, T. Akazawa, Y. Miyamoto, M. Ayata, K. Honda, M. Kurita-Taniguchi, M. Matsumoto, H. Ogura, T. Taniguchi, and T. Seya. 2005. Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic cells establish systemic viral infection. *J Immunol* 175 (5):3252-61.
- Sidorenko, S. P., and E. A. Clark. 2003. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol* 4 (1):19-24.
- Sinn, P. L., G. Williams, S. Vongpunswad, R. Cattaneo, and P. B. McCray, Jr. 2002. Measles virus preferentially transduces the basolateral surface of well-differentiated human airway epithelia. *J Virol* 76 (5):2403-9.
- Takeuchi, K., M. Takeda, N. Miyajima, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzuki, J. Shahnewaz, S. Kadota, and K. Nagata. 2005. Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol* 79 (12):7838-44.
- Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406 (6798):893-7.
- Tatsuo, H., N. Ono, and Y. Yanagi. 2001. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 75 (13):5842-50.
- Ulane, C. M., A. Kentsis, C. D. Cruz, J. P. Parisien, K. L. Schneider, and C. M. Horvath. 2005. Composition and assembly of STAT-targeting ubiquitin ligase complexes: paramyxovirus V protein carboxyl terminus is an oligomerization domain. *J Virol* 79 (16):10180-9.
- Veazey, R. S., M. DeMaria, L. V. Chalifoux, D. E. Shvetz, D. R. Pauley, H. L. Knight, M. Rosenzweig, R. P. Johnson, R. C. Desrosiers, and A. A. Lackner. 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280 (5362):427-31.
- Veillette, A. 2006. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 6 (1):56-66.
- von Messling, V., D. Milosevic, and R. Cattaneo. 2004. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (39):14216-21.

- von Messling, V., D. Milosevic, P. Devaux, and R. Cattaneo. 2004. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol* 78 (15):7894-903.
- von Messling, V., N. Oezguen, Q. Zheng, S. Vongpunsawad, W. Braun, and R. Cattaneo. 2005. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 79 (9):5857-62.
- von Messling, V., C. Springfield, P. Devaux, and R. Cattaneo. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77 (23):12579-91.
- von Messling, V., G. Zimmer, G. Herrler, L. Haas, and R. Cattaneo. 2001. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* 75 (14):6418-27.
- von Pirquet, C. 1908. Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion waehrend der Masern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 30:1297-1300.
- Welstead, G. G., C. Iorio, R. Draker, J. Bayani, J. Squire, S. Vongpunsawad, R. Cattaneo, and 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.
- Zhu, Y. D., J. Heath, J. Collins, T. Greene, L. Antipa, P. Rota, W. Bellini, and M. McChesney. 1997. Experimental measles. II. Infection and immunity in the rhesus macaque. *Virology* 233 (1):85-92.

Publication no.2

Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets

Nicholas Svitek^a and Veronika von Messling^{a*}

^aINRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531, boul. des Prairies, Laval, Quebec, Canada H7V 1B7

Received 6 November 2006;

revised 1 December 2006;

accepted 2 January 2007.

Available online 7 February 2007.

Virology

Juin 2007, p. 404-410, Vol. 362, Issue 2

J'ai cloné les cytokines de furet additionnelles et établi l'essai de PCR en temps réel. De plus, j'ai isolé les leucocytes du sang, j'ai extrait leur ARNm et effectué l'analyse par PCR en temps-réel de la réponse de cytokines chez des furets infectés avec des souches létales et atténuées du CDV.

* Corresponding author. Fax: +1 450 686 5305.

E-mail address: veronika.vonmessling@iaf.inrs.ca (V. von Messling)

RÉSUMÉ

L'immunosuppression sévère est une caractéristique des infections par les Morbillivirus. Pour étudier les mécanismes sous-jacents à cette immunosuppression, nous avons développé un modèle d'infection au virus de la maladie de Carré chez le furet. Le modèle reproduit tous les signes cliniques d'une infection par le MV. Par contre, le manque de réactifs spécifiques au furet a limité la caractérisation de la réponse de l'immunité cellulaire. Pour y remédier, nous avons cloné les gènes de cytokines de furet et avons établi un essai de PCR en temps réel semi-quantitatif. Pour démontrer l'utilité de cet essai, nous avons comparé le profil de cytokines induit par des souches létales et non-létales durant la phase prodromique. Nous avons observé une inhibition généralisée de l'induction de la transcription de cytokines chez les animaux qui sont décédés suite à la maladie, alors que les animaux ayant survécu à la maladie ont établi une réponse robuste et soutenue. L'essai de cytokines nouvellement développé renforce et élargit le modèle de furet non seulement pour des études de la pathogenèse morbillivirale mais aussi pour plusieurs autres virus respiratoires humains incluant la grippe et le SRAS.

ABSTRACT

Severe immunosuppression is a hallmark of Morbillivirus infections. To study the underlying mechanisms, we have developed a ferret model of canine distemper virus infection. The model reproduces all clinical signs of measles, but the lack of ferret-specific reagents has limited the characterization of the cellular immune response. Towards this, we cloned ferret cytokines and established semi-quantitative real-time PCR assays. To demonstrate the utility of these assays we compared the cytokine profiles elicited by lethal and non-lethal strains during the prodromal phase. We observed a general lack of cytokine induction in animals that later succumbed to the disease, whereas survivors mounted a robust and sustained response. The newly developed cytokine assays strengthen and expand the ferret model not only for Morbillivirus pathogenesis studies but also for several other human respiratory viruses including influenza and SARS.

Keywords: Morbillivirus; Canine distemper virus; Immunosuppression; Ferret cytokine mRNA quantification; Prediction of disease outcome

INTRODUCTION

Morbilliviruses are highly contagious respiratory pathogens that cause systemic disease and are accompanied by severe immunosuppression (Griffin 2001; Murphy 1999). Disease severity varies from moderate to severe for measles (MV) in humans and canine distemper virus (CDV) in dogs to usually lethal for CDV in most wild carnivores and rinderpest in cattle (Rima and Duprex 2006). Regardless of the ultimate disease outcome, the infection is characterized by a dramatic decrease of white blood cells and an inhibition of lymphocyte proliferation within the first weeks after infection (Borrow and Oldstone 1995; Griffin 2001; von Messling et al. 2003). However, the knowledge regarding interactions between the host and the immune system preceding these events remains limited.

Since MV only infects humans and certain non-human primates, we have established a model based on the study of the closely related canine distemper virus (CDV) in ferrets, one of its natural hosts (von Messling et al. 2003). Ferrets are highly sensitive to the disease, and for the most part succumb to infection with a wild type virus. On the other hand, infection with attenuated CDV strains results in disease signs and progression that parallels MV infection in humans (Kauffman, Bergman, and O'Connor 1982). Virus control and clearance in surviving animals usually occur within 3 to 4 weeks after inoculation and coincide with the development of neutralizing antibodies (von Messling et al. 2003; von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004). The application of our model to study the immune response during the crucial early phase of CDV infection has so far been difficult as specific reagents to detect cytokine responses in ferrets are not readily available.

This lack of immunological reagents constitutes a major limitation for the use of ferrets in pathogen–host interaction studies, for which it is becoming increasingly attractive. Ferrets are naturally susceptible to several human respiratory pathogens and a number of gastro-intestinal bacterial diseases (Ball 2006). They have long been recognized as a model for the efficacy assessment of new vaccines or treatment

approaches against influenza and more recently severe acute respiratory syndrome (SARS), and they are also used to study prion diseases (Bartz et al. 1998; Maher and DeStefano 2004; ter Meulen et al. 2006) .

The purpose of the present study was to establish mRNA-based cytokine assays for ferrets and to validate this new tool by comparing the early host response to lethal and non-lethal CDV infections. Towards this, we completed the sequences of ferret cytokines representing the different axes of the cellular immune response and developed semi-quantitative real-time PCR assays. We then evaluated cytokine mRNA expression levels at 3 and 7 days after inoculation and found that survival was associated with a robust and sustained response whereas animals that succumbed to the disease experienced a generalized shutoff of cytokine expression.

RESULTS

Cloning and characterization of ferret cytokines

Since reagents for the assessment of the cellular immune response in ferrets are not commercially available, we set out to obtain the sequences of a ferret cytokine panel including those reflecting early innate immune response activation, tumor necrosis factor (TNF) α , interferon (IFN) α , and interleukin (IL) 6, those indicating Th1 polarization, IFN γ , IL2, and IL12p40, and the Th2 cytokines IL4 and IL10. As mustelids, ferrets are most closely related to other carnivores like dogs and cats (McKenna M.C. 1997). The first set of primers was therefore based on canine and feline sequences available in GenBank. We initially obtained small fragments of ferret IFN α , IFN γ , IL2, IL4, IL6, and TNF α and used those sequences to measure cytokine mRNA induction using a gel-based assay (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006). To develop a robust and versatile real-time PCR-based assay that generates a representative cytokine profile, we included IL10 and IL12p40 and pursued the sequencing of larger parts of the open reading frames. This strategy has so far yielded complete open reading frames for IL2, IL4, IL6, IFN α (consensus sequence), and TNF α (GenBank accession nos. IL2 EF368206; IL4 EF368210; IL6 EF368209; IFN α EF368207; TNF α EF368211) and partial gene sequences for IL10 and IFN γ (> 95) and IL12p40 (60%; GenBank accession nos. IL10 EF368212; IFN γ EF368214; IL12p40 EF368213). When comparing the ferret cytokines with the respective canine and feline proteins, we observed a slightly higher overall amino acid identity between ferrets and dogs than between ferrets and cats (Table 1). This degree of similarity on the amino acid and nucleotide level (data not shown) confirms the identity of the obtained sequences.

Early CDV immunosuppression is independent of the viral load

To establish and validate ferret cytokine real-time PCR assays, we compared samples from animals that succumbed to the disease with those originating from

Table 1
 Comparison of ferret cytokines with the respective canine and feline protein sequences available in GenBank

Protein	<u>% AA identity</u>	<u>% AA identity</u>
	Ferret/Dog	Ferret/Cat
IFN α ^a	67	72
IFN γ ^b	88	85
TNF α	95	92
IL2	86	85
IL4	83	77
IL6	78	73
IL10 ^b	93	89
IL12p40 ^b	94	92

^a Values based on consensus sequence.

^b Values based on alignment of available gene sequence.

survivors. Different viruses were included to assure the identification of general characteristics of disease outcome rather than profiles associated with one individual strain. Samples included in the lethal group originated from animals infected with either 5804P-eGFP/H (von Messling, Svittek, and Cattaneo 2006) or A75eH (Rudd, Cattaneo, and von Messling 2006), whereas the survivor group consisted of individuals inoculated with the highly pathogenic but non-lethal strain 5804P-eGFP/uN (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004) or survivors of 5804P/A75eH chimeric viruses. These viruses, in which the envelope glycoproteins were exchanged between the two lethal strains, cause severe disease but only 60–80% mortality (unpublished results). In the case of 5804P-eGFP/uN, which carries an eGFP-containing additional transcription unit upstream of the N gene, the non-lethal phenotype is due to a slight delay in replication efficacy, whereas minimal incompatibilities between viral proteins originating from different strains are the likely cause of survival in the case of the 5804P/A75 chimeric viruses.

In animals that succumb to the disease, we observed a dramatic drop in leukocyte numbers and an almost complete loss of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation activity upon phytohemagglutinin (PHA) stimulation between 3 and 7 days after inoculation, prior to the onset of disease signs (Figs. 1A and B, circles). In contrast, survivors experienced an equally severe but transient leukocyte drop, and the inhibition of lymphocyte proliferation was less pronounced (Figs. 1A and B, triangles). No marked differences in peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-associated virus titers and neutralizing antibody levels against CDV were noted between the two groups at these early time points (Figs. 1C and D).

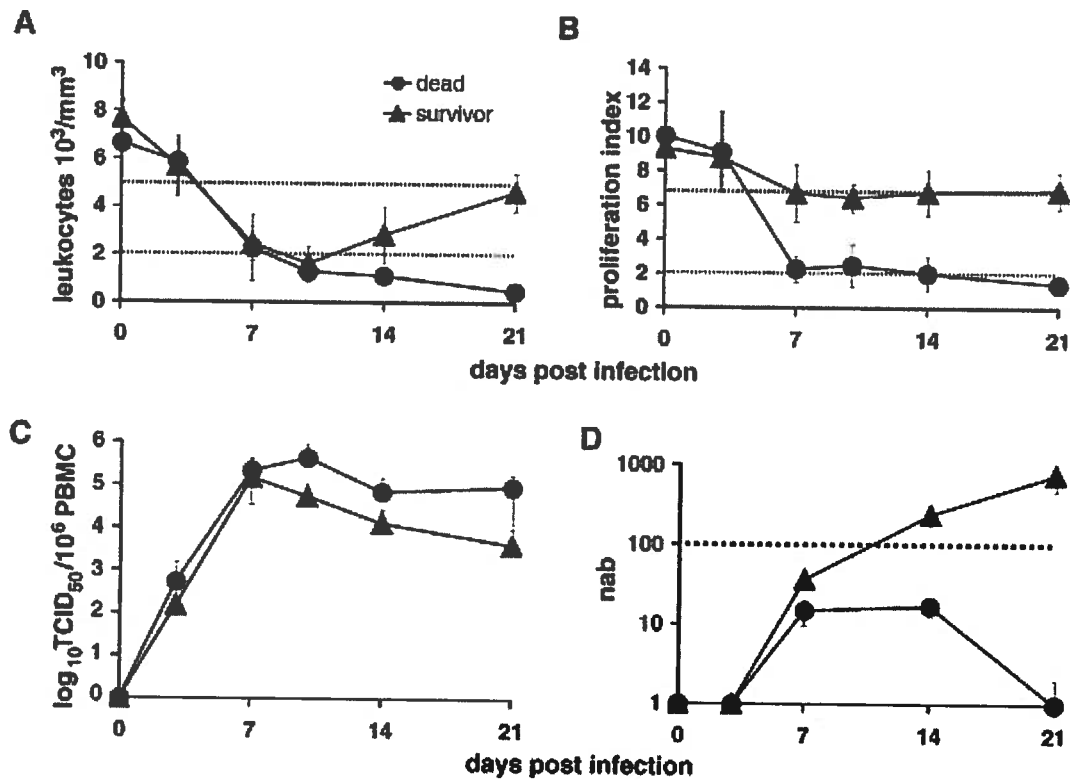


Fig. 1. Clinical parameters in animals infected with lethal or non-lethal CDV strains. (A) Leukocyte numbers, (B) *in vitro* proliferation activity of lymphocytes, (C) cell-associated virus titers expressed in 50% log₁₀ tissue culture infectious doses (TCID₅₀) in PBMCs, and (D) neutralizing antibody titers over the first 21 days of the disease. Animals infected with the lethal strains 5804P-eGFP/H ($n = 5$) or A75eH ($n = 6$) are represented by circles, those infected with the non-lethal virus 5804P-eGFP/uN ($n = 4$) and the survivors of infections with chimeric 5804P/A75eH envelope exchange viruses ($n = 4$) by triangles. Days post-infection are indicated on the X axis, leukocyte number, proliferation activity, cell-associated virus titer, or neutralizing antibody titer on the Y axis. Error bars represent the standard deviation. The narrow dotted lines indicate cut-off values associated with moderate (upper line) and severe (lower line) immunosuppression. The wider dotted line represents the protective threshold of neutralizing antibodies.

Blood cell composition and infection levels at early disease stages are independent of disease outcome

Because of their important role in CDV pathogenesis and easy accessibility, PBMCs are ideally suited to follow the systemic cytokine response over time in the same animal. We have previously shown that 5804P targets primarily T and B cells and that a lethal infection results in a relative reduction of the T cell population, beginning at 10 days post-infection (d.p.i.) (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006). To assure the comparability between samples from both groups, we determined infection levels and PBMC subpopulation composition at the different time points. Consistent with our previous results, we observed no infected cells or relevant changes in PBMC subpopulations at 3 d.p.i. (Figs. 2A and B, compare 0 and 3 d.p.i.). At 7 d.p.i., more than 40% of cells expressed eGFP (Fig. 2A, 7 d.p.i.), which could be further subdivided in 28–30% T cells, 13–21% B cells, and 3–4% monocytes regardless of the disease outcome (Fig. 2B, left and right panel). After the onset of clinical signs at 10 d.p.i., the two groups diverged similar to what was observed in the immunological parameters (Fig. 1).

CDV survival is associated with a robust cytokine response

To determine if the newly established cytokine assays allow a discrimination of the two groups at early disease stages, when other assays fail to detect a difference, we compared the relative induction of the different cytokine mRNAs at 3 and 7 d.p.i. in animals that succumbed to the disease with survivors. The most striking finding was a generalized lack of cytokine upregulation in animals infected with a lethal strain at both time points (Figs. 3A–C, circles). For TNF α , IL6, and IL2, we even observed a reduction in cytokine mRNA levels below baseline in the

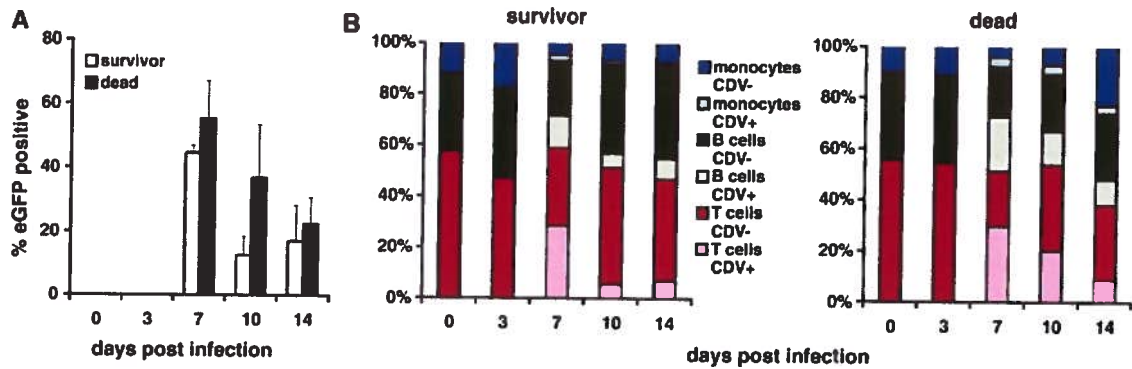


Fig. 2. Extent and PBMC subtype specificity of lethal and non-lethal CDV infection. (A) FACS analysis of the percentage of eGFP expression in PBMCs isolated from animals that succumbed (black bars) to or survived (white bars) the disease at 0 to 14 days after inoculation. Error bars represent the standard deviation. (B) Relative percentages of PBMC subtypes infected 0 to 14 days after infection with lethal or non-lethal viruses. T cells are shown in red, B cells are shown in green, and monocyte-lineage cells are shown in blue. Lighter shades represent eGFP-expressing cells; full shades represent negative cells. The means of the results from all animals assigned to the respective groups are shown.

majority of animals analyzed, suggesting an infection-induced shutdown of gene expression (Figs. 3A and B, circles). The only exception was IL12p40, which was upregulated in a small subset of the animals examined (Fig. 3B, middle panel, circles).

In contrast, the majority of animals infected with non-lethal viruses showed a robust upregulation of the innate immune response cytokine IL6 and the Th1-type cytokine IFN γ at 3 d.p.i., which was sustained through day seven (Figs. 3A and B, triangles). At the earlier time point, a broad range of IFN α expression levels was observed, and a subset of animals displayed a very strong IL10 response (Figs. 3A and C, D3, triangles). Seven days after inoculation, the Th1-type cytokines IL2 and IL12p40 and the Th2-type cytokines IL4 and IL10 were also strongly expressed (Figs. 3B and C, D7, triangles).

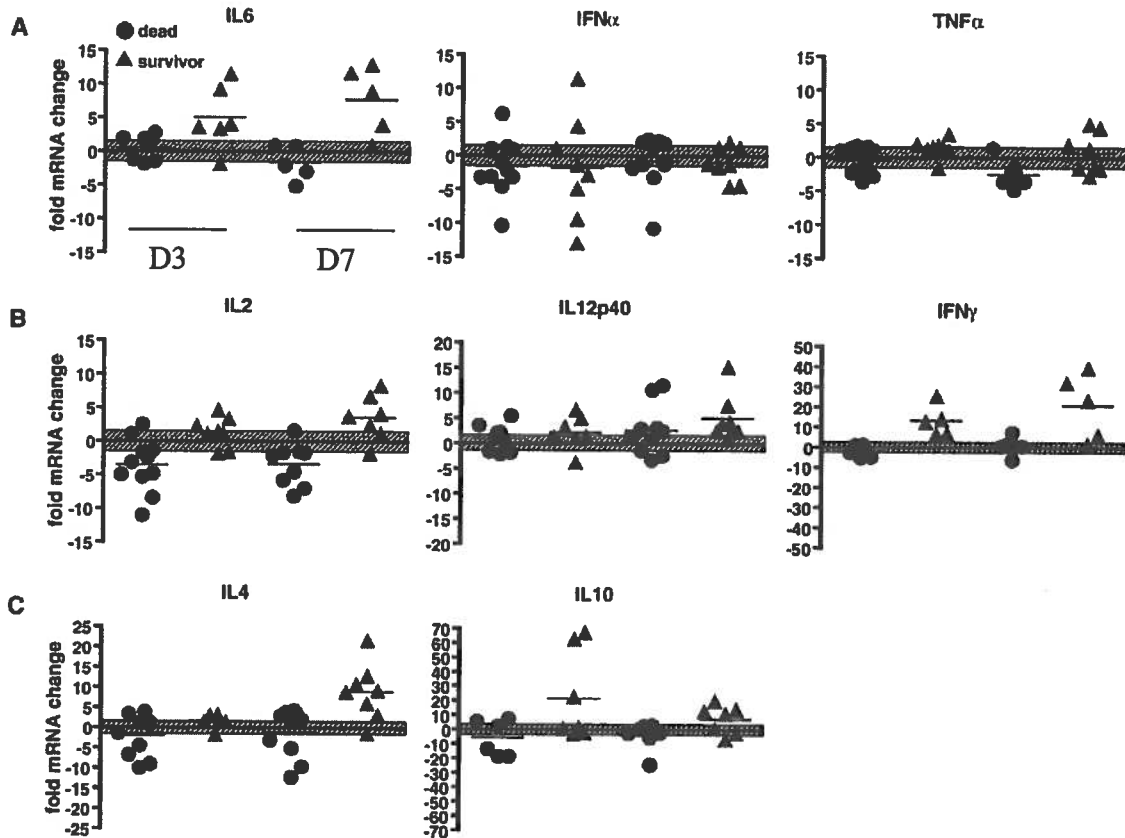


Fig. 3. Comparison of cytokine responses in animals infected with lethal or non-lethal CDV strains. (A) Innate immunity, (B) Th1-type, and (C) Th2-type cytokine mRNA expression in both groups at 3 (D3) and 7 (D7) days post-infection. Animals infected with lethal strains ($n = 11$) are represented by circles, those infected with non-lethal viruses (survivors; $n = 8$) by triangles. The fold mRNA expression change compared to pre-infection levels of the same animal is indicated on the Y axis. Each samples was analyzed in triplicates and only samples where the variation among triplicates was less than 10% were included in the analysis, resulting in the variability in numbers of individuals plotted for the different cytokines. The black bar represents the mean of all the samples. The hatched zone represents threshold levels of 1.5 fold expression change, which is considered normal variability.

DISCUSSION

The dramatic drop in leukocyte numbers and the loss of function in the remaining cells observed within the first week after infection indicate that Morbilliviruses interfere with the induction of an appropriate immune response at very early stages (Borrow and Oldstone 1995; Schneider-Schaulies et al. 2001). To better understand the basis for host immune response control in our ferret model, we established semi-quantitative real-time RT-PCR assays based on ferret cytokine sequences and compared the response associated with lethal disease outcome or survival. We found that animals succumbing to the disease failed to mount a sustained response, while survivors showed initially a Th1 polarization that later transitioned into a Th2-biased response.

