

**ALPHONSE LIGONDÉ**

**Immunisation génétique anti-BLV: Effet de la co-injection du gène codant pour l'IL-2 sur la réponse immunitaire humorale**

Mémoire

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

Jury d'évaluation:

M. Arella, Ph.D. directeur  
A. Merzouki, Ph.D co-directeur  
D.J.S. Arora, Ph.D. président  
J. Galipeau, M.D. correcteur externe

**DÉCEMBRE 2000**

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

*À ma mère, à mon père, à mon frère  
À ma famille et tous ceux qui m'ont  
soutenu au cours de ce travail*

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
SOMMAIRE	ix
1. INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Leucose Bovine Enzootique (EBL)	5
2.1.1 Historique	5
2.1.2 Description de la maladie	5
2.1.3 Impact sanitaire et économique de l'infection au BLV	6
2.1.4 Transmission du BLV	7
2.1.5 Prévalence mondiale de l'infection du BLV	9
2.2 Virus de la Leucémie Bovine (BLV)	10
2.2.1 Taxonomie	10
2.2.1.1 Morphologie et propriétés physico-chimiques	10
2.2.2 Structure virale	10
2.2.2.1 Génome viral	10
2.2.2.2 Les protéines structurales virales	11
2.2.2.3 ARN messagers viraux	16
2.2.3 Régulation de l'expression du BLV	16
2.2.3.1 Activation de l'expression par la protéine Tax	16
2.2.3.2 Régulation de l'expression par la protéine Rex	17
2.2.3.3 Les protéines GIII et RIV	17
2.2.4 BLV et la transformation cellulaire	18
2.3 Prophylaxie de l'infection du BLV	19
2.3.1 Vaccin recombinant <i>env-vaccine</i>	19
2.3.2 Vaccin BLV mutants	20
2.3.3 Vaccin ADN	20
2.4 Immunisation génétique	20
2.4.1 Historique	21
2.4.2 Principe	23
2.4.2.1 Maturation et Présentation de l'antigène	23
2.4.3 Facteurs modifiant l'immunité	25
2.4.3.1 Caractéristiques du vecteur	25
2.4.3.2 Motifs CpG et séquences immunostimulatrices	25

2.4.3.3	Méthode et voie d'immunisation	26
2.4.3.3.1	Intramusculaire	27
2.4.3.3.2	Genegun	27
2.4.3.4	Caractéristiques de l'antigène	28
2.4.3.5	Régime d'immunisation	29
2.4.4	Optimisation de la réponse immunitaire	30
2.4.4.1	Cytokines	30
2.4.4.2	Molécules costimulatrices	32
2.4.5	Avantages <i>versus</i> Inquiétudes	32
	OBJECTIFS	34
3.	MATERIEL ET METHODES	36
3.1	Virus de la leucose bovine	37
3.1.1	Provenance	37
3.1.2	Production	37
3.1.3	Purification sur gradient de saccharose	37
3.1.4	Visualisation en microscopie électronique	38
3.1.5	Visualisation sur gel de polyacrylamide	38
3.2	Extraction des acides nucléiques viraux	39
3.3	Amplification par PCR du cadre de lecture ouvert de la glycoprotéine d'enveloppe gp51	40
3.3.1	Amorces oligonucléotidiques sens et anti-sens	40
3.3.2	Réaction de polymérisation en chaîne	41
3.3.3	Analyse électrophorétique de l'amplicon ANDc gp51	41
3.4	Clonage et Séquençage de l'insert ANDc gp51 dans le vecteur pCR™ 2.1	42
3.4.1	Purification de l'insert	42
3.4.2	Clonage dans le vecteur pCR™2.1	
3.4.2.1	Réaction de ligation	43
3.4.2.2	Transformation des bactéries <i>E.coli</i> (invαf <sup>r</sup> )	44
3.4.3	Criblage des bactéries recombinantes et confirmation de la présence de l'insert ADNc dans le plasmide recombinant	44
3.4.4	Séquençage de l'ADN gp51	46
3.5	Sous-clonage de l'insert ADN gp51 dans le vecteur d'expression pcDNA3	46
3.5.1	Digestion et purification de l'insert ADNc gp51 et du vecteur d'expression pcDNA3	47
3.5.2	Ligation du fragment ADNc gp51 dans le vecteur pcDNA3 linéarisé	47
3.5.3	Transformation <i>E.coli</i> XL1Blue	48
3.5.3.1	Préparation de cellules compétentes	48
3.5.3.2	Transformation	49
3.5.3.3	Criblage des bactéries recombinantes et confirmation de la présence de l'insert ADNc dans le plasmide recombinant	49

3.5.3.4 Séquençage de l'ADN gp51	49
3.5.4 Maxipréparation de l'ADN gp51	50
3.5.4.1 Extraction des plasmides recombinants par lyse alcaline	50
3.4.4.2 Dosage d'ADN	51
3.6 Production de l'interleukine-2 murine	51
3.6.1 Élu­tion(dans solution saline)	51
3.6.2 Transformation et Criblage de bactéries recombinantes pour la présence du plasmide recombinant	52
3.6.3 Séquençage de l'ADN de L'IL-2 murine	53
3.6.4 Maxipréparation de l'ADN IL-2	53
3.6.4.1 Extraction des plasmides recombinants par lyse alcaline	53
3.6.4.2 Préparation de l'acide nucléique pour l'injection	53
3.7 Protocole d'immunisation	54
3.7.1 Les animaux	54
3.7.2 Voie et calendrier des injections	57
3.8 Évaluation de la réponse humorale	57
3.8.1 ELISA	57
3.8.2 Immunobuvardage de type "Western"	58
3.8.2.1 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	58
3.8.2.2 Immunobuvardage	59
3.8.3 Immunoprécipitation	60
4. RÉSULTATS	
4.1 Purification du virus	63
4.2 Amplification par PCR de la glycoprotéine d'enveloppe gp51	63
4.3 Production du plasmide recombinant codant pour l'IL2 murine	70
4.4 Production en maxipréparation des plasmides recombinants pcDNA3/gp51 et pcDNA3/IL2 et du pcDNA3 seul	72
4.5 Evaluation de la réponse immunitaire humorale	72
4.5.1 Recherche d'anticorps anti-gp51 suscités par l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 par un test ELISA indirecte	72
4.5.2 Cinétique de production d'anticorps	76
4.5.3 Évaluation du titre d'anticorps	76
4.6 Évaluation de la spécificité des anticorps suscités par les différents types d'injection par immunobuvardage de type "Western"	82
4.7 Immunoprécipitation	90
5. DISCUSSION	94
6. CONCLUSION	102
REMERCIEMENTS	105
RÉFÉRENCES	107

**LISTE DES TABLEAUX**

page

**TABLEAU 1:** Protocole d'injection des souris. 55**TABLEAU 2:** Courbes d'absorbance et titres d'anticorps obtenus en  
fonction des différents types d'injection. 84

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1:	Structure génomique du Virus de la Leucose Bovine (BLV)	13
FIGURE 2:	Micrographie électronique représentant le virus de la leucose bovine (BLV)	65
FIGURE 3:	Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines virales du BLV	66
FIGURE 4:	Profil électrophorétique sur gel d'agarose de l'amplicon gp51	67
FIGURE 5:	Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'amplicon gp51	68
FIGURE 6:	Profil électrophorétique sur gel d'agarose du plasmide recombinant pcDNA3/IL2	71
FIGURE 7:	Profil électrophorétique des maxipréparations plasmidiques de pcDNA3/gp51, pcDNA3/IL2 et pcDNA3	74
FIGURE 8:	Titre ELISA de la réponse en anticorps obtenue suite à différentes Immunisations	75
FIGURE 9:	Cinétique de production d'anticorps (pcDNA3/gp51 vs. BLV)	78
FIGURE 10:	Cinétique de production d'anticorps (pcDNA3/gp51+ pcDNA3/IL2 vs BLV)	80
FIGURE 11:	Titre d'anticorps en fonction des types d'injection	86
FIGURE 12:	Détection de protéines virales par Immunobuvardage de type "Western" à l'aide des sérums provenant des 2 <sup>ième</sup> et 3 <sup>ième</sup> séries d'immunisation	88
FIGURE 13:	Détection des protéines virales immunoprécipitées par immunobuvardage de type "Western"	91

## LISTE DES ABREVIATIONS

- A : Base déoxyadenosine  
a.a : acides aminé  
ADN: acide désoxyribonucléique  
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire  
ARN: acide ribonucléique  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
 $\alpha$ : alpha  
 $\beta$ : bêta  
 $\mu$ g: microgramme  
 $\mu$ l: microlitre  
BLV : "Bovine Leukemia Virus" (Virus de la leucose bovine)  
BSA: albumine sérique bovine "Bovine Serum Albumine"  
C : Base déoxycytosine  
°C: degré Celsius  
CRE : "cAMP responsive element"  
CREB2: "cAMP responsive element binding protein-2"  
CPA: cellule présentatrice d'antigène "Cell Presenting Antigen"  
DO: densité optique  
E.coli : Escherichia coli  
EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique  
ELISA: enzyme linked immunosorbent assay  
FLK : "Fœtal Lamb Kidney" (cellules de reins d'agneaux fœtaux)  
G : Base déoxyguanidine  
g: gramme  
g: force gravitationnelle  
H<sub>2</sub>O : Eau  
HTLV : "Human T-cell Leukemia virus"  
IgG: immunoglobuline Gamma

IL-2 :	Interleukine-2
Kb:	kilobase
KDa:	kilodalton
Kg:	kilogramme
M:	mole (Concentration molaire)
mg:	milligramme
ml:	millilitre
mM:	millimole
NK:	"natural killer cell"
Nm:	nanomètre
Pb:	paire de base
PBS:	solution saline phosphatée
PCR:	réaction en chaîne de la polymérase
p/v:	poids par volume
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE:	electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl Sulfate
sec :	seconde
T :	Base déoxythymidine
UV:	ultraviolet
V:	volt
v/v:	volume par volume
CTL:	lymphocytes T-cytotoxiques
Gp:	glycoprotéine
LTR:	longue répétition terminale
PVDF:	difluorure de polyvinylidène

## SOMMAIRE

Parmi les affections qui touchent les bovins, la leucose bovine enzootique (EBL) est parmi les plus fréquentes. Le virus de la leucose bovine (BLV) est le responsable de ce désordre lymphoprolifératif ciblant essentiellement les cellules B. Afin de contrôler la dispersion de l'infection virale, plusieurs stratégies prophylactiques ont été employées dont les vaccins classiques et recombinants, à base de virus de la vaccine. Plus récemment, il a été démontré que les vaccins à base d'ADN codant pour une protéine virale sont capables d'induire une réponse immunitaire antivirale et de conférer une protection durable. Les mécanismes qui sont à la base des réponses immunitaires variables ne sont pas encore bien définis. Plusieurs hypothèses relient ces différences à l'efficacité de transfection; l'expression et la nature antigénique de la protéine codée, et la capacité de la protéine à être présentée de façon appropriée au système immunitaire. L'utilisation de cytokines, notamment l'interleukine 2, comme adjuvants, peut augmenter la réponse immunitaire lors d'une administration simultanée à un vaccin à base d'ADN.

Dans cette étude, nous avons voulu démontrer que l'efficacité d'une préparation d'ADN contenant la gp51 du BLV, peut être grandement améliorée par la co-injection d'un plasmide codant pour l'interleukine-2 (IL-2). Il est connu que la majorité des vaccins classiques contre les rétrovirus animaux ciblaient une protection via la production d'anticorps neutralisants. Ainsi, nous avons choisi comme gène modèle, le gène codant pour la glycoprotéine majeure de l'enveloppe gp51, la protéine cible des anticorps neutralisants.

Nos résultats démontrent, en premier lieu, chez un modèle murin, qu'il y a une réponse humorale spécifique associée à l'immunisation génétique anti-BLV. De plus, cette réponse ne semble visible qu'en présence d'immunoadjuvant (IL-2). Ces résultats ouvrent la voie à des études d'efficacité de ce type de vaccin chez l'espèce bovine, hôte naturel du BLV.

## **1. INTRODUCTION**

Le virus de la leucose bovine enzootique (BLV) est un rétrovirus semblables au virus leucémogène humain HTLV (Schwartz, 1994). La plupart (70%) des bovins infectés par ce virus développent une prolifération lymphocytaire B accompagnée d'une diminution des performances zootechniques (Schwartz, 1994). Environ 1 à 5% des animaux infectés meurent de lymphosarcome B (Schwartz, 1994). Cette maladie, à faible incidence au Canada, (Shettigara *et al.*, 1986) entraîne d'importantes pertes économiques par les baisses de productions laitières et d'efficacité de reproduction, pertes de poids et la mort des animaux infectés (Olson, 1974)

Plusieurs stratégies de prophylaxie faisant appel à la vaccination avec des vecteurs vaccine recombinants ayant comme gène marqueur la protéine de l'enveloppe (Portetelle *et al.*, 1991, 1993), à des provirus BLV génétiquement modifié (Willems *et al.*, 1993 ; Temin, 1993) et à des animaux transgéniques résistants (Cantor *et al.*, 1993) ont été étudié pour contrôler l'infection par le BLV.

L'un des plus récents progrès dans le domaine de la vaccination est l'immunisation par ADN. Cette nouvelle technologie se décrit comme étant l'induction d'une réponse immunitaire contre une protéine antigénique, exprimée *in vivo*, suite à l'introduction d'ADN plasmidique codant pour la séquence polypeptidique (Davis *et al.*, 1994).

Depuis plusieurs années, des adjuvants ont été utilisés afin d'améliorer l'efficacité des vaccins. L'adjuvant de Freund est parmi ceux les plus fréquemment utilisés en laboratoire (Iwasaki *et al.*, 1997). Ce mélange d'huile non-métabolisable, de surfactant et de mycobactérie est considéré comme l'un des plus efficaces. Le désavantage majeur associé à cet adjuvant est qu'il entraîne une forte réponse inflammatoire au site d'injection (Geissler *et al.*, 1997). Cette réaction inflammatoire peut causer la formation de granulomes chroniques, d'abcès et même de nécrose du tissu de l'animal (Geissler *et al.*, 1997). Pour ces raisons il devient impératif de développer des nouvelles stratégies de vaccination.

Parmi les nouvelles avenues, l'utilisation de nombreuses cytokines lors des immunisations est préconisée. Certaines études ont démontré que l'ampleur et la nature de la réponse immune générée par des vaccins classiques ou à base d'ADN peuvent être modulés par la co-injection de plasmides codant par des cytokines. (Iwasaki *et al.*, 1997 ; Geissler *et al.*, 1997 ; Chow *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 1998). Parmi ces dernières, l'interleukine-2 est celle qui est la plus étudiée à ce titre.

Ce projet de recherche a pour but d'évaluer le rôle immunomodulateur de l'interleukine-2, au niveau de la réponse immunitaire humorale, dans le cadre du développement éventuel d'un vaccin ADN anti-BLV. Nous avons utilisé le gène codant pour la glycoprotéine de l'enveloppe, gp51, à titre de gène marqueur. Pour des raisons pratiques, cette étude a été réalisée dans le modèle murin qui n'est pas un hôte naturel du virus (Schwartz 1994).

## **2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **2.1. La Leucose Bovine Enzoétique (EBL)**

### **2.1.1 Historique**

Parmi les affections qui touchent les bovins, la leucose bovine enzootique est la plus fréquente des maladies néoplasiques rencontrées. Le premier cas de leucémie bovine a été reporté en 1871 dans la région de Klaipeda en Lituanie lorsqu'on a observé une vache qui présentait des nœuds lymphatiques hypertrophiés et de la splénomégalie. Par la suite, en 1917, Kenneth démontre que cette maladie est causée par un agent contagieux, le virus de la leucose bovine (BLV) (revue de Burny *et al.*, 1980). C'est en 1976 que Kettmann et ses collaborateurs démontrent que les particules de BLV sont des virus à ARN exogène et qu'elles transportent un complexe ARN transcriptase inverse. Cette découverte a permis la classification du BLV parmi les rétrovirus oncogènes (Kettmann *et al.*, 1976).

### **2.1.2 Description de la maladie**

Le BLV induit une infection chronique et persistante qui cible essentiellement les lymphocytes B (Kettmann *et al.*, 1980; Levy *et al.*, 1987). La transmission virale se réalise par les différentes composantes du sang infectées (revue de Burny *et al.*, 1980). L'animal, une fois infecté, développe des anticorps dirigés contre les protéines de la capsid et celles de l'enveloppe 2 à 8 semaines post infection (revue de Burny *et al.*, 1980). Ces anticorps sont présents durant toute la vie de l'animal et présenteront des niveaux de variation importants, qui sont probablement reliés à son état physiologique et immun (Schwartz *et al.*, 1994).

Dans les années qui suivent l'infection, 70% des animaux vont démontrer une augmentation du ratio lymphocytes B/T dans le sang, tout en conservant un nombre total, apparemment normal de lymphocytes, soit environ de 4000 à 10 000 par mm<sup>3</sup> de sang (Lewin, 1989). Parmi ces animaux, la moitié développeront une lymphocytose persistante

qui correspond à une augmentation stable du nombre de lymphocytes circulants qui peut atteindre parfois jusqu'à 100 000 par mm<sup>3</sup> de sang (Lewin,1989). Plus récemment, Yakobson et son équipe ont démontré que la progression de la maladie vers le stade de lymphocytose persistante peut être ralentie par l'expression hâtive et continue de cytokines (Yakobson *et al.*, 2000).