Cytokine responses to CDV have so far been mostly studied in dogs with naturally contracted disease at the time of euthanasia. The results represent thus the profile at the late stages of the acute disease phase or at the onset of neurologic disease after recovery from the acute infection. Interestingly, animals with severe signs of disease and viremia at the time of death displayed low or absent cytokine mRNA induction in blood-derived RNA, consistent with our initial findings in 5804P-infected ferrets and this study (Grone, Frisk, and Baumgartner 1998; von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006). In contrast, individuals with mild or absent general signs of disease but neurologic manifestations mounted a broad response not only in the blood but also locally in the CNS (Grone, Frisk, and Baumgartner 1998; Markus, Failing, and Baumgartner 2002). The role of the systemic and local immune response in the context of this delayed neurologic form of CDV remains to be investigated in ferrets.

The striking lack of any cytokine response in animals infected with a lethal virus as early as 3 d.p.i. indicates a viral interference with immune system activation at a time when the infection in PBMCs is barely detectable. *In vitro*, it has been demonstrated that minute amounts of MV envelope are suffice to induce an anergic state in exposed lymphocytes, but the exact interactions remain to be elucidated (Schlender et al. 1996). In addition, the non-essential protein V has been shown to inhibit activation of an anti-viral

response by interfering with nuclear localization of STATs (Devaux et al. 2007; Palosaari et al. 2003). It is possible that the shutdown of cytokine expression observed for the lethal CDV strains results from contacts between viral glycoproteins and immune cells in combination with a V and phosphoprotein-dependent inhibition of the induction of the anti-viral state in infected cells. Taken together our findings demonstrate that the disease outcome is decided within the first days of infection.

The Th1/Th2 switch observed in animals infected with non-lethal viruses mirrors previous reports of children naturally infected with MV, where IL2 and IFN γ were expressed during the acute phase of the disease, and the increase of IL4 coincided with antibody-mediated virus clearance (Griffin, Ward, and Esolen 1994; Moss et al. 2002). In the same context, elevated IL10 levels were detected for weeks after the infection, which might be an important factor in the long-lasting immunosuppression associated with MV (Moss et al. 2002). In our study, ferrets infected with non-lethal viruses closely reproduce these findings, further supporting the value of this model for the characterization of the mechanisms underlying Morbillivirus-induced immunosuppression.

In addition to Morbillivirus pathogenesis studies, ferrets are a recognized model for the development of vaccines and anti-viral therapies against influenza, and more recently SARS (Maher and DeStefano 2004; ter Meulen et al. 2006). They are also used for transmission studies of different transmissible spongiforme encephalopathies (Bartz et al. 1998; Bartz et al. 1994) and parallel human disease manifestations for several bacterial diseases including Helicobacter-induced gastric ulcers, hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing Escherichia coli, and campylobacteriosis (O'Rourke and Lee 2003; Woods et al. 2002). By comparing samples from animals with different disease outcome, we have demonstrated that our semi-quantitative real-time PCR assays are sufficiently sensitive to detect a very weak response and even a reduction from baseline levels as observed in animals that later succumbed to the disease. At the same time, the assays allow the quantification of the response across a much wider range than the previous gel-based approach (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006). This will enable the more detailed comparison of the cytokine responses to specifically attenuated viruses

in future studies. Furthermore, this RNA-based assay can easily be applied to various tissues as well as bodily fluids, enabling the assessment of the local and systemic responses at the same time. It thus adds a versatile new tool to the study of host–pathogen interactions in this model.

MATERIALS AND METHODS

Ferret cytokine sequences

To obtain sequences encoding ferret IL2, 4, 6, 10, and 12p40, IFN α and γ , and TNF α , as well as GAPDH as a housekeeping gene, total RNA was isolated (RNeasy, Qiagen) from PBMCs of healthy animals stimulated with 5 μ g/ml PHA (Sigma) for 24 h. The RNA was then reverse transcribed (Superscript III, Invitrogen) using a mixture of oligoT and random hexamer primers to maximize cDNA output. Primer pairs for the initial amplification of ferret cytokines were based on conserved regions in the respective genes of the phylogenetically related carnivores, dogs and cats, available in GenBank (canine sequences: IL2 AM238655; IL4 NM001003159; IL6 NM001003301; IL10 NM001003077; IL12p40 U49100; IFN α A33693; IFN γ NM001003174; TNF α Z70046; feline sequences: IL2 NM001043337; IL4 NM001043339; IL6 NM001009211; IL10 NM001009209; IL12p40 Y07762; IFN α DQ220469; IFN γ X86974; TNF α NM001009835). Once a partial ferret sequence was determined (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006), ferret specific primers were chosen to obtain increasing parts of the open reading frame either in combination additional canine/feline-based primers or by 3' and 5' RACE according to the manufacturer's instruction (GeneRacer RACE-Ready cDNA kit, Invitrogen). Primer pairs for the real-time PCR assay were designed using the Primer Quest program of Integrated DNA Technologies (Table 2). Protein alignments and the calculation of percent amino acid identity were performed using MegAlign (DNASTAR, Lasergene).

Viruses and animal experiments

The samples analyzed in this study originated from animals infected with either one of the lethal strains 5804P-eGFP/H (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004) and A75eH (Rudd, Cattaneo, and von Messling 2006), the non-lethal strain 5804P-eGFP/uN (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004), and survivors of infections with

chimeric 5804P/A75eH envelope exchange viruses that cause 60–80% lethality (unpublished results).

Male ferrets over 16 weeks of age (Marshall Farms) were inoculated intranasally with 10^5 50% tissue culture infectious doses of the respective virus, and blood samples were collected twice during the first 2 weeks, and weekly thereafter. At each time point, the total white blood cell count, proliferation activity, cell-associated virus titers, and neutralizing antibody titers were determined as described previously (Rudd, Cattaneo, and von Messling 2006) and (von Messling et al. 2003). Briefly, neutralizing antibodies were measured by serum neutralizing assay. Serial dilutions of serum starting at 10^{-1} were incubated with 10^2 TCID₅₀ of Onderstepoort CDV strain and incubated for 15 min before $2-3 \times 10^4$ VerodogSLAMtag cells were added. Paltres were read after 3 days where syncytia were visible. The titer was expressed as the reciprocal dilution at which syncytia formation was first detected. Flow cytometry analysis of the PBMC subpopulations was carried out following the protocol published previously (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004; von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006).

For the cytokine mRNA quantification, 3 ml blood was collected in Na-EDTA-coated vacuum tubes (Vacutainer, Beckton Dickinson) immediately before and at 3 and 7 d.p.i. PBMCs were isolated by destroying the erythrocytes with ACK lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.01 mM EDTA, pH 7.2–7.4), resuspended in RNAlater (Qiagen), and stored at -20 °C. The RNA was purified using the RNeasy kit in combination with an on-the-column DNase treatment (Qiagen), and the yield was quantified by UV spectrophotometry.

Semi-quantitative real-time PCR assays

To assess cytokine expression, the cDNA produced from 10 ng RNA was combined with 0.5 μ M of each primer and the DyNAmo SYBR Green 2-Step qRT-PCR reaction mix (Finnzymes) to a 10 μ l reaction according to the manufacturer's instructions. The real-time PCR was performed in a RG-3000A (Rotor-Gene), using the following

Table 2
Primer pairs used in the cytokine real-time PCR assays

Gene	Primers	
	Forward	Reverse
IFN α	5'-ATGCTCCTGGCAGCAAAATGAGGAGA-3'	5'-TTCTGCAGCTGCTTGCTGTCAAAC-3'
IFN γ	5'-CCATCAAGGAAAGACATGCTTGTCAAG-3'	5'-CTGGACCTGCAGATCATTACAGGAA-3'
TNF α	5'-TGGAGCTGACAGACAACCAAGCTAA-3'	5'-TGATGGTGTGGTAAGGAGCACAT-3'
IL2	5'-TGCTGGACTTACAGTTGCTCT-3'	5'-CAATTCTGTGGCCTTCTTGGGCAT-3'
IL4	5'-CGTTGAACATCCTCACAGCGGAGAAAC-3'	5'-TTGCCATGTTCCCTGAGGTTCCCTGTGA-3'
IL6	5'-CAAATGTGAAGACAGCAAGGAGGCA-3'	5'-TCTGAAACTCCTGAAGACCCGTTAGTG-3'
IL10	5'-TCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGT-3'	5'-TCCACCGCCTTGCTCTTATTCTCA-3'
IL12p40	5'-ATCGAGGTTGTGGGTGCTATT-3'	5'-TAGGTTTCATGGGTGGGCTCTGGTTT-3'
GAPDH	5'-AACATCATCCCTGCTTCCACTGGT-3'	5'-TGTTGAAGTCCGAGGAGACAAACCT-3'

protocol: denaturation at 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s, 60 °C for 15 s, and 72 °C for 25 s, and a melting curve analysis to confirm reaction specificity. Each experiment was performed in triplicate, and only values that varied less than 10% were considered. The fold change ratios between experimental and control samples for each gene were calculated with GAPDH levels as a reference. Towards this the cycle at which GAPDH crosses the detection threshold (Ct) is subtracted from the Ct value of the gene of interest at each time point (ΔC_t). The fold change is then calculated by subtracting the ΔC_t values of the respective gene at day 0 from those obtained at subsequent days ($\Delta\Delta C_t$). To transform these values into absolute values, the formula: fold change = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ is used (Schmittgen et al. 2000).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Roberto Cattaneo, Charles M. Dozois, and Alain Lamarre for comments on the manuscript and are grateful to all laboratory members for support and lively discussion. This work was supported by grants from the CIHR (MOP-66989), CFI (9488), and a CIHR New Investigator Award to V.v. M, NIH grant R01 A163476 to Roberto Cattaneo (V.v.M. co-investigator), and an Armand-Frappier Foundation scholarship to N.S.

REFERENCES

- Ball, R. S. 2006. Issues to consider for preparing ferrets as research subjects in the laboratory. *ILAR J* 47 (4):348-57.
- Bartz, J. C., R. F. Marsh, D. I. McKenzie, and J. M. Aiken. 1998. The host range of chronic wasting disease is altered on passage in ferrets. *Virology* 251 (2):297-301.
- Bartz, J. C., D. I. McKenzie, R. A. Bessen, R. F. Marsh, and J. M. Aiken. 1994. Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *J Gen Virol* 75 (Pt 11):2947-53.
- Borrow, P., and M. B. Oldstone. 1995. Measles virus-mononuclear cell interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 191:85-100.
- Devaux, P., V. von Messling, W. Songsunthong, C. Springfield, and R. Cattaneo. 2007. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* 360 (1):72-83.
- Griffin, D. E. 2001. Measles virus. In *Fields Virology, 4th ed., vol. 1*, edited by D. M. K. a. P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Griffin, D. E., B. J. Ward, and L. M. Esolen. 1994. Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. *J Infect Dis* 170 Suppl 1:S24-31.
- Grone, A., A. L. Frisk, and W. Baumgartner. 1998. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 65 (1):11-27.
- Kauffman, C. A., A. G. Bergman, and R. P. O'Connor. 1982. Distemper virus infection in ferrets: an animal model of measles-induced immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 47 (3):617-25.
- Maher, J. A., and J. DeStefano. 2004. The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 33 (9):50-3.
- Markus, S., K. Failing, and W. Baumgartner. 2002. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *J Neuroimmunol* 125 (1-2):30-41.

- McKenna M.C., Bell S.K. 1997. *Classification of Mammals Above the Species Level*. New York City, NY, USA: Columbia University Press.
- Moss, W. J., J. J. Ryon, M. Monze, and D. E. Griffin. 2002. Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J Infect Dis* 186 (7):879-87.
- Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., Studdert, M. 1999. *Veterinary Virology (3rd ed.)*. San Diego, CA: Academic Press.
- O'Rourke, J. L., and A. Lee. 2003. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Microbes Infect* 5 (8):741-8.
- Palosaari, H., J. P. Parisien, J. J. Rodriguez, C. M. Ulane, and C. M. Horvath. 2003. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77 (13):7635-44.
- Rima, B. K., and W. P. Duprex. 2006. Morbilliviruses and human disease. *J Pathol* 208 (2):199-214.
- Rudd, P. A., R. Cattaneo, and V. von Messling. 2006. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol* 80 (19):9361-70.
- Schlender, J., J. J. Schnorr, P. Spielhoffer, T. Cathomen, R. Cattaneo, M. A. Billeter, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 1996. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (23):13194-9.
- Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer, and M. W. Reed. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285 (2):194-204.
- Schneider-Schaulies, S., S. Niewiesk, J. Schneider-Schaulies, and V. ter Meulen. 2001. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med* 1 (2):163-81.
- ter Meulen, J., E. N. van den Brink, L. L. Poon, W. E. Marissen, C. S. Leung, F. Cox, C. Y. Cheung, A. Q. Bakker, J. A. Bogaards, E. van Deventer, W. Preiser, H. W. Doerr, V. T. Chow, J. de Kruif, J. S. Peiris, and J. Goudsmit. 2006. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants. *PLoS Med* 3 (7):e237.

- von Messling, V., D. Milosevic, and 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. Springfield, P. Devaux, and R. Cattaneo. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77 (23):12579-91.
- von Messling, V., N. Svitek, and R. Cattaneo. 2006. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol* 80 (12):6084-92.
- Woods, J. B., C. K. Schmitt, S. C. Darnell, K. C. Meysick, and A. D. O'Brien. 2002. Ferrets as a model system for renal disease secondary to intestinal infection with *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Infect Dis* 185 (4):550-4.

Publication no. 3

STAT1-Independent V Protein-Mediated Block of Mx Transcription is Essential for Morbillivirus Virulence

Nicholas Svitek¹, Roberto Cattaneo², and Veronika von Messling^{1*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Quebec, Canada.

²Department of Molecular Medicine and Virology and Gene Therapy Graduate Track, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, Minnesota 55905.

En préparation.

J'ai effectué la totalité des expériences et j'ai participé à la rédaction de l'article.

* Corresponding Author, Mailing Address:

INRS – Institut Armand-Frappier, University of Quebec, 531, boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada. Phone: (450) 686-5010. Fax: (450) 686-5309.

E-mail: veronika.vonmessling@iaf.inrs.ca

Running title: Mx Inhibition is Essential for CDV Virulence

RÉSUMÉ

Le rôle de la protéine V des morbillivirus dans le contrôle du système immunitaire inné a été largement caractérisé *in vitro*. Pour évaluer la contribution des différentes interactions pour la pathogenèse, l'immunosuppression, la virulence et la létalité du virus de la maladie de Carré, des virus recombinants transportant des mutations déjà identifiées dans le système du MV ont été évalués dans des furets. Nous avons observé que la perturbation du motif doigt de zinc, localisé dans la région unique de V, résulte en l'atténuation de la maladie ainsi qu'en une perte de l'inhibition de la signalisation de l'interféron (IFN) de type I. En revanche, tous les animaux infectés avec un mutant ne reconnaissant pas STAT1 ont succombé à la maladie, malgré une activation efficace de la cascade de signalisation de l'IFN de type I et II. Une investigation complémentaire utilisant des promoteurs naturels de différents gènes induits par les IFN dans un essai avec le gène rapporteur de la luciférase a révélé une forte corrélation entre le contrôle de la transcription de Mx et la virulence. Nos résultats indiquent que la protéine V contrôle plusieurs voies de signalisation de l'immunité innée et suggèrent que l'inhibition de Mx joue un rôle important dans la pathogenèse morbillivirale.

ABSTRACT

The role of the morbillivirus V protein in the control of the innate immune system has been extensively characterized *in vitro*. To evaluate the contribution of the different interactions to pathogenesis, immunosuppression, virulence, and lethality of recombinant canine distemper viruses carrying mutations previously identified in the measles system were evaluated in ferrets. We observed that disruption of the zinc finger motif located in the V unique region resulted in an attenuated disease and loss of type I interferon (IFN) signaling inhibition. In contrast, all animals infected with a STAT1-blind mutant succumbed to the disease, despite efficient activation of the type I and II IFN signaling cascade. Further investigation using natural promoters of different IFN-stimulated genes in a luciferase reporter gene assay revealed a strong correlation between the control of Mx transcription and virulence. Our findings indicate that the V protein controls several innate immune signaling pathways, and suggest that Mx plays an important role in morbillivirus pathogenesis.

INTRODUCTION

Immune suppression is a hallmark of morbillivirus infections (Moss and Griffin 2006; Schneider-Schaulies and Schneider-Schaulies 2009; von Pirquet 1908), and the resulting secondary infections contribute importantly to their morbidity and mortality (Abramson et al. 1995; Dollimore et al. 1997). Among the viral proteins involved, the accessory V protein plays a key role in the interference with the innate immune response. The V protein mRNA is transcribed from the phosphoprotein (P) gene open reading frame by insertion of a non-templated guanine at an editing site located in the last third of the gene (Cattaneo et al. 1989; Thomas, Lamb, and Paterson 1988). Consequently, V shares its amino-terminal part with P, but has a unique carboxy-terminus. The latter contains a cysteine-rich domain, which binds two atoms of zinc (Liston and Briedis 1994; Paterson et al. 1995; Li et al. 2006) and is highly conserved among paramyxoviruses (Lamb 2001). An important role of V in virulence has been demonstrated for several paramyxoviruses (Devaux et al. 2008; Fukuhara et al. 2002; Kato et al. 1997), most notably in canine distemper virus (CDV), where V knock out (Vko) derivatives of a lethal strain caused only a very mild disease without detectable immune suppression (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006).

In vitro studies with the measles virus (MeV) V protein indicate that the amino- and carboxy-terminal domains contribute to its immune interfering activity. The P/V shared amino-terminal domain alone blocks type I and type II interferon (IFN) responses. This activity has been mapped to the amino acid stretch 110-130 with the tyrosine 110 being essential for binding the signal transducer and activator of transcription (STAT)1 molecule (Devaux et al. 2007; Ohno et al. 2004). Disruption of one of the zinc binding domains in the V-unique region results in a 70% loss of its type I IFN inhibitory activity (Ramachandran, Parisien, and Horvath 2008), and it has been shown that this region can directly inhibit IFN β synthesis by interacting with the double-stranded RNA sensor mda-5 (Andrejeva et al. 2004; Childs et al. 2007; Childs et al. 2008). Systematic screening of the entire region revealed that aspartic acid at position 248 and, to a lesser extent,

phenylalanine 246 are important for the inhibition of STAT2 nuclear translocation (Caignard et al. 2009; Ramachandran, Parisien, and Horvath 2008).

This multifaceted interference with the IFN response is likely to impact the transcription of IFN-stimulated genes (ISG), which are essential for an appropriate antiviral response. Among the ISG, Mx, a guanosine triphosphatase (GTPase), is known as a decisive player in RNA virus control and clearance (Haller, Staeheli, and Kochs 2007; Tumpey et al. 2007). Its anti-viral effect has been mainly characterized for segmented negative-strand RNA viruses, where resistance to orthomyxoviruses in mice was mapped solely to the Mx1 gene (Arnheiter et al. 1990; Staeheli et al. 1986) and it was recently suggested to play a role in limiting cross-species transmission (Dittmann et al. 2008). However, an antiviral activity of Mx has also been demonstrated for a variety of non-segmented RNA viruses (Schwemmle et al. 1995). For MeV, an increased expression of the MxA, the human Mx homologue, correlating with a decrease of viral transcription, was observed in infected human brain cell cultures (Schneider-Schaulies et al. 1994), and the presence of MxA resulted in a 100-fold reduction of released infectious particles in a human monocytic cell line (Schnorr et al. 1993). However, its importance for morbillivirus pathogenesis remains to be evaluated.

To assess the contribution of the different V protein domains to morbillivirus innate immune interference, we produced a series of recombinant CDVs with mutations in either domain based on previous *in vitro* studies with MeV. We observed that the mutation of one of the conserved cysteines led to survival of all ferrets infected, while the Y110H mutation in the P/V shared region had no effect, even though it was no longer able to inhibit type I IFN induction *in vitro* and in immune cells. To identify the V-IFN pathway interaction important for survival, we evaluated the V protein mutants in a luciferase-based reporter gene assay using several IFN-dependent promoters and observed that the ability to control Mx-expression was the determining factor.

RESULTS

V mutant viruses retain parental replication efficacy.

In vitro studies with the MeV V protein have shown that the naturally occurring mutations Y110H in the P/V-domain, C272R in the V-unique region, which disrupts the zinc finger motif interfere with different actors involved in innate immune activation (Caignard et al. 2009; Devaux et al. 2007; Ohno et al. 2004; Ramachandran, Parisien, and Horvath 2008). To investigate the importance of these interactions for virulence, we generated recombinant CDVs carrying the corresponding knock out mutations. An additional virus with a C255S substitution was also included in the study to determine if the observed effect was dependent on one specific cysteine or caused by a disruption of the zinc finger structure (Fig. 1A). Both cysteine substitutions cause a silent point mutation in the P open reading frame and consequently do not result in an alteration of its protein sequence. All mutated V proteins were expressed at wild type levels in the viral context, and no alteration of P protein expression was observed (Fig. 1B). Kinetics of intracellular virus production revealed that the recombinant viruses replicated similar to their parents (Fig. 1C), while a slight delay was observed for the released virus (Fig. 1D).

Disruption of the zinc finger motif results in attenuation.

To assess the impact of these mutations on pathogenesis, groups of six to eight ferrets were infected intranasally with each of the mutants. We had previously reported that the V protein is important for lethal disease outcome and immunosuppression (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006), so the disease phenotype of the mutant viruses was compared to wild type and Vko viruses. Animals infected with either cysteine mutant experienced a mild disease similar to those infected with Vko and survived the infection, while all animals infected with the Y110H mutant developed severe rash, high fever, and substantial weight loss, and ultimately succumbed to the disease (Fig. 2A). The cell-associated viremia observed for this virus was similar to the wild type parent. In contrast, the cysteine mutants resulted in a hundredfold lower peak titer, which was still around

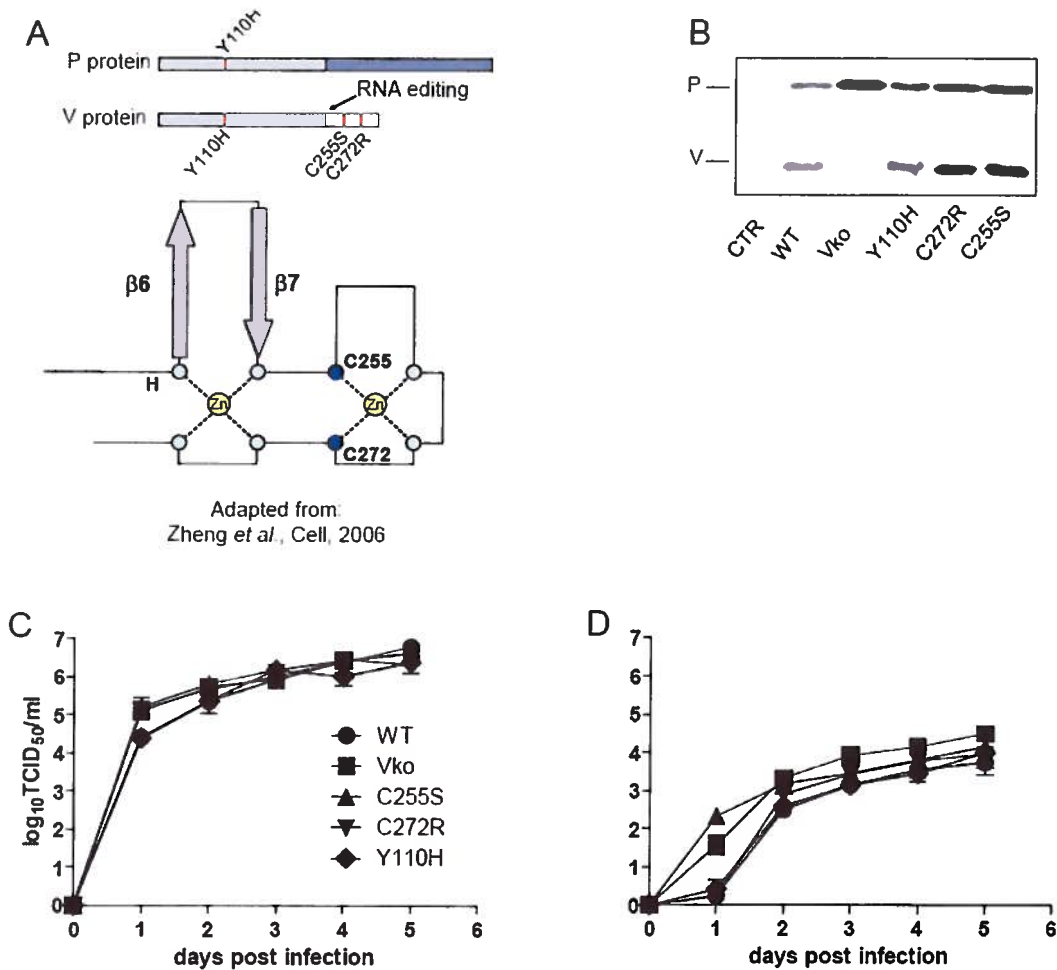


FIG. 1. In vitro characterization of P/V mutant viruses. (A) Schematic presentation of the P and V proteins and amino acid substitutions introduced. The P/V shared region is shown in gray and the V-unique region is shown in white. The arrow indicates the RNA editing site. Below the proteins is a schematic presentation of the V zinc binding domain adapted to illustrate the position of the conserved cysteines in the CDV V protein. (B) Western blot analysis of the P and V proteins expressed by the wild type 5804PeH, Vko, and the three V protein mutant viruses, Y110H, C272R, C255S using a rabbit anti-peptide hyperimmune serum against the common amino-terminal end of the P and V proteins. CTR, uninfected cell control. (C and D) Growth curve analysis of the five viruses on VerodogSLAMtag cells at a multiplicity of infection of 0.01. Data points represent averages of (C) cell-associated and (D) cell-free virus titers expressed as 50% tissue culture infectious doses (TCID₅₀). Error bars indicate standard deviations.

tenfold higher than Vko, and the viremia was cleared within three weeks (Fig. 2B). These results correlated with the percentage of infected PBMC determined by FACS analysis (data not shown). All viruses caused leukopenia within seven days after infection, which resolved rapidly in animals infected with Vko or the cysteine mutants, and progressively worsened in animals infected with lethal strains (Fig. 2C). Both lethal viruses resulted in severe inhibition of lymphocyte proliferation, an indicator of morbillivirus immune suppression, while Vko had no significant effect. In contrast, both cysteine mutants partially retained their ability to inhibit proliferation, temporarily reaching wild type levels (Fig. 2D).

Inhibition of IFN signaling does not correlate with virulence.

For MeV, the V protein-mediated inhibition of IFN signaling through interference with STAT1 and STAT2 translocation to the nucleus has been clearly demonstrated (Palosaari et al. 2003). To confirm that CDV V has the same activity, and to determine the phenotype of the different V protein mutants, we first evaluated the extent of interference with IFN signaling by luciferase reporter gene assay using plasmids carrying either repetitive sequences of the IFN-stimulated response element (ISRE) or the IFN γ activated sequence (GAS) as promoters. The wild type CDV V protein was as efficient as MeV V in blocking the induction of type I and II IFN-mediated transcription (Fig. 3A and B). In contrast, all the mutations analyzed resulted in a loss of the proteins' ability to interfere with type I IFN signaling (Fig. 3A). However, the attenuated cysteine mutants completely retained their type II IFN-inhibiting activity, whereas the lethal Y110H mutant lost this function as well (Fig. 3B).

To determine if the loss of IFN signaling inhibition was the result of the mutant proteins' inability to prevent STAT1 and STAT2 nuclear translocation, intracellular STAT1 and STAT2 distribution was assessed by immunofluorescence. Upon stimulation with IFN γ , the cysteine mutants were as efficient as the wild type CDV and MeV V proteins in blocking STAT1 nuclear translocation, while the Y110H mutant had completely lost this ability (Fig. 3C), thereby supporting the reporter gene findings. All

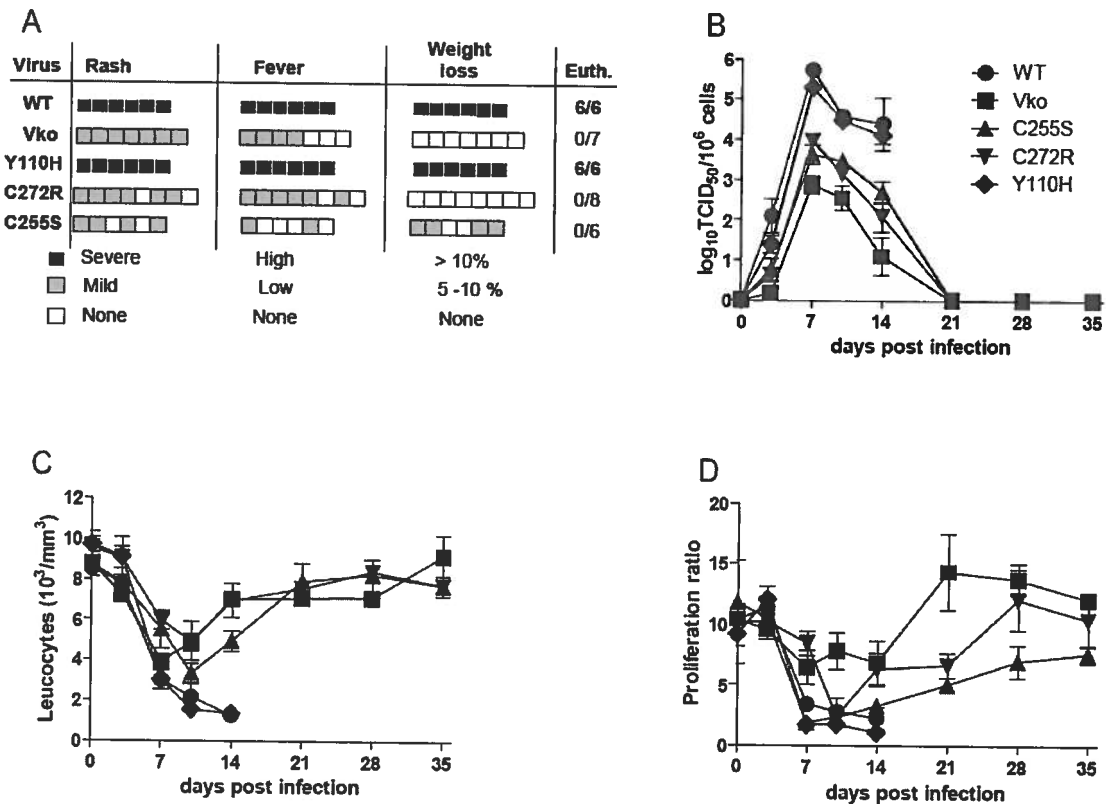


FIG. 2. Virulence assessment of P/V mutant viruses. Groups of six to eight animals were inoculated intranasally with 10^5 TCID₅₀ of the respective virus and observed for up to five weeks. (A) A color code system was used to assess the clinical disease severity. Each box represents one animal. For the rash, black color represents the most severe skin eruption, gray represents a mild rash, and white represents no rash. For the fever, black represents a body temperature of more than 39.2°C sustained for at least three days, gray represents a body temperature of more than 39.2°C sustained not more than two days, and white represents normal body temperature between 37.8°C and 38.9°C. For the weight loss, black represents a loss of more than 10% of initial body weight at the day of infection, gray represents a loss of more than 5% and not more than 10% of initial body weight, and white represents no weight loss measured. Number of animals euthanized for humane reasons is depicted in the last column. (B) Number of CDV infected cells per million PBMC. (C) Number of leukocytes per ml of blood. (D) Proliferation activity of PBMC isolated from animals infected with recombinant CDV. Error bars indicate the standard error. TCID₅₀, tissue culture infectious dose50.

V protein mutants were able to interfere with STAT2 nuclear translocation upon stimulation with IFN α (Fig. 3D), confirming previously published results that the tyrosine at position 110 in the MeV V protein is only involved in STAT1 retention (Devaux et al. 2007; Ramachandran, Parisien, and Horvath 2008). However, the mutated V proteins seemed to be less efficient, which may partially explain the observed type I IFN-mediated reporter gene transcription. In light of the animal studies, where the Y110H mutant was found to retain wild type virulence and mortality, these results demonstrate that neither V protein-mediated interference with STAT1/2 nuclear translocation nor transcriptional activation of the ISRE and GAS promoters correlate with virulence.

The Y110H mutant fails to control type I IFN responses *in vivo*.

Lethal CDV infections in ferrets are characterized by a complete lack of cytokine responses (Svitek and von Messling 2007). To determine if the loss of type I and II IFN signaling interference observed *in vitro* for the Y110H mutant resulted in the induction of an IFN response *in vivo*, we analyzed its IFN mRNA profile in PBMC three days after infection. Consistent with our previous findings, ferrets infected with the parental strain were unable to upregulate type I and II IFN mRNAs (Fig. 4A-C). In contrast, the Y110H mutant resulted in a substantial induction of IFN α and IFN β transcription (Fig. 4A and 4B), while still inhibiting IFN γ mRNA production (Fig. 4C). Animals infected with the cysteine mutant virus C255S, which survived the diseases, mounted an effective type I and II IFN response.

V-unique region-mediated control of the Mx1 promoter is essential for virulence.

To identify the interaction between the V protein and the innate immune response that determines disease outcome, the interference of the V protein at different stages of the type I IFN pathway was characterized in more detail. To assess the level of activation inhibition of RNA sensors like mda-5 or RIG-I, the V protein mutants were co-transfected with luciferase reporter gene plasmids containing the IFN β promoter (Kochs, Garcia-Sastre, and Martinez-Sobrido 2007). The inhibition of IFN β induction upon stimulation

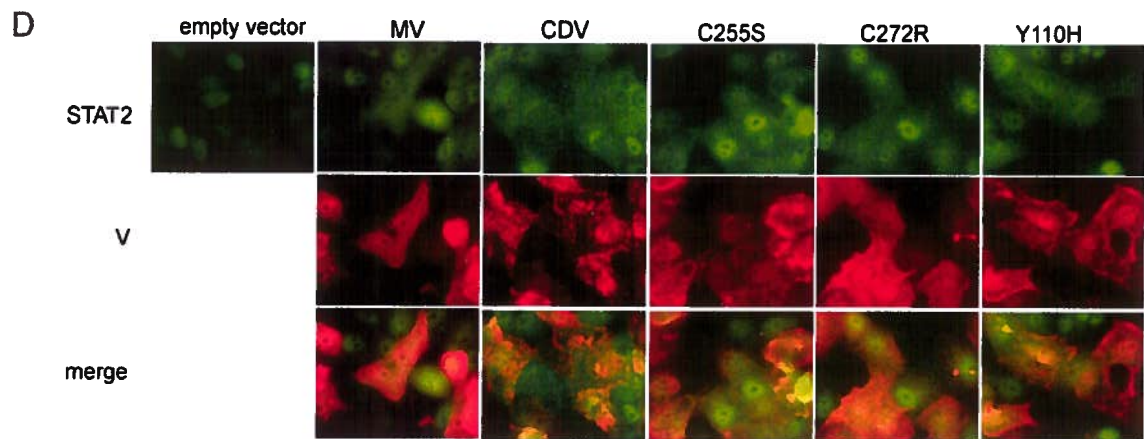
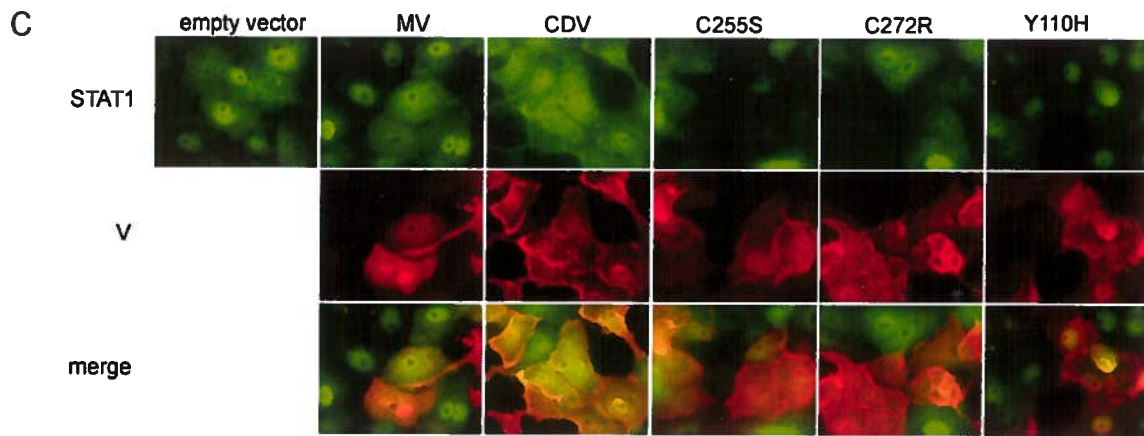
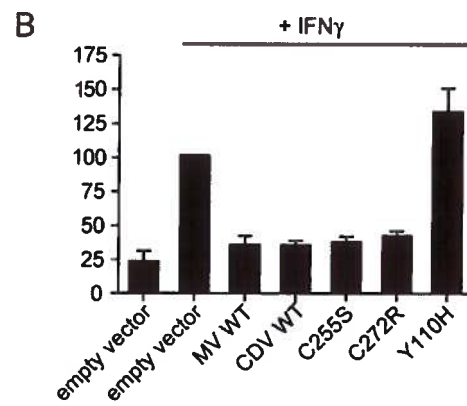
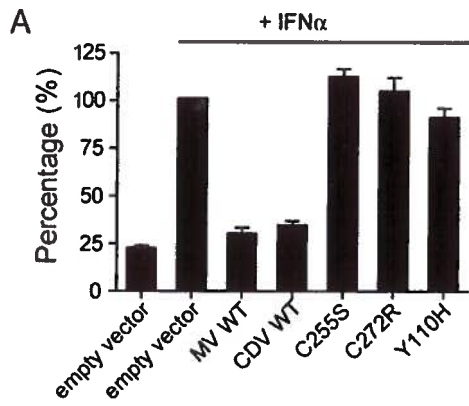


FIG.3 The V-unique region of CDV V protein is not required for IFN signaling blockade. Vero cells were transfected with an **(A)** ISRE-luciferase reporter gene plasmid or a **(B)** GAS-luciferase reporter gene plasmid and either an empty vector or a vector expressing the MeV V protein (MV WT), the CDV V protein (CDV WT), or the mutant CDV V proteins C255S, C272R, and Y110H. Cells were treated with 1000 U of IFN- α per ml or 10 ng of IFN γ per ml for 16 h prior to lysis and luciferase activity measurement. Luciferase activity of cells transfected with an empty vector was set to 100 %. Each bar represents the average of three experiments done in triplicates, and error bars indicate the standard error (SEM). Immunofluorescence assay of **(C)** STAT1 and **(D)** STAT2 cellular distribution. Vero cells were transfected with an empty vector or a vector expressing the different V protein constructs, and were untreated or treated with either 10 ng/ml IFN γ **(C)** or 1000U/ml IFN α **(D)** for 2 hours, 40 hours after the transfection. The cells were then fixed, permeabilized, and stained with antisera against the V protein (red), and STAT1 or STAT2 (green).

with poly inosine:cytidine (I:C) or Sendai virus (data not shown) was generally modest, reaching only 50% for the wild type MeV and CDV V proteins and mutant V proteins (Fig. 5A), suggesting that the changes had no effect on the activation of the IFN β promoter.

To investigate the possibility of differential regulation of downstream ISGs, we investigated the transcriptional activation of ISG54 and Mx1 in a similar assay using luciferase reporter gene plasmids carrying the natural promoters of the respective gene (Kochs, Garcia-Sastre, and Martinez-Sobrido 2007). Despite their inability to interfere with ISRE-mediated transcription, all mutants were able to block ISG54, a key indicator of innate immune activation, which can be induced by type I IFNs and IRF-3, albeit to a lesser extent than wild type proteins (Fig. 5B). For the lethal Y110H mutant, this effect was even more pronounced in the case of Mx1 transcription, which is known to specifically inhibit RNA virus replication (Schneider-Schaulies et al. 1994), where it retained wild type suppressive activity (Fig. 5C). In contrast, the cysteine mutants were only able to partially block transcription of Mx1. This observation was reproduced in MDCK cells where the cysteine mutants completely lost their inhibitory capacity compared to wild type and Y110H V proteins (data not shown). Consistent with our *in vitro* findings, animals infected with the C255S mutant expressed higher levels of Mx1 than those infected with lethal viruses (Fig. 5D).

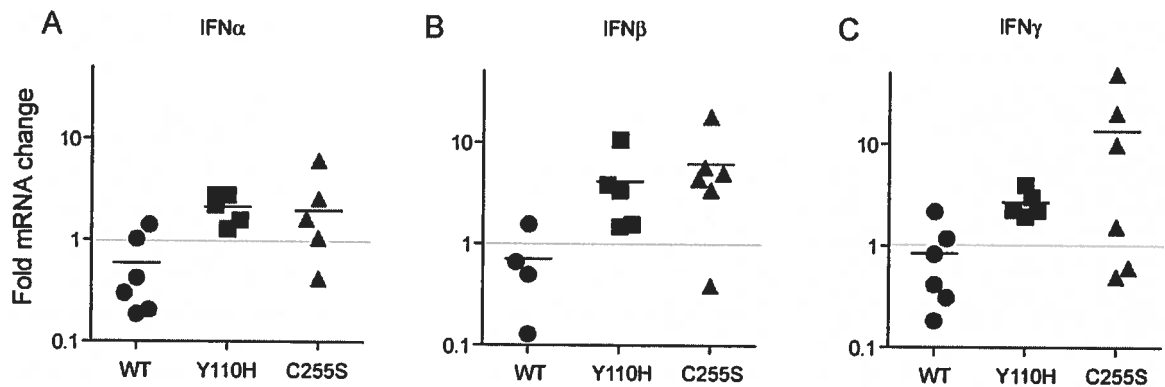


FIG.4 The Y110H mutant CDV fails to control the type I IFN response in PBMC. Semi-quantitative analysis of IFN α (A), IFN β (B), and IFN γ (C) mRNA expression in PBMC of animals infected with the parental strain 5804PeH, the tyrosine mutant Y110H or the cysteine C255S mutant virus. RNA was isolated from PBMC on day 3 post-infection, and semi-quantitative real-time PCR assays were conducted using primers specific for the respective gene. The fold change ratios between experimental and control samples for each gene were calculated and normalized against GAPDH using the $\Delta\Delta C_t$ method. The black line indicates the geometric mean.

DISCUSSION

Morbillivirus V protein-mediated interference with innate immune activation has been the subject of intense study over the last years. It is now clear that V inhibits the nuclear translocation of STAT1 and 2 thereby interfering with type I and II IFN-mediated transcriptional activation (Palosaari et al. 2003). Naturally occurring mutations and systematic screening have led to the identification of residue Y110 as essential for STAT1 interactions (Devaux et al. 2007; Bankamp et al. 2008), and have highlighted the importance of the zinc finger motif in the V unique region for STAT2 interference (Ramachandran, Parisien, and Horvath 2008; Caignard et al. 2009). Independent of these mechanistic analyses, the importance of the V unique region for virulence has been demonstrated in a variety of animal models (Valsamakis et al. 1998; von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006; Devaux et al. 2008; Fukuhara et al. 2002). In this study, we set out to determine the contribution of the previously identified key residues and motifs to virulence and innate immune response control using a lethal CDV strain in ferrets.

Why does type I IFN expression not prevent immune suppression and death?

Type I IFNs are important activators of the innate immune response, and essential for the control of viral infections. It was thus unexpected that a virus unable to block STAT1 nuclear translocation and type I IFN transcription remained fully virulent. The presence of type I IFNs at the same levels as found in animals infected with non-lethal viruses indicates that the interference with the cells' ability to appropriately respond to IFNs is more important for morbillivirus virulence than its ability to induce the production of IFNs. Binding of type I IFNs to their cellular receptors IFNAR1 and 2 will initiate a signaling cascade that ultimately leads to phosphorylation of tyrosine residues in STAT molecules. The best characterized pathway involves the binding of phosphorylated STAT1/2 molecules to IRF9, which leads to the formation of ISGF3 and subsequent transcription of ISRE controlled genes (van Boxel-Dezaire, Rani, and Stark 2006). However, there is increasing evidence that STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 and STAT6 homodimers, as well as STAT1/3, STAT1/4, STAT1/5, STAT2/3 and STAT5/6

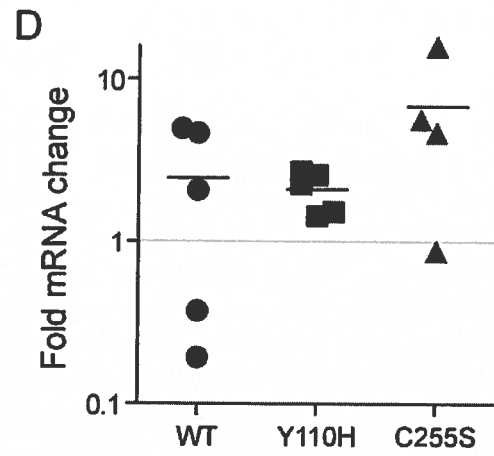
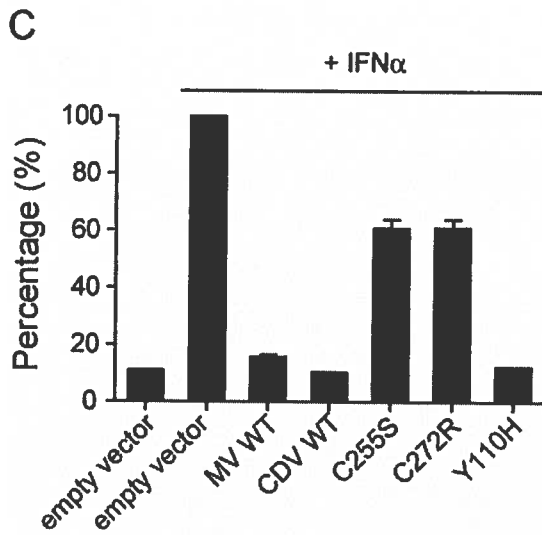
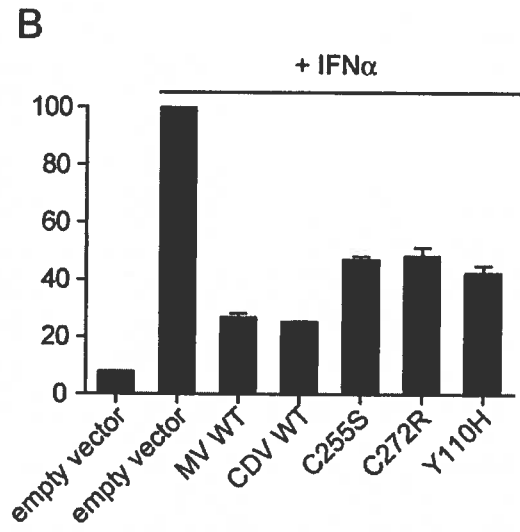
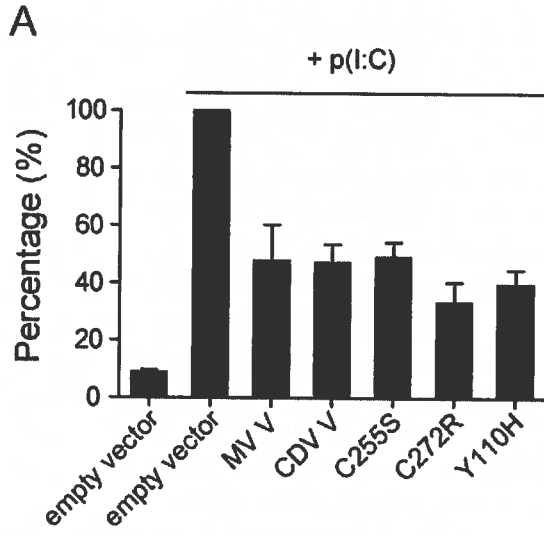


FIG.5 The V-unique region of CDV V protein is required for Mx1 promoter activation blockade. **(A)** Vero cells were transfected with an IFN β promoter-, **(B)** ISG54 promoter-, or **(C)** Mx1 promoter-controlled luciferase reporter gene plasmid and either an empty vector or a vector expressing the MeV V protein (MV WT), the CDV V protein (CDV WT), or the mutant CDV V proteins C255S, C272R, and Y110H. Cells were treated with 1000 U of IFN- α per ml or 1 μ g of poly (I:C) per ml for 16 h prior to lysis and luciferase activity measurement. Luciferase activity of cells transfected with an empty vector was set to 100%. Data represent three independent triplicate experiments. Error bars represent the standard error (SEM). Semi-quantitative analysis of Mx1 mRNA expression was evaluated in PBMC **(D)** of animals infected with the parental strain 5804PeH, the tyrosine mutant Y110H or the cysteine C255S mutant virus. RNA was isolated from PBMC on day 3 post-infection, and semi-quantitative real-time PCR assays were performed using primers specific for the Mx1 gene. The fold change ratios between experimental and control samples for each gene were calculated and normalized against GAPDH using the $\Delta\Delta$ Ct method. The black line indicates the geometric mean.

heterodimers also engage in signal transduction (Platanias 2005). Furthermore, it was recently demonstrated that, in the presence of p38 inhibitors, ISGs could not be induced upon stimulation with IFN in an ISRE-dependent manner (Uddin et al. 1999), indicating that STAT-independent signaling via p38 and mitogen-activated protein kinases (MAPK) contributes importantly to IFN-mediated transcription initiation (Platanias 2005). Our results thus provide first evidence for morbillivirus V protein interference with additional elements of the IFN signaling pathways and suggest that control of a STAT1/2-independent pathway may be essential for virulence.