L'expansion de la population lymphocytaire est le résultat de la prolifération polyclonale de lymphocytes B matures qui sont cytologiquement et karyotypiquement normaux (Grimaldi *et al.*, 1983). La plupart de ces lymphocytes ont pour caractéristique de porter les marqueurs CD5 (Ungar-Waron *et al.*, 1999) CD11b et CD11c (Letesson *et al.*, 1991). De plus, Dusinsky et ses collaborateurs ont démontré que les lymphocytes isolés de bétail infecté par le virus BLV démontrent une diminution, de l'expression de l'ordre de 50 %, du marqueur L-sélectine (CD62L) comparativement aux lymphocytes provenant d'animaux sains (Dusinsky *et al.*, 2000). Cette expression réduite pourrait contribuer à une dérégulation du système immunitaire de l'hôte (Dusinsky *et al.*, 2000).

La démonstration ultime et rare de l'infection au BLV, apparaissant chez 1 à 5% des animaux infectés, est le développement de lymphosarcomes multicentriques 1-8 ans après infection (Burny *et al.*, 1980 ; Lewin *et al.*, 1989). Les 2/3 des animaux qui développent des tumeurs présentaient déjà les signes cliniques de lymphocytose persistante (Burny *et al.*, 1980). Cette forme tumorale de l'infection au BLV affecte seulement le bétail âgé de 2 ans et plus. Le pic d'incidence de cette forme tumorale survient autour des âges de 5 à 8 ans (Lewin, 1989), permettant ainsi la différenciation avec les cas de leucémie sporadique bovine. Cette dernière affecte seulement les animaux de moins d'un an et n'est pas associée à l'infection au BLV.

### **2.1.3 Impact sanitaire et économique de l'infection au BLV**

Ces manifestations cliniques induites par le virus entraînent d'importantes pertes économiques. Elles relèvent tout d'abord des coûts associés à l'infection, c'est-à-dire. i) les coûts reliés à la perte de production laitière par les vaches qui présentent des signes

cliniques de la maladie, ii) perte de production chez les animaux infectés, iii) les coûts vétérinaires associés au diagnostic de la leucémie, iv) et les coûts associés à la mort ou à l'abattage (Pelzer *et al.*, 1997). De plus, nous observons les pertes de revenus occasionnées par les restrictions d'exportation de vaches laitières et de produits dérivés, notamment les embryons et le semen, et les coûts à la société pour la recherche scientifique (Pelzer *et al.*, 1997). Aux États-Unis, les pertes économiques liées à l'infection au BLV étaient estimées à 86 millions \$ en 1992 (Da *et al.*, 1993).

En considérant le mode de transmission du virus, il est théoriquement possible d'éradiquer l'infection en utilisant des mesures sanitaires. Plusieurs pays, dont le Danemark en 1959 et l'Allemagne en 1963, ont engagé une lutte contre l'infection au BLV (revue de Burny *et al.*, 1980). La France, pour préserver ces échanges économiques avec la CEE, a dû procéder de la même manière en décrétant le 8 mai 1981 que la forme tumorale du BLV est une maladie contagieuse. Cela a impliqué l'abattage systématique et l'enlèvement des carcasses présentant des lésions tumorales ainsi que le marquage des animaux à abattre pour être consommés dans les 6 mois. Les fermes se sont vues offrir une étiquette de qualité pour les cheptels exempts de leucémie bovine enzootique. En 1988, les mesures contre le BLV se sont intensifiées avec l'identification obligatoire d'animaux séropositifs. Pour encourager les éleveurs à se débarrasser de leurs bêtes séropositives, le gouvernement a octroyé une subvention d'environ 600 \$ pour chaque animal abattu à l'intérieur du mois qui a suivi son identification. Globalement ces mesures ont coûté 100 millions \$ en 1988 (Pelzer *et al.*, 1997).

#### **2.1.4 Transmission du BLV**

En plus du bétail, le BLV infecte naturellement le zébus, le buffle et le capybaras (Burny *et al.*, 1980). De façon verticale, le virus est transmis par l'entremise de lymphocytes infectés (Mammerickx *et al.*, 1988). Il a été démontré qu'aussi peu que 1500 lymphocytes provenant d'une vache présentant des signes cliniques de lymphocytose persistante sont suffisants pour infecter un autre animal (Mammerickx *et al.*, 1988). Généralement cette contamination est iatrogénique, et survient lorsque les

animaux sont manipulés sans le respect des règles d'hygiène pour les injections, le tatouage ou les examens rectaux (Burrige et Thurmond, 1981).

Oshima et ses collaborateurs ont reporté que dans certaine région, la transmission pouvait également se réaliser à l'aide d'insectes piqueurs tel que les Tabanidés (Oshima *et al.*, 1981). De plus, les sécrétions bronchiales qui contiennent des lymphocytes infectés peuvent aussi être une source d'infection surtout lorsque les animaux sont maintenus dans des enclos surpeuplés (Burrige et Thurmond, 1981). Le BLV ne semble pas se transmettre par voie sexuelle (Valikhov *et al.*, 1984).

En ce qui concerne la transmission horizontale, les veaux peuvent être infectés durant la seconde moitié de la gestation, principalement lorsque la mère est en lymphocytose persistante (Burrige et Thurmond, 1981). Malgré son potentiel virulent, le colostrum est une source mineure d'infection, car la présence d'anticorps anti-BLV qu'il contient protège le veau (Van der Maaten *et al.*, 1981).

Pour ce qui a trait aux infections expérimentales, les moutons sont préférentiellement utilisés (Pelzer *et al.*, 1997). En effet, ces derniers sont très sensibles à l'infection au BLV soit par des lymphocytes infectés ou par des particules virales purifiées (Mammerickz *al.*, 1988). Les moutons développent des lymphosarcomes dans plus de 90% des cas dans les 6 mois jusqu'à 7 ans suivant l'injection, tout dépendant de la charge virale au moment de l'infection (Mammerickz *al.*, 1988). Cette sensibilité supérieure des moutons semble due à la grande permissivité des cellules ovines à la réplication virale (Burny *et al.*, 1980).

Le lapin est un modèle expérimental intéressant pour l'infection au BLV, puisque celui-ci développe un syndrome d'immunodéficience 45 à 763 jours après infection (Altanerova *et al.*, 1989). On peut détecter environ 3 semaines après à l'infection expérimentale, des anticorps dirigés contre la protéine de la capsid ainsi que la présence de provirus intégré dans les leucocytes du sang périphérique (Altanerova *et al.*, 1989). D'autres espèces animales, comme le rat, le porc, le singe rhésus et le chimpanzé sont

capables de développer des anticorps suite à une infection expérimentale, mais la présence de provirus intégré dans les cellules hôtes n'a pas été démontré (Burny *et al.*, 1980).

Si on s'en tient aux études sérologiques, les humains ne semblent pas être susceptibles à l'infection au BLV (Oshima *et al.*, 1981). Cependant, les études de Derse et Martarano ont démontré que les cellules humaines étaient sensibles à l'infection au BLV *in vitro* (Derse et Martarano, 1990).

### **2.1.5 Prévalence mondiale de l'infection au BLV**

Les échanges commerciaux d'animaux reproducteurs ont mené à la propagation de l'infection au BLV dans le monde. Pour cette raison, plusieurs pays européens ont établi des programmes de lutte contre le BLV, ce qui a mené à l'éradication de l'infection en Belgique, Irlande, Luxembourg et la Norvège (Pelzer *et al.*, 1997). D'autres pays de l'Europe de l'Ouest sont sur la voie de l'éradication (Pelzer *et al.*, 1997).

Plus près de nous, les États-Unis, le Canada et l'Australie sont aussi affectés par l'infection au BLV. Ceci est explicable par le fait qu'en Amérique du Nord les cas de leucémie bovine ne sont pas à déclaration obligatoire (Pelzer *et al.*, 1997). Plus précisément, aux États-Unis et au Canada, 66% des cheptels laitiers (10.2% des animaux) et 14% de ceux destinés à être consommé (1.2% des animaux) sont infectés par le virus et on observe d'importantes variations entre les provinces ou États (Da *et al.*, 1993).

Des sondages aléatoires des bétails canadiens dans les débuts des années 1980. ont démontré que 40% à 45% des troupeaux laitiers et 14% du bétail étaient affectés par une maladie infectieuse. De ces sondages, 9.3% des vaches laitières et 0.5% des troupeaux de bœufs étaient infectés par le BLV. Le pourcentage de troupeaux infectés dans chaque province varie de 0% à 60%. Il est à souligner que 90% des troupeaux infectés étaient situés au Manitoba, en Ontario et au Québec (Da *et al.*, 1993).

## **2.2. Virus de la Leucémie Bovine (BLV)**

### **2.2.1 Taxonomie**

Le virus de la leucose est membre de la sous-famille des Oncovirinae dans la famille des Retroviridae (Coffin, 1991) et est apparenté aux virus de la leucémie humaine (HTLV I et II). Il est classé dans le genre HTLV-BLV (Zandomeni *et al.*, 1991)

#### **2.2.1.1 Morphologie et propriétés physico-chimiques**

Les particules virales du BLV sont enveloppées et de formes sphériques. Leur diamètre varie entre 80 à 100 nm et possèdent des projections formées par des glycoprotéines de surface de 8 nm de longueur. Le noyau interne est sphérique ou icosaédrique et renferme la nucléocapside virale concentrique (ICTV, 1993).

Pour ce qui est des propriétés physico-chimiques, la densité du virus dans le saccharose a été évaluée à 1.16-1.18g/cm<sup>3</sup> (ICTV, 1993). Les particules virales sont sensibles à la chaleur, aux détergents et au formaldéhyde mais sont relativement résistantes aux U.V. Les glycoprotéines de surface peuvent être partiellement clivées par des enzymes protéolytiques (ICTV, 1993).

### **2.2.2 Structure virale**

#### **2.2.2.1 Génome viral**

La première séquence complète du BLV publiée indique que le virus possède 8714 nucléotides (Sagata *et al.*, 1985). Comme tous les rétrovirus, les extrémités du BLV présentent des séquences appelées LTR "Long Terminal Repeat" qui sont composées de 3 régions consécutives nommées U3, R et U5 (Schwartz *et al.*, 1994). La figure 1 montre la structure génomique du BLV. En 5' la région U3 contient les

séquences régulatrices de la transcription. La région 3'U3 contient les signaux de polyadénylation et l'extrémité 3' de la région R correspond au site de polyadénylation. Les ARNm viraux sont initiés à la première base de la région R. Comme schématisé sur la figure 1, le génome est constitué de 8 gènes: *gag*, *pri*, *pol*, *env*, *tax*, *rex*, *RIII* et *GIV* (Alexandersen *et al.*, 1993).

### 2.2.2.2 Les protéines structurales

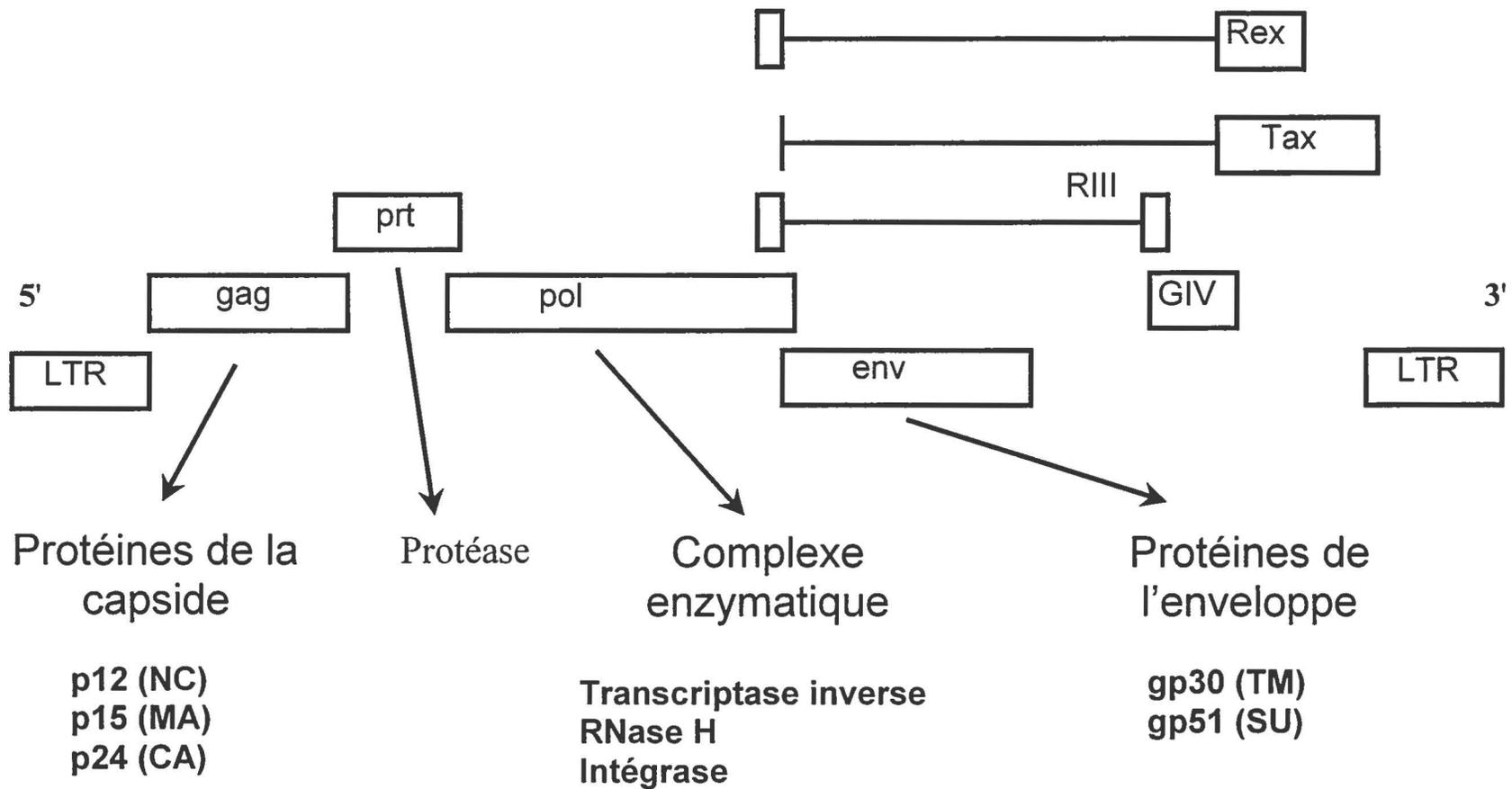
Les particules virales du BLV sont constituées de 2 ARNs viraux et de protéines structurales (Alexandersen *et al.*, 1993). Ces protéines sont celles de la capsid, les protéines de l'enveloppe, la transcriptase inverse et la protéase virale qui sont codées par les cadres de lecture ouverts *gag*, *env*, *pol*, et *pri* respectivement (Alexandersen *et al.*, 1993).

Les protéines matures de la capsid, la transcriptase inverse et la protéase sont obtenues après le clivage de 3 protéines précurseurs différentes, provenant d'un AUG commun situé à l'extrémité 5' de la région *gag*. Ces 3 précurseurs sont fabriquées à partir de 3 cadres de lecture différents, et sont le résultat d'un changement de cadre de lecture d'un ou de deux nucléotides durant la traduction (Hatfield *et al.*, 1989). Les protéines codées par le gène *gag* sont impliquées dans la formation de la capsid virale (Yoshinaka *et al.*, 1986). Un précurseur de 45 KDa est d'abord synthétisé et puis clivé par la protéase virale pour donner les protéines matures *p15*, *p24* et *p12*. La *p24* est la protéine majeure de la capsid. La *p12* constitue la nucléocapsid et est associée à 2 molécules d'ARN viraux monocaténaïres et identiques (Yoshinaka *et al.*, 1986). La *p15* est une protéine myristilée associée aux protéines de la capsid et à la double couche lipidique de la membrane virale (Yoshinaka *et al.*, 1986).

Le produit mature du gène *pol* (70 KDa) est produit à partir d'une protéine précurseur de 145 KDa. Elle a une activité ADN polymérase ARN-dépendante (transcriptase inverse) dans sa portion N-terminale et une activité ribonucléase H dans sa

portion C-terminale (Burny *et al.*, 1980). Le produit du gène *pol* possède également une activité intégrase (Burny *et al.*, 1980).

**Figure 1: Structure génomique du Virus de la Leucose Bovine (BLV)**



Tiré de The International Committee on Taxonomy of Viruses (1993)

Le produit du gène *pri* est synthétisé à partir d'une protéine précurseur de 65 KDa qui provient d'un clivage par une protéase aspartique dimérique de 14 KDa (Kato *et al.*, 1989). Elle réalise les clivages des protéines précurseurs des gènes *gag*, *pri*, *pol* et *env* (Kato *et al.*, 1989).

Les glycoprotéines matures gp51 et gp30 sont obtenues suite à un clivage par la protéase virale d'une protéine précurseur glycosylée de 72 KDa (Vonèche *et al.*, 1992). Johnston et ses collaborateurs ont rapporté que la gp51 et la gp30 sont liées par des ponts disulfures (Johnston *et al.*, 2000). La gp51 se retrouve à la surface de la membrane virale et assure la reconnaissance du récepteur viral cellulaire (Vonèche *et al.*, 1992). Le segment N-terminal de la gp30 est insérée de manière oblique dans la double couche lipidique et ancre le complexe gp51/gp30 dans l'enveloppe virale et de la membrane de la cellule infectée (Vonèche *et al.*, 1992). L'association gp30/gp51 aide à la fusion des membranes durant l'infection de la cellule hôte et contribue ainsi à la formation de syncytia (Vonèche *et al.*, 1992).