Morbilliviruses differentially control transcription of ISGs.

Since the lack of ISRE-mediated transcription inhibition of the respective V protein mutants had no influence on their ability to control ISG54 and Mx1 transcription, it is likely that the V protein interacts with additional cellular effectors. Even though we did not further investigate the pathways involved, the striking correlation between Mx1 transcription control and survival points to one of its other promoter elements. In addition to ISREs, the Mx1 promoter contains binding sites for NF κ B, the ubiquitous transcription factor Sp1, Il6 response elements, and GAAA stretches (Assiri and Ott 2007; Gerardin et al. 2004; Thomas et al. 2006). In the ovine, human, mouse and bovine Mx1 promoter region, progesterone and oestrogen receptor and AP-1 transcription binding site are also found (Assiri and Ott 2007), and a regulatory role for IL6 in maintaining Mx1 gene expression has been demonstrated (Gerardin et al. 2004). It is thus likely that V interferes with one or several of these signaling pathways.

Mx expression is needed to control morbillivirus infections.

The role of Mx in the control of influenza and other segmented negative-strand RNA viruses has been extensively characterized *in vitro* and *in vivo* (Arnheiter et al. 1990; Haller, Staeheli, and Kochs 2007). In mice, the presence of a functional Mx1 gene confers resistance to lethal challenge with mouse-adapted or highly pathogenic influenza A virus strains (Tumpey et al. 2007; Grimm et al. 2007), and IFN-induced Mx expression

leads to reduced morbidity in ferrets infected with seasonal influenza A (Kugel et al. 2009). Here, we provide compelling evidence that Mx has a similar function in the context of morbillivirus and possibly other non-segmented negative-strand RNA virus infections. It has been shown that Mx inhibits primary MeV transcription (Schneider-Schaulies et al. 1994), and an Mx-mediated interference with the nuclear import of nucleocapsids has been demonstrated for segmented negative-strand RNA viruses (Kochs and Haller 1999; Kochs et al. 2002). However, the exact mechanism of action and interacting viral proteins during cytoplasmatic replication remain to be characterized.

MATERIALS AND METHODS

Cells and viruses.

VerodogSLAMtag (von Messling et al. 2003), Vero cells (ATCC CCL-81) and 293 cells were maintained in Duplecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) with 5% foetal bovine serum (Invitrogen). CDV strains 5804PeGFPH (von Messling, Milosevic, and Cattaneo 2004) and 5804PeGFPH Vko (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006) and all recombinant viruses produced were grown in VerodogSLAMtag cells.

Generation of recombinant viruses.

The mutations resulting in the amino acid substitution Y110H, C255S and C272R (Fig. 1A) were introduced in a subcloned P gene fragment flanked by the unique restriction sites *KpnI* and *SacII*. The fragment was then transferred into the 5804PeH genomic cDNA containing the enhanced green fluorescent protein (eGFP) in an additional transcriptional unit between the hemagglutinin (H) and polymerase (L) genes. Recombinant viruses were recovered using the reverse genetics system described in (Anderson and von Messling 2008) and expanded on VerodogSLAMtag cells. Briefly, 293 cells were transfected in a 6-well plate with plasmids expressing the MV nucleocapsid (N) (0.5 µg), phospho (P) (0.1 µg)-, and polymerase (L) (0.5 µg) proteins and the T7 polymerase (0.7 µg) together with the respective full-length CDV genomic plasmid (4µg) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Three days later, cells were collected and overlaid onto 3×10^6 VerodogSLAMtag cells in a 10 cm dish. Two to three individual syncytia were selected and transferred on fresh VerodogSLAMtag cells. Growth kinetics were performed on VerodogSLAMtag cells at 32°C using a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 50 % tissue-culture infectious doses (TCID₅₀). Supernatant and cell-associated virus were quantified by limited dilution method daily for five days.

Animal experiments and assessment of virulence.

All animal experiments were approved by the INRS-Institut Armand-Frappier Institutional Animal Care and Use Committee. Groups of at least six CDV-seronegative male ferrets (*Mustela putorius furo*) were infected intranasally with 10^5 TCID₅₀ of each virus as described previously (von Messling et al. 2003). Rash, fever, and weight loss were assessed daily and graded on a 0-1-2 scale, with 0 representing only minimal deviations of the physiologic state. A localized or mild generalized rash was graded as 1, and severe generalized rash and peripheral oedema were scored as 2. For fever, a body temperature above 39.2 °C for no more than two days was considered 1, and for three days or more 2. Between 5 and 10% initial body weight loss was graded as 1, and more than 10% as 2. The total white blood cell count was determined from fresh heparinized blood diluted 1:100 in water containing 3% acetic acid. For the lymphocyte proliferation activity, 3×10^5 PBMC were seeded in a round-bottom 96-well plate in RPMI 10% FBS and either left untreated or stimulated with 2 µg/ml of PHA for 24h. Proliferation was measured by BrDU incorporation (Roche) following manufacturer's instructions. The viremia was quantified as outlined before (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006).

Luciferase reporter gene assays

The 5804P V gene was cloned into the mammalian expression plasmid pCG, and the respective mutations were introduced by site-directed mutagenesis. For each V protein mutant, triplicate wells of Vero cells seeded in black 96 well plates (Greiner Bio-One) were transfected with 0.1 µg of the respective V gene expression plasmid or empty vector control, 0.1 µg of either plasmid p(9-27)4tkΔ(-39)lucifer containing four tandem copies of the 9-27 ISRE (King and Goodbourn 1998) to assess type I IFN-mediated transcriptional activation, pGAS-luc (Stratagene) for IFN γ -mediated activation, p125-luc (Kochs, Garcia-Sastre, and Martinez-Sobrido 2007) for IFN β promoter activation, and Mx1-luc (Kochs, Garcia-Sastre, and Martinez-Sobrido 2007) or ISG54-luc (gift from Dr. David E. Levy) for natural ISG promoter activation, and 0.05 µg of phRG-TK (Promega) as internal control for the transfection efficiency. After 24 h, the transfection medium was

replaced with fresh medium supplemented with 1000 U/ml of universal type I IFN α (PBL Interferon Source), or 10 ng/ml of human IFN γ (Cedarlane), or 1 μ g/ml of poly I:C (Sigma), respectively. Cells were harvested 16 h later in Dual-Glo luciferase assay lysis buffer (Promega), and luciferase activity was measured using a luminometer (Luminoskan Ascent, Thermo). Values for firefly luciferase activity were normalized to *Renilla* luciferase activity, and results were expressed as a percentage of the empty vector control stimulated value.

Antibodies and indirect immunofluorescence.

CDV V was detected with a polyclonal rabbit anti-peptide antiserum raised against the keyhole limpet hemagglutinin-coupled peptide CKDDPEMQTRVWYATPSQDLK (Sheldon Biotechnology Centre, McGill University) corresponding to amino acids 279 to 299. MeV V was stained with a rabbit anti-peptide serum raised against amino acids 18-40 in the P/V shared amino-terminus, and STAT1 and STAT2 were detected using commercially available monoclonal antibodies (C-111 and A-7, respectively, Santa Cruz Biotechnology). FITC-conjugated donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) and Alexa Fluor[®] 568-conjugated goat anti-rabbit (Invitrogen) antisera were used as secondary antibodies.

For immunofluorescence analysis, Vero cells were grown to 80% confluence in Lab-Tek II 8-Chamber Slide System (Nalgene Nunc International) and transfected with 0.5 μ g of empty vector or V-expressing plasmids using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instruction. At 40 h post transfection, cells were stimulated with 1000 U/ml of IFN α or 10 ng/ml of IFN γ for 2 h. Cells were then washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, and permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS for 10 min at 4°C. Samples were blocked with 10% foetal bovine serum followed by sequential incubation with the respective primary and secondary antibodies for 45 min on ice. Images were obtained using a Nikon Eclipse 800 microscope. Only slides where transfection efficiency reached at least 30% were considered.

Western blot analysis.

Vero cells were plated at 5×10^5 per well in a 6-well plate, infected with the respective viruses at a MOI of 0.1, and incubated at 37°C for 48 h. For the analysis of viral protein expression, Vero cells were lysed in RIPA buffer (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl), and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by transfer on polyvinyl difluoride membranes (Millipore Corporation). P and V proteins were detected using the CDV P/V-specific rabbit anti-peptide antiserum against the P/V shared domain (von Messling, Svitek, and Cattaneo 2006) in combination with a peroxidase-coupled donkey anti-rabbit secondary antiserum, and visualized using ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) and the Image Station 2000MM (Kodak).

IFN and Mx1 mRNA transcription analysis.

Ferret Mx1 gene was cloned and PCR primers were designed as previously described (Svitek and von Messling 2007). Relative IFN α , β , γ and Mx1 mRNA transcription levels were analysed by semiquantitative real-time PCR analysis as described previously (Svitek and von Messling 2007). Briefly, mRNA was isolated from PBMCs of infected ferrets using the RNeasy Mini kit from QIAGEN. Ten ng of RNA together with specific primers against ferret IFN α , β , γ or Mx1 was mixed with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR master mix (QIAGEN) following the manufacturer's instruction. GAPDH mRNA transcription was used as internal control, and mRNA transcription levels were normalized to D0 values. Relative change in transcription levels was calculated using the formula $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ to evaluate fold transcription (Svitek et al. 2008; Schmittgen et al. 2000).

ACKNOWLEDGEMENTS

The plasmids pMx1p-Luc, and p125-Luc were a kind gift of Dr. Georg Kochs at the Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Freiburg, Germany. The plasmids p(9-27)4tkΔ(-39)lucifer and pISG54-Luc, were a kind gift of Dr. David E. Levy at the New York University Langone Medical Center. We thank Dr. Karola Obojes for help with the ferret Mx1 gene cloning. We also thank all laboratory members for continuing support and lively discussions. This work was supported by CIHR grant MOP66989 to V.v.M., NIH grant R01 AI063476 to R.C., and an Armand-Frappier Foundation fellowship to N.S.

REFERENCES

- Abramson, O., R. Dagan, A. Tal, and S. Sofer. 1995. Severe complications of measles requiring intensive care in infants and young children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 149 (11):1237-40.
- Anderson, D. E., and 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):10510-8.
- Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, and R. E. Randall. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49):17264-9.
- Arnheiter, H., S. Skuntz, M. Noteborn, S. Chang, and E. Meier. 1990. Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* 62 (1):51-61.
- Assiri, A. M., and T. L. Ott. 2007. Cloning and characterizing of the ovine MX1 gene promoter/enhancer region. *Dev Comp Immunol* 31 (8):847-57.
- Bankamp, B., J. M. Fontana, W. J. Bellini, and P. A. Rota. 2008. Adaptation to cell culture induces functional differences in measles virus proteins. *Virol J* 5:129.
- Caignard, G., M. Bourai, Y. Jacob, F. Tangy, and P. O. Vidalain. 2009. Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* 383 (1):112-20.
- Cattaneo, R., K. Kaelin, K. Baczko, and M. A. Billeter. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56 (5):759-64.
- Childs, K. S., J. Andrejeva, R. E. Randall, and S. Goodbourn. 2008. Mechanism of mda-5 inhibition by paramyxovirus V proteins. *J Virol*.
- Childs, K., N. Stock, C. Ross, J. Andrejeva, L. Hilton, M. Skinner, R. Randall, and S. Goodbourn. 2007. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology* 359 (1):190-200.
- Devaux, P., G. Hodge, M. B. McChesney, and R. Cattaneo. 2008. Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *J Virol* 82 (11):5359-67.

- Devaux, P., V. von Messling, W. Songsunghong, C. Springfield, and R. Cattaneo. 2007. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* 360 (1):72-83.
- Dittmann, J., S. Stertz, D. Grimm, J. Steel, A. Garcia-Sastre, O. Haller, and G. Kochs. 2008. Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J Virol* 82 (7):3624-31.
- Dollimore, N., F. Cutts, F. N. Binka, D. A. Ross, S. S. Morris, and P. G. Smith. 1997. Measles incidence, case fatality, and delayed mortality in children with or without vitamin A supplementation in rural Ghana. *Am J Epidemiol* 146 (8):646-54.
- Fukuhara, N., C. Huang, K. Kiyotani, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2002. Mutational analysis of the Sendai virus V protein: importance of the conserved residues for Zn binding, virus pathogenesis, and efficient RNA editing. *Virology* 299 (2):172-81.
- Gerardin, J. A., E. A. Baise, G. A. Pire, M. P. Leroy, and D. J. Desmecht. 2004. Genomic structure, organisation, and promoter analysis of the bovine (*Bos taurus*) Mx1 gene. *Gene* 326:67-75.
- Grimm, D., P. Staeheli, M. Hufbauer, I. Koerner, L. Martinez-Sobrido, A. Solorzano, A. Garcia-Sastre, O. Haller, and G. Kochs. 2007. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (16):6806-11.
- Haller, O., P. Staeheli, and G. Kochs. 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89 (6-7):812-8.
- Kato, A., K. Kiyotani, Y. Sakai, T. Yoshida, and Y. Nagai. 1997. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J* 16 (3):578-87.
- King, P., and S. Goodbourn. 1998. STAT1 is inactivated by a caspase. *J Biol Chem* 273 (15):8699-704.
- Kochs, G., A. Garcia-Sastre, and L. Martinez-Sobrido. 2007. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 81 (13):7011-21.
- Kochs, G., and O. Haller. 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (5):2082-6.

- Kochs, G., C. Janzen, H. Hohenberg, and O. Haller. 2002. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (5):3153-8.
- Kugel, D., G. Kochs, K. Obojes, J. Roth, G. P. Kobinger, D. Kobasa, O. Haller, P. Staeheli, and V. von Messling. 2009. Intranasal administration of alpha interferon reduces seasonal influenza A virus morbidity in ferrets. *J Virol* 83 (8):3843-51.
- Lamb, R. A., Kolakofsky, D. 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields virology, 4th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.*:p. 1305-1340. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, and D. E. Griffin (ed.).
- Li, T., X. Chen, K. C. Garbutt, P. Zhou, and N. Zheng. 2006. Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell* 124 (1):105-17.
- Liston, P., and D. J. Briedis. 1994. Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 198 (1):399-404.
- Moss, W. J., and D. E. Griffin. 2006. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4 (12):900-8.
- Ohno, S., N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi, and Y. Yanagi. 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol* 85 (Pt 10):2991-9.
- Palosaari, H., J. P. Parisien, J. J. Rodriguez, C. M. Ulane, and C. M. Horvath. 2003. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77 (13):7635-44.
- Paterson, R. G., G. P. Leser, M. A. Shaughnessy, and R. A. Lamb. 1995. The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208 (1):121-31.
- Platanias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5 (5):375-86.
- Ramachandran, A., J. P. Parisien, and C. M. Horvath. 2008. STAT2 is a primary target for measles virus V protein-mediated alpha/beta interferon signaling inhibition. *J Virol* 82 (17):8330-8.
- Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer, and M. W. Reed. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study

mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem* 285 (2):194-204.

Schneider-Schaulies, S., and J. Schneider-Schaulies. 2009. Measles Virus-Induced Immunosuppression. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:243-269.

Schneider-Schaulies, S., J. Schneider-Schaulies, A. Schuster, M. Bayer, J. Pavlovic, and V. ter Meulen. 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol* 68 (11):6910-7.

Schnorr, J. J., S. Schneider-Schaulies, A. Simon-Jodicke, J. Pavlovic, M. A. Horisberger, and V. ter Meulen. 1993. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol* 67 (8):4760-8.

Schwemmler, M., K. C. Weining, M. F. Richter, B. Schumacher, and P. Staeheli. 1995. Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein. *Virology* 206 (1):545-54.

Staeheli, P., O. Haller, W. Boll, J. Lindenmann, and C. Weissmann. 1986. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 44 (1):147-58.

Svitek, N., P. A. Rudd, K. Obojes, S. Pillet, and V. von Messling. 2008. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* 376 (1):53-9.

Svitek, N., and V. von Messling. 2007. Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology* 362 (2):404-10.

Thomas, A. V., M. Palm, A. D. Broers, H. Zezafoun, and D. J. Desmecht. 2006. Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics* 58 (5-6):383-9.

Thomas, S. M., R. A. Lamb, and R. G. Paterson. 1988. Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5. *Cell* 54 (6):891-902.

Tumpey, T. M., K. J. Szretter, N. Van Hoeven, J. M. Katz, G. Kochs, O. Haller, A. Garcia-Sastre, and P. Staeheli. 2007. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses. *J Virol* 81 (19):10818-21.

- Uddin, S., B. Majchrzak, J. Woodson, P. Arunkumar, Y. Alsayed, R. Pine, P. R. Young, E. N. Fish, and L. C. Platanius. 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem* 274 (42):30127-31.
- Valsamakis, A., H. Schneider, P. G. Auwaerter, H. Kaneshima, M. A. Billeter, and D. E. Griffin. 1998. Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J Virol* 72 (10):7754-61.
- van Boxel-Dezaire, A. H., M. R. Rani, and G. R. Stark. 2006. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 25 (3):361-72.
- von Messling, V., D. Milosevic, and 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. Springfield, P. Devaux, and R. Cattaneo. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77 (23):12579-91.
- von Messling, V., N. Svitek, and R. Cattaneo. 2006. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol* 80 (12):6084-92.
- von Pirquet, C. E. 1908. Das verhalten der kutanen tuberkulinreaktion wahrend der masern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 30:1297-1300.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Ce projet de doctorat avait pour objectif d'étudier la contribution de la protéine V à l'immunosuppression causée par le CDV. Nous avons observé que l'expression de la protéine V durant l'infection est essentielle pour la virulence et empêche l'individu infecté de monter une réponse immunitaire efficace, notamment en bloquant la synthèse d'ARNm de cytokines impliquées dans différentes voies du système immunitaire. Par ailleurs, nous avons démontré que c'est bien le domaine C-terminal qui est impliqué dans la pathogenèse. En caractérisant l'activité de V au niveau cellulaire, nous en sommes venus à l'évidence que la létalité du virus ne corrèle pas avec la capacité de la protéine V à inhiber la translocation nucléaire des molécules STAT1 et STAT2 suite à une stimulation par les IFN. Par contre, l'incapacité des protéines V arborant une mutation dans une des cystéines conservées à inhiber la transduction cellulaire menant à l'activation du promoteur de Mx1 nous suggère que V inhibe spécifiquement la synthèse de certains ISG et que ceci corrèle avec la sévérité de la maladie.

L'inhibition d'une réponse de cytokines empêche la reconnaissance et l'élimination appropriées de l'infection

V joue un rôle clé dans l'inhibition de la réponse antivirale innée, ce qui permet au virus de se propager librement en l'absence de protéines antivirales intracellulaires (Fontana, Bankamp, et Rota 2008). Un effet important de cette inhibition de la synthèse d'IFN est l'incapacité des cellules infectées de communiquer leur état d'infection aux cellules avoisinantes non-infectées. Ceci a pour conséquence de laisser le champ libre aux nouvelles particules virales pour procéder à l'infection de nouvelles cellules. De plus, en l'absence d'IFN, les cellules ne peuvent pas établir une réponse adaptative convenable puisque l'IFN joue un rôle clé dans la synthèse d'autres cytokines importantes pour une réponse cellulaire et humorale ainsi que pour la synthèse des molécules des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, essentielles pour la présentation antigénique (Beineke et al. 2009).

Le virus peut ainsi librement infecter les populations lymphocytaires, contribuant à leur mort et à une diminution plus drastique de la réponse immunitaire. La propagation du virus permet aux glycoprotéines virales d'exercer leurs effets sur les lymphocytes. Les cellules infectées libèrent la nucléoprotéine qui contribue à l'immunosuppression en se liant aux cellules B, inhibant ainsi la prolifération de ces cellules et la synthèse d'anticorps (Laine et al. 2005; Marie et al. 2001; Ravel et al. 1997). Par ailleurs, l'observation de la libération d'un facteur soluble par les cellules infectées par le MV suggère que le phénomène se produit aussi avec le CDV, contribuant ainsi à l'immunosuppression générale due à l'infection (Fujinami et al. 1998).

Nous observons une inhibition quasi-totale de l'induction de cytokines dans les PBMCs d'animaux infectés avec le virus de type sauvage. Les mécanismes de cette inhibition sous-jacente à l'infection peuvent être expliqués à différents niveaux, dont l'inhibition directe de la transcription de cytokines par la protéine V et aussi une inhibition indirecte due à la destruction par le virus, des cellules immunitaires impliquées dans la synthèse de cytokines.

Il est intéressant de noter qu'il existe d'autres virus à infection systémique qui empêchent l'hôte de monter une réponse immunitaire spécialement en inhibant la synthèse de cytokines. Par exemple, bien qu'il ait été démontré que les filovirus comme Ebola et Marburg régulent à la hausse de façon dérégulée la synthèse de cytokines en début d'infection, ces derniers possédant la capacité d'inhiber la synthèse de cytokines en fin d'infection, entre autres grâce aux protéines VP35 et VP24 (Mohamadzadeh, Chen, et Schmaljohn 2007). En effet, ces virus augmentent la synthèse de cytokines proinflammatoires par les macrophages, par contre inhibent la synthèse d'IFN par les cellules dendritiques et inhibent l'activation des cellules T par les cellules dendritiques (Bosio et al. 2003). De plus, une étude révèle que les cellules dendritiques infectées avec Ebola ne peuvent plus, en plus de l'IFN- α , synthétiser les cytokines proinflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, les cytokines de type T_H1 IL-10 ou de type T_H2 IL-2, IL-12 et IFN- γ (Mahanty et al. 2003). Des études menées chez les macaques infectés avec le SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) et qui ne développent pas une immunodéficiences ne démontre

pas une synthèse accrue de cytokines alors que les macaques qui développent le syndrome d'immunodéficience acquise synthétisent à la hausse l'ISG oligoadénylate synthétase (OAS) et la chimiokine CXCL10 (Dunham et al. 2006; Durudas et al. 2009). Selon ces études, la résistance au développement de l'immunodéficience chez les macaques ne corrèle et ne s'explique pas avec une synthèse à la hausse de cytokines et une adaptation du virus avec son hôte naturel au court de l'évolution pourrait expliquer ce phénomène.

Les infections localisées, comme celles causées par les virus du SRAS ou de la grippe au niveau des voies respiratoires, vont pour leur part occasionner une forte synthèse de cytokines, d'où l'appellation « tempête de cytokines (*cytokine storm*) » chez les patients hospitalisés (Chan et al. 2005; Huang et al. 2005; Ng et al. 2006; Perrone et al. 2008). Par ailleurs, lors d'une infection par des souches virulentes du virus de l'influenza, les furets sont limités dans leur synthèse d'IFN de type I et II ainsi que d'IL-8 comparativement aux souches atténuées (Svitek et al. 2008). Par contre, une production plus importante d'IL-6 est observée avec les souches pathogènes.