Il a été suggéré que la gp30 puisse avoir une fonction de signalisation dans la cellule infectée. En effet, sa portion intracytoplasmique présente un motif (YXXL), qui est impliqué dans la transduction du signal récepteur des cellules T ( $\zeta$  chain) et des cellules B (Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  chain) (Alber *et al.*, 1993). Il est plausible de penser que les anticorps anti-BLV dirigés contre l'enveloppe pourraient stimuler la gp30 et dérégler ainsi la prolifération des cellules infectées (Alber *et al.*, 1993).

Contrairement aux lentivirus, les protéines d'enveloppe gp30 et gp51 sont bien conservées parmi les variants connus (Schwartz *et al.*, 1994). La comparaison de séquence nucléotidique d'enveloppe de 7 isolats Européens, Américain et Japonais ont démontré une variabilité inférieure à 6% (Mamoun *et al.*, 1990) alors qu'en comparaison la variabilité nucléotidique atteint 66% entre les protéines d'enveloppe des différents variants du HIV-1 (Goudsmit *et al.*, 1991).

### 2.2.2.3 ARN messagers viraux

La transcription du génome du BLV produit au moins 7 ARNms viraux qui sont obtenus par épissage alternatifs. Les ARNms non-épissés codent pour les protéines de la capsid, la transcriptase inverse et la protéase virale. Un ARN viral mono-épissé code pour les glycoprotéines de l'enveloppe, et un ARNm viral doublement épissé code pour des protéines régulatrices de la transcription appelées Tax et Rex. La protéine Tax stimule l'initiation de la transcription, alors que Rex favorise la stabilité et le traitement des ARNms mono-épissés et non-épissés et régulent ainsi la synthèse des protéines structurales virales. Il y a également 2 autres ARNms qui codent pour 2 nouvelles protéines RIII et GIV pour lesquelles les rôles ne sont pas encore bien définis.

### 2.2.3 Régulation de l'expression du BLV

La portion 3' du génome du BLV, autrefois appelé la région pX, code pour 4 protéines: Tax, Rex, RIII et GIV. Il est actuellement bien documenté que les protéines Tax et Rex participent dans la régulation de l'expression du BLV.

#### 2.2.3.1 Activation de l'expression par la protéine Tax

La protéine Tax du BLV est une phosphoprotéine de 34 kDa qui transactive l'initiation de la synthèse d'ARN à partir de la région U3 du LTR viral (Katoh *et al.*, 1989). La région U3 comprend 3 éléments de 21 paires de base (bp) qui sont sensibles à l'action transactivateur de la protéine Tax (Derse, 1987). Ces 3 éléments sont fortement homologues et comprennent un noyau de 8 paires de base, qui ressemblent à l'élément sensible au cAMP (CRE). Une mutation du CRE dans le LTR du BLV supprime l'action transactivateur par la protéine Tax (Katoh *et al.*, 1989). De plus, il a été démontré qu'un facteur nucléaire cellulaire appelé "CRE-binding-protein-2" (CREB2) lie la région de 21 paires de bases et est impliqué dans la transactivation par le LTR du BLV (Willems *et al.*, 1992).

Plus récemment, il a été suggéré que la protéine Tax soit impliquée dans le processus de leucémiogénèse à cause de sa seconde fonction qui est l'immortalisation des cellules primaires *in vitro* (Twizere *et al.*, 2000)

### **2.2.3.2 Régulation de l'expression par la protéine Rex**

Rex est une phosphoprotéine nucléaire de 18kDa qui est impliquée dans le contrôle post-transductionnelle du BLV. La protéine Rex permet l'accumulation d'ARN viral non-épissé ou mono-épissé, probablement en renforçant leur stabilité (Derse, 1988). Une séquence de 250 pb située entre le signal de polyadénylation et le site de polyadénylation dans la région 3'R du LTR est nécessaire pour le fonctionnement de Rex (Derse, 1988). Cette séquence appelée "Rex Responsive Element" (RRE) présente, par sa structure secondaire, de grandes homologies avec son équivalent du HTLV-1. Cette homologie est si importante que la protéine Rex de HTLV-1 peut remplacer la protéine Rex du BLV et vice versa (Felber *et al.*, 1989). En absence de la protéine Rex, seules les ARN doublement épissés sont synthétisés, ce qui suggère que l'expression des protéines du virus soit régulée par la protéine Rex (Schwartz *et al.*, 1994).

### **2.2.3.3 Les protéines GIII et RIV**

L'étude de l'épissage différentiel des ARN messagers du BLV a révélé l'existence de 2 ARNms codant pour 2 nouvelles protéines, RIII et GIV (Alexandersen *et al.*, 1993). Le niveau d'expression de l'ARN de GIV est en corrélation avec l'apparition clinique de lymphocytose persistante. Toutefois ces 2 protéines n'ont pas été détectées *in vivo* et leur rôle est encore sous étude. En utilisant des vecteurs pour l'expression de RIII et GIV lors d'expériences de transfection cellulaire, on peut démontrer que GIV transactive faiblement l'activité du LTR du BLV et rend plus efficace la fonction de la protéine Rex alors que RIII inhibe la fonction de la protéine Rex (Alexandersen, 1993).

#### 2.2.4 BLV et la transformation cellulaire

Le mécanisme par lequel le BLV induit le développement tumoral n'est pas encore décrit. Aucun réarrangement d'oncogènes connus (*c-myc*, *c-myb*, *c-erbB*, *c-src*, *c-Ha-ras*, *c-fos* et *c-sis*) n'a pu être démontré comme étant impliqué dans l'induction de tumeurs par la BLV (Kettmann *et al.*, 1983). De plus, le BLV ne montre aucun site préférentiel pour son intégration entre les tumeurs, ce qui ne permet pas de proposer l'hypothèse de mutation par insertion (Kettmann *al.*, 1983). Cependant plusieurs observations expérimentales indiquent que la protéine Tax du BLV et celle de HTLV-1 peuvent agir en tant qu'oncogènes. Notamment, des transfections de la protéine Tax du BLV avec l'oncogène Ha-ras induisent des tumeurs dans les fibroblastes embryonnaires de rat dans des souris nude (Willems *et al.*, 1990). De plus, les ARNms codant pour Tax (et/ou Rex) sont détectables dans les animaux qui sont en lymphocytose persistante ou avec des tumeurs, alors que les ARNms codant pour les protéines structurales ne l'étaient pas (Haas *et al.*, 1992). Ainsi, la protéine transactivatrice Tax est l'élément viral le plus probable, impliqué dans la transformation de lymphocytes (Sagata *et al.*, 1985). Cependant, son expression n'est pas toujours démontrée dans les stades avancés de la tumeur (Sagata *et al.*, 1985). Il est plausible de penser que Tax pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la tumeur mais par contre ne semble pas être essentiel dans le maintien de celle-ci (Sagata *et al.*, 1985).

Bien que Tax soit probablement impliqué dans le développement de syndrome lymphoprolifératif induits par le BLV, d'autres protéines virales, plus précisément Rex, GIV, RIII et même les protéines d'enveloppe semblent jouer un rôle dans la pathogénicité du BLV. La protéine Rex du BLV peut déranger la stabilité des ARNms cellulaires, comme par exemple la protéine rex de HTLV-1 qui augmente la demi-vie des ARNms du récepteur de l'IL-2. Les protéines du gène *env* pourraient transmettre des signaux intracellulaires suite à une stimulation par des anticorps anti-*env* (Alber *et al.*, 1993). Les rôles possibles des protéines RIII et GIV dans la pathogénèse du BLV restent des éléments à étudier, surtout pour la protéine GIV pour laquelle le niveau d'ARNm reste

toujours élevé durant la lymphocytose persistante (Alexandersen *et al.*, 1993). Par conséquent, le dérèglement lymphocytaire induit par l'infection au BLV implique potentiellement plusieurs molécules virales et il reste beaucoup à faire pour déterminer le rôle spécifique de chacune d'entre elles.

### **2.3. Prophylaxie de l'infection du BLV et pathogénicité**

Tel que décrit précédemment, l'infection par le BLV est largement répandue dans le monde. Les prophylaxies par de simples mesures sanitaires basées sur l'abat d'animaux séropositifs ont permis une diminution significative du taux d'infection dans les pays de l'Europe de l'Ouest (Pelzer, 1997). Cependant, lorsque l'infection est endémique et affecte une majorité d'animaux, l'abattage ne devient plus une solution applicable et d'autres mesures de protection doivent être considérées (Pelzer, 1997).

En effet, il est très important de développer des stratégies de lutte contre le BLV dans les pays où la dispersion de l'infection est trop grande pour entreprendre des prophylaxies sanitaires. Le BLV représente un excellent modèle animal pour étudier la prophylaxie des maladies rétrovirales. Sa structure génétique complexe est analogue à celle des autres rétrovirus de primates. De plus, sa pathogénicité chez les moutons est reproductible, fréquente, et facilement détectable à l'intérieur de délais convenable pour en permettre l'expérimentation. Pour ces diverses raisons, plusieurs stratégies de vaccination ont été testées.

#### **2.3.1 Vaccin recombinant utilisant comme vecteur le virus de la vaccine**

Il a d'abord été démontré que la réponse immunitaire humorale dirigée contre le BLV est protectrice, car les immunoglobulines provenant de sérum de moutons infectés préviennent l'infection d'un mouton sain lors d'une épreuve intradermique avec des lymphocytes infectés (Kono *et al.*, 1986). À la lumière de ces résultats, une équipe Belge dirigé par Portetelle a construit et testé un vecteur recombinant *env-vaccine* (Portetelle *et al.*, 1991 ; 1993). La protection a été évaluée chez des moutons par une épreuve

intraveineuse de lymphocytes infectés 6 semaines suivant un rappel vaccinal. Le vecteur protecteur codait pour les glycoprotéines d'enveloppe gp51 et gp30, alors que les vecteurs codant pour la gp51 ou la gp30 seule n'induisaient pas la production d'anticorps neutralisant, et donc n'étaient pas protecteurs (Portetelle *et al.*, 1991; 1993).

### 2.3.2 Vaccin BLV mutants

Cette stratégie repose sur la construction de BLV infectieux, immunogéniques mais non-pathogènes. Des mutants BLV ont été ainsi construits avec des délétions dans les différents gènes du virus (Willems *et al.*, 1993). Comme au préalable, cette équipe a d'abord démontré que des provirus BLV injectés intradermiquement dans des liposomes cationiques chez les moutons étaient infectieux, permettant ainsi l'étude du potentiel infectieux et pathogénique des provirus mutants (Willems *et al.*, 1993). Ils ont démontré que ce potentiel est altéré pour les provirus mutants *gag*, *pol* et *env* mais pas pour les provirus mutants RIII et GIV (Willems *et al.*, 1993).

### 2.3.3 Vaccin ADN

Plus récemment Brillowska et son équipe (1999) ont démontré que l'injection intramusculaire d'un plasmide exprimant la glycoprotéine de surface gp51 et celle transmembranaire gp30 génère une réponse immunitaire cellulaire (Brillowska *et al.*, 1999). D'après le protocole expérimental, sept des dix vaches immunisées par ce plasmide, ont pu résister à une épreuve virale sévère, soit une dose infectieuse de 500 lymphocytes infectés par le BLV (Brillowska *et al.*, 1999).

## 2.4. Immunisation Génétique

Le plus récent développement dans la vaccinologie est l'immunisation avec des polynucléotides (Babiuk, 1999). Cette technologie est communément appelée immunisation à ADN ou immunisation génétique. Elle est décrite comme étant un procédé de transfection *in vivo*, dans laquelle un organisme reçoit une injection de

plasmide codant pour une ou des protéines et développe une réponse immunitaire contre cette ou ces protéines (Babiuk, 1999).

L'ADN nu qui est utilisé comme immunogène est inséré dans un vecteur d'expression, qui contient entre autres les séquences appropriées pour la croissance dans les bactéries et l'expression dans les cellules eucaryotiques (Babiuk *et al.*, 1999). Ainsi, le plasmide va être multiplié dans des bactéries, extrait, dilué dans une solution saline, et finalement injecté à l'organisme (Cohen *et al.*, 1998).

#### **2.4.1 Historique**

La propriété du matériel génétique à produire des gènes pour des fins thérapeutiques, est connu depuis déjà un certain temps (Koprowski et Weiner, 1998). Les premières expériences décrivant le transfert d'ADN dans les cellules d'un animal vivant ont été reportées par Stasmey en 1950, Parchkis en 1955, et Ito en 1958 (revue de Koprowski et Weiner, 1998). Ces expériences décrivaient la capacité de préparations de chromatine, préparations grossières d'ADN provenant dans ce cas-ci de cellules cancéreuses, d'induire la formation de tumeurs suite à une injection chez des rongeurs de laboratoire (Koprowski et Weiner, 1998). Par la suite, les progrès de la science ont poussé plus loin la purification du matériel génétique et ont confirmé que l'injection de gène d'ADN en absence de vecteur viral peut conduire à l'expression du gène inoculé chez l'hôte (Koprowski et Weiner, 1998).

Des expériences additionnelles ont appliqué ces découvertes aux molécules d'ADN recombinant. Israël et ses collaborateurs en 1979, ont rapporté que des clones recombinants d'ADN purifié contenant des dimères de la tête et de la queue du virus du polyome induisaient une séroconversion de l'animal inoculé suite à une injection du vecteur ADN chez des souris. Des expériences similaires utilisant des plasmides contenant le matériel génétique de l'hépatite B ont été décrit par Will (1984).

En 1992, Tang *et al.* ont rapporté que la livraison *in vivo* du gène de l'hormone de croissance humaine, dans une cassette d'expression, induisait une expression chez les animaux inoculés. Ces auteurs ont utilisé un "gene gun" pour envoyer des particules d'or recouvertes d'ADN à travers les couches de la peau de souris (revue de Koprowski et Weiner, 1998). Les animaux inoculés ont produit des niveaux détectables d'hormone de croissance humaine. Ils ont également rapporté qu'il y avait une production d'anticorps dirigé contre cette hormone de croissance humaine par la souris. Ces auteurs ont nommé cette procédure d'immunisation, immunisation génétique, décrivant la capacité de gènes inoculés d'être des immunogènes individuels (revue de Koprowski et Weiner, 1998). Presque dans la même période, il a été démontré que les vaccins à ADN pouvait produire une réponse immunitaire contre l'influenza (Ulmer *et al.*, 1993 ; Fynan *et al.*, 1993), le HIV-1 (Wang *et al.*, 1993) et l'hépatite B (Davis *et al.*, 1993).

Ces études comportent plusieurs caractéristiques : Ils démontrent que les vaccins ADN peuvent induire l'immunité dans plusieurs modèles de maladies ; les différentes réponses immunitaires telles que la production d'anticorps, différenciations des lymphocytes Th et CTL pouvaient être générées ; qu'une réponse peut être induite par différentes voies d'immunisation (e. g., intramusculaire, épidermique ou mucosale) ; et, dans le cas de l'influenza, que ces vaccins peuvent protéger l'animal lors d'une épreuve avec un virus pathogène (Cohen *et al.*, 1998). Depuis, l'immunisation génétique a été étudiée dans plusieurs modèle de maladies infectieuses en plus de ceux précédemment mentionné, nous pouvons citer un vaccin contre l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) (Manickan *et al.*, 1995), HSV-2 (Bourne *et al.*, 1996), l'hépatite C (Geissler *et al.*, 1997) et plus récemment contre l'Ébola ( Xu *et al.*, 1998).

En plus des applications pour les maladies infectieuses, l'immunisation génétique est également envisagée dans l'immunothérapie dirigée contre le cancer (Cohen *et al.*, 1998). Il a été démontré que l'injection d'ADN plasmidique codant pour des antigènes associés aux tumeurs provoquait une réponse immunitaire tumorale antigène-spécifique.

et pouvait protéger les souris contre une épreuve tumorale létale (Conry *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1995).

## 2.4.2 Principe

### 2.4.2.1 Maturation et présentation de l'antigène

La première étape du procédé est la transfection de cellules qui prennent en charge le plasmide (Whitton *et al.*, 1999). L'ADNc et la présence d'un promoteur eucaryotique fort tel que le promoteur précoce CMV, dans la construction plasmidique, orientent la synthèse d'ARNms et mènent à la production de protéines immunogéniques. Deux situations peuvent se présenter selon que la cellule transfectée est une cellule présentatrice d'antigènes (CPA) (e.g., cellule dendritique (CD)), ou non (e.g., myocyte) (Whitton *et al.*, 1999). Les CPA expriment les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II ainsi que les molécules co-stimulatrices B7.1 et B7.2 (Janeway et Travers, 1997). Les protéines sont ainsi “processées” par les voies restreintes aux molécules de classe I et II, et les peptides résultants sont associés à la chaîne lourde et  $\beta_2$  microglobuline ( $\beta_2m$ ) de la classe I ou les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la classe II (Janeway et Travers, 1997). Ces complexes immunogéniques de classe I ou II sont exprimés à la surface de la cellule pour être présenter aux cellules T naïves et initier ainsi la réponse immunitaire (Janeway et Travers, 1997).

Dans la situation où la cellule transfectée n'est pas une CPA professionnelle, comme par exemple un myocyte, la deuxième étape de la vaccination à ADN est de transférer la protéine d'intérêt de cette cellule vers une CPA (Whitton *et al.*, 1999). Ce transfert peut se réaliser par deux mécanismes majeurs: i) sécrétion de la protéine par le myocyte, ce qui a déjà été démontré (Whitton *et al.*, 1999), ii) acquisition de la protéine par la CPA suite à la mort de la cellule (e.g., par apoptose) (Albert *et al.*, 1998). La troisième étape du procédé est le “processing” de la protéine par la CPA selon la voie restreinte aux molécules de classe I ou II du CMH (Whitton *et al.*, 1999).

Selon la voie restreinte aux molécules de classe II, la protéine est endocytée et se retrouve dans le cytoplasme sous forme d'une vésicule intracellulaire. Le pH de cette vésicule diminue, au fil de la migration à l'intérieur de la cellule, pour ainsi activer des protéases qui dégradent la protéine en des peptides. Parallèlement dans le reticulum endoplasmique, les molécules de classe II sont synthétisées et ces protéines partiellement repliées sont liées à une chaîne invariante (Ii) qui prévient la liaison avec des peptides. La partie terminale de Ii contient CLIP (peptide de classe II de la chaîne invariante). Ii dirige la circulation de la molécule de classe II à travers l'appareille de Golgi, les endosomes acides qui contiennent les peptides d'intérêt et les molécules intracellulaires de classe II, H2DM. H2DM active le clivage de CLIP et la dégradation de Ii pour que les peptides puissent se lier aux molécules de classe II destinées à être transférées à la surface cellulaire (Cresswell *et al.*, 1995).

Dans la voie restreinte aux molécules de classe I du CMH, la synthèse de la protéine (e.g., protéine virale) s'effectue dans le cytoplasme. La protéine est ensuite "processée" par des protéasome en des peptides qui doivent être transportés à l'intérieur du reticulum endoplasmique (RE) à travers les TAP1/TAP2 (Transporteurs associés au "processing" d'antigènes). Ces hétérodimères possèdent des cassettes liant l'ATP sur la face cytosolique et des domaines transmembranaires qui font saillie à l'intérieur du RE. À l'intérieur du RE, les molécules de classe I (chaîne lourde) partiellement repliées sont liées à la calnexine jusqu'à ce que la  $\beta_2$ microglobuline ( $\beta_2m$ ) se lie. Les protéines chaperonines, calreticuline et tapasine, ainsi que TAP, se lient au complexe classe I: $\beta_2m$ , et ainsi la calnexine est relâchée. TAP livre le peptide à la molécule de classe I et le repliement complet se réalise. Le trimère de classe I composé de la chaîne lourde, peptide et  $\beta_2m$  est ensuite transporté à la surface de la cellule (Cresswell *et al.*, 1995).

### 2.4.3 Facteurs modifiants l'immunité

#### 2.4.3.1 Caractéristiques du vecteur

Plusieurs variables influencent l'expression de gènes suite à l'administration d'ADN. Parmi celles-ci le véhicule d'administration est un élément clé sur lequel les chercheurs se penchent afin d'optimiser cette expression (Brown, 1994). Les vecteurs plasmidiques utilisés dans la vaccination génétique possèdent une origine de réplication bactérienne (ColE1), pour permettre la production à grande échelle dans la souche bactérienne *Escherichia coli* (Brown, 1994). La présence d'un gène de résistance à un antibiotique (tel que l'ampicilline, kanamycine) permet la sélection de bactéries transformées (Brown, 1994). Également sont ajoutés un promoteur, une séquence de polyadénylation et de terminaison de la transcription de l'ARN messenger afin d'exprimer le ou les gène(s) d'intérêt dans les cellules de mammifères (Brown, 1994).

Les promoteurs les plus fréquemment utilisés dans les plasmides sont le promoteur précoce du cytomégalovirus humain (HCMV) (Boshart *et al.*, 1985) et celui du virus simien (SV40) (Moreau *et al.*, 1981). Ces promoteurs induisent l'expression à de hauts niveaux dans plusieurs types cellulaires (Foecking *et al.*, 1986).

#### 2.4.3.2 Les motifs CpG et séquences immunostimulatrices

Il a été démontré que l'ADN provenant de bactéries, mais non de vertébrés, peut induire une réponse immunitaire non spécifique (Krieg *et al.*, 1996). Ceci serait dû à des différences dans la fréquence de dinucléotides cytosine-phosphate-guanine (CpG) trouvés dans les deux génomes (Krieg *et al.*, 1996). Ces dinucléotides sont présents à une fréquence normale de 1 sur 16 dans l'ADN bactérien, et sont 10 à 20 fois moins fréquents dans l'ADN de vertébrés, un phénomène appelé "CpG suppression" (Krieg *et al.*, 1996).

Chez les vertébrés, la majorité de ces dinucléotides contiennent une cytosine méthylée, alors que chez les bactéries elles sont non-méthylées (Krieg *et al.*, 1996). Krieg et ces collaborateurs (1995) ont démontré que des oligonucléotides contenant un ou plusieurs dinucléotides CpG pouvait déclencher une prolifération des cellules B et une sécrétion d'immunoglobulines. Il a été ensuite démontré que l'activation immunitaire était plus grande lorsque les dinucléotides étaient flanqués par deux purines du côté 5' et deux pyrimidines côté 3', formant ainsi un motif CpG ou une "séquence immunostimulatrice" (Krieg *et al.*, 1996).

L'ADN bactérien peut également stimuler l'activité cellulaire des cellules NK et l'immunité cellulaire par l'induction de cytokines inflammatoires comme les interférons(IFNs) et l'interleukine 12 (IL-12) (Krieg *et al.*, 1996). Ainsi la découverte que l'ADN plasmidique par le biais des séquences immunostimulatrices riches en CpG, peut avoir un effet stimulateur sur la réponse immunitaire, fourni une variable intéressante qui peut être utilisée et manipulée dans la fabrication de matériel pour l'immunisation génétique.

#### **2.4.3.3 Méthode et voies d'immunisation**

La manière dont le vaccin ADN va être administré influence le type de réponse immunitaire provoquée. C'est-à-dire qu'il semble que le site d'inoculation et la méthode par laquelle le plasmide est administré peuvent affecter indépendamment l'immunité induite d'une manière qualitative et/ou quantitative (Cohen *et al.*, 1998). La vaccination ADN a été démontrée via plusieurs voies: incluant la voie intraveineuse (Fynan *et al.*, 1993), intramusculaire (Davis *et al.*, 1994), intra nasale (Wang *et al.*, 1997), intra épidermique (Fynan *et al.*, 1993), intra vaginale (Bagarazzi *et al.*, 1997) et plus récemment intra splénique (Gerloni *et al.*, 1997) et intra hépatique (Wolff *et al.*, 1997). La majorité des vaccins ADN étudiés jusqu'à maintenant, utilisent soit la peau ou le muscle comme cible d'immunisation (Cohen *et al.*, 1998).

#### 2.4.3.3.1 Intramusculaire

L'injection intramusculaire est la méthode la plus couramment utilisée de par sa simplicité et son efficacité relative. L'ADN dissout dans une solution saline semble être le véhicule optimal pour l'expression chez la souris (Wolff *et al.*, 1992). Le mélange vaccinal auquel on ajoute souvent un facilitateur (e.g. bupivacaine) dans le but d'augmenter la prise en charge de l'ADN est ensuite administré à l'aide d'une seringue. Il a été démontré par différents groupes de chercheurs que l'administration d'agents toxiques causant la nécrose du tissu musculaire, précédant l'injection de l'ADN pouvait augmenter l'expression génique (Cohen *et al.*, 1998).

Il a été rapporté que l'injection d'ADN intramusculairement, génère une réponse immunitaire majoritairement de type TH1, avec une augmentation du ratio IgG2a:IgG1, une production d'interféron- $\gamma$  et une faible production d'interleukine 4 (Xiang *et al.*, 1995; Pertmer *et al.*, 1996 ; Feltquate *et al.*, 1997).

#### 2.4.3.3.2 Genegun

Une autre méthode d'inoculation d'ADN est le "genegun". Ce procédé consiste à projeter des micro projectiles (e.g, billes d'or) directement à l'intérieur de cellules. Ces micro projectiles sont recouvertes d'ADN (Pertmer *et al.*, 1996). Cette technologie requiert des quantités infimes d'ADN (de l'ordre du nanogramme) (Pertmer *et al.*, 1996). À titre indicatif, il faut 20 à 100 fois plus d'ADN lors d'une immunisation intramusculaire pour susciter une réponse immunitaire comparable à celle produite par le "genegun" (Pertmer *et al.*, 1996).

L'inoculation épidermique et musculaire par le genegun présente un profil de réponse immunitaire similaire (Fuller *et al.*, 1994; Pertmer *et al.*, 1996; Feltquate *et al.*, 1997). C'est-à-dire que l'on observe un phénotype Th2, avec une production d'anticorps

IgG1, peu d'interféron- $\gamma$ , et une forte production d'interleukine-4 (Fuller *et al.*, 1994; Pertmer *et al.*, 1996; Feltquate *et al.*, 1997). Il a été démontré que des injections intradermiques par le "genegun" induisent les deux profils Th1(Raz *et al.*, 1996; Feltquate *et al.*, 1997) et Th2( Pertmer *et al.*, 1996).

#### **2.4.3.4 Caractéristiques de l'antigène**

Un autre paramètre qui a une influence directe sur l'amplitude et l'orientation de la réponse immunitaire est la localisation de la protéine native (Cohen *et al.*, 1998). La vaccination génétique a induit une réponse immunitaire avec succès pour des protéines qui étaient séquestrées dans le cytoplasme (e.g.,  $\beta$ -galactosidase), liée à la membrane (e.g., protéine G du virus de la rage) ou sécrétée (e.g., antigène de surface du virus de l'hépatite B) (Cohen *et al.*, 1998). Il est possible qu'un type de protéine soit meilleur qu'un autre pour induire une réponse immunitaire (Cohen *et al.*, 1998). Par exemple, un antigène sécrété pourrait être plus efficace à induire une réponse lymphocytes T helper CD4+ et production d'anticorps qu'une qui n'est pas sécrétée (Cohen *et al.*, 1998). Cette hypothèse n'a pas encore été démontrée par les expériences de laboratoire.

Les formes sécrétées de la protéine G de la rage et l'antigène de surface de l'hépatite B (HbsAg) ne sont pas des meilleures inductrices d'immunité cellulaire et humorale que celles liées à la membrane dans des études réalisées chez la souris (Xiang *et al.*, 1995 ; Chow *et al.*, 1997), et le plasmide qui codait pour la protéine sécrétée de la rage conférait moins de protection contre une épreuve virale que celui qui codait pour un antigène lié à la membrane (Xiang *et al.*, 1995). D'autres études sont en cours avec d'autres antigènes, pour confirmer que la forme de la protéine codée par le plasmide joue un rôle critique dans l'induction d'une réponse immunitaire par le vaccin ADN (Cohen *et al.*, 1998).

#### 2.4.3.5 Régime d'immunisation

Le régime optimal pour administrer un vaccin ADN (e.g., la dose, le nombre et ou la fréquence d'immunisation) est loin d'être déterminé et fait l'objet de nombreux débats.

Dans une étude utilisant le "genegun" comme méthode de livraison, l'immunisation de souris avec un vaccin ADN ayant comme gène marqueur le gène d'enveloppe du HIV-1, induit une forte réponse CTL et une faible réponse anticorps lorsqu'une, deux ou trois immunisations étaient données, mais une quatrième immunisation causait une chute dans l'activité CTL et une augmentation marquée du titre d'anticorps. Ce changement dans la nature de la réponse immunitaire était accompagné par un changement dans la production de cytokines par les splénocytes stimulés par l'antigène, avec une baisse dans la production d'interféron  $\gamma$  et une hausse de l'interleukine 4 (Fuller *et al.*, 1994). Cette baisse dans la production d'interféron  $\gamma$  avec des immunisations successives a été également rapporté avec un plasmide qui codait pour la nucléoprotéine du virus de l'influenza (Pertmer *et al.*, 1996).

Le moment de l'immunisation peut également influencer la réponse immunitaire. En effet des souris vaccinées 2 fois à trois mois d'intervalles ont généré des plus hauts titres d'anticorps et de productions de cytokines que des souris vaccinés deux ou trois fois à des intervalles d'un mois, suggérant ainsi qu'une période de repos plus longue entre les immunisations pourrait augmenter l'immunité (Prayaga *et al.*, 1997). Ces expériences sont d'actualité pour voir si ces faits sont applicables à différents modèles de maladies et d'autres espèces animales.

## 2.4.4 Optimisation de la réponse immunitaire

### 2.4.4.1 Cytokines

La voie la plus prometteuse pour moduler la réponse immunitaire associée à l'injection d'un vaccin ADN, est l'utilisation d'adjuvant biologique tels que les cytokines. Ces dernières sont des molécules sécrétées principalement par les cellules dérivées de la moelle osseuse qui agissent d'une manière soit autocrine ou paracrine pour induire une réponse spécifique dans les cellules qui expriment un récepteur particulier de cytokines (Xiang *et al.*, 1997). Raz et ces collaborateurs ont rapporté en 1993, qu'une injection d'un gène de cytokines à l'intérieur d'un muscle résultait en l'action biologique caractéristique de cette cytokine *in vivo*, et pouvait augmenter la réponse immunitaire humorale (Raz *et al.*, 1993). Depuis, plusieurs laboratoires ont rapporté que la co-injection de plasmide codant pour des cytokines peut avoir un effet considérable sur la réponse immunitaire vis-à-vis un plasmide codant pour un antigène (Xiang *et al.*, 1997).

Les premières études qui ont utilisées des gènes de cytokines comme adjuvants à l'immunisation génétique, ont utilisé des plasmides qui codaient pour l'interleukine 2 (IL-2), un stimulateur puissant de l'immunité cellulaire qui induit la prolifération et la différenciation des cellules T et B, également la croissance des cellules NK (Smith 1988; Janeway *et al.*, 1994). Plus récemment, Chow et ces collaborateurs (1997) ont démontré que l'injection d'un vecteur qui codait pour HBsAg et IL-2 sur le même plasmide, induisait une augmentation marquée de la réponse anticorps et prolifération de cellules T comparé au plasmide qui codait pour HBsAg seul, entraînant du même coup une augmentation de production d'interleukine 2 et d'interféron  $\gamma$ . Des résultats similaires ont été rapportés pour la protéine noyau du virus de l'hépatite C (HCV) par Geissler et collaborateurs (1997), qui ont également démontré une augmentation de la réponse CTL après une co-injection du gène d'interleukine 2. Ensemble, ces résultats suggèrent que la co-injection du gène d'interleukine 2 peut augmenter l'immunité humorale et cellulaire

avec un plasmide codant un pour un antigène et par le fait même augmenter la production de cytokines de type Th1 (Chow *et al.*, 1997).

D'autres cytokines ont été étudiées en concert avec l'immunisation génétique, tel que l'interleukine-4, qui induit la différenciation des cellules T helper en sous-type Th2, améliore la croissance B, et médie le changement de classe des immunoglobulines Ig (Swain *et al.*, 1991). Il a été démontré qu'une injection de plasmide codant pour l'interleukine-4, 3 jours avant l'immunisation avec une protéine antigène, augmentait le niveau d'anticorps antigènes-spécifiques. (Raz *et al.*, 1993). La co-inoculation de souris avec des plasmides codant pour l'interleukine-4 et la protéine nucléaire du HCV résultait en l'augmentation des réponses anticorps et prolifération des cellules T, mais une baisse dans la réponses des CTL spécifique comparé au plasmide HCV seul (Geissler *et al.*, 1997). Ainsi, l'IL-4 semble augmenter la réponse humorale suite à l'immunisation génétique, mais son inhibition relative de la réponse type Th1 limite son utilité comme adjuvant dans les vaccins viraux ou tumoraux ou dans l'immunothérapie (Geissler *et al.*, 1997).

Également les cytokines tel que le "granulocyte-monocyte colony-stimulating factor" (GM-CSF) et l'IL-12 peuvent être utilisé comme adjuvant dans l'immunisation génétique. GM-CSF augmente la production de granulocytes et de macrophages, et induit la maturation et l'activation de CPA comme les cellules dendritiques (Morrissey *et al.*, 1987; Heufler *et al.*, 1988; Janeway *et al.*, 1994). En théorie, la co-expression de GM-CSF et d'un antigène codé par un plasmide peut augmenter la réponse immunitaire de l'hôte contre l'antigène en développant le pool de CPA activées au site d'injection. Xiang et Ertl (1995) ont testé cette théorie *in vivo* en co-inoculant à des souris avec des plasmides codant pour GM-CSF et la glycoprotéine du virus de la rage. La co-expression de GM-CSF a augmenté la réponse anticorps dirigé contre la glycoprotéine de la rage d'une manière dose-dépendante et a amélioré la réponse des cellules "T helper" comparé à l'injection de la glycoprotéine de la rage compris dans un vecteur seul (Xiang et Ertl, 1995). L'interleukine-12 est une cytokine prototype Th1 connue pour être un inducteur puissant de l'immunité cellulaire, conduisant à la production d'IFN- $\gamma$  et augmentation de

l'activité cytotoxique des cellules NK et cellules T (Gately *et al.*, 1992; Trinchieri *et al.*, 1995). Kim et ces collaborateurs (1997) ont examiné les effets de la coadministration du gène de l'IL-12 sur le système immunitaire avec des plasmides codant les gènes *env*, *gag/pol* et deux gènes accessoires, *nef* et *vif* du VIH. Comme prévu, IL-12 induit une réponse type Th1, avec une baisse dans la production d'anticorps et une augmentation dans la prolifération des cellules T, également une réponse assez marquée de la réponse CTL contre les 4 antigènes (Kim *et al.*, 1997).

#### **2.4.4.2 Molécules co-stimulatrices**

Une autre stratégie pour renforcer l'efficacité de l'immunisation génétique est la co-livraison de gènes de molécules de co-stimulation tel que B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), et CD40, afin d'améliorer la capacité de présenter l'antigène des cellules transfectées. Ces molécules jouent un rôle important dans la présentation de l'antigène en fournissant un second signal nécessaire pour une activation efficace des cellules T restreintes au CMH (June *et al.*, 1994). Des études réalisées chez la souris, ont démontré que l'injection intramusculaire d'une cassette d'expression du gène B7.2 avec une cassette pour la nucléoprotéine de l'influenza (Iwasaki *et al.*, 1997) ou des protéines du HIV (Kim *et al.*, 1997) résultait en une augmentation significative de la réponse des cellules T cytotoxiques dirigé contre l'antigène (Kim *et al.*, 1997).