L'inhibition de la prolifération lymphocytaire ne nécessite pas la présence du motif doigt de zinc dans la protéine V

On sait que les infections morbillivirales conduisent à l'inhibition de la prolifération lymphocytaire chez les hôtes infectés (Heaney, Barrett, et Cosby 2002; Heaney, Cosby, et Barrett 2005; Niewiesk et al. 1997; von Messling et al. 2003). Cette inhibition peut être expliquée, entre autres, par l'action des glycoprotéines de surface, de la nucléoprotéine, et de la relâche d'un facteur soluble. En comparant l'inhibition de la prolifération causée par les souches sauvage et Vko avec des virus portant une mutation dans l'une des cystéines conservées, nous avons observé que ces derniers maintiennent partiellement leurs propriétés immunosuppressives même s'ils démontrent un phénotype atténué. Nos observations *in vitro* ont démontré que les protéines V avec des cystéines mutées maintiennent leur capacité à interférer avec la translocation des molécules STAT.

Il est par conséquent probable qu'elles inhibent aussi, du moins partiellement, la production des cytokines qui font partie des voies d'activation de la prolifération (van Boxel-Dezaire, Rani, et Stark 2006).

De plus, cette inhibition partielle permet au virus de se répliquer à des niveaux plus élevés que le CDV-Vko, menant à l'augmentation de l'expression d'autres protéines virales, notamment les glycoprotéines. Des études antérieures ont démontré une forte corrélation entre la présence de l'enveloppe virale et l'inhibition de la prolifération (Schlender et al. 1996; Weidmann, Maisner et al. 2000). La virémie beaucoup plus faible observée chez les animaux infectés avec le CDV-Vko pourrait mener à une concentration de glycoprotéines inférieure au seuil nécessaire pour induire un effet sur la prolifération lymphocytaire. L'inhibition de la prolifération lymphocytaire par d'autres virus immunosuppresseurs, notamment le VIH grâce à la protéine Vpr, a été observée (Ayyavoo et al. 1997). En effet, la protéine Vpr induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. De plus, le VIH code pour un facteur de virulence, la protéine Nef, qui a la propriété d'interférer avec l'établissement de la synapse immunologique et régule à la baisse la molécule CD3 de la surface des cellules T (Haller et al. 2006; Thoulouze et al. 2006; Geyer, Fackler, et Peterlin 2001). Ceci a pour conséquence l'inhibition des cellules T.

La protéine V comme facteur de virulence

Il est clair que la protéine V des morbillivirus est un important facteur de virulence. Ceci confirme les observations effectuées dans d'autres études qui ont démontré le rôle de la protéine V dans l'établissement de la pathogenèse chez plusieurs Paramyxovirus. Des études effectuées avec le virus Sendai (SeV) ont démontré que la région riche en cystéine est importante pour la virulence (Fukuhara et al. 2002). Par contre, l'étude ne porte pas sur les propriétés immunosuppressives du virus mais fait seulement état du niveau de répllication virale dans les poumons ainsi que des doses létales utilisées. Par ailleurs, une étude plus récente a caractérisé en détail l'implication de la protéine V du SeV dans l'immunosuppression contribuant à la pathogenèse. En effet,

les auteurs démontrent qu'il y a une plus grande production d'IFN dans les poumons de souris infectées avec des souches virales n'exprimant pas la protéine V ou portant une délétion dans sa région riche en cystéines, comparativement au virus sauvage (Kiyotani et al. 2007).

Des études effectuées avec des souches vaccinales du MV n'exprimant plus ou surexprimant la protéine V ont mis en évidence son importance *in vivo* chez le rat de coton (Tober et al. 1998). Les expériences menées chez cet animal montrent qu'un dérèglement dans l'expression de la protéine V diminue le taux de réplication dans les poumons. Dans une étude qui s'est déroulée chez des souris transgéniques, il a été observé qu'un MV déficient dans l'expression de la protéine V se répand moins dans le système lymphatique (Mrkic et al. 2000). Plus récemment, une étude chez les primates a démontré que la protéine V du MV est importante pour infecter les lymphocytes et les organes lymphoïdes (Devaux et al. 2008). De plus, cette étude a tracé un lien entre la présence de la protéine V et l'inhibition de la transcription de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α , confirmant nos observations menées chez le furet (Devaux et al. 2008; Svitek et von Messling 2007; von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006).

Il est probable que la protéine V seule, en dehors du contexte viral, puisse causer une immunosuppression, comme c'est le cas de la protéine Nef du VIH lorsqu'elle est exprimée dans des souris transgéniques (Hanna et al. 1998; Hanna et al. 2006; Hanna et al. 2004; Hanna et al. 2001; Poudrier et al. 2001; Priceputu et al. 2005; Weng et al. 2004). Par contre, l'effet serait probablement moins fort que lors d'une infection morbillivirale puisque la destruction des lymphocytes par le virus contribue fortement à l'immunosuppression. De plus, il a été récemment démontré chez le singe que les protéines P, V et C ne sont pas les seuls facteurs de virulence du MV et que la pathogenèse morbillivirale est beaucoup plus complexe (Bankamp, Hodge et al. 2008).

La protéine V étant un important facteur de virulence, le fait de bloquer sa synthèse par la génération de virus recombinants peut s'avérer une stratégie forte

intéressante pour la conception de nouveaux vaccins sécuritaires. En effet, une stratégie similaire a été employée pour générer des virus de l'influenza atténués afin d'évaluer leur efficacité dans des études vaccinales. L'utilisation de ces virus exprimant une forme tronquée de NS1, une protéine contrôlant l'immunité innée, s'est avérée utile pour permettre une vaccination beaucoup plus efficace utilisant un virus fonctionnel (Vincent et al. 2007).

L'utilisation d'un MV chez qui la synthèse de la protéine V aurait été bloquée pourrait aussi être prometteuse dans le but de générer des virus oncolytiques ayant un phénotype atténué envers les cellules saines. En effet, le MV a fait l'objet d'intenses études dans le domaine de la virothérapie oncolytique (Russell et Peng 2009). Le fait que des enfants atteints de rougeole démontrent une rémission d'un lymphome de Burkitt a ouvert la route au développement de souches virales efficaces dans l'élimination de tumeurs (Mota 1973; Nakamura et al. 2005; Taqi et al. 1981; Zygiert 1971). L'utilisation d'un VSV atténué quant à sa capacité à inhiber l'immunité innée a déjà démontré son efficacité dans le traitement de tumeurs ne possédant pas un système immunitaire inné fonctionnel sans poser de danger pour les cellules environnantes (Stojdl et al. 2003). Ainsi, l'utilisation d'un MV-Vko pourrait fort bien être une stratégie d'avant-garde dans le traitement anticancéreux.

Inhibition de la signalisation des IFN

Toutes nos études d'immunofluorescence et nos essais luciférase ont été menés dans les cellules Vero. Le choix de cette lignée s'est d'abord reposé sur le fait qu'elles ont été utilisées dans environ la moitié des études portant sur l'activité inhibitrice de la signalisation des IFN de la protéine V du MV (Devaux et al. 2007; Fontana et al. 2008; Bankamp, Hodge et al. 2008; Bankamp, Fontana et al. 2008) et nous voulions conserver le même système. Bien qu'un article fait mention de la faible expression d'IRF-3 dans cette lignée cellulaire et que l'état antiviral indépendant de la signalisation menant à la synthèse d'IFN- β est déficient suite à une stimulation au PolyI :C (Chew et al. 2009),

les cellules Vero ont, tout de même, une voie de signalisation conduisant à la synthèse d'IFN- β fonctionnelle. En effet, elles ont été utilisées dans les études portant sur l'inhibition de la signalisation conduisant à la synthèse d'IFN- β par la protéine V de différents *Paramyxovirus* suite à une stimulation au PolyI:C (Nakatsu et al. 2008; Andrejeva et al. 2004; Childs et al. 2009; Boxer, Nanda, et Baron 2009). De plus, le fait que ces cellules ne synthétisent pas d'IFN- β (Mosca et Pitha 1986) facilite l'interprétation des données dans nos essais luciférases.

Nous avons montré que la protéine V mutante au niveau de la tyrosine n'est pas en mesure de bloquer la signalisation de l'IFN de type I et de type II ; ce qui est compatible avec l'incapacité de la protéine à bloquer la translocation nucléaire de STAT1 (Devaux et al. 2007; Ohno et al. 2004). D'autre part, les protéines mutantes au niveau des cystéines maintiennent leur capacité à bloquer la signalisation de l'IFN de type II à un niveau similaire à celui de la protéine sauvage, ce qui corrèle avec la rétention cytoplasmique de STAT1. Par contre, elles ne sont pas capable de bloquer la signalisation de l'IFN de type I. Cet effet est probablement dû à la légère incapacité de bloquer la translocation nucléaire de STAT2, ce qui pourrait être suffisant pour activer la transcription des gènes sous le contrôle de l'ISRE.

De plus, d'autres facteurs de transcription cellulaire permettant l'expression génique dépendante des ISRE, qui sont généralement bloqués par la région unique de la protéine V sauvage, pourraient être affectés par la présence des protéines mutantes au niveau des cystéines (Platanias 2005).

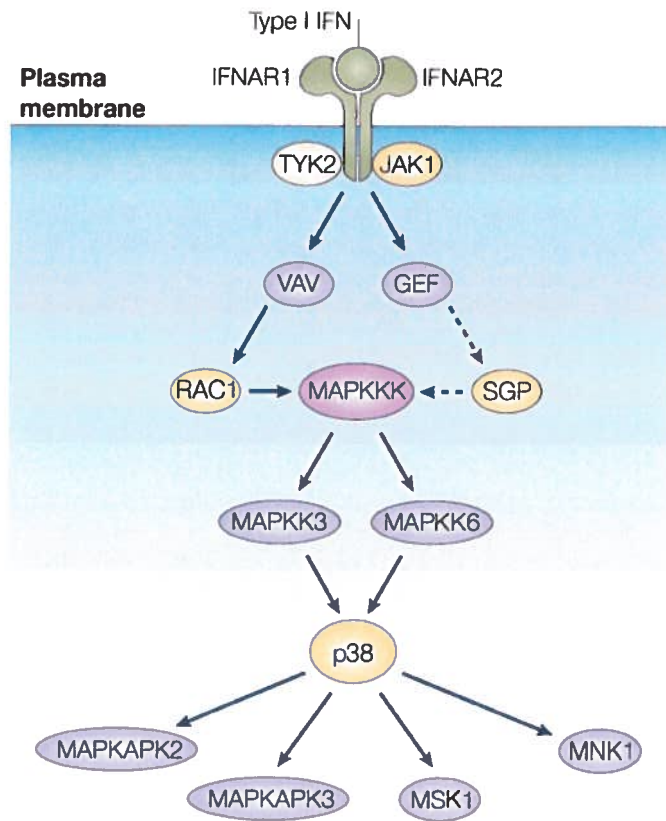
Même si les virus démontrant un phénotype atténué perdent leur capacité de bloquer la signalisation de l'IFN de type I qui mène à la transcription de gènes sous le contrôle des ISRE, ceci n'explique pas la survie de l'animal. En effet, la protéine V mutante au niveau de la tyrosine, qui est exprimée par le virus responsable d'une infection mortelle, a complètement perdu sa capacité inhibitrice de la transcription dépendante de la stimulation par l'IFN de type I et II respectivement.

Pour identifier l'interaction entre la protéine V et les voies de signalisation cellulaires qui corrélerent avec la létalité du virus, nous avons exploré en profondeur la régulation de la réponse immunitaire innée par la protéine V en utilisant la luciférase comme gène rapporteur dans des plasmides contenant le promoteur des ISG Mx1 ou ISG54. La protéine mutante Y110H conserve sa capacité d'inhibition du promoteur Mx1 au même niveau que ceux des protéines sauvages. Par contre, les protéines portant une mutation au niveau des cystéines perdent cette propriété.

Cette incohérence avec les résultats obtenus avec le plasmide ISRE pourrait s'expliquer par le fait que les événements de signalisation conduisant à l'activation de Mx1 peuvent être spécifiques à cet ISG et que les protéines mutantes au niveau des cystéines ne parviennent pas à les contrôler complètement (Platanias 2005). Il est aussi possible que les événements de signalisation conduisant à l'activation de Mx1 soient les mêmes, mais que la protéine V soit en interaction avec d'autres activateurs transcriptionnels qui renforcent ou promeuvent pleinement l'inhibition de Mx1 (van Boxel-Dezaire, Rani, et Stark 2006). En effet, nous pouvons toujours voir, pour les deux protéines mutantes au niveau des cystéines, une légère diminution de l'activité inhibitrice dans les cellules Vero, qui pourrait être attribuée à d'autres domaines fonctionnels intacts de la protéine. Cependant, cette inhibition n'est probablement pas suffisante pour bloquer la biogenèse de Mx1, dont le niveau synthétisé par la cellule serait suffisant pour inhiber la réplication virale. Il est plausible que la protéine V régule spécifiquement l'inhibition de Mx1 puisque toutes les protéines mutantes ont un pouvoir inhibiteur équivalent du promoteur ISG54, bien qu'il soit légèrement moindre que les protéines sauvages.

En conclusion, il n'y a pas de corrélation entre la capacité de la protéine V à maintenir STAT dans le cytoplasme et l'inhibition de la transcription de Mx1. Il y a des raisons de supposer que la protéine V du CDV interagisse avec d'autres effecteurs cellulaires qui contrôlent la transcription de Mx1.

La liaison de l'IFN de type I sur ses récepteurs IFNAR1 et IFNAR2 va initier une cascade de signalisation qui conduira à la phosphorylation de résidus tyrosine des



Nature Reviews | Immunology

Figure 8. Voies de signalisation par les *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) par les IFN de type I (Platanias 2005).

Les JAK activés par l'IFN de type I régulent l'activation de VAV ou d'autres *guanine-nucleotide-exchange factors* (GEF) par phosphorylation. Ceci résulte en l'activation de petites protéines G (RAC1, et autres *small G proteins* (SGP)) qui régulent la voie de signalisation des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).

molécules STAT, favorisant leur translocation nucléaire et l'activation de gènes antiviraux. Les molécules les plus étudiées dans la réponse de l'IFN de type I sont les molécules STAT1 et STAT 2 qui se lient à IRF9 (p48) pour former ISGF3 qui se liera à l'ISRE (Platanias 2005; van Boxel-Dezaire, Rani, et Stark 2006). Cependant, il est maintenant clair que d'autres partenaires cellulaires s'engagent dans la transduction du signal. Des homodimères de STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 et STAT6, ainsi que des hétérodimères de STAT1 / 3, STAT1 / 4, STAT1 / 5, STAT2 / 3 et STAT5 / 6 ont été démontrés suite à une stimulation par les IFN de type I (Parmar et Platanias 2003).

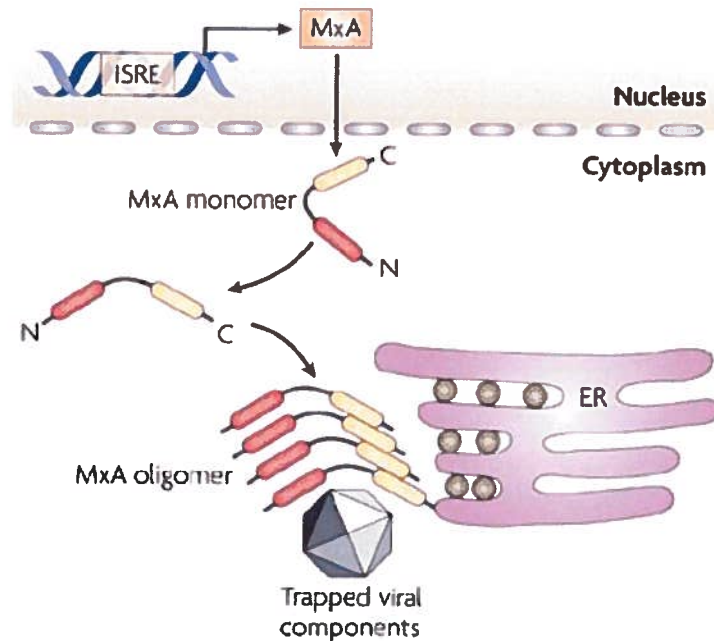
Des molécules autres que les STATs ont un rôle dans le transfert du message intracellulaire vers le noyau (figure 8). La famille des protéines CRK, ainsi que les protéines de la famille des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) jouent un rôle important dans la signalisation de l'IFN de type I (Ahmad et al. 1997; Bos, de Rooij, et Reedquist 2001; Fish et al. 1999; Lekmine et al. 2002; Uddin et al. 2003). En outre, la signalisation de p38 est la plus impliquée dans les voies de signalisation des MAPK en réponse à l'IFN (Platanias 2005). Il a été démontré que l'isoforme p38 α est activée par phosphorylation en réponse à l'IFN (Goh, Haque, et Williams 1999; Uddin et al. 1999). Plus important encore, dans une étude utilisant des inhibiteurs de p38, il a été démontré que certains ISG ne pouvaient pas être induits suite à la stimulation par l'IFN de manière ISRE-dépendante (Uddin et al. 1999). Aussi, dans cette étude, les protéines STAT1 et STAT2 pouvaient être efficacement phosphorylées et liées sous la forme mature du complexe ISGF3 sur l'ISRE, suggérant que p38 a un effet direct sur l'activation des ISG par l'ISRE.

Une découverte intéressante est que l'inhibition de l'activité de p38 corrèle avec une perte de l'activité antivirale de l'IFN- α contre le virus VSV et le virus de l'encéphalomyocardite virale (Goh, Haque, et Williams 1999). Cette inhibition a aussi été liée au contrôle du virus de l'hépatite C (VHC) par l'IFN- α (Ishida et al. 2004). Par ailleurs, la cascade de signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est impliquée dans l'activation des ISG de façon indépendante des STAT (Uddin et al. 1997; Uddin et al. 2000).

Puisqu'il existe d'autres voies en plus de celles mentionnées (van Boxel-Dezaire, Rani, et Stark 2006), il y a de nombreuses possibilités pour la protéine V du CDV d'interagir avec une ou plusieurs protéines impliquées dans ces cascades de signalisation et de contrôler l'activation du gène Mx1 suite à la liaison de l'IFN de type I sur son récepteur. Nos données démontrent que la protéine V joue un rôle dans la fine régulation de la réponse antivirale induite par les IFN et bloque la réponse à différentes étapes de son activation.

L'activité antivirale de Mx

Les protéines V portant une mutation dans l'une des cystéines ne sont plus capables d'inhiber la transcription du gène Mx. Cette observation met en lumière l'importance de cette protéine dans le contrôle de la propagation des paramyxovirus. Il est intéressant de voir que la survie d'une infection morbillovirale corrèle avec l'activation du gène Mx car cet effet a été observé dans le contexte du virus de la grippe (Haller, Staeheli, et Kochs 2007). Des souris n'exprimant pas de Mx succombent à l'infection grippale mais, lorsque cette mutation est compensée par l'ajout d'une protéine Mx fonctionnelle, elles survivent à l'infection (Hefti et al. 1999). La protéine Mx protège les souris autant des souches grippales adaptées à cette espèce animale que des souches ayant un fort potentiel pandémique comme la souche de 1918 ou la souche H5N1 (Grimm et al. 2007; Tumpey et al. 2007). Il avait déjà été démontré que la protéine MxA jouait un rôle dans le contrôle de la réplication du MV, mais son importance dans la pathogenèse demeurait inconnue (Schneider-Schaulies et al. 1994; Schnorr et al. 1993). Ensemble, ces observations démontrent clairement le rôle clé que joue Mx dans l'immunité innée contre les virus. La protéine Mx a été connue initialement pour sa propriété à inhiber la réplication des orthomyxovirus, d'où son nom d'*orthomyxovirus resistance gene*. Chez les rongeurs, il existe une forme cytoplasmique qui se nomme Mx2 ainsi qu'une forme nucléaire qui se nomme Mx1. Mx1 inhibe les virus qui se répliquent au niveau du noyau tandis que la protéine Mx2 inhibe les virus à réplication cytoplasmique comme les



Nature Reviews | Immunology

Figure 9. Mécanisme d'action de la protéine MxA (Platanias 2005).

Une fois que l'IFN de type I se lie sur son récepteur, une cascade de signalisation amène à la synthèse de gènes induits par l'IFN (*Interferon stimulated genes*, ISG), dont la protéine *myxovirus-resistance* (Mx)A, par la liaison des facteurs de transcription, entre autres, sur l'ISRE présent dans le promoteur du gène. La protéine MxA s'accumule dans le cytoplasme ou sur des membranes intracellulaires sous forme oligomérique. Suite à une infection virale, des monomères de MxA sont relâchés et se lient aux nucléocapsides ou aux autres composantes virales pour les piéger et les dégrader.

rhabdovirus et les bunyavirus (Sandrock et al. 2001). Chez les autres mammifères, les protéines Mx sont aussi au nombre de deux, MxA et MxB. Par contre, elles se trouvent toutes les deux dans le cytoplasme où seulement MxA possède une activité antivirale (King, Raposo, et Lemmon 2004). Malgré le fait que MxA se retrouve au niveau du cytoplasme, son activité antivirale ne dépend pas du compartiment cellulaire où les virus se répliquent. Ainsi, la protéine MxA peut inhiber la propagation de différentes familles de virus à ARN ainsi que certains virus à ADN comme le *Semliki forest virus* (Landis et al. 1998), le virus coxsackie (Chieux et al. 2001) et le virus de l'hépatite B (Gordien et al. 2001).

Le mécanisme d'action des protéines Mx repose, entre autres, sur leur capacité à se lier à certaines structures du virion (figure 9), notamment la nucléocapside des orthomyxovirus (Kochs et Haller 1999). Cette liaison est empêchée par la présence d'anticorps contre la protéine MxA (Kochs et Haller 1999). Suite à ces observations, il a été suggéré que la protéine MxA reconnaît les virus entrant dans la cellule en se liant à leur nucléocapside et, les complexes résultants empêchent leur réplication (Haller, Staeheli, et Kochs 2007). Il a aussi été observé que la protéine MxA peut se lier à la protéine de la nucléocapside seule, la séquestrant ainsi pour l'empêcher de poursuivre son activité régulatrice de la transcription des ARNm et de la réplication du génome viral (Kochs et al. 2002). Toutes ces indications suggèrent que la protéine MxA est un déterminant antiviral important dictant la survie d'une infection pathogène.

La protéine V des paramyxovirus

Bien que la protéine V chez la plupart des paramyxovirus joue un rôle clé dans l'immunosuppression et que la région C-terminale soit conservée à environ 50% chez tous les paramyxovirus, les mécanismes moléculaires impliqués diffèrent d'un virus à l'autre. Aussi, la stratégie employée par les différents paramyxovirus pour synthétiser la protéine V varie d'un genre de virus à l'autre (Hausmann et al. 1999). La plupart des protéines V sont cytoplasmiques et non-structurales (Fontana, Bankamp, et Rota 2008;

Gombart, Hirano, et Wong 1992; Wardrop et Briedis 1991), à part celle des rubulavirus chez qui la protéine V se retrouve dans le noyau ainsi que dans les virions (Paterson et al. 1995; Takeuchi et al. 1990; Watanabe et al. 1996). Dans le cas des virus possédant une protéine V non-structurale, sa présence n'est pas nécessaire pour la propagation *in vitro* puisque des virus n'exprimant pas de V démontrent une cinétique de réplication virale similaire à celle des virus de type sauvage (Delenda et al. 1997; Schneider, Kaelin, et Billeter 1997; von Messling, Svitek, et Cattaneo 2006).