#### **2.4.5 Avantages versus inquiétudes**

Les vaccins génétiques possèdent de nombreux avantages comparativement aux vaccins traditionnels (Kucerova *et al.*, 1999). Le premier est définitivement la facilité de construction de vecteurs (Babiuk *et al.*, 1999). Les gènes insérés dans le plasmide peuvent être modifiés rapidement notamment par la suppression ou l'insertion de domaines transmembranaires, séquences signale, chaîne d'hydrocarbure ou d'autres résidus qui pourraient affecter le traitement de la protéine (Babiuk *et al.*, 1999). La séquence peut être modifiée par mutagenèse dirigée, permettant l'échange d'un seul acide aminé dessiné de façon à augmenter le potentiel antigénique d'épitopes individuels ou.

pour éliminer des épitopes qui déclencheraient une réponse immune non-désirée (Babiuk *et al.*, 1999). Un autre avantage des vaccins génétiques est leur stabilité (Babiuk *et al.*, 1999). Leur résistance à la chaleur est très importante pour leur utilisation dans les pays en voie de développement où il est difficile de maintenir des températures basses soit pour le transport ou pour la conservation (Babiuk *et al.*, 1999).

Les vaccins génétiques, ne véhiculent pas le risque de virulence (Babiuk *et al.*, 1999). Par contre, l'intégration du vecteur ADN dans le génome de la cellule hôte qui se multiplie, peut causer la transformation de cette cellule et ainsi le cancer (Babiuk *et al.*, 1999). Cet événement rare, est néfaste pour l'utilisation de tels vaccins dans la population et notamment chez de jeunes enfants (Babiuk *et al.*, 1999). Malgré ces questions de sécurité, qui sont toujours sous études, les vaccins génétiques fournissent un outil puissant pour étudier les mécanismes de base qui gouvernent une réponse immunitaire primaire (Babiuk *et al.*, 1999).

## **OBJECTIFS**

Suite aux analyses de la littérature qui soulignent l'importance de développer un vaccin efficace contre le BLV, ainsi que l'utilisation d'immunomodulateurs (tel que l'IL-2) dans la réponse immunitaire, nous avons décidé de poursuivre les objectifs suivants:

1. Amplifier et cloner dans le plasmide d'expression (pcDNA3) la glycoprotéine de surface du virus (gp51) qui est généralement reconnue comme la plus importante pour l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale.
2. Immuniser les souris avec le plasmide recombinant (pcDNA3/gp51) en co-injectant avec un plasmide codant pour l'IL-2 (pcDNA3/IL2).
3. Évaluation de la réponse humorale associée à cette injection.

### **3. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **3.1 Virus de la leucose bovine (BLV)**

#### **3.1.1 Provenance**

La souche virale FLK-BLV nous a été gracieusement fournie par le laboratoire du Dr Carole Simard du Centre de Recherche d'Agriculture Canada à Charlottetown (Ile-du-Prince-Edouard). Les cellules de reins d'agneaux fœtaux " foetal lamb kidney " (FLK) sont infectées de façon persistante par le BLV (Filice *et al.*, 1988). Cette lignée cellulaire a été obtenue par la co-cultivation de cellules FLK et de lymphocytes provenant d'un veau adulte affecté par la leucémie bovine enzootique (Van der Maaten et Miller, 1976).

#### **3.1.2 Production**

Les cellules ont été cultivées, tel que décrit dans les travaux de Van der Maaten et Miller en 1974 et 1976, dans le milieu Minimum Essentiel Eagle contenant les sels d'Earle, des acides aminés non-essentiels, 20% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur, de la streptomycine à une concentration de 100 µg/mL, de la pénicilline (100 unités/mL) et de la kanamycine (100 µg/mL) (Van der Maaten et Miller, 1976). Le milieu de culture a été renouvelé lorsque les cellules formaient un tapis confluent. Les cellules étaient ensuite prélevées du flacon de polystyrène (Corning, Canlab, Québec, Canada) avec 0.02% d'acide éthylènediaminetetraacétique et remises en culture avec des dilutions de 1 à 2.

#### **3.1.3 Purification du virus (gradient de saccharose)**

Un volume de 10 ml de culture cellulaire (FLK/BLV) a été clarifié par centrifugation à 10 000 x g pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube de 10 ml puis centrifugé à 100 000 x g pendant 90 minutes dans une ultracentrifugeuse munie du rotor 50,2 TI (Beckman). Le culot contenant le virus est ensuite resuspendu dans 500 µl de PBS 10 mM pH 7,2. La suspension virale a été déposée

sur en gradient discontinu de saccharose de 20-50 % (p/v), puis centrifugé à 28 000 x g pendant 90 minutes. La fraction visible obtenue est ensuite délicatement prélevée et lavée au PBS 10 mM pH 7,2. Afin d'éliminer le saccharose, le volume de la fraction virale est augmenté à 50 ml avec du PBS 10 mM pH 7,2. Le virus est mis au culot en centrifugeant à 100 000 x g pendant 90 minutes, resuspendu dans 200 µl de PBS 10 mM pH 7,2 et gardé au froid (-20°C) jusqu'à son utilisation.

### **3.1.4 Visualisation en microscopie électronique**

La pureté de la suspension virale et l'intégrité des particules virales a été observée en microscopie électronique en utilisant la coloration négative à l'acide phosphotungstique 3 % (PTA), pH 6,3 à l'aide du microscope électronique Hitachi H-7100. Ainsi, une goutte de la suspension virale est déposée sur une languette de parafilm. Une grille de cuivre de 300 mailles est déposée sur l'échantillon pendant 1 minute, puis 2 minutes sur une goutte de PTA. L'excès de liquide est enlevé au moyen d'un papier filtre avant de procéder à l'examen en microscopie électronique.

### **3.1.5 Visualisation des protéines virales sur gel de polyacrylamide**

L'électrophorèse a été réalisée sur un gel de 1 mm d'épaisseur en présence de SDS, selon la méthode décrite initialement par Laemmli (1970). Le système électrophorétique "Mini-Protean® II Dual Slab Electrophoresis" (BioRad Laboratories, Ltd., Richmond, Californie, USA) a été utilisé selon les recommandations du manufacturier. La concentration du gel d'entassement est de 4% et celle du gel de séparation est de 12 %. Un volume de 10 µl de la suspension virale purifiée (section 3.1.4) ainsi que des dilutions 1/10 et de 1/100 de cette suspension ont été mélangé à 10 µl de tampon dénaturant et réducteur concentré 2 fois (4% (p/v) SDS (BioRad), 20 % (v/v) glycérol (Fisher), 5 % (v/v) β-mercaptoéthanol (BioRad), 0,01 % de bleu de bromophénol (Sigma) préparé dans du tampon 0,125 M Tris-HCl (Sigma), pH 6,8) a été chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Suite à une centrifugation à 10 000 x g pendant 1 minute, les échantillons ont été déposés dans les puits du gel. Des marqueurs de masse moléculaire ont été utilisés dans un puits

de référence (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BioRad). Le tampon d'électrophorèse dans la cuve était composé de 0,1 % SDS (BioRad), 0,192 M glycine (BioRad), 0,025 M Tris (Sigma), pH 8,3.

L'électrophorèse des échantillons a été effectué sous un voltage constant de 200 volts (V) pendant 45 minutes à la température ambiante à l'aide d'un générateur de courant (PowerSupply modèle 1000/500, BioRad Laboratories, Ltd., Richmond, CA, USA).

Suite à l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide a été coloré au sel d'argent à l'aide de la trousse "Rapid-Ag-Stain" (ICN; Schawz/Mann Biotech, Ohio, USA). Brièvement, le gel a été déposé 15 minutes dans de l'eau distillée. Par la suite, l'eau distillée a été décantée et un volume de 200 ml d'une solution de pré-traitement (40 % méthanol, 10 % éthanol, 5 % solution de rinçage) a été ajouté et gardé pendant 10 minutes sous agitation constante. La solution de pré-traitement décantée, un volume de 200 ml de solution de coloration à l'argent, déjà prête à l'utilisation (Rapid-Ag-Stain), est ajoutée et incubée pendant 25 minutes sous agitation constante. Le gel est ensuite lavé 4 fois à l'eau distillée. Au dernier lavage, l'eau distillée est remplacée par 200 ml d'une solution de développement et incubé jusqu'à l'apparition de protéines colorées de l'intensité désirée. La solution est ensuite décantée et le gel lavé 4 fois avec de l'eau distillée avant son séchage ou la prise en photographie sous éclairage incandescent.

### **3.2 Extraction des acides nucléiques viraux**

Les tapis cellulaires confluents ont été resuspendus dans deux tampons de lyse spécifiques à l'ADN et l'ARN à une concentration de  $10^7$  cellules/ml Le tampon de lyse de l'ADN est composé de 10mM Tris (pH 8.3), 50mM KCl, 2.5mM  $MgCl_2$ , 1.0% NP-40 et 1.0% Tween-20. Le tampon de lyse de l'ARN est composé de 4M guanidinium thiocyanate, citrate de sodium 25mM (pH 7.0), sarcosyl (N-Lauryl-Sarcosine) 5.0% et  $\beta$ -mercaptoethanol.

L'isolement des acides désoxyribonucléiques (ADN) est réalisé à l'aide de la trousse DNazole™ (Genomic DNA Isolation Reagent, Life Technologies). Un volume de 50 µL de réactif DNazole a été ajouté à 100 µL de lysat cellulaire conservant l'ADN. Les cellules sont lysées par un pipettage délicat avant que 250 µL d'éthanol soient ajoutés pour précipiter l'ADN. Le culot d'ADN viral est récupéré suite à une centrifugation de 1000 x g pendant 2 minutes à la température de la pièce. Ce dernier est ensuite lavé 2 fois avec 900 µL d'éthanol 95%. Après avoir séché le culot, l'ADN a été resuspendu dans de l'eau stérile et utilisé dans la réaction de polymérisation en chaîne (section 3.3).

### **3.3 Amplification par réaction de polymérisation en chaîne du cadre de lecture ouvert de la glycoprotéine d'enveloppe gp51**

#### **3.3.1 Amorces d'oligonucléotides**

La séquence des amorces nucléotidiques ayant servies à l'amplification de l'ADNc ont été dessinées d'après la séquence publiée par Sagata (1985). L'amorce sens F(4821-4838), (5'-ACCATGCCTAAAGAACGACGG-3') est identique à la séquence nucléotidique publiée (Sagata 1985) de la gp51 allant du nucléotide 4821 au nucléotide 4838. Cependant nous y avons ajouté en amont de cette séquence, la séquence préférentielle de Kozak (ACC) (Kozak M, 1987) pour permettre un meilleur attachement des ribosomes ainsi qu'un site de clivage par l'endonucléase de restriction *HindIII* en vue des expériences de clonage dans le vecteur d'expression pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, California, USA).

L'amorce anti-sens R(5706-5725), (5'CTACGTCTGACCCGGGTAGG) est identique à l'inverse de la séquence complémentaire de la gp51 publiée (Sagata 1985) allant du nucléotide 5706 au nucléotide 5725. Également nous avons ajouté un site de clivage par l'endonucléase de restriction *XbaI* pour les expériences successives de clonage.

Les amorces ont été synthétisées par le service de synthèse des oligonucléotides du laboratoire du Dr François Sharek du Centre de Microbiologie / Biotechnologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

### **3.3.2 Réaction de la polymérisation en chaîne**

Pour effectuer la réaction PCR, nous avons ajouté dans un microtube 250µL "thinwall" (Eppendorf) les réactifs suivants: 31,5µL d'H<sub>2</sub>O stérile bi-distillée, 5µL de tampon Taq 10X (GibcoBRL), (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>), 1µL d'un mélange de dNTP à une concentration de 10mM, 1µL de l'amorce sens F(4841-4838) à une concentration de 50 picomoles/µL, 1µL de l'amorce anti-sens R(5706-5725) à une concentration de 50 picomoles/µL, 5µL d'ADN viral purifié (section 3.2) et 0,5µL (5 unités/µL) de AmpliTaq Gold (Perkin Elmer). Cette DNA Taq polymérase est reconnue pour le peu d'erreurs d'incorporation de nucléotides sur le gabarit. Ce tube a été ensuite transféré dans un thermocycleur Turbo (DNA Thermal cycler, Perkin Elmer Canada Ltée, Norwalk, CT, USA) pour permettre l'amplification sous les conditions suivantes: 30 secondes de dénaturation de l'ADN à 94°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 42°C et 45 secondes d'élongation à 72°C. Ce cycle a été répété 35 fois. Une étape supplémentaire d'élongation à 72°C pendant 10 minutes a été ajoutée afin de finaliser la formation des brins incomplets lors des phases d'élongation. Les produits d'amplification ont été ensuite conservés à 4°C jusqu'à leur analyse sur gel d'agarose.

### **3.3.3 Analyse électrophorétique de l'amplicon ADNc gp51**

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% p/v. Le gel a été préparé en dissolvant 0,8g d'agarose (Agarose LE SeaKem<sup>®</sup>; FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) dans 100 ml de tampon TAE composé de 40mM de Tris-acétate et de 1mM l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ajusté au pH 7,8 avec de l'acide acétique glacial. Le gel a été ensuite transféré dans une cellule électrophorétique (International Biotechnology Inc., New Haven, CT, USA) contenant du tampon TAE. Un volume de 5 µl du produit PCR mélangé à 1 µl de tampon de chargement 6X (0.25% Bleu

de Bromophénol, 0,25% de Xylène-Cyanol, 30% de Glycérol) a été déposé dans un puits du gel submergé dans le TAE. De plus, un puits a été réservé pour les marqueurs de taille moléculaire 1Kb "DNA ladder" (Gibco-BRL) pour permettre une estimation de la taille de l'amplicon par comparaison suite à la migration dans le gel. Ce dernier a été ainsi soumis à un voltage constant de 120 volts produit par un générateur de courant (Powersupply modèle 1000/500, Biorad Laboratories, Ltd., Richmond, CA, USA). Suite à la migration, le gel a été transféré dans un bain contenant une solution de bromure d'éthidium d'une concentration de 0,01mg/ml pour une durée de 60 minutes, afin de visualiser l'ADN lorsque le gel est exposé aux rayons ultraviolets (UV) de courtes longueurs d'ondes générés par une lampe U.V (Foto UV 300 DNA transilluminator 110v modèle 3-3000, Fotodyne Inc., New Berlin, MD, USA). À l'aide d'une caméra d'instantanées (Polaroid MP-4 Land Camera 44-01) une photographie du gel a été prise pendant l'exposition aux rayons UV.

### **3.4 Clonage et Séquençage du fragment codant pour la gp51 dans le vecteur pCR®2.1**

Afin de conserver la stabilité et l'intégrité de l'amplicon, nous avons effectué le clonage dans le vecteur pCR®2.1. Ceci permet également d'obtenir des quantités plus importantes de l'ADNc et ainsi faciliter les expériences subséquentes de sous-clonage.

#### **3.4.1 Purification de l'amplicon gp51 par élution sur matrice de silice**

La purification de l'amplicon gp51 s'est réalisée à l'aide de la trousse "Gene Clean" (Bio 101, La Jolla, CA, USA). Un volume de 30 µl du produit d'amplification a été mélangé à 6µl de tampon de chargement 6X et déposé dans un puits d'un gel d'agarose 0,8% p/v et soumis aux conditions électrophorétiques telle que décrites dans la section 3.3.3. Après coloration au bromure d'éthidium et visualisation aux rayons UV ajustés à l'intensité de longueurs d'onde longues, la bande d'intérêt a été excisée du gel à l'aide d'un scalpel puis placée dans un tube Eppendorf 1,5 ml préalablement pesé. Le volume de fragment de gel d'intérêt a été estimé à partir de son poids en grammes. Au volume

d'agarose ont été ajoutés 3 volumes d'une solution d'iodure de sodium (NaI). Le tout a été ensuite incubé pendant environ 5 minutes à 56°C, jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Un volume de 5 µl d'une suspension de billes de silice "Glassmilk®" a été ajouté et incubé 5 minutes à température pièce avec quelques agitations pour favoriser le contact des billes avec l'ADN. Suite à cette incubation, le tube a été centrifugé à une vitesse de 13000 x g pendant 20 sec et le surnageant décanté. Le culot contenant les billes de silice sur lesquelles l'ADN s'est adsorbé a été ensuite lavé 3 fois avec 500 µl de solution "New Wash" conservé à -20°C. L'amplicon gp51 a été élué en incubant les billes de silice dans un volume de 5 µl d'eau distillée stérile et le tube placé à 56°C pendant 5 minutes. Une centrifugation à 13000 x g pendant 1 minute, a permis de récupérer le surnageant qui a été transféré dans un tube Eppendorf stérile. Cette étape d'éluion a été réalisée à 2 reprises pour obtenir un volume final de 10 µl d'amplicon purifié. La quantité d'ADNc gp51 a été ensuite évaluée par lecture au spectrophotomètre à 260 nm.

#### 3.4.2.1 Réaction de Ligation

La réaction de ligation entre l'ADNc gp51 généré par PCR et le vecteur pCR®2.1 (figure 1) s'est fait à l'aide de la trousse "TA Cloning®Kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA). Le principe de cette ligation repose sur la caractéristique "gabarit indépendant" de la *Taq* polymérase de rajouter un désoxyadénosine (A) à l'extrémité 3' des produits PCR. Le vecteur linéarisé de ce Kit possède un résidu désoxythymidine (T) libre à son extrémité 3' ce qui permet au produit PCR de se lier efficacement au vecteur.