À l'exception du virus parainfluenza humain de type 4, le rôle des protéines V des paramyxovirus converge vers une inhibition de la réponse immunitaire innée (Fontana, Bankamp, et Rota 2008; Nishio et al. 2005). Par contre, chaque virus a développé une stratégie particulière visant à bloquer cette réponse. Nos expériences montrent que les molécules STAT1 et STAT2 ne sont pas dégradées par V mais sont bien retenues au niveau du cytoplasme, ce qui concorde avec ce qui est observé pour la protéine V du MV (Palosaari et al. 2003). Par ailleurs, il est démontré que la protéine V du virus *Newcastle disease* (NDV) va promouvoir la dégradation de la molécule STAT1 (Huang et al. 2003). De plus, la protéine V de plusieurs rubulavirus comme celle du virus des oreillons (*mumps virus*, MuV) et du virus parainfluenza 5 (PIV5, anciennement *simian virus 5*, SV5) va aussi cibler la molécule STAT1 qui sera dirigée pour être dégradée par le protéasome (Didcock et al. 1999; Kubota et al. 2001). Pour ce qui en est du virus SV41, un autre rubulavirus, sa protéine V diminue le niveau de STAT1 sans que le protéasome ne soit impliqué (Nishio et al. 2001). Dans le cas du parainfluenza virus humain de type 2, c'est la molécule STAT2 qui sera ciblée pour la dégradation et cette protéine V n'est pas capable d'inhiber la signalisation de l'IFN- γ (Parisien et al. 2001). D'autres part, chez la protéine V du virus Nipah, le domaine fonctionnel pour bloquer la translocation nucléaire de STAT1 et STAT2, en formant des complexes de haut poids moléculaire dans le cytoplasme, est limité à la région N-terminale et donc, la région riche en cystéine n'est pas requise pour son activité (Rodriguez, Parisien, et Horvath 2002).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons vu que la protéine V agit à deux niveaux. D'une part, elle est impliquée dans le contrôle de la transcription de cytokines dans les cellules du sang périphérique. D'autre part, elle est impliquée dans l'inhibition de l'induction des gènes induits par les IFN, dont le gène Mx. Cela permet au virus de contrer l'effet antiviral de ces protéines, ce qui favorise sa propagation. Lorsque la protéine V est altérée dans son domaine C-terminal, dans notre cas lorsqu'une des cystéines conservées est mutée, la protéine V perd spécifiquement la capacité d'inhiber la transcription du gène Mx alors qu'un autre gène antiviral induit par les interférons, ISG54, est inhibé jusqu'à un certain point.

Nous pensons que la mutation d'une des cystéines change la conformation de la région C-terminale de la protéine V affectant ainsi sa liaison avec les protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'immunité innée. Il sera intéressant donc, dans des études futures, de cartographier plus en détail les acides aminés de ce domaine de V qui sont importants pour son activité. D'autre part, une investigation de la voie de signalisation impliquée dans l'activation du promoteur Mx1 qui est ciblée par V contribuera grandement à notre compréhension de la biologie des *Morbillivirus*. Nous suggérons que la protéine V pourrait peut-être cibler la molécule STAT3 puisqu'elle est impliquée dans la voie de signalisation de l'IL-6 et que des séquences de l'*IL-6 response element* sont présentes dans le promoteur du gène Mx1. De plus, il a été démontré que la protéine V du MV liait STAT3. Une analyse plus approfondie de la régulation des ISG par micro puce d'ADN (*DNA microarray*) dans des cellules exprimant V pourra nous éclairer sur l'impact global de cette protéine sur l'inhibition de la transcription des ISG. Par ailleurs, il est clair que la présence de V est essentielle à la stratégie virale et il est fort probable qu'elle agisse à d'autres niveaux de la réponse immunitaire. Notamment, elle pourrait contribuer directement à l'inhibition de la présentation antigénique en agissant au niveau du contrôle du système ubiquitine-protéasome.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad, S., Y. M. Alsayed, B. J. Druker, et L. C. Platanius. 1997. The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor protein. *J Biol Chem* 272 (48):29991-4.
- Alkhatib, G., S. H. Shen, D. Briedis, C. Richardson, B. Massie, R. Weinberg, D. Smith, J. Taylor, E. Paoletti, et J. Roder. 1994. Functional analysis of N-linked glycosylation mutants of the measles virus fusion protein synthesized by recombinant vaccinia virus vectors. *J Virol* 68 (3):1522-31.
- Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, et R. E. Randall. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49):17264-9.
- Appel, M. J. 1970. Distemper pathogenesis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 156 (12):1681-4.
- Appel, M. J., et W. V. Harris. 1988. Antibody titers in domestic ferret jills and their kits to canine distemper virus vaccine. *J Am Vet Med Assoc* 193 (3):332-3.
- Atabani, S. F., A. A. Byrnes, A. Jaye, I. M. Kidd, A. F. Magnusen, H. Whittle, et C. L. Karp. 2001. Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production. *J Infect Dis* 184 (1):1-9.
- 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.
- Avota, E., A. Avots, S. Niewiesk, L. P. Kane, U. Bommhardt, V. ter Meulen, et S. Schneider-Schaulies. 2001. Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med* 7 (6):725-31.
- Avota, E., H. Harms, et S. Schneider-Schaulies. 2006. Measles virus induces expression of SIP110, a constitutively membrane clustered lipid phosphatase, which inhibits T cell proliferation. *Cell Microbiol* 8 (11):1826-39.
- Avota, E., N. Muller, M. Klett, et S. Schneider-Schaulies. 2004. Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *J Virol* 78 (17):9552-9.

- Ayyavoo, V., S. Mahalingam, Y. Rafaeli, S. Kudchodkar, D. Chang, T. Nagashunmugam, W. V. Williams, et D. B. Weiner. 1997. HIV-1 viral protein R (Vpr) regulates viral replication and cellular proliferation in T cells and monocytoïd cells in vitro. *J Leukoc Biol* 62 (1):93-9.
- Bankamp, B., J. M. Fontana, W. J. Bellini, et P. A. Rota. 2008. Adaptation to cell culture induces functional differences in measles virus proteins. *Virology* 373 (1):39-50.
- Bankamp, B., G. Hodge, M. B. McChesney, W. J. Bellini, et P. A. Rota. 2008. Genetic changes that affect the virulence of measles virus in a rhesus macaque model. *Virology* 373 (1):39-50.
- Bankamp, B., J. Wilson, W. J. Bellini, et P. A. Rota. 2005. Identification of naturally occurring amino acid variations that affect the ability of the measles virus C protein to regulate genome replication and transcription. *Virology* 336 (1):120-9.
- 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., A. C. Banyard, S. Parida, et T. Barrett. 2005. The Plowright vaccine strain of Rinderpest virus has attenuating mutations in most genes. *J Gen Virol* 86 (Pt 4):1093-101.
- 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.
- Bellini, W. J., G. Englund, S. Rozenblatt, H. Arnheiter, et C. D. Richardson. 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53 (3):908-19.
- Bisat, F., N. B. Raj, et P. M. Pitha. 1988. Differential and cell type specific expression of murine alpha-interferon genes is regulated on the transcriptional level. *Nucleic Acids Res* 16 (13):6067-83.
- Blumberg, B. M., et D. Kolakofsky. 1981. Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures. *J Virol* 40 (2):568-76.
- 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.
- Blumberg, B. M., K. Rose, M. G. Simona, L. Roux, C. Giorgi, et D. Kolakofsky. 1984. Analysis of the Sendai virus M gene and protein. *J Virol* 52 (2):656-63.

- Bos, J. L., J. de Rooij, et K. A. Reedquist. 2001. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (5):369-77.
- Bosio, C. M., M. J. Aman, C. Grogan, R. Hogan, G. Ruthel, D. Negley, M. Mohamadzadeh, S. Bavari, et A. Schmaljohn. 2003. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis* 188 (11):1630-8.
- Bourhis, J. M., B. Canard, et S. Longhi. 2006. Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications. *Virology* 344 (1):94-110.
- Boxer, E. L., S. K. Nanda, et M. D. Baron. 2009. The rinderpest virus non-structural C protein blocks the induction of type 1 interferon. *Virology* 385 (1):134-42.
- Caignard, G., M. Bourai, Y. Jacob, F. Tangy, et P. O. Vidalain. 2009. Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. *Virology* 383 (1):112-20.
- Caignard, G., M. Guerbois, J. L. Labernardiere, Y. Jacob, L. M. Jones, F. Wild, F. Tangy, et P. O. Vidalain. 2007. Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. *Virology* 368 (2):351-62.
- Calain, P., et L. Roux. 1988. Generation of measles virus defective interfering particles and their presence in a preparation of attenuated live-virus vaccine. *J Virol* 62 (8):2859-66.
- 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.
- Carsillo, M., K. Klapproth, et S. Niewiesk. 2009. Cytokine imbalance after measles virus infection but no correlation with immune suppression. *J Virol*.
- 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., K. Kaelin, K. Baczko, et M. A. Billeter. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56 (5):759-64.
- 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.

- Chan, M. C., C. Y. Cheung, W. H. Chui, S. W. Tsao, J. M. Nicholls, Y. O. Chan, R. W. Chan, H. T. Long, L. L. Poon, Y. Guan, et J. S. Peiris. 2005. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res* 6:135.
- Chew, T., R. Noyce, S. E. Collins, M. H. Hancock, et K. L. Mossman. 2009. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol Immunol* 46 (3):393-9.
- Chieux, V., W. Chehadeh, J. Harvey, O. Haller, P. Watre, et D. Hober. 2001. Inhibition of coxsackievirus B4 replication in stably transfected cells expressing human MxA protein. *Virology* 283 (1):84-92.
- Childs, K. S., J. Andrejeva, R. E. Randall, et S. Goodbourn. 2009. Mechanism of mda-5 Inhibition by paramyxovirus V proteins. *J Virol* 83 (3):1465-73.
- Choppin, P. W., A. Scheid, et W. E. Mountcastle. 1975. Proceedings: Paramyxoviruses, membranes, and persistent infections. *Neurology* 25 (5):494.
- Condack, C., J. C. Grivel, P. Devaux, L. Margolis, et R. Cattaneo. 2007. Measles virus vaccine attenuation: suboptimal infection of lymphatic tissue and tropism alteration. *J Infect Dis* 196 (4):541-9.
- Curran, J. 1996. Reexamination of the Sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein. *Virology* 221 (1):130-40.
- Curran, J., J. B. Marq, et D. Kolakofsky. 1992. The Sendai virus nonstructural C proteins specifically inhibit viral mRNA synthesis. *Virology* 189 (2):647-56.
- de Swart, R. L. 2009. Measles studies in the macaque model. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:55-72.
- 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.
- de Witte, L., M. Abt, S. Schneider-Schaulies, Y. van Kooyk, et T. B. Geijtenbeek. 2006. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* 80 (7):3477-86.

- Delenda, C., S. Hausmann, D. Garcin, et D. Kolakofsky. 1997. Normal cellular replication of Sendai virus without the trans-frame, nonstructural V protein. *Virology* 228 (1):55-62.
- Devaux, P., et R. Cattaneo. 2004. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol* 78 (21):11632-40.
- Devaux, P., G. Hodge, M. B. McChesney, et R. Cattaneo. 2008. Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *J Virol* 82 (11):5359-67.
- Devaux, P., V. von Messling, W. Songsunghong, C. Springfield, et R. Cattaneo. 2007. Tyrosine 110 in the measles virus phosphoprotein is required to block STAT1 phosphorylation. *Virology* 360 (1):72-83.
- Didcock, L., D. F. Young, S. Goodbourn, et R. E. Randall. 1999. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol* 73 (12):9928-33.
- Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, et C. D. Richardson. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75 (2):295-305.
- Du, W., D. Thanos, et T. Maniatis. 1993. Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74 (5):887-98.
- Dunham, R., P. Pagliardini, S. Gordon, B. Sumpter, J. Engram, A. Moanna, M. Paiardini, J. N. Mandl, B. Lawson, S. Garg, H. M. McClure, Y. X. Xu, C. Ibegbu, K. Easley, N. Katz, I. Pandrea, C. Apetrei, D. L. Sodora, S. I. Staprans, M. B. Feinberg, et G. Silvestri. 2006. The AIDS resistance of naturally SIV-infected sooty mangabeys is independent of cellular immunity to the virus. *Blood* 108 (1):209-17.
- Duprex, W. P., F. M. Collins, et B. K. Rima. 2002. Modulating the function of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase by insertion of green fluorescent protein into the open reading frame. *J Virol* 76 (14):7322-8.
- Durudas, A., J. M. Milush, H. L. Chen, J. C. Engram, G. Silvestri, et D. L. Sodora. 2009. Elevated levels of innate immune modulators in lymph nodes and blood are associated with more-rapid disease progression in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. *J Virol* 83 (23):12229-40.
- 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.
- Faaberg, K. S., et M. E. Peeples. 1988. Association of soluble matrix protein of Newcastle disease virus with liposomes is independent of ionic conditions. *Virology* 166 (1):123-32.
- Ferron, F., S. Longhi, B. Henrissat, et B. Canard. 2002. Viral RNA-polymerases -- a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales. *Trends Biochem Sci* 27 (5):222-4.
- Fish, E. N., S. Uddin, M. Korkmaz, B. Majchrzak, B. J. Druker, et L. C. Platanius. 1999. Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons. *J Biol Chem* 274 (2):571-3.
- Fontana, J. M., B. Bankamp, W. J. Bellini, et P. A. Rota. 2008. Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology* 374 (1):71-81.
- Fontana, J. M., B. Bankamp, et P. A. Rota. 2008. Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol Rev* 225:46-67.
- Foster, G. R., et N. B. Finter. 1998. Are all type I human interferons equivalent? *J Viral Hepat* 5 (3):143-52.
- Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delprat, P. Rivaller, M. C. Rissoan, Y. J. Liu, et C. Rabourdin-Combe. 1997. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* 186 (6):813-23.
- Fujinami, R. S., X. Sun, J. M. Howell, J. C. Jenkin, et J. B. Burns. 1998. Modulation of immune system function by measles virus infection: role of soluble factor and direct infection. *J Virol* 72 (12):9421-7.
- Fukuhara, N., C. Huang, K. Kiyotani, T. Yoshida, et T. Sakaguchi. 2002. Mutational analysis of the Sendai virus V protein: importance of the conserved residues for Zn binding, virus pathogenesis, and efficient RNA editing. *Virology* 299 (2):172-81.
- Geyer, M., O. T. Fackler, et B. M. Peterlin. 2001. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* 2 (7):580-5.

- Goh, K. C., S. J. Haque, et B. R. Williams. 1999. p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *EMBO J* 18 (20):5601-8.
- Gombart, A. F., A. Hirano, et T. C. Wong. 1992. Expression and properties of the V protein in acute measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus strains. *Virus Res* 25 (1-2):63-78.
- Gordien, E., O. Rosmorduc, C. Peltekian, F. Garreau, C. Brechot, et D. Kremsdorf. 2001. Inhibition of hepatitis B virus replication by the interferon-inducible MxA protein. *J Virol* 75 (6):2684-91.
- Grais, R. F., C. Dubray, S. Gerstl, J. P. Guthmann, A. Djibo, K. D. Nargaye, J. Coker, K. P. Alberti, A. Cochet, C. Ihekweazu, N. Nathan, L. Payne, K. Porten, D. Sauvageot, B. Schimmer, F. Fermon, M. E. Burny, B. S. Hersh, et P. J. Guerin. 2007. Unacceptably high mortality related to measles epidemics in Niger, Nigeria, and Chad. *PLoS Med* 4 (1):e16.
- Griffin, D. E., et B. J. Ward. 1993. Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 168 (2):275-81.
- Grimm, D., P. Staeheli, M. Hufbauer, I. Koerner, L. Martinez-Sobrido, A. Solorzano, A. Garcia-Sastre, O. Haller, et G. Kochs. 2007. Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (16):6806-11.
- Grosjean, I., C. Caux, C. Bella, I. Berger, F. Wild, J. Banchereau, et D. Kaiserlian. 1997. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med* 186 (6):801-12.
- Hahm, B., N. Arbour, et M. B. Oldstone. 2004. Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology* 323 (2):292-302.
- Hahm, B., J. H. Cho, et M. B. Oldstone. 2007. Measles virus-dendritic cell interaction via SLAM inhibits innate immunity: selective signaling through TLR4 but not other TLRs mediates suppression of IL-12 synthesis. *Virology* 358 (2):251-7.
- Haller, C., S. Rauch, N. Michel, S. Hannemann, M. J. Lehmann, O. T. Keppler, et O. T. Fackler. 2006. The HIV-1 pathogenicity factor Nef interferes with maturation of stimulatory T-lymphocyte contacts by modulation of N-Wasp activity. *J Biol Chem* 281 (28):19618-30.

- Haller, O., P. Staeheli, et G. Kochs. 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* 89 (6-7):812-8.
- Hanna, Z., D. G. Kay, N. Rebai, A. Guimond, S. Jothy, et P. Jolicoeur. 1998. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95 (2):163-75.
- Hanna, Z., E. Priceputu, C. Hu, P. Vincent, et P. Jolicoeur. 2006. HIV-1 Nef mutations abrogating downregulation of CD4 affect other Nef functions and show reduced pathogenicity in transgenic mice. *Virology* 346 (1):40-52.
- Hanna, Z., E. Priceputu, D. G. Kay, J. Poudrier, P. Chrobak, et P. Jolicoeur. 2004. In vivo mutational analysis of the N-terminal region of HIV-1 Nef reveals critical motifs for the development of an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice. *Virology* 327 (2):273-86.
- Hanna, Z., X. Weng, D. G. Kay, J. Poudrier, C. Lowell, et P. Jolicoeur. 2001. The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J Virol* 75 (19):9378-92.
- Hausmann, S., D. Garcin, C. Delenda, et D. Kolakofsky. 1999. The versatility of paramyxovirus RNA polymerase stuttering. *J Virol* 73 (7):5568-76.
- Heaney, J., T. Barrett, et S. L. Cosby. 2002. Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J Virol* 76 (7):3579-84.
- Heaney, J., S. L. Cosby, et T. Barrett. 2005. Inhibition of host peripheral blood mononuclear cell proliferation ex vivo by Rinderpest virus. *J Gen Virol* 86 (Pt 12):3349-55.
- Hefti, H. P., M. Frese, H. Landis, C. Di Paolo, A. Aguzzi, O. Haller, et J. Pavlovic. 1999. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. *J Virol* 73 (8):6984-91.
- Hicks, J. T., J. L. Sullivan, et P. Albrecht. 1977. Immune responses during measles infection in immunosuppressed Rhesus monkeys. *J Immunol* 119 (4):1452-6.
- Hoffman, S. J., F. P. Polack, D. A. Hauer, et D. E. Griffin. 2003. Measles virus infection of rhesus macaques affects neutrophil expression of IL-12 and IL-10. *Viral Immunol* 16 (3):369-79.

- Homann, H. E., P. H. Hofschneider, et W. J. Neubert. 1990. Sendai virus gene expression in lytically and persistently infected cells. *Virology* 177 (1):131-40.
- Homma, M., et S. Tamagawa. 1973. Restoration of the fusion activity of L cell-borne Sendai virus by trypsin. *J Gen Virol* 19 (3):423-6.
- 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.
- Horvath, C. M. 2004. Weapons of STAT destruction. Interferon evasion by paramyxovirus V protein. *Eur J Biochem* 271 (23-24):4621-8.
- Hsu, E. C., C. Iorio, F. Sarangi, A. A. Khine, et C. D. Richardson. 2001. CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 279 (1):9-21.
- Huang, K. J., I. J. Su, M. Theron, Y. C. Wu, S. K. Lai, C. C. Liu, et H. Y. Lei. 2005. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol* 75 (2):185-94.
- Huang, Z., S. Krishnamurthy, A. Panda, et S. K. Samal. 2003. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J Virol* 77 (16):8676-85.
- ICTVdB. *01.048.1.02. Morbillivirus*
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm> (version 4) 2006 [cited. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>.
- Ishida, H., K. Ohkawa, A. Hosui, N. Hiramatsu, T. Kanto, K. Ueda, T. Takehara, et N. Hayashi. 2004. Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 321 (3):722-7.
- Iwatsuki, K., M. Okita, F. Ochikubo, T. Gemma, Y. S. Shin, N. Miyashita, T. Mikami, et C. Kai. 1995. Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. *J Comp Pathol* 113 (2):185-90.
- Jacoby, R. O., et R. A. Griesemer. 1970. Effect of adrenalectomy on the lymphoid lesions in dogs with experimentally induced canine distemper. *Am J Vet Res* 31 (10):1825-33.

- Karp, C. L., M. Wysocka, L. M. Wahl, J. M. Ahearn, P. J. Cuomo, B. Sherry, G. Trinchieri, et D. E. Griffin. 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 273 (5272):228-31.
- Kato, A., K. Kiyotani, Y. Sakai, T. Yoshida, et Y. Nagai. 1997. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J* 16 (3):578-87.
- 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.
- Kerdiles, Y. M., C. I. Sellin, J. Druelle, et B. Horvat. 2006. Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev Med Virol* 16 (1):49-63.
- King, M. C., G. Raposo, et M. A. Lemmon. 2004. Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (24):8957-62.
- Kiyotani, K., T. Sakaguchi, A. Kato, Y. Nagai, et T. Yoshida. 2007. Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice. *Virology* 359 (1):82-91.
- Kochs, G., et O. Haller. 1999. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem* 274 (7):4370-6.
- Kochs, G., et O. Haller. 1999. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (5):2082-6.
- Kochs, G., C. Janzen, H. Hohenberg, et O. Haller. 2002. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (5):3153-8.
- Kolakofsky, D., L. Roux, D. Garcin, et R. W. Ruigrok. 2005. Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol* 86 (Pt 7):1869-77.
- Krakovka, S. 1982. Mechanisms of in vitro immunosuppression in canine distemper virus infection. *J Clin Lab Immunol* 8 (3):187-96.
- Krakovka, 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.
- Krakowka, S., et A. Koestner. 1977. Comparison of canine distemper virus strains in gnotobiotic dogs: effects on lymphoid tissues. *Am J Vet Res* 38 (12):1919-22.
- Kubota, T., N. Yokosawa, S. Yokota, et N. Fujii. 2001. C terminal CYS-RICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon alpha and gamma signal transduction pathway through decrease of STAT 1-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 283 (1):255-9.
- Kumagai, K., R. Yamaguchi, K. Uchida, et S. Tateyama. 2004. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. *J Vet Med Sci* 66 (2):175-81.
- Laine, D., J. M. Bourhis, S. Longhi, M. Flacher, L. Cassard, B. Canard, C. Sautes-Fridman, C. Roubardin-Combe, et H. Valentin. 2005. Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through NTAIL-NR and N CORE-Fc gammaRIIB1 interactions, respectively. *J Gen Virol* 86 (Pt 6):1771-84.
- Laine, D., M. C. Trescol-Biemont, S. Longhi, G. Libeau, J. C. Marie, P. O. Vidalain, O. Azocar, A. Diallo, B. Canard, C. Roubardin-Combe, et H. Valentin. 2003. Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from Fc gammaRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J Virol* 77 (21):11332-46.
- Lamb, R. A., et P. W. Choppin. 1977. The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. II. Intracellular distribution of polypeptides. *Virology* 81 (2):371-81.
- Lamb, R. A., Kolakofsky, D. 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields virology, 4th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA*:p. 1305-1340. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et D. E. Griffin (ed.).
- Lan, N. T., R. Yamaguchi, K. Uchida, S. Sugano, et S. Tateyama. 2005. Growth profiles of recent canine distemper isolates on Vero cells expressing canine signalling lymphocyte activation molecule (SLAM). *J Comp Pathol* 133 (1):77-81.
- Landis, H., A. Simon-Jodicke, A. Kloti, C. Di Paolo, J. J. Schnorr, S. Schneider-Schaulies, H. P. Hefti, et J. Pavlovic. 1998. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. *J Virol* 72 (2):1516-22.

- Lekmine, F., A. Sassano, S. Uddin, B. Majchrzak, O. Miura, B. J. Druker, E. N. Fish, A. Imamoto, et L. C. Platanius. 2002. The CrkL adapter protein is required for type I interferon-dependent gene transcription and activation of the small G-protein Rap1. *Biochem Biophys Res Commun* 291 (4):744-50.
- 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.
- Li, T., X. Chen, K. C. Garbutt, P. Zhou, et N. Zheng. 2006. Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. *Cell* 124 (1):105-17.
- Liston, P., et D. J. Briedis. 1994. Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 198 (1):399-404.
- Mahanty, S., K. Hutchinson, S. Agarwal, M. McRae, P. E. Rollin, et B. Pulendran. 2003. Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J Immunol* 170 (6):2797-801.
- Malbec, O., W. H. Fridman, et M. Daeron. 1999. Negative regulation of hematopoietic cell activation and proliferation by Fc gamma RIIB. *Curr Top Microbiol Immunol* 244:13-27.
- Manchester, M., D. S. Eto, A. Valsamakis, P. B. Liton, R. Fernandez-Munoz, P. A. Rota, W. J. Bellini, D. N. Forthal, et M. B. Oldstone. 2000. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 74 (9):3967-74.
- Marie, J. C., J. Kehren, M. C. Trescol-Biemont, A. Evlashev, H. Valentin, T. Walzer, R. Tedone, B. Loveland, J. F. Nicolas, C. Rabourdin-Combe, et B. Horvat. 2001. Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity* 14 (1):69-79.
- 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.
- McCullough, B., S. Krakowka, et A. Koestner. 1974. Experimental canine distemper virus-induced lymphoid depletion. *Am J Pathol* 74 (1):155-70.
- McIlhatton, M. A., M. D. Curran, et B. K. Rima. 1997. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence). *J Gen Virol* 78 (Pt 3):571-6.