Ainsi, nous avons mélangé dans un tube Eppendorf 0,5 ml stérile, 2 µl de vecteur pCR®2.1, 4 µl d'ADNc gp51 purifié par Gene Clean (section 3.4.1) respectant un rapport vecteur: insert de 1:3, 2 µl d'H<sub>2</sub>O distillée stérile, 1 µl de tampon 10X (60 mM TrisHCl pH7,5, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, 70 mM β-mercaptoéthanol, 1 mM ATP, 20 mM DDT, 10 mM spermidine), et finalement 1 µl d'enzyme T4 DNA ligase (4,0 unité de Weiss/µl). Le tube a été ensuite incubé à 14°C pendant 18 heures et entreposé à 4°C jusqu'à l'étape de transformation.

### 3.4.2.2 Transformation des bactéries *E.coli* (INV $\alpha$ F')

La transformation a été réalisée à l'aide de la trousse "TA Cloning®Kit" (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA). Brièvement, dans un tube d'isopropylène contenant 50  $\mu$ l de cellules compétentes *E.coli* (INV $\alpha$ F') "one shot™" déposé sur la glace, ont été ajoutés en agitant délicatement 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,5 M et 2  $\mu$ l du produit de ligation (section 3.4.2.1). Le mélange est ensuite incubé 30 minutes sur la glace avant d'être transféré dans un bain-marie à 42°C pendant exactement 30 secondes afin de produire un choc thermique des bactéries. Suite à cette étape, le tube est refroidi sur la glace pendant 2 minutes. Un volume de 250  $\mu$ l de milieu SOC (2,0% tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 20 mM de glucose) à température pièce a été ensuite ajouté et les bactéries ont été incubées à 37°C pendant 1 heure sous agitation constante en position horizontale dans un agitateur rotatif à 225 r.p.m.. Suite à cette incubation, des volumes de 50  $\mu$ l et de 200  $\mu$ l ont été ensuite étalés sur des boîtes de Pétri contenant 15 ml de milieu agar Luria-Bertani (LB) (1,0% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 1,0% de NaCl, 1,5% d'agar pH 7,0) auquel ont été ajoutés 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline pour la sélection des bactéries contenant le plasmide de résistance et 40 mg/ml de substrat colorimétrique soit le Bromo-4-Chloro-3-Indol- $\beta$ -D-Galactopyranoside (X-Gal). Ce substrat donne une couleur blanche aux bactéries contenant le plasmide recombinant incapable d'exprimer le gène de la  $\beta$ -galactosidase. Les boîtes de Pétris sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 heures.

### 3.4.3 Criblage des bactéries recombinantes et confirmation de la présence du fragment d'ADNc gp51 dans le pCR®2.1

L'analyse des colonies possédant le plasmide recombinant a été précédée d'une étape de purification du plasmide. Une dizaine de colonies blanches provenant des Pétris ont été sélectionnées et propagées dans 3 ml de milieu liquide de LB supplémenté d'ampicilline 100  $\mu$ g/ml pendant 18 heures sous agitation constante à 37°C. Les

minipréparations d'ADN sont réalisées par la technique de la lyse alcaline à l'aide de la trousse "High Pure Plasmid Isolation Kit"(Boehringer Mannheim).

Les suspensions bactériennes ont été transférées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml pour être ensuite centrifugés à la vitesse 10 000 x g pendant 3 minutes. Les surnageants ont été ensuite décantés et les culots resuspendu dans un volume de 250 µl de tampon de resuspension(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH. 8,0) additionné de ribonucléase A à une concentration de 1 mg/ml (Pharmacia Biotech). Un volume de 250 µl de tampon de lyse (0,2 M NaOH, 1%SDS) a été ajouté délicatement et a été incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Par la suite, 350 µl de solution neutralisante (4 M d'hydrochloride de guanidine et 0,5 M d'acétate de potassium pH 4,2) ont été rajoutés et les tubes incubés sur la glace pendant 5 minutes. Les tubes sont centrifugés à la vitesse de 10 000 x g pendant 10 minutes. Les surnageants sont ensuite transférés dans le combiné "High Pure filter tube" et "collection tube" qui sont centrifugés à 10 000 x g pendant 60 secondes. Les filtrats sont ensuite jetés. Un volume de 700 µl de solution de lavage (80% ethanol, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) sont ensuite ajouté au combiné "High Pure filter tube" et "collection tube" qui sont centrifugé à 10 000 x g pendant 60 secondes. Après avoir éliminé toute trace de solution de lavage résiduelle par une centrifugation additionnelle, le "collection tube" est remplacé par un tube Eppendorf de 1,5 ml. Un volume 100 µl d'H<sub>2</sub>O distillée stérile est ajouté au "High Pure filter tube" et ensuite centrifugé à 10 000 x g pendant 30 secondes. Le filtrat recueilli dans le tube Eppendorf contient le plasmide recombinant purifié.

La présence du fragment d'ADNc gp51 à l'intérieur des plasmides recombinants a été confirmée par la digestion de ceux-ci par l'endonucléase de restriction *EcoR1* (GibcoBRL). Pour ce faire, un volume de 5 µl d'ADN plasmidique purifié a été transféré dans un tube Eppendorf contenant 3,5 µl d'H<sub>2</sub>O distillée stérile. Nous avons ensuite ajouté 1 µl de tampon de digestion "React® 3" 10X (GibcoBRL; 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl) et 0,5 µl (10 U/µl) d'enzyme *EcoR1*. Par la suite, les tubes ont été transférés dans un bain-marie à 37°C pendant 60 minutes. Les produits de digestion ont été déposés dans des puits d'un gel de 0,8% d'agarose et soumis aux conditions d'électrophorèse et de révélation décrites dans la section 3.3.3.

### 3.4.4 Séquençage de l'ADNc gp51

Pour vérifier l'intégrité de la séquence de l'ADNc gp51, nous avons procédé au séquençage de 3 des plasmides recombinants. Ce travail a été réalisé par le service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier avec le séquenceur ABI Prism modèle 310 (Perkin Elmer). La technique employée est une légère modification de celle décrite par Sanger *et al.*, 1977, en utilisant des inhibiteurs de chaînes oligonucléotidiques comme les didéoxynucléotides à la place de désoxynucléotide prévenant ainsi l'élongation de la chaîne.

La séquence obtenue a été ensuite comparée à celle publiée par Sagata en 1985 à l'aide du logiciel GeneWorks 2.5 (Intelligenetics Inc., Mountain View, CA, USA).

### 3.5 Sous-Clonage du fragment d'ADNc gp51 dans le vecteur d'expression pcDNA3

L'insert provenant du plasmide recombinant (pCR@2.1/gp51) a été sous cloné dans le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3 (figure 2)(Invitrogen, San Diego, California, USA). Parmi les nombreuses caractéristiques qui nous ont amené à choisir ce vecteur d'expression, nous pouvons citer les suivantes : Ce vecteur a une taille de 5.4 kb et possède un site de clonage multiple, la séquence promoteur stimulatrice du gène précoce immédiat du cytomégalovirus humain (CMV) permet un haut niveau transcriptionnel de l'insert (Boshart, *et al.*, 1985) et les signaux de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH) stabilisent les ARNm transcrits en les polyadénylant. Également, la présence d'une origine de répllication ColE1 provenant de pUC19 permet la croissance dans les bactéries *E. coli* en des niveaux très élevés de copies. De plus le gène de la  $\beta$ -lactamase confère une résistance à l'ampicilline pour la sélection. Les séquences T7 et Sp6 situés respectivement en amont et aval du site de clonage multiple permet le séquençage de l'insert par l'utilisation d'amorces disponibles commercialement.

### 3.5.1 Digestion et purification de l'insert et du vecteur d'expression

Les sites de reconnaissance pour les endonucléases de restriction *Xba*1 (Gibco BRL) et *Hind*III (Gibco BRL) situés respectivement en amont et en aval de l'insert et présent dans le site de clonage multiple du vecteur d'expression ont été utilisés pour la digestion. Ainsi pour ce qui est de l'insert, un volume de 8 µl du plasmide recombinant (pCR®2.1/gp51) purifié (section 3.4.3) a été transféré dans un tube Eppendorf contenant 1 µl de tampon "React®2" 10X (Gibco BRL; Tris-HCl 500 mM, pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> à 500 mM). Des volumes de 0,5 µl d'enzyme *Xba*1 (Gibco BRL) et 0,5 µl d'enzyme *Hind*III (Gibco BRL) ont été ajoutés avant de transférer le tube dans un bain-marie à 37°C pour 90 minutes. Parallèlement, un volume de 5 µl du vecteur d'expression pcDNA3 a été mélangé à 3 µl d'H<sub>2</sub>O distillée stérile, 1 µl de tampon "React®2" 10X (Gibco BRL; 500 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM MgCl<sub>2</sub>) et aux volumes de 0,5 µl d'enzyme *Xba*1 (Gibco BRL) et 0,5 µl d'enzyme *Hind*III (Gibco BRL) avant d'être incubé dans un bain-marie à 37°C pour 90 minutes. Suite à l'incubation, les deux produits de digestion ont été déposés dans un puits de gel d'agarose de 0,8 % et soumis aux conditions d'électrophorèse décrites dans la section 3.3.3.

Après coloration au bromure d'éthidium et visualisation aux UV de longues longueurs d'onde, les bandes d'intérêt, soit l'insert d'une taille de 902 pb et le vecteur d'expression d'une taille de 5400 pb, ont été excisées du gel à l'aide d'un scalpel puis placés dans 2 tubes Eppendorf de 1,5 ml préalablement pesés. La purification des produits de digestion a été réalisée à l'aide de la trousse "Gene Clean" (section 3.3.3).

### 3.5.2 Ligation de l'insert ADNc gp51 et du vecteur d'expression pcDNA3

La réaction de ligation a été faite selon la technique décrite dans la section 3.4.2.1. Nous avons respecté un rapport molaire approximatif vecteur: insert de 1:3. Après l'ajout du tampon de ligation et de l'enzyme T4 DNA ligase, le tout a été incubé pendant 18

heures à 14°C puis transféré à 4°C jusqu'à l'étape de transformation des bactéries *E.coli* XL1-Blue.

### 3.5.3 Transformation des bactéries

La lignée de bactérie *E.coli* XL1-Blue est celle qui a été utilisée parce qu'elle permet la production d'une excellente qualité d'ADN. De plus, elle permet la sélection des colonies bleues / blanches avec le substrat X-gal (génotype: recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac<sup>-</sup>, F'[proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, ΔlacZDM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)]).

#### 3.5.3.1 Préparation de cellules compétentes

La préparation de cellules compétentes s'est fait selon de la technique modifiée de Cohen et al.(1972) en présence de chlorure de calcium. Des bactéries ont été étalées sur un pétri contenant du milieu LB (1% bacto-tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 1 % NaCl) auquel nous avons ajouté 1,5 % d'agar p/p et incubées à 37°C pendant 18 heures. Une colonie provenant de ce Pétri est sélectionnée et ensuite repiquée dans 4 ml de milieu LB liquide et incubé à 37°C pendant 18 heures sous agitation constante à 225 r.p.m. Suite à cette incubation, un volume de 1 ml est transféré dans 100 ml de milieu LB et le tout incubé à 37°C pendant environ 3 heures jusqu'à ce que la densité optique à la longueur d'onde de 600 nm (DO<sub>600</sub>) atteigne 0,4-0,5, correspondant approximativement à la moitié de la phase logarithmique de croissance. Les bactéries sont ensuite transférées stérilement dans 2 tubes de polypropylène de 50 ml (Falcon 2070) gardés sur la glace. Les cultures sont ensuite refroidies en gardant les tubes sur la glace pendant 10 minutes.

Les bactéries sont ensuite centrifugées pendant 15 minutes à 4°C à la vitesse de 1000 x g. Le surnageant est décanté et toute trace du milieu est éliminée en gardant les tubes inversés pendant 1 minute. Les culots sont ensuite resuspendu dans 10 ml de chlorure de calcium froid 0,1 M et gardés sur la glace pendant 30 minutes avant d'être à nouveau centrifugé à 4°C à une vitesse de 1000 x g. pendant 10 minutes. Les surnageants sont ensuite décantés et toute trace de liquide est éliminée en maintenant les tubes

inversés pendant 1 minute. Chaque culot est resuspendu pour une deuxième fois dans 2 ml de chlorure de calcium froid 0,1 M. Les cellules sont ensuite aliquotées en des volumes de 200 µl dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et conservés à -70°C jusqu'à l'étape de transformation (section 3.5.3.2).

### **3.5.3.2 Transformation**

La réaction de transformation s'est réalisée selon la méthode décrite dans la section 3.4.2.2. Un volume de 5 µl du produit de ligation a été utilisé pour être mélangé à 100 µl de bactéries fraîchement rendues compétentes (section 3.5.3.1). Des volumes de 50 µl, 100 µl et de 200 µl de bactéries ont été étalés sur du milieu LB agar contenant de l'ampicilline (100µg/ml).

### **3.5.3.3 Criblage des bactéries recombinantes et confirmation de la présence du fragment d'ADNc gp51**

Une dizaine de colonies de chaque pétri ont été propagées dans du bouillon liquide de LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml). La minipréparation des plasmides a été réalisé à l'aide de la trousse "High Pure Plasmid Isolation Kit"(Boehringer Mannheim). La procédure est identique à celle décrite dans la section 3.4.3. L'analyse des plasmides s'est effectué à l'aide des endonucléases de restriction *Hind*III et *Xba*I selon la méthode décrite dans la section 3.5.1. Les produits de digestion ont été ensuite déposés dans des puits d'un gel de 0,8 % et soumis aux conditions électrophorétiques décrites dans la section 3.3.3.

### **3.5.3.4 Séquençage du fragment de l'ADNc gp51**

Les fragments d'ADNc gp51 de trois plasmides recombinants purifiés à la section 3.5.3.3 ont été séquencés. Cette étape a été réalisée par le service de séquençage de l'institut Armand-Frappier et utilise la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). L'amorce sens du promoteur T7 et l'amorce antisens du promoteur Sp6 ont été utilisées. L'analyse des séquences nucléotidiques et de leur traduction en acides aminés a été réalisée à l'aide du logiciel "GeneWorks 2.5" (Intelligenetics Inc., Mountain View, CA, USA).

### 3.5.4 Maxipréparation de l'ADN gp51

La production en grande échelle du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 s'est fait à l'aide de la trousse "Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System" (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Cet ADN purifié nous servira de matériel d'injection pour les expériences d'immunisation des souris (section 3.7).

#### 3.5.4.1 Extraction des plasmides recombinants par lyse alcaline

Un bouillon de culture de 3 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) a été ensemencé par le clone d'intérêt et incubé à 37°C pendant 18 heures sous agitation constante à 225 r.p.m. Ensuite, un volume de 2,5 ml de ce bouillon a été transféré dans un erlenmeyer de 2 litres contenant 500 ml de milieu LB auquel de l'antibiotique (l'ampicilline 100 µg/ml) a été ajouté puis incubé à 37°C pendant 18 heures sous agitation constante à 225 r.p.m. Les bactéries ont été ensuite récupérées par centrifugation à la vitesse de 5000 x g pendant 10 minutes à 22°C. Le surnageant décanté, le culot est resuspendu dans 15 ml de solution de resuspension (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A). La solution de lyse, 15 ml, (0,2 M NaOH, 1% SDS) est ensuite ajoutée et le tout a été incubé pendant 20 minutes à la température de la pièce. Par la suite, 15 ml de solution de neutralisation (acétate de potassium 1,32 M pH 4,8) est ajoutés au lysat bactérien et est centrifugé à 14000 x g pendant 15 minutes à 22°C. Le surnageant est ensuite filtré sur papier Whatman®#1 puis mesuré dans un cylindre gradué. Un volume d'isopropanol égal à la moitié du surnageant est ensuite ajouté pour précipité l'ADN. La préparation est ensuite mélangée et centrifugée à 14000 x g pendant 15 minutes à 22°C. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 2 ml de tampon TE. Un volume de 10 ml de "Wizard® Maxipreps DNA Purification Resin" est ensuite ajouté à la solution d'ADN. Le mélange ADN/Résine est ensuite transféré dans une colonne de résine préformée et est aspiré à travers la colonne à l'aide d'une pompe à vide. Un volume de 25 ml de solution de lavage de la colonne "Column Wash Solution" est

ensuite ajouté et aspiré à travers la colonne. Dans le but de rincer la résine, 5 ml d'éthanol 80 % est ajouté pour y être ensuite aspiré. La colonne est ensuite placée dans un tube de 50 ml (Fisher) et centrifugé à 1300 x g pendant 5 minutes. La résine est ensuite séchée par aspiration pendant 5 minutes, avant d'être replacé dans un tube de 50 ml (Fisher). Un volume de 1,5 ml d'H<sub>2</sub>O préchauffé (65-70°C) est ensuite ajouté à la colonne et le tout centrifugé à 1300 x g pendant 5 minutes. L'éluat est ensuite filtré sur filtre de 0,2 µm et transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et le tout est centrifugé à 14000 x g pendant 1 minute pour enlever toute trace de résine. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et conservé à 4°C jusqu'à l'étape de dosage.

#### **3.5.4.2 Dosage et Resuspension de l'ADN dans du PBS**

La quantité d'ADN produit à la section 3.5.4.1 a été évalué au spectrophotomètre en mesurant la densité optique à la longueur d'onde de 260 nm. La quantité d'ADN a été calculé approximativement selon la règle qu'une unité de DO est égale à 50 µg/ml. L'ADN a été ensuite lyophilisé et resuspendu dans un volume de tampon physiologique stérile (PBS 10 mM pH 7,2) de sorte à obtenir une solution d'ADN de concentration finale de 2 µg/ml. Cette suspension nous servira de matériel d'injection lors des expériences d'immunisation.

### **3.6 Préparation du plasmide codant de l'interleukine-2 murine**

Le plasmide recombinant pcDNA3/IL2 contenant le cadre de lecture ouvert de l'interleukine 2 murine nous a été gracieusement fourni par le laboratoire du Dr H. Ertl de l'Institut Wistar de Philadelphie. L'ADN fixé sur papier filtre Whatman® (membrane) a été d'abord élué dans un tampon concentré en sel avant d'être produit à grande échelle.

#### **3.6.1 Éluition**

La portion du papier filtre où l'ADN a été fixé et été déposé dans un tube Eppendorf. Un volume de 1 ml de tampon d'éluition (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 1M,

EDTA 10 mM pH 8,0) a été transféré dans le tube contenant le papier filtre broyé partiellement de sorte à le recouvrir complètement. Le tout est incubé dans un bain-marie à 65°C pendant 30 minutes. Le liquide est ensuite transféré dans un autre tube Eppendorf et un second aliquot de tampon concentré en sel est déposé dans le tube contenant le papier filtre et incubé pendant 15 minutes à 65°C. Les 2 aliquots sont combinés puis extraits au phénol:Chloroforme. Le volume de la phase aqueuse est évalué puis transférée dans un tube Eppendorf à laquelle on ajoute 0,2 volumes d'acétate d'ammonium 10 M et 2 volumes d'éthanol à 4°C. Le mélange est incubé 10 minutes à température pièce et l'ADN est récupéré en centrifugeant à 12000 x g pendant 20 minutes. Le culot est rincé délicatement avec de l'éthanol 70 % et l'ADN est redissous dans un volume de 5 µl de tampon TE (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0). Cette suspension servira à transformer des bactéries *E.coli* XL1-Blue pour permettre la production à grande échelle du plasmide (section 3.6.2).

### **3.6.2 Transformation et Criblage de bactéries recombinantes pour la présence du plasmide recombinant**

Un volume de 3 µl de plasmide purifié pcDNA3/IL2 (section 3.6.1) est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* XL1-Blue compétentes (section 3.5.3.1). La réaction de transformation s'est réalisée selon la méthode décrite dans la section 3.4.2.2. Des volumes de 50 µl, 100 µl et de 200 µl de bactéries ont été étalés sur du milieu LB agar contenant de l'ampicilline (100 µg/ml).

Par la suite, une dizaine de colonies de chaque Pétri ont été propagées dans du bouillon liquide de LB contenant la même concentration d'ampicilline. La minipréparation des plasmides a été réalisée à l'aide de la trousse "High Pure Plasmid Isolation Kit"(Boehringer Mannheim). La procédure est identique à celle décrite dans la section 3.4.3. L'analyse des plasmides s'est effectuée à l'aide de l'endonucléase de restriction *Bam*H1 selon la méthode décrite dans la section 3.5.1. Les produits de digestion ont été ensuite déposés dans des puits d'un gel de 0,8 % et soumis aux conditions électrophorétiques décrites dans la section 3.3.3.

### **3.6.3 Séquençage de l'ADNc de l'IL2 murine**

Trois plasmides recombinants purifiés à la section 3.6.2 ont été séquençés dans le but de vérifier l'intégrité de la séquence. Ce séquençage a été effectué selon la méthodologie décrite à la section 3.5.3.4.

### **3.6.4 Maxi-préparation de l'ADNc de l'IL2 murine**

La production en grande échelle du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 s'est faite à l'aide de la trousse "Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System" (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Cet ADN purifié nous servira de matériel d'injection pour les expériences d'immunisation de souris.

#### **3.6.4.1 Extraction des plasmides recombinants par lyse alcaline**

Un bouillon de culture de 3 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline 100 µg/ml a été ensemencé par le clone d'intérêt pcDNA3/IL2 et incubé à 37°C pendant 18 heures sous agitation constante à 225 r.p.m. Ensuite, un volume de 2,5 ml de ce bouillon a été transféré dans un erlenmeyer de 2 litres contenant 500 ml de milieu LB auquel de l'antibiotique a été ajouté puis incubé à 37°C pendant 18 heures sous agitation constante à 225 r.p.m. La description de la méthode d'extraction des plasmides est détaillée dans la section 3.5.4.1.

#### **3.6.4.2 Préparation de l'acide nucléique pour l'injection des souris**

La quantité d'ADN produit à la section 3.6.4.1 a été évaluée au spectrophotomètre en mesurant la densité optique à la longueur d'onde 260 nm. La quantité d'ADN a été évaluée selon la méthode décrite dans la section 3.5.4.2. L'ADN a été ensuite lyophilisé et resuspendu dans un volume de tampon physiologique stérile (PBS 10 mM pH 7.2) de

sorte à obtenir une solution d'ADN de concentration finale de 2 µg/ml. Cette suspension nous servira de matériel d'injection lors des expériences d'immunisation.

### **3.7 Protocole d'immunisation**

#### **3.7.1 Les Animaux**

Des souris femelles Balb/c (H-2<sup>d</sup>) âgées de 4-6 semaines (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, CA) ont été utilisées pour les expériences d'immunisation.

Les souris ont été divisées en huit groupes. Le premier groupe est composé d'une souris qui a été injecté avec 50µg de plasmide pcDNA3 servant de témoin négatif. Le second groupe est composé d'une souris injectée avec 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/gp51. Le troisième groupe est composé de 2 souris injectées avec 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/gp51 avec de l'adjuvant complet de Freund pour la première injection et de l'adjuvant incomplet pour les doses de rappel. Le quatrième est composé de 2 souris injectées avec 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/GP51 et 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/IL2. Le cinquième groupe est composé d'une souris injecté avec une dilution 1/10 d'une suspension purifiée de virus (section 3.1.3) avec de l'adjuvant complet de Freund pour la première injection et de l'adjuvant incomplet pour les doses de rappel. Le sixième groupe est composé d'une souris injectée avec une dilution 1/10 d'une suspension purifiée de virus (section 3.1.3) et de 50 µg de plasmide recombinant pcDNA3/IL2. Le septième groupe est composé d'une souris injecté avec une dilution 1/10 d'une suspension purifiée de virus (section 3.1.3) servant de témoin positif. Le huitième est composé d'une souris injectée avec du PBS (tampon physiologique) servant de témoin négatif. Le tableau 1 résume le protocole d'injection des souris.

**Tableau 1: Protocole d'injection des souris**

<b>Groupes</b>	<b>Souris</b>	<b>Première injection</b>	<b>Deuxième et troisième injections</b>
1	1	ADN vect. pcDNA3 seul	ADN vect. pcDNA3 seul
2	2	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51)	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51)
3	3	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) + ACF	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) + AIF
	4	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) + ACF	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) + AIF
4	5	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) + IL-2	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) + IL-2
	6	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) +IL-2	ADN vect. recombinant (pcDNA3/gp51) +IL-2
5	7	ADN viral + ACF	ADN viral + AIF
6	8	ADN viral + IL-2	ADN viral + IL-2
7	9	ADN viral seul	ADN viral seul
8	10	PBS	PBS

### 3.7.2 Voie et calendrier des injections

De façon générale, les souris ont reçu des injections intramusculaires au niveau du quadriceps caudal des pattes postérieures à l'aide d'une aiguille 23G. Le volume final de chaque injection est de 50  $\mu$ l. Les injections se sont effectués aux jours 0, 14, 28. Les prélèvements sanguins se sont fait par la veine rétro-orbitale de l'œil aux jours 14, 28 et 42 suivant la première série d'injections.

## 3.8 Évaluation de la réponse immunitaire humorale

La présence et la titration d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines virales ou contre les protéines recombinantes codées par les plasmides, a été réalisé par le test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecte, l'immunobuvardage de type "Western" et par immunoprécipitation.

### 3.8.1 Test ELISA indirecte

Dans des plateaux 96 puits à fond plat (Linbro®/Titertek®, E.I.A Microtitration plate, ICN Biomedicals) nous avons transféré le lysat cellulaire FLK/BLV homogène dilué 1/64 (section 3.2) à raison de 100  $\mu$ l par puits. Les plateaux ont été incubés 18 heures à 4°C et l'excédent d'antigène qui n'a pas été adsorbés a été vidangé par inversion puis lavé 2 fois avec une solution de lavage (PBS 10 mM pH 7,2, Tween-20 (BioRad) 0,5% (v/v)). Les sites non spécifiques des puits ont été bloqués par 300  $\mu$ l d'une solution de saturation (PBS 10 mM pH 7,2, Sérum d'Albumine Bovine (BSA) 2% (p/v) (Sigma), Tween-20 (BioRad) 0,1% (v/v)) et incubé 90 minutes à température pièce. La solution de saturation est ensuite vidangée et les puits lavés 3 fois avec la solution de lavage. Des volumes de 100  $\mu$ l de sérums dilués en série logarithmique de base 2 dans une solution de dilution (PBS 10 mM pH 7,2, BSA 1%(p/v), Tween-20 (BioRad) 0,05%) ont été ajouté aux puits et incubé 60 minutes à température pièce sous agitation à 225 r.p.m. Chaque sérum a été traité en duplicata. Les puits ont été ensuite vidangés et lavés 5 fois avec la

solution de lavage avant d'ajouter 100 µl d'une solution d'immunoglobuline de chèvre anti-IgG (High & Low chain) de souris conjugué à la Biotine diluée 1/250 dans la solution de dilution puis incubé 60 minutes à température pièce sous agitation constante de 225 r.p.m. Après incubation, les puits ont été lavé 5 fois puis sont rajoutés 100 µl d'un complexe streptavidine/péroxydase "Horse Radish Peroxydase"(Calbiochem®, San Diego, CA,USA) dilué 1/250 et le tout incubé 30 minutes à température pièce sous agitation constante de 225 r.p.m. Suite à cette incubation, les puits ont été lavés et un volume de 100 µl d'une solution de révélation contenant le substrat (0,4 % (p/v) d'hypochlorure d'orthophénylène diamine (OPD; Sigma), 0,12 % (v/v) de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Sigma) préparé dans un tampon 0,05 M acide citrique (Baker), 0,1 M phosphate de sodium dibasique anhydre (Fisher), pH 5,0. Les plateaux ont été ensuite incubés 30 minutes à température pièce et à la noirceur. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout de 100 µl de HCl 1N. Les densités optiques (DO) ont été ensuite lues à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek, Multiskan, Flow) à une longueur d'onde de 492 nm.

### **3.8.2 Immunobuvardage de type "Western"**

La spécificité des anticorps produits suite à l'immunisation des souris a été étudiée par immunobuvardage de type "Western". La capacité des anticorps à reconnaître des protéines virales dénaturées a été ainsi étudiée.

#### **3.8.2.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Les électrophorèses ont été réalisées selon la méthode décrite dans la section 3.1.5. Ainsi un échantillon du lysat cellulaire homogène (section 3.2) auquel a été ajouté un volume égal de tampon dénaturant et réducteur concentré 2 fois (4% (p/v) SDS (BioRad), 20 % (v/v) glycérol (Fisher), 5 % (v/v) β-mercaptoéthanol (BioRad), 0,01 % de bleu de bromophénol (Sigma) préparé dans du tampon 0,125 M Tris-HCl (Sigma), pH 6,8). Cet échantillon a été chauffé à 100°C pendant 5 minutes. Suite à une centrifugation à 13 000 r.p.m. pendant 1 minute, les échantillons ont été déposés dans les puits du gel. Un puits a

été réservé pour les marqueurs de masse moléculaire constitués de protéines standards colorées (Rainbow™ High Range Coloured protein molecular weight markers, Amersham Life Science). L'électrophorèse des échantillons a été effectuée selon les conditions décrites dans la section 3.1.5.

Suite à la séparation sur le gel de polyacrylamide, les protéines virales ont été transférées électrophorétiquement sur une membrane de polyvinylidifluoride (PVDF) 0,2 µm (BioRad Trans-Blot Transfer Medium, PVDF) à l'aide du système "Mini trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell" (BioRad Laboratories). Le tampon de transfert est constitué de 25 mM de Tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glycine et de 20 % méthanol. Le transfert a été réalisé en appliquant un voltage constant de 100 V pendant 2 heures à 4°C à l'aide d'un générateur de courant (PowerSupply modèle 1000/500, BioRad Laboratories, Ltd., Richmond, CA, USA).

### **3.8.2.2 Immunobuvardage**

Les membranes de PVDF contenant les protéines virales transférées (section 3.8.2.1) ont été incubées dans une solution de saturation (2 % (p/v) BSA, 0,2 % (v/v) Tween-20, 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl, pH 7,5) pendant 18 heures à 4°C sous agitation constante. Les membranes ont été ensuite découpées de façon à séparer les puits. Les languettes ont été incubées 60 minutes à température pièce sous agitation constante dans une solution de sérum provenant de souris immunisé contre le virus ou contre le plasmide des 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup> séries d'immunisation. Les sérums des souris immunisées contre le virus sont dilués 1:500 et ceux des souris immunisés contre les plasmides dilués 1:100. La solution de dilution est composée de 1 % BSA (p/v), 0,1 % (v/v) Tween-20, 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl, pH 7,5. Suite à cette incubation les languettes sont lavées 3 fois pendant 15 minutes à température pièce sous agitation dans une solution de lavage (0,05% (v/v) Tween-20, 50 mM NaCl, 2,5 mM Tris-HCl pH 7,5). Les languettes sont ensuite incubées dans une solution d'immunoglobuline de chèvre anti-IgG (High & Low chain) de souris conjugué à la Biotine diluée 1/250 dans la solution de dilution puis incubées 60 minutes à température pièce sous agitation constante. Après incubation, les

languettes ont été lavé 3 fois pendant 15 minutes puis sont rajoutés une solution d'un complexe streptavidine/péroxydase "Horse Radish Peroxydase"(Calbiochem®, San Diego, CA,USA) dilué 1/250 dans la solution de dilution et le tout incubé 30 minutes à température de la pièce sous agitation constante. Après incubation, les languettes sont lavées 3 fois pendant 15 minutes et transférées dans une solution de révélation (3-3' diamino benzidine hydrochloride) jusqu'à l'apparition de bandes brunâtres. La réaction a été arrêtée par plusieurs lavages dans de l'eau distillée.

### 3.8.3 Immunoprécipitation

La spécificité des anticorps a été vérifiée en effectuant une immunoprécipitation. Les sérums de souris de la 3<sup>ième</sup> série de prélèvements ayant reçu le plasmide pcDNA3 seul, le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 et le virus BLV en présence de l'adjuvant de Freund ont été utilisé pour précipiter les protéines virales contenues dans le lysat cellulaire (section 3.2). Ainsi un volume de 50 µl du lysat cellulaire dilué 1/10 a été déposé dans un tube Eppendorf contenant 50 µl de sérum dilué 1/10, provenant de la souris ayant reçu des injections de pcDNA3. De même cette étape a été effectuée avec les sérums provenant des souris ayant reçue le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 et le virus BLV en présence de l'adjuvant de Freund. Les 3 tubes ont été ensuite incubés à température pièce pendant 60 minutes avec de légères agitations pour favoriser la formation de complexe antigène-anticorps. Un volume de 40 µl de protéine A couplée aux billes de Sépharose (Pharmacia Biotech) est ajouté aux tubes puis incubé 60 minutes avec de légères agitations pour favoriser l'adhésion des complexes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 10 000 x g pendant 10 secondes et les culots lavés avec 100 µl d'une solution de 50 mM Tris-HCl pH 7,5 et 0,5 M NaCl. Au dernier lavage, les culot sont resuspendus dans 20 µl de tampon dénaturant et réducteur concentré 2 fois (4% (p/v) SDS (BioRad), 20 % (v/v) glycérol (Fisher), 5 % (v/v) β-mercaptoéthanol (BioRad), 0,01 % de bleu de bromophénol (Sigma) préparé dans du tampon 0,125 M Tris-HCl (Sigma), pH 6,8) puis chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide de 12 % de façon à obtenir 4 puits contenant le même produit de

précipitation. Le tout est ensuite transféré sur membrane de PVDF (section 3.8.2.1). La méthode d'immunobuvardage décrite à la section 3.8.2.2 est ensuite utilisée pour identifier les protéines précipitées.

La membrane a donc été découpée de façon à obtenir 4 languettes de chaque précipitation. Les 4 languettes contenant les précipités de pcDNA3 ont été testés de la façon suivante: La première languette a été testée contre le sérum pcDNA3 (sérum homologue ayant servi à la précipitation), la deuxième languette a été testée contre le sérum de la souris injectée par pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2, la troisième languette a été testée contre le sérum de souris injectée par le virus BLV en présence de l'adjuvant de Freund et la quatrième languette a été testé contre le sérum de la souris ayant reçu le virus BLV en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2.

Cette procédure a été appliquée pour tester les deux autres produits de précipitation, en utilisant les mêmes sérums.

## 4. RÉSULTATS

#### 4.1 Purification du virus (gradient de saccharose)

Les virus contenus dans le lysat cellulaire FLK/BLV (section 3.2) ont été purifiés sur un gradient discontinu de saccharose. La bande obtenue a été récoltée puis analysée en microscopie électronique (Figure 2) et par SDS-PAGE (Figure 3). L'examen au microscope des virus purifiés montre une forte densité de particules virales ayant une forme icosaédrique, caractéristique des rétrovirus. De plus cette observation au microscope électronique, révèle qu'environ 40 % de ces particules virales sont brisées telles qu'apparaissant à la figure 2.