- Merika, M., A. J. Williams, G. Chen, T. Collins, et D. Thanos. 1998. Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1 (2):277-87.
- Mohamadzadeh, M., L. Chen, et A. L. Schmaljohn. 2007. How Ebola and Marburg viruses battle the immune system. *Nat Rev Immunol* 7 (7):556-67.
- Mosca, J. D., et P. M. Pitha. 1986. Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. *Mol Cell Biol* 6 (6):2279-83.
- Moss, W. J., et D. E. Griffin. 2006. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4 (12):900-8.
- Moss, W. J., J. J. Ryon, M. Monze, et D. E. Griffin. 2002. Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J Infect Dis* 186 (7):879-87.
- Mota, H. C. 1973. Infantile Hodgkin's disease: remission after measles. *Br Med J* 2 (5863):421.
- Mrkic, B., B. Odermatt, M. A. Klein, M. A. Billeter, J. Pavlovic, et R. Cattaneo. 2000. Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *J Virol* 74 (3):1364-72.
- Nagai, Y., H. Ogura, et H. Klenk. 1976. Studies on the assembly of the envelope of Newcastle disease virus. *Virology* 69 (2):523-38.
- Nahmias, A. J., D. Griffith, C. Salsbury, et K. Yoshida. 1967. Thymic aplasia with lymphopenia, plasma cells, and normal immunoglobulins. Relation to measles virus infection. *JAMA* 201 (10):729-34.
- Nakamura, T., K. W. Peng, M. Harvey, S. Greiner, I. A. Lorimer, C. D. James, et S. J. Russell. 2005. Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat Biotechnol* 23 (2):209-14.
- Nakatsu, Y., M. Takeda, S. Ohno, R. Koga, et Y. Yanagi. 2006. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. *J Virol* 80 (23):11861-7.
- Nakatsu, Y., M. Takeda, S. Ohno, Y. Shirogane, M. Iwasaki, et Y. Yanagi. 2008. Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol* 82 (17):8296-306.

- Nanda, S. K., et M. D. Baron. 2006. Rinderpest virus blocks type I and type II interferon action: role of structural and nonstructural proteins. *J Virol* 80 (15):7555-68.
- Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Roubourdin-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., 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.
- Ng, W. F., K. F. To, W. W. Lam, T. K. Ng, et K. C. Lee. 2006. The comparative pathology of severe acute respiratory syndrome and avian influenza A subtype H5N1--a review. *Hum Pathol* 37 (4):381-90.
- Niewiesk, S. 2009. Current animal models: cotton rat animal model. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:89-110.
- Niewiesk, S., I. Eisenhuth, A. Fooks, J. C. Clegg, J. J. Schnorr, S. Schneider-Schaulies, et V. ter Meulen. 1997. Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. *J Virol* 71 (10):7214-9.
- Niewiesk, S., M. Gotzelmann, et V. ter Meulen. 2000. Selective in vivo suppression of T lymphocyte responses in experimental measles virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (8):4251-5.
- Niewiesk, S., H. Ohnimus, J. J. Schnorr, M. Gotzelmann, S. Schneider-Schaulies, C. Jassoy, et V. ter Meulen. 1999. Measles virus-induced immunosuppression in cotton rats is associated with cell cycle retardation in uninfected lymphocytes. *J Gen Virol* 80 (Pt 8):2023-9.
- Nishio, M., M. Tsurudome, M. Ito, et Y. Ito. 2005. Human parainfluenza virus type 4 is incapable of evading the interferon-induced antiviral effect. *J Virol* 79 (23):14756-68.
- Nishio, M., M. Tsurudome, M. Ito, M. Kawano, H. Komada, et Y. Ito. 2001. High resistance of human parainfluenza type 2 virus protein-expressing cells to the antiviral and anti-cell proliferative activities of alpha/beta interferons: cysteine-rich V-specific domain is required for high resistance to the interferons. *J Virol* 75 (19):9165-76.
- Normile, D. 2008. Rinderpest. Driven to extinction. *Science* 319 (5870):1606-9.

- 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.
- Ohno, S., N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi, et Y. Yanagi. 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol* 85 (Pt 10):2991-9.
- 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.
- Oswald, I. P., R. T. Gazzinelli, A. Sher, et S. L. James. 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 148 (11):3578-82.
- 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.
- Parisien, J. P., J. F. Lau, J. J. Rodriguez, B. M. Sullivan, A. Moscona, G. D. Parks, R. A. Lamb, et C. M. Horvath. 2001. The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. *Virology* 283 (2):230-9.
- Parmar, S., et L. C. Platanias. 2003. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol* 15 (6):431-9.
- Paterson, R. G., G. P. Leser, M. A. Shaughnessy, et R. A. Lamb. 1995. The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208 (1):121-31.
- Permar, S. R., S. A. Klumpp, K. G. Mansfield, A. A. Carville, D. A. Gorgone, M. A. Lifton, J. E. Schmitz, K. A. Reimann, F. P. Polack, D. E. Griffin, et N. L. Letvin. 2004. Limited contribution of humoral immunity to the clearance of measles viremia in rhesus monkeys. *J Infect Dis* 190 (5):998-1005.
- Permar, S. R., S. A. Klumpp, K. G. Mansfield, W. K. Kim, D. A. Gorgone, M. A. Lifton, K. C. Williams, J. E. Schmitz, K. A. Reimann, M. K. Axthelm, F. P. Polack, D. E. Griffin, et N. L. Letvin. 2003. Role of CD8(+) lymphocytes in control and clearance of measles virus infection of rhesus monkeys. *J Virol* 77 (7):4396-400.
- Perrone, L. A., J. K. Plowden, A. Garcia-Sastre, J. M. Katz, et T. M. Tumpey. 2008. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive

infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS Pathog* 4 (8):e1000115.

- 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.
- Pillet, S., N. Svitek, et V. von Messling. 2009. Ferrets as a model for morbillivirus pathogenesis, complications, and vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:73-87.
- Pillet, S., et V. von Messling. 2009. Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. *J Virol* 83 (12):6279-87.
- Platanias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5 (5):375-86.
- Plumet, S., W. P. Duprex, et D. Gerlier. 2005. Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol* 79 (11):6900-8.
- Poch, O., B. M. Blumberg, L. Bougueleret, et N. Tordo. 1990. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71 (Pt 5):1153-62.
- Polack, F. P., S. J. Hoffman, W. J. Moss, et D. E. Griffin. 2002. Altered synthesis of interleukin-12 and type 1 and type 2 cytokines in rhesus macaques during measles and atypical measles. *J Infect Dis* 185 (1):13-9.
- Poudrier, J., X. Weng, D. G. Kay, G. Pare, E. L. Calvo, Z. Hanna, M. H. Kosco-Vilbois, et P. Jolicoeur. 2001. The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity* 15 (2):173-85.
- Powrie, F., S. Menon, et R. L. Coffman. 1993. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 23 (11):3043-9.
- Priceputu, E., I. Rodrigue, P. Chrobak, J. Poudrier, T. W. Mak, Z. Hanna, C. Hu, D. G. Kay, et P. Jolicoeur. 2005. The Nef-mediated AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with increased Fas/FasL expression on T cells and T-cell death but is not prevented in Fas-, FasL-, tumor necrosis factor receptor 1-, or interleukin-1beta-converting enzyme-deficient or Bcl2-expressing transgenic mice. *J Virol* 79 (10):6377-91.

- 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.
- Ramachandran, A., J. P. Parisien, et C. M. Horvath. 2008. STAT2 is a primary target for measles virus V protein-mediated alpha/beta interferon signaling inhibition. *J Virol* 82 (17):8330-8.
- Ravanel, K., C. Castelle, T. Defrance, T. F. Wild, D. Charron, V. Lotteau, et C. Roubourdin-Combe. 1997. Measles virus nucleocapsid protein binds to FcgammaRII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med* 186 (2):269-78.
- Reutter, G. L., C. Cortese-Grogan, J. Wilson, et S. A. Moyer. 2001. Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis. *Virology* 285 (1):100-9.
- Rivas, J. M., et S. E. Ullrich. 1992. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 149 (12):3865-71.
- Rodriguez, J. J., J. P. Parisien, et C. M. Horvath. 2002. Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol* 76 (22):11476-83.
- 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.
- Russell, R., R. G. Paterson, et R. A. Lamb. 1994. Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 199 (1):160-8.
- Russell, S. J., et K. W. Peng. 2009. Measles virus for cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:213-41.
- 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.
- Sandrock, M., M. Frese, O. Haller, et G. Kochs. 2001. Interferon-induced rat Mx proteins confer resistance to Rift Valley fever virus and other arthropod-borne viruses. *J Interferon Cytokine Res* 21 (9):663-8.

- Scheid, A., et P. W. Choppin. 1974. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* 57 (2):475-90.
- Schlender, J., J. J. Schnorr, P. Spielhoffer, T. Cathomen, R. Cattaneo, M. A. Billeter, V. ter Meulen, et S. Schneider-Schaulies. 1996. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (23):13194-9.
- Schneider-Schaulies, S., J. Schneider-Schaulies, A. Schuster, M. Bayer, J. Pavlovic, et V. ter Meulen. 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol* 68 (11):6910-7.
- 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.
- Schnorr, J. J., S. Schneider-Schaulies, A. Simon-Jodicke, J. Pavlovic, M. A. Horisberger, et V. ter Meulen. 1993. MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol* 67 (8):4760-8.
- Schnorr, J. J., M. Seufert, J. Schlender, J. Borst, I. C. Johnston, V. ter Meulen, et S. Schneider-Schaulies. 1997. Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro. *J Gen Virol* 78 (Pt 12):3217-26.
- Schobesberger, M., A. Summerfield, M. G. Doherr, A. Zurbriggen, et C. Griot. 2005. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol* 104 (1-2):33-44.
- Sellin, C. I., et B. Horvat. 2009. Current animal models: transgenic animal models for the study of measles pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 330:111-27.
- 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.
- Steinhauser, M. L., C. M. Hogaboam, S. L. Kunkel, N. W. Lukacs, R. M. Strieter, et T. J. Standiford. 1999. IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 162 (1):392-9.
- 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- et ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* 71 (2):1506-13.

Stojdl, D. F., B. D. Lichty, B. R. tenOever, J. M. Paterson, A. T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E. G. Brown, R. K. Durbin, J. E. Durbin, J. Hiscott, et J. C. Bell. 2003. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4 (4):263-75.

Streif, S., K. Pueschel, A. Tietz, J. Blanco, V. T. Meulen, et S. Niewiesk. 2004. Effector CD8+T cells are suppressed by measles virus infection during delayed type hypersensitivity reaction. *Viral Immunol* 17 (4):604-8.

Stricker, R., G. Mottet, et L. Roux. 1994. The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. *J Gen Virol* 75 (Pt 5):1031-42.

Sun, X., J. B. Burns, J. M. Howell, et R. S. Fujinami. 1998. Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor in suppression. *Virology* 246 (1):24-33.

Svitek, N., P. A. Rudd, K. Obojes, S. Pillet, et V. von Messling. 2008. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* 376 (1):53-9.

Svitek, N., et V. von Messling. 2007. Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology* 362 (2):404-10.

Taga, K., H. Mostowski, et G. Tosato. 1993. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 81 (11):2964-71.

Taga, K., et G. Tosato. 1992. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148 (4):1143-8.

Takeuchi, K., S. I. Kadota, M. Takeda, N. Miyajima, et K. Nagata. 2003. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* 545 (2-3):177-82.

Takeuchi, K., K. Tanabayashi, M. Hishiyama, Y. K. Yamada, A. Yamada, et A. Sugiura. 1990. Detection and characterization of mumps virus V protein. *Virology* 178 (1):247-53.

- Taqi, A. M., M. B. Abdurrahman, A. M. Yakubu, et A. F. Fleming. 1981. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* 1 (8229):1112.
- Tarbouriech, N., J. Curran, C. Ebel, R. W. Ruigrok, et W. P. Burmeister. 2000. On the domain structure and the polymerization state of the sendai virus P protein. *Virology* 266 (1):99-109.
- 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.
- Thanos, D., et T. Maniatis. 1995. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83 (7):1091-100.
- Thomas, S. M., R. A. Lamb, et R. G. Paterson. 1988. Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5. *Cell* 54 (6):891-902.
- Thoulouze, M. I., N. Sol-Foulon, F. Blanchet, A. Dautry-Varsat, O. Schwartz, et A. Alcover. 2006. Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* 24 (5):547-61.
- Tidona, C. A., H. W. Kurz, H. R. Gelderblom, et G. Darai. 1999. Isolation and molecular characterization of a novel cytopathogenic paramyxovirus from tree shrews. *Virology* 258 (2):425-34.
- 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.
- Tumpey, T. M., K. J. Szretter, N. Van Hoeven, J. M. Katz, G. Kochs, O. Haller, A. Garcia-Sastre, et P. Staeheli. 2007. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza viruses. *J Virol* 81 (19):10818-21.
- Uddin, S., E. N. Fish, D. Sher, C. Gardziola, O. R. Colamonici, M. Kellum, P. M. Pitha, M. F. White, et L. C. Platanius. 1997. The IRS-pathway operates distinctively from the Stat-pathway in hematopoietic cells and transduces common and distinct signals during engagement of the insulin or interferon-alpha receptors. *Blood* 90 (7):2574-82.

- Uddin, S., F. Lekmine, A. Sassano, H. Rui, E. N. Fish, et L. C. Platanias. 2003. Role of Stat5 in type I interferon-signaling and transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 308 (2):325-30.
- Uddin, S., B. Majchrzak, P. C. Wang, S. Modi, M. K. Khan, E. N. Fish, et L. C. Platanias. 2000. Interferon-dependent activation of the serine kinase PI 3'-kinase requires engagement of the IRS pathway but not the Stat pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 270 (1):158-62.
- Uddin, S., B. Majchrzak, J. Woodson, P. Arunkumar, Y. Alsayed, R. Pine, P. R. Young, E. N. Fish, et L. C. Platanias. 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem* 274 (42):30127-31.
- Valsamakis, A., H. Schneider, P. G. Auwaerter, H. Kaneshima, M. A. Billeter, et D. E. Griffin. 1998. Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J Virol* 72 (10):7754-61.
- van Boxel-Dezaire, A. H., M. R. Rani, et G. R. Stark. 2006. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 25 (3):361-72.
- van der Poll, T., A. Marchant, C. V. Keogh, M. Goldman, et S. F. Lowry. 1996. Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 174 (5):994-1000.
- Vincent, A. L., W. Ma, K. M. Lager, B. H. Janke, R. J. Webby, A. Garcia-Sastre, et J. A. Richt. 2007. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine* 25 (47):7999-8009.
- 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., D. Milosevic, P. Devaux, et R. Cattaneo. 2004. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol* 78 (15):7894-903.
- von Messling, V., N. Oezguen, Q. Zheng, S. Vongpunsawad, W. Braun, et R. Cattaneo. 2005. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 79 (9):5857-62.
- von Messling, V., C. Springfield, P. Devaux, et R. Cattaneo. 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77 (23):12579-91.

- von Messling, V., N. Svitek, et R. Cattaneo. 2006. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol* 80 (12):6084-92.
- Wang, M., J. E. Libbey, I. Tsunoda, et R. S. Fujinami. 2003. Modulation of immune system function by measles virus infection. II. Infection of B cells leads to the production of a soluble factor that arrests uninfected B cells in G0/G1. *Viral Immunol* 16 (1):45-55.
- Ward, B. J., et D. E. Griffin. 1993. Changes in cytokine production after measles virus vaccination: predominant production of IL-4 suggests induction of a Th2 response. *Clin Immunol Immunopathol* 67 (2):171-7.
- Wardrop, E. A., et D. J. Briedis. 1991. Characterization of V protein in measles virus-infected cells. *J Virol* 65 (7):3421-8.
- Watanabe, N., M. Kawano, M. Tsurudome, S. Kusagawa, M. Nishio, H. Komada, T. Shima, et Y. Ito. 1996. Identification of the sequences responsible for nuclear targeting of the V protein of human parainfluenza virus type 2. *J Gen Virol* 77 (Pt 2):327-38.
- Weidle, U., et C. Weissmann. 1983. The 5'-flanking region of a human IFN-alpha gene mediates viral induction of transcription. *Nature* 303 (5916):442-6.
- Weidmann, A., C. Fischer, S. Ohgimoto, C. Ruth, V. ter Meulen, et S. Schneider-Schaulies. 2000. Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. *J Virol* 74 (16):7548-53.
- Weidmann, A., A. Maisner, W. Garten, M. Seufert, V. ter Meulen, et S. Schneider-Schaulies. 2000. Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression in vitro. *J Virol* 74 (4):1985-93.
- Weng, X., E. Priceputu, P. Chrobak, J. Poudrier, D. G. Kay, Z. Hanna, T. W. Mak, et P. Jolicoeur. 2004. CD4+ T cells from CD4C/HIVNef transgenic mice show enhanced activation in vivo with impaired proliferation in vitro but are dispensable for the development of a severe AIDS-like organ disease. *J Virol* 78 (10):5244-57.
- 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.

- Wright, N. G., H. J. Cornwell, H. Thompson, et I. M. Lauder. 1974. Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *Vet Rec* 94 (5):86-92.
- Wunschmann, A., S. Alldinger, E. Kremmer, et W. Baumgartner. 1999. Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Vet Immunol Immunopathol* 67 (2):101-16.
- Wunschmann, A., E. Kremmer, et W. Baumgartner. 2000. Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 73 (1):83-98.
- 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.
- Yanagi, Y., N. Ono, H. Tatsuo, K. Hashimoto, et H. Minagawa. 2002. Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virology* 299 (2):155-61.
- Yanagi, Y., M. Takeda, et S. Ohno. 2006. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87 (Pt 10):2767-79.
- Yokota, S., T. Okabayashi, N. Yokosawa, et N. Fujii. 2008. Measles virus P protein suppresses Toll-like receptor signal through up-regulation of ubiquitin-modifying enzyme A20. *FASEB J* 22 (1):74-83.
- Yokota, S., H. Saito, T. Kubota, N. Yokosawa, K. Amano, et N. Fujii. 2003. Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology* 306 (1):135-46.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, et T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5 (7):730-7.
- Yoshida, T., Y. Nakayama, H. Nagura, T. Toyoda, K. Nishikawa, M. Hamaguchi, et Y. Nagai. 1986. Inhibition of the assembly of Newcastle disease virus by monensin. *Virus Res* 4 (2):179-95.
- Zhu, Y. D., J. Heath, J. Collins, T. Greene, L. Antipa, P. Rota, W. Bellini, et M. McChesney. 1997. Experimental measles. II. Infection and immunity in the rhesus macaque. *Virology* 233 (1):85-92.

Zygiert, Z. 1971. Hodgkin's disease: remissions after measles. *Lancet* 1 (7699):593.

ANNEXE I : Séquences des gènes de furet clonés

GenBank: EU477256.1

Mustela putorius furo interleukin 8 (IL-8) mRNA, partial cds

Features

Sequence

LOCUS EU477256 296 bp mRNA linear MAM
02-JUN-2008
DEFINITION Mustela putorius furo interleukin 8 (IL-8) mRNA, partial
cds.
ACCESSION EU477256
VERSION EU477256.1 GI:169135242
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 296)
AUTHORS **Svitek,N.**, Rudd,P.A., Obojes,K., Pillet,S. and von
Messling,V.
TITLE Severe seasonal influenza in ferrets correlates with
reduced
interferon and increased IL-6 induction
JOURNAL Virology 376 (1), 53-59 (2008)
PUBMED 18420248
REFERENCE 2 (bases 1 to 296)
AUTHORS Obojes,K., **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-FEB-2008) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, Quebec H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..296
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
gene 1..>296
/gene="IL-8"
CDS 1..>296
/gene="IL-8"
/codon_start=1
/product="interleukin 8"
/protein_id="ACA48516.1"
/db_xref="GI:169135243"

/translation="MTSKLAVALLAVFLLSAVLCEAAVLTRVSSELRCQCIKTHSTPF

HPKYIKELRVIDSGPHCENSEIIVKLVNGKEVCLDPKEDWVQRIVQIFLKKAEK"

ORIGIN

1 atgacttcca agctggctgt tgctctcttg gcagttttcc tgctttctgc
agttctgtgt

61 gaagctgcag ttctgacgag agtgagttca gaactccgat gccagtgc
ataaacccac

121 tccagcctt tccatccca atatatcaa gaactgagag tgattgacag
tggccacat

181 tgtgaaaact cagaaatcat tgtaaagctt gtcaatggaa aagaggtgtg
cctggacccc

241 aaggaagact gggtacagag aattgtacag atatTTTTga agaaggctga
gaaaca

GenBank: EF368214.1

Mustela putorius furo interferon gamma (IFN gamma) mRNA, partial cds

Features

Sequence

LOCUS EF368214 437 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interferon gamma (IFN gamma) mRNA,
partial
cds.
ACCESSION EF368214
VERSION EF368214.1 GI:124491214
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 437)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 437)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..437
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:[9669](#)"
gene <1..437
/gene="IFN gamma"
CDS <1..437
/gene="IFN gamma"
/codon_start=3
/product="interferon gamma"
/protein_id="[ABN12942.1](#)"
/db_xref="GI:124491215"

```
/translation="CQAMFFKEIEDLKEYFNASNPDVADGGPLFLDILKNWREESDKK
IIQSQIVSFYLLKFEDFKDNQIIQRSMDTIKEDMLVRRFFNNSSSKLEDFLKLIRIPVN
                                DLQVQRKAINELIKVMNDLSPRSNLRKRKRSHSLFRGRRASK"
ORIGIN
    1 actgtcaggc catgtttttt aaagaaatag aagacctaaa ggaatatttt
aatgcaagta
    61 atccagatgt agcagatggt gggcctcttt tcttagatat tttgaagaac
tggagagagg
    121 agagtgacaa aaaaatcatt caaagccaaa ttgtctcctt ctacttgaaa
ctgtttgaag
    181 acttcaaaga taaccagatc attcaaagga gcatggatac catcaaggaa
gacatgcttg
    241 tcaggttctt caataacagc agcagtaagc tggaggactt ccttaagctg
attcgaattc
    301 ctgtgaatga tctgcaggtc cagcgcaaag cgataaatga actcatcaaa
gtgatgaatg
    361 atctctcacc aagatctaac ctaaggaagc ggaaaaggag tcacagtctg
tttcgaggcc
    421 gcagagcatc gaaataa
```

GenBank: EF368213.1

Mustela putorius furo interleukin 12p40 (IL12p40) mRNA, partial cds

Features

Sequence

LOCUS EF368213 600 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interleukin 12p40 (IL12p40) mRNA,
partial
cds.
ACCESSION EF368213
VERSION EF368213.1 GI:124491212
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 600)
AUTHORS **Svitek, N.** and von Messling, V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 600)
AUTHORS **Svitek, N.** and von Messling, V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..600
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
gene <1..600
/gene="IL12p40"
CDS <1..600
/gene="IL12p40"
/codon_start=1
/product="interleukin 12p40"
/protein_id="ABN12941.1"
/db_xref="GI:124491213"

/translation="CEAKNYSGRFTCWWLTAISTDLKFSVKSSRGLSDTQGVTCGAVT

LSAERVVDNRDYKKYTVVECYEGSACPAAEESLPIEVVVGAIHKLKYENYTSSFFIRD

IIKPDPPMNLQLKPLQNSRHVEVSWDYPDWTWSTPHSYFSLTFCVQGQKNNREKKERL
CVDKTSAKVTCHKDAKIRVQARDRYSSWSNWSVSCS"