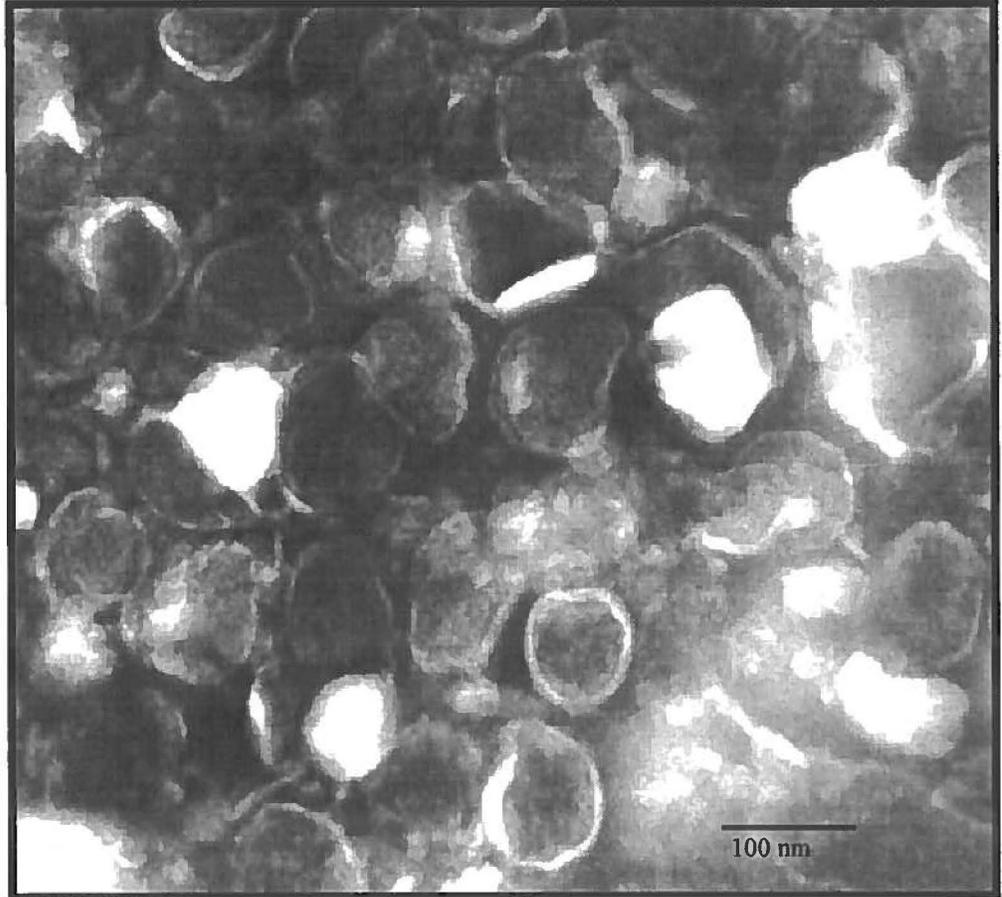
L'analyse par SDS-PAGE montre clairement les protéines majeures du virus soit la glycoprotéine de surface de l'enveloppe de 51 kDa (gp51) et la protéine majeure de la capsid de 24 kDa (p24). Tel que décrit dans la revue bibliographique, ces protéines sont les protéines majeures du virus, impliquées dans la réponse immunitaire.

#### 4.2 Amplification par PCR de la glycoprotéine d'enveloppe gp51

Tel qu'attendu, suite à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur l'ADN viral purifié (section 3.2), nous avons obtenu une bande à la taille de 902 pb. La figure 4 montre un gel d'agarose de 0,8 % sur lequel a été déposé un volume de 5 µl de la réaction de PCR. Cet amplicon a été cloné dans le vecteur pCR®2.1.

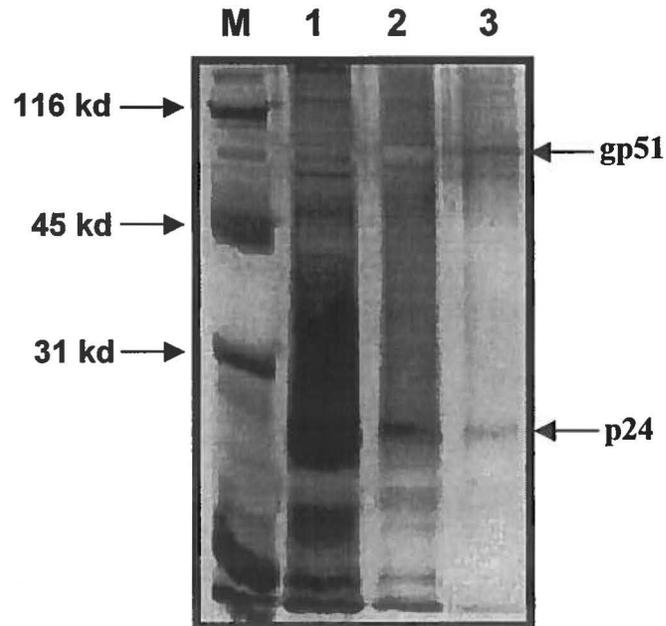
L'alignement de la séquence du gène gp51 (figure 5) avec celle publiée par Sagata (Sagata *et al.*, 1985) montre une homologie de plus de 99 %. De plus, nous avons observé 2 substitutions au niveau de la traduction en acide aminé où il y a notamment 2 nucléotides qui ne sont pas appariés avec ceux retrouvés dans la séquence de Sagata. Ainsi, à la position de l'acide aminé 123, il y a un acide glutamique au lieu d'un acide aspartique, et à la position de l'acide aminé 252 où il y a une thréonine au lieu d'une sérine. L'insert gp51 a été ensuite sous-cloné dans le vecteur d'immunisation génétique pcDNA3 (Xiang *et al.*, 1995). Pour obtenir des quantités suffisantes pour l'immunisation

des souris, nous avons procédé à la production massive (maxipréparations plasmidiques) de ce clone.



**FIGURE 2 : Micrographie électronique représentant le virus de la leucose bovine (BLV)**

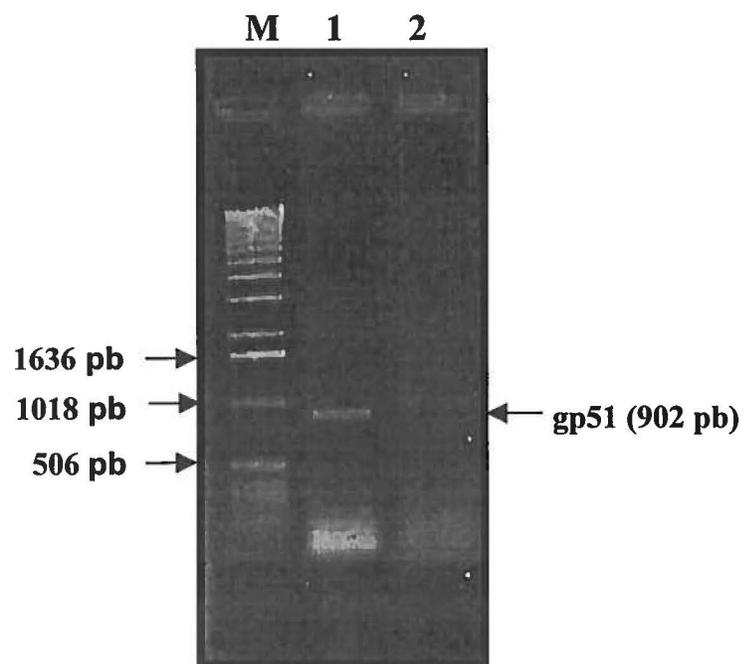
**Grossissement X 150 000.**



**FIGURE 3 : Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines virales du BLV.**

Le virus a été soumis à une purification sur gradient de saccharose (section 3.1.3) avant d'être analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) et coloré au sel d'argent.

- M** : Marqueurs de Masse Moléculaire
- Piste 1** : Suspension virale purifiée
- Piste 2** : Suspension virale purifiée diluée 1/10
- Piste 3** : Suspension virale purifiée diluée 1/100



**FIGURE 4: Profil électrophorétique sur gel d'agarose de l'amplicon gp51.**

Gel d'agarose (0,8 %) coloré au bromure d'éthidium et photographié sous lumière U.V.

- M** : Marqueurs de taille moléculaire (1kb) (Gibco-BRL)  
**Piste 1** : Produit d'amplification correspondant à la gp51 du BLV  
**Piste 2** : Témoin négatif du PCR sans ADN viral

**FIGURE 5 : Analyse comparative de la séquence en acides aminés de l'amplicon gp51**

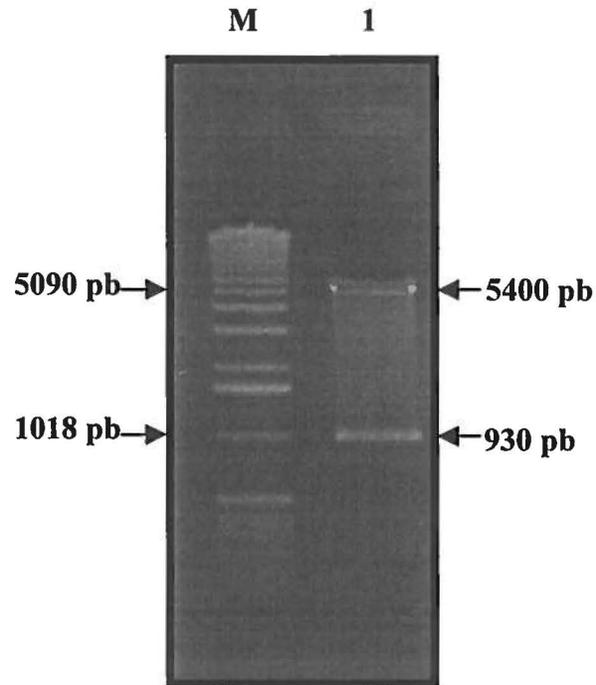
Les pointillés représentent les acides aminés identiques dans la séquence obtenue par notre laboratoire et celle de Sagata (Sagata *et al.*, 1985). Les mutations aux positions 123 (acide glutamique → acide aspartique), et 252 (thréonine → sérine) sont notées en rouge.

Consensus	MPKERRSRRR	PQPIIRWVSL	TLTLLALCRP	IQTWRCSLSL	GNQQWMTAYN	50
gp51	.....	.....	.....	.....	.....	50
gp51 Sagata	.....	.....	.....	.....	.....	50
Consensus	QEAKFSISID	QILEAHNQSP	FCAKSPRYTL	DSVNGYPKIY	WPPQGRRRF	100
gp51	.....	.....	.....	.....	.....	100
gp51 Sagata	.....	.....	.....	.....	.....	100
Consensus	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RF.CPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILEFLHLK	150
gp51	.....	.....	..E.....	.....	.....	150
gp51 Sagata	.....	.....	..D.....	.....	.....	150
Consensus	QCHGIFTTLW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WPSVRSWAL	200
gp51	.....	.....	.....	.....	.....	200
gp51 Sagata	.....	.....	.....	.....	.....	200
Consensus	LLNQTARAFP	DCAICWEPS	PWAPEILVYN	KTISSSGPGL	ALPDAQIFWV	250
gp51	.....	.....	.....	.....	.....	250
gp51 Sagata	.....	.....	.....	.....	.....	250
Consensus	N.SSFNTTQG	WHHPSQRLLF	NVSQGNALLL	PPISLVNLST	ASSAPPTRVR	300
gp51	.T.....	.....	.....	.....	.....	300
gp51 Sagata	.S.....	.....	.....	.....	.....	300

### 4.3 Production du plasmide recombinant codant pour l'IL2 murine

Suite à l'élution de l'ADN fixé sur le papier filtre Whatman® (section 3.6.1), nous avons effectué une transformation de cellules bactériennes *E.coli* XL1-Blue dans le but de produire à grande échelle le plasmide recombinant pcDNA3/IL2.

Le plasmide extrait par la méthode de la lyse alcaline a été analysé par profil de restriction suite à la digestion endonucléasique de l'enzyme *Bam*H1, avant d'être produit en grande quantité pour l'immunisation des souris. La figure 6 montre les produits de digestion qui ont été déposés dans des puits d'un gel d'agarose de 0,8 %. Comme prévu, nous avons obtenu une bande à la taille de 930 pb correspondant au cadre de lecture ouvert de l'IL2 murine, et une bande à la taille de 5400 pb correspondant au vecteur d'expression pcDNA3. L'IL2 murine a été subséquemment séquencée et sa séquence correspondait à celle décrite par le laboratoire du Dr Ertl qui nous a fourni le plasmide.



**FIGURE 6 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose du plasmide recombinant pcDNA3/IL2.**

Le plasmide recombinant a été digéré par l'endonucléase de restriction Bam H1 pour libérer l'amplicon cloné et analysé sur gel d'agarose à 0,8 %.

**M** : Marqueurs de taille moléculaire (1kb)

**Piste 1** : Produits de digestion soit l'insert, l'IL 2 murine à la taille de 930 pb et le vecteur pcDNA3 à la taille de 5400 pb.

#### **4.4 Production en maxipréparation des plasmides recombinants pcDNA3/gp51 et pcDNA3/IL2 et du pcDNA3 seul**

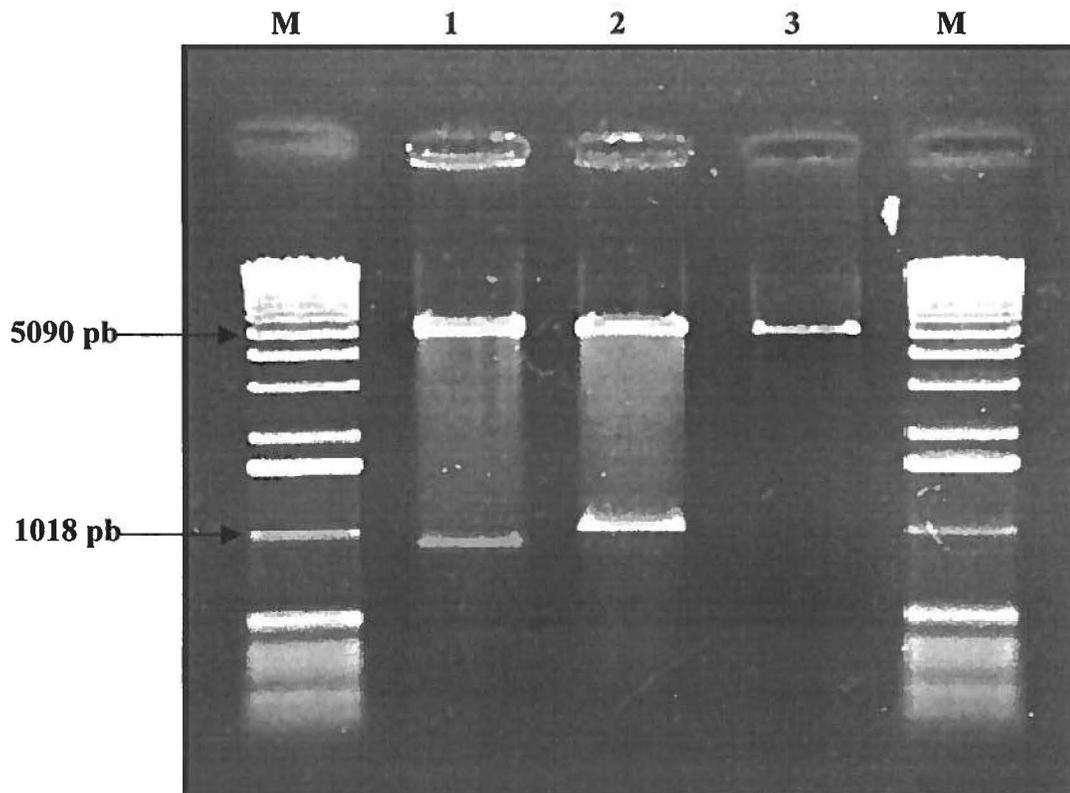
Afin d'obtenir des quantités d'ADN suffisantes pour l'immunisation des souris, des maxipréparations plasmidiques à partir de bouillon de culture ont été préparées. La figure 7 représente les produits de maxipréparation digérés par les endonucléases de restriction *HindIII* et *XbaI* dans le cas du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 et uniquement *BamHI* pour le plasmide recombinant pcDNA3/IL2. Le plasmide pcDNA3 a également été digéré par l'endonucléase de restriction *BamHI*. De façon générale, le rapport de densité optique à la longueur d'onde 260 nm sur celle de 280 nm est supérieur à 1,8 pour les différentes maxipréparations ce qui démontre un bon degré de pureté des plasmides recombinants (Killeen, 1997).

#### **4.5 Évaluation de la réponse immunitaire humorale**

##### **4.5.1 Recherche d'anticorps anti-gp51 obtenus par l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 par un test ELISA indirecte (section 3.8.1).**

Les sérums des souris provenant de la série d'immunisations ont servi à démontrer la présence d'anticorps suite à l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 (figure 8). Comme prévu, les sérums de souris qui ont été injectés avec le PBS ou le pcDNA3 (servant de témoin négatif) ne démontrent aucune réponse significative avec le test ELISA. En effet, pour les deux échantillons, des valeurs d'absorbance équivalentes au bruit de fond ont été enregistrées aux dilutions 1:20 jusqu'à 1:640. Également, le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 n'a pas entraîné de réponse significative en anticorps avec des valeurs d'absorbance comparables aux témoins négatifs. Par contre, le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 a montré une forte production d'anticorps de l'ordre de 100 fois supérieure à celle du plasmide recombinant

pcDNA3/gp51 utilisé sans le plasmide recombinant pcDNA3/IL2. Il faut cependant remarquer que la quantité d'anticorps produits suite à l'injection du virus complet qui