ORIGIN

1 tgtgaggcaa agaattattc tggacgtttc acctgctggt ggctgacagc
aatcagtact
61 gatttgaat tcagtgtaa aagcagcaga ggcctctctg acaccaagg
ggtgacgtgt
121 ggagcagtga cgctctcagc agagagggtc agagtggaca acaggatta
taagaagtac
181 acgggtggaat gttacgaggg cagtgcctgc cctgccgccg aggagagcct
gcccacgag
241 gttgtggtgg gtgctattca caagctcaag tatgaaaact acaccagcag
cttcttcac
301 aggacatca tcaaaccaga cccacccatg aacctacagc tgaagccgtt
acaaaattct
361 cggcatgtgg aggtcagctg ggattacccc gacacctgga gcaccccga
ttcctacttc
421 tccctgacgt tctgcgtaca gggccagggc aagaacaata gggagaagaa
agagagactc
481 tgcgtggaca agacctcagc caaggtcacg tgccataagg atgccaagat
ccgtgtgcaa
541 gcccgagacc gctactatag ctcatcctgg agcaactggg catctgtgtc
ctgcagttag

GenBank: EF368212.1

Mustela putorius furo interleukin 10 (IL10) mRNA, partial cds

Features

Sequence

LOCUS EF368212 366 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interleukin 10 (IL10) mRNA, partial
cds.
ACCESSION EF368212
VERSION EF368212.1 GI:124491210
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 366)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289104/)
REFERENCE 2 (bases 1 to 366)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..366
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
gene <1..>366
/gene="IL10"
CDS <1..>366
/gene="IL10"
/codon_start=2
/product="interleukin 10"
/protein_id="ABN12940.1"
/db_xref="GI:124491211"

/translation="RELRAAFGRVKTFQMKDKLGSILLTGSLLEDFKGYLGCQALSE
MIQFYLEEVMQAENHDPEVKEHVNSLGEKLTLLRRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVK
SAFSKLQERGVYKAMSEFD"

ORIGIN

1 ccgagagctc cgagcagcct tcggcagggg gaagactttc tttcaaatga
aggacaagct
61 gggcagcata ttgttgactg ggtccttgct ggaggacttt aagggttacc
tggggtgcca
121 agccctgtcg gagatgatcc agttttactt ggaggagggtg atgccccagg
ccgagaacca
181 cgaccagaa gtcaaggagc acgtgaactc gctgggggaa aagctgaaga
ccctgcggct
241 gaggctgcgg cgctgtcatc gatttctgcc ctgtgagaat aagagcaagg
cggtgagca
301 ggtgaaaagc gccttcagta agctccaaga gagaggtgtc taaaagcca
tgagtgagtt
361 tgacat

GenBank: EF368211.1

Mustela putorius furo tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mRNA, complete cds

Features

Sequence

LOCUS EF368211 702 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mRNA, complete cds.
ACCESSION EF368211
VERSION EF368211.1 GI:124491208
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia; Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 702)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289104/)
REFERENCE 2 (bases 1 to 702)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..702
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
gene 1..702
/gene="TNF alpha"
CDS 1..702
/gene="TNF alpha"
/codon_start=1
/product="tumor necrosis factor alpha"
/protein_id="ABN12939.1"
/db_xref="GI:124491209"

/translation="MSTESMIRDVELGEEALPKKAGAPKGSRRWCLSLFSFLLVAGA
TTLFCLLHFGVIGPQREELPDGLQLIKPLAQTVKSSSRTPSDKPVAVVANPEAEGQL
QWLSRRANALLANGVELTDNQLIVPSDGLYLIYSQVLFKGRGCSSTNVLLTHTISRFA
VSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGTEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINLPAYL
DFAESGQVYFGI IAL"

ORIGIN

1 atgagcactg aaagcatgat ccgggacgtg gagctgggcg aggaggcact
ccccagaag
61 gcaggggccc ccaagggctc ccgaaggtgc tggtagcctca gcctcttctc
cttctctctc
121 gtcgcaggag ccaccacact gttctgcctg ctgcactttg gagtgatcgg
ccccagagg
181 gaagagctgc cagatggcct ccaactaatc aaacctctgg ccagacagt
caaatcatct
241 tctcgaactc caagtgaaa gcctgtagct catggttag caaacctga
agctgagggg
301 caactccaat ggctgagccg acgtgccaat gccctcctgg ccaatggtgt
ggagctgaca
361 gacaaccagc taatagtgcc atcagacggg ctgtacctta tctactcgca
ggtcctcttc
421 aagggccgag gatgttcttc caccaatgtg ctcttacc acaccatcag
ccgcttcgct
481 gtctcctacc agaccaaggt caacctcctg tctgcatca agagccctg
ccaaaggaa
541 acccagagg ggactgaggc caagccctgg tacgagcca tctacctggg
aggggtcttc
601 caactggaga aggggatcg actcagcgt gagatcaacc tgctgccta
tctcgacttt
661 gccgaatccg ggcaggtcta ctttgggatc attgccctgt ga

GenBank: EF368210.1

Mustela putorius furo interleukin 4 mRNA, complete cds

Features

Sequence

LOCUS EF368210 399 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interleukin 4 mRNA, complete cds.
ACCESSION EF368210
VERSION EF368210.1 GI:124491206
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 399)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED 17289104
REFERENCE 2 (bases 1 to 399)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..399
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
CDS 1..399
/codon_start=1
/product="interleukin 4"
/protein_id="ABN12938.1"
/db_xref="GI:124491207"

/translation="MGLTSQLIPTLVCLLALTGTFFIHGHNFSAIKEIIKTLNILTAR
NDSCMELTVTEVFSAPKNTSEKEIFCRAATVLQQLSTHNCSNRLRLRGLHRNLRNMANM
TCSVNEVKKSTLKDFLERLKVIMQQKYRHR"

ORIGIN

```
1 atgggtctca cctcccaact gattccaact ctggtctgct tactagcact
caccggcact
61 ttcattccacg gacataactt cagtattgcc attaaggaga tcatcaaaac
gttgaacatc
121 ctcacagcga gaaacgactc atgcatggag ctgaccgtca ctgaagtctt
ctctgccccca
181 aagaacacaa gtgagaagga aatcttctgc agagctgcaa ctgtgcttca
gcagctctct
241 acacacaatt gctccaacag attgctcaga ggacttcaca ggaacctcag
gaacatggca
301 aacatgacct gttcggtgaa tgaagtcaag aagagtacac tgaaagactt
cttgaaaagg
361 ctaaaagtga tcatgcaaca gaaatactac aggcactga
```

GenBank: EF368209.1

Mustela putorius furo interleukin 6 mRNA, complete cds

Features

Sequence

LOCUS EF368209 633 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interleukin 6 mRNA, complete cds.
ACCESSION EF368209
VERSION EF368209.1 GI:124491204
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 633)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED 17289104
REFERENCE 2 (bases 1 to 633)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..633
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
CDS 1..633
/codon_start=1
/product="interleukin 6"
/protein_id="ABN12937.1"
/db_xref="GI:124491205"

/translation="MNSLSTSAFSPVAFSLGLLLVMATAFPTPGPLGGDSKDDATSNR
PPLTSADKMEDFIRFILGKISALKKEMCEKYKNCEDSKEALAENNLNLPKLA EEDKCF
QSQFNQETCLTRITTTGLQEFQIHLKYLEANYEGNKNNNAHSVYISTKHLLQKLRPMNRV
EVTTPDPPTDSSLQALFKSQDKWLKHVTIHLILRSLEDFLQFSLRAIRIM"

ORIGIN

```
1 atgaactccc tctccacaag cgccttcagt ccagtggcct tctctctggg
gctgctcctg
61 gtgatggcta ctgctttccc taccocggga cccctgggag gagattccaa
agatgatgcc
121 acctcaaaca gaccaccact cacctctgca gacaaaatgg aagacttcat
taggttcatc
181 cttggcaaaa tctctgcatt gaaaaaggag atgtgtgaaa agtataaaaa
atgtgaagac
241 agcaaggagg cactggcaga gaacaaccta aatcttccaa aactggcaga
agaggacaaa
301 tgcttccagt ctcaattcaa tcaggagacc tgtctgacaa gaatcactac
cggctctcag
361 gagtttcaga tacacctgaa atacctagag gccaaactatg agggtaataa
gaacaatgcc
421 cactctgtgt acatcagcac caaacacctg ctccagaagc tgaggcccat
gaatcgggtt
481 gaagtgacca ccccgacc taccacagat tccagcctgc aggctctctt
caagtcgcag
541 gacaagtggc tgaaacacgt aacaattcac ctcatcctac ggagccttga
ggatttcctg
601 cagttcagcc tgagggccat tcggatcatg tag
```

GenBank: EF368208.1

Mustela putorius furo interferon beta mRNA, complete cds

Features

Sequence

LOCUS EF368208 561 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interferon beta mRNA, complete cds.
ACCESSION EF368208
VERSION EF368208.1 GI:124491202
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 561)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289104/)
REFERENCE 2 (bases 1 to 561)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..561
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
CDS 1..561
/codon_start=1
/product="interferon beta"
/protein_id="ABN12936.1"
/db_xref="GI:124491203"

/translation="MTSRCILQTALLVYFSTTVLAMNYNLLRFQLSSSSVECQELLQ
LNGTSKDCLKDRMNFKIP EEIQKSQKFQKEDIVLV TLEMFQKTS DIFRRNLSSTGWNE
SIVENLLATLHWQKEHLEEI LEDIMQEENV TWDHRTL LHLKRYL RIVRYL KAKEFSV
CAWTIVQAEILRSFFFLDKL TDSLPN"

ORIGIN

```
1 atgaccagca ggtgtatcct ccaaactgct ctcttggtat atttctccac
cacggttctt
61 gccatgaact ataacttact tcgattccaa ctaagcagca gcagtgtgga
gtgccaggag
121 ctctttctac agttgaatgg aacatctaaa gactgcctca aggacaggat
gaacttcaag
181 atccctgagg agatccagaa atcccagaag ttccagaagg aggacatcgt
attggtcacc
241 cttgagatgt tccaaaagac ttctgatatt ttcaggagaa atctctcaag
cacgggatgg
301 aatgagagca ttgtcgagaa cctccttgcc aactccact ggcagaagga
acatctggag
361 gaaatcctgg aggacatcat gcaggaggaa aacgtcactt gggaccacag
gacccttctg
421 cacctgaaga gatattatct aaggattgtg cgttacctga aagcgaagga
gttcagcgtc
481 tgtgcctgga caatagtgca agcagaaatc ctcaggagct ttttcttctt
tgataaactt
541 acagattctc tccctaactg a
```

GenBank: EF368207.1

Mustela putorius furo interferon alpha mRNA, complete cds

Features

Sequence

LOCUS EF368207 564 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interferon alpha mRNA, complete cds.
ACCESSION EF368207
VERSION EF368207.1 GI:124491200
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 564)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289104/)
REFERENCE 2 (bases 1 to 564)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..564
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
CDS 1..564
/codon_start=1
/product="interferon alpha"
/protein_id="ABN12935.1"
/db_xref="GI:124491201"

/translation="MALPCSFLVALVVLSCHSLGSLGCDLPQDHGLLHWRALMLLRQM
RRLSASSCDNYTNHFGFPQEAFDSKQLQKAQALSVIHVTNQKTFHLFCTEASPAPWNT
TLLEELCSGLSEQLGHLEACPLQEAGV GELPLVNGDSILRNYFQRISLYLQEKQYSPC
AWEMVRAEIMKPLYASTALHKRLRSRK"

ORIGIN

1 atggccctgc cctgctcctt cttggtggcc ctggtggtgc tcagctgcca
ctccctcggc
61 tctctgggat gtgacctgcc tcaggaccac ggcttctgc actggagggc
cctgatgctc
121 ctgcgacaaa tgaggagact gtctgctagc tcctgtgaca actacacaaa
ccactttggc
181 tccccccagg aggcgtttga cagcaagcag ctgcagaagg ctcaagccct
ctctgtcatc
241 catgtgacga accagaagac cttccacctc ttctgcacag aggcctcacc
tgctccctgg
301 aacacgacct tcctggagga attgtgctca ggactttctg agcagctggg
ccacctggaa
361 gcctgtcccc tgcaggaggc aggggtggga gagctgcccc tggatgaatgg
ggactccatc
421 ctgaggaact acttccagag aatctccctc tatctgcaag agaagcaata
cagcccttgt
481 gcctgggaga tgggccgagc agagatcatg aaacccttgt atgcatcaac
agccttgcat
541 aagagattgc ggagcaggaa gtga

GenBank: EF368206.1

Mustela putorius furo interleukin 2 mRNA, complete cds

Features

Sequence

LOCUS EF368206 459 bp mRNA linear MAM
14-JUN-2007
DEFINITION Mustela putorius furo interleukin 2 mRNA, complete cds.
ACCESSION EF368206
VERSION EF368206.1 GI:124491198
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 459)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED 17289104
REFERENCE 2 (bases 1 to 459)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..459
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
CDS 1..459
/codon_start=1
/product="interleukin 2"
/protein_id="ABN12934.1"
/db_xref="GI:124491199"

/translation="MYKMQLLSCIVLTLALFANSAPTTSSSTKEAQQOLEQLLLDLQL
LLNGVKNYESPRMLTFKFYMPKKATELTHLQCLAEELKLLLEVLYLAQSKNFHLTDIK
ELMSNINVTLKLGSETSFKCEYDDETVTITEFLNKWITFCQSIFSTLT"

ORIGIN

```
1 atgtacaaaa tgcaactctt gtcttgcacg gtactgactc tcgcactctt
cgcaaacagt
61 gcacctacta cttcaagctc tacgaaggaa gcacagcaac agctggagca
attgctgctg
121 gacttacagt tgctcttgaa tggagttaaa aattatgaga gcccaggat
gctcacgttt
181 aaattctaca tgccaagaa ggccacagaa ttgactcatc ttcaatgtct
agcagaagaa
241 ctcaaacttt tggaggaagt gctatattta gctcaaagca aaaactttca
cttgacagac
301 atcaaggaac taatgagcaa tatcaatgta acacttctga aactaaaggg
atctgaaaca
361 agtttcaaat gtgaatatga tgacgagaca gtaaccatta cagaatttct
gaacaaatgg
421 attacttttt gtcaaagcat cttctcaaca ctgacttga
```

GenBank: EF396236.1

Mustela putorius furo aldolase mRNA, partial cds

Features

Sequence

LOCUS EF396236 946 bp mRNA linear MAM
21-FEB-2007
DEFINITION Mustela putorius furo aldolase mRNA, partial cds.
ACCESSION EF396236
VERSION EF396236.1 GI:125971813
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia;
Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 946)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict
Morbillivirus
disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289104/)
REFERENCE 2 (bases 1 to 946)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531
boul.
des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..946
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
CDS <1..>946
/codon_start=3
/product="aldolase"
/protein_id="ABN58928.1"
/db_xref="GI:125971814"

/translation="APGKGILAADESTGSIKRXQSIGTENTEENRRFYRQLLLTADD
RVNPCIIGGVILFHETLYQKTDDGRPFPPQVIKSKGGVVGIVDKGVVPLAGTNGETTTQ
GLDGLSERCAQYKKDGADFAKWRCVLKIGEHTPSALAIMENANVLARYASICQQNGIV
PIVEPEILPDGDHDLKRCQYVTEKVLAAVYKALSDHHIYLEGTLKPNMVTTPGHACTQ

KYSHEEIAMATVTALRRTPPAVTGITFLSGGQSEEEASINLNAINKCPLLKPWALTF
SYGRALQASALKAWGGKKENLKAAQEYIKRALANSLA"

ORIGIN

1 tggctccggg caagggcatc ctggctgcag atgagtccac tgggagcatc
gccaagcggg
61 tgcagtccat yggcactgag aacacagagg agaaccgccg cttctaccgc
cagttgctgc
121 tgaccgctga tgaccgcgtg aaccctgca tygggggcgt catcctcttc
cacgagacc
181 tgtaccagaa gacagatgat gggcgtccct tcccccaagt tatcaaatcc
aagggcgggtg
241 ttgtgggcat caaggtggac aagggcgtgg tgcccctggc aggaacaaac
ggcgagacta
301 ccaccaagg gctggatggg ctgtccgagc gctgtgcca gtacaagaag
gacggagctg
361 actttgcaa gtggcgtgt gtgctgaaga ttggggaaca caccctca
gcccttgcca
421 tcatggaaaa tgccaatggt ctggcccgtt acgccagcat ctgccagcag
aacggcatcg
481 tgcccatcgt ggagcctgag atcctcccgg acggggacca cgacttgaaa
cgctgtcagt
541 atgtaaccga gaaggtgctg gctgctgtgt acaaggctct gagtgaccat
catatctacc
601 tggaaggcac tctgctgaag cccaacatgg taaccccagg ccatgcctgc
accagaaat
661 attctcatga ggagattgcc atggcaaccg tcacagcact gcgccgaca
gtgccccctg
721 ctgtcactgg gatcaccttc ctgtccggag gccagagtga ggaggaggca
tccatcaacc
781 tcaacgcat caacaagtgc cccctgctga agccgtgggc cctgaccttc
tcctatggcc
841 gcgcgtcca ggcttctgcc ctgaaggcct ggggtgggaa gaaggagaac
ctgaaggccg
901 cccaggagga gtacatcaag cgagccctgg ccaacagcct tgccctg

GenBank: EF392835.1

Mustela putorius furo glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, complete cds

Features

Sequence

LOCUS EF392835 1002 bp mRNA linear MAM
20-FEB-2007
DEFINITION Mustela putorius furo glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, complete cds.
ACCESSION EF392835
VERSION EF392835.1 GI:125743204
KEYWORDS .
SOURCE Mustela putorius furo (domestic ferret)
ORGANISM Mustela putorius furo
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Carnivora; Caniformia; Mustelidae; Mustelinae; Mustela.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1002)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets
JOURNAL Virology 362 (2), 404-410 (2007)
PUBMED [17289104](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1002)
AUTHORS **Svitek,N.** and von Messling,V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (24-JAN-2007) INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, QC H7V 1B7, Canada
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1002
/organism="Mustela putorius furo"
/mol_type="mRNA"
/sub_species="furo"
/db_xref="taxon:9669"
gene 1..1002
/gene="GAPDH"
CDS 1..1002
/gene="GAPDH"
/codon_start=1
/product="glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"
/protein_id="[ABN54800.1](#)"

/db_xref="GI:125743205"

/translation="MVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFIDLNYMVYM
FQYDSTHGKFGHTVKAENGLVINGKISISIFQERDPANIKWGDAGA EYVVESTGVFTT
MEKAGAHKGGAKRVII SAPSADAPMFVMGVNHEKYDNSLKIVSNASC TTNCLAPLAK
VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQKTVDGPSGKLWRDGRGAAQNIIPASTGAAKAVGKV
IPELNGKLTGMAFRVPTPNVSVDLTCRLEKAAKYDDIKKVVKQASEGPLKGILGYTE
DQVVSDFNSDTHSSTFDAGAGIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMVYMASKE"

ORIGIN

1 atggtgaagg tcggagtcaa cggatttggc cgtattgggc gcctggtcac
cagggtgct
61 tttaactctg gtaaagtgga tattgtcgcc atcaatgacc ctttcattga
tctcaactac
121 atggtctaca tgttccagta tgattctacc cacggtaaat tccacggcac
agtcaaggct
181 gagaacggga agcttgtcat caatgggaag tccatctcca tcttccagga
gcgagatccc
241 gccaacatca aatggggcga tgctggtgct gagtatgttg tggagtccac
tggggtcttc
301 accaccatgg agaaggctgg ggctcacttg aagggcgggg ccaagagagt
catcatctct
361 gctccttctg ctgatgcccc catgttcgtg atgggtgtga accatgagaa
gatatgacaac
421 tccctcaaga ttgtcagcaa tgccctctgt accaccaact gcttggctcc
tctggccaag
481 gtcatccatg acaactttgg cattgtggag ggactcatga ccaccgtcca
tgccatcact
541 gccaccaga agactgtgga cggcccctct ggaagctgt ggcgtgacgg
ccgaggggct
601 gcccagaaca tcatccctgc ttccactggt gcagccaagg ctgtaggcaa
ggtcatccct
661 gagctgaatg ggaagctcac tggcatggcc ttccgtgtcc ccacccccaa
cgtgtctggt
721 gtggatctga cctgccgctt ggagaaagct gccaaatag atgacatcaa
gaagtggtg
781 aagcaggcat cagagggccc ccttaagggc atcctggggt atactgagga
ccaggttgtc
841 tcctgcgact tcaacagtga caccactcc tctacctcg atgctggggc
tggcattgct
901 ctcaatgacc actttgtcaa gctcatttcc tggatgaca atgaatttgg
ctacagcaac
961 cgggtggtgg acctcatggt ctacatggcc tccaaggagt aa

ANNEXE II : Contributions complémentaires

Une infection grippale saisonnière sévère chez le furet corrèle avec une induction réduite d'interféron et une augmentation de l'induction d'IL-6

Nicholas Svitek, Penny A. Rudd, Karola Obojes, Stéphane Pillet, Veronika von Messling

Virology (2008). 376 : 53-59

Dans cette publication, j'ai participé à l'élaboration de la figure numéro 5. Pour ce faire, j'ai établi l'isolation et la purification d'ARNm provenant de cellules présentes dans la cavité nasale des furets. J'ai contribué au clonage du gène de l'interleukine 8 de furet. J'ai aussi contribué à la génération des données de l'induction de cytokines par l'essai de PCR en temps réel que j'avais précédemment établi lors d'études d'infection par le CDV.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Virology. 2008 Jun 20;376(1):53-9.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.02.035>

Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction

Svitek N, Rudd PA, Obojes K, Pillet S, von Messling V.

Résumé

Bien que le furet est un des modèles animaux les plus utilisés pour l'étude de la pathogenèse du virus de la grippe, la pénurie de réactif immunologique convenable à, jusqu'à ce jour, limité leur utilisation dans des études de la réponse de l'hôte. Utilisant un essai de PCR en temps réel récemment établi pour une gamme de cytokine de furet, nous avons analysé la réponse immunitaire locale chez le furet envers des isolats humains du virus influenza de sous-types H1N1 et H3N2 qui variaient dans leur virulence. Nous avons observé que la sévérité des signes cliniques corrélait avec des changements histopathologiques dans les poumons et qu'elle était indépendante du sous-type. Les souches causant une maladie bénigne était associées à une forte et rapide réponse innée ainsi qu'une régulation à la hausse de l'IL-8, alors que les infections sévères étaient caractérisées par une moindre induction des interférons de type I et II ainsi qu'une forte régulation à la hausse de l'IL-6. Ces découvertes suggèrent que des souches plus virulentes doivent interférer plus efficacement avec la réponse de l'hôte à des étapes précoces de l'infection.

Un virus de la rougeole chimérique contenant l'enveloppe du virus de la maladie de Carré (CDV) protège les furets d'un défi léthal par leCDV

Ronan Nicolas Rouxel, Nicholas Svitek et Veronika von Messling

Vaccine (2009)

Dans cette publication, j'ai participé aux études *in vivo* et j'ai entraîné M. Ronan Nicolas Rouxel à bien effectuer les manipulations animales. De plus, j'ai supervisé M. Rouxel à effectuer les essais de neutralisation, les comptes leucocytaires ainsi que les infections de PBMCs *in vitro* et de leur analyse par FACS.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Vaccine. 2009 Aug 6;27(36):4961-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.096. Epub 2009 Jun 18.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.096>.

A chimeric measles virus with canine distemper envelope protects ferrets from lethal distemper challenge.

Rouxel RN, Svitek N, von Messling V.

Résumé

Le CDV infecte un large éventail de carnivores, et au cours des dernières décennies, a provoqué des épidémies dans une variété de populations de carnivores sauvages. Puisque le vaccin vivant atténué, actuellement disponible, n'est pas suffisamment sécuritaire chez ces espèces hautement sensibles, nous avons produit un virus chimériques combinant le complexe de réplication de la souche vaccinale de la rougeole Moraten avec l'enveloppe d'un récent isolat du CDV de type sauvage. Le virus résultant ne cause pas de maladie ou d'immunosuppression chez les furets et leur confère une protection suite à un défi avec la souche létale de type sauvage, démontrant son utilité potentielle dans les efforts de conservation de la faune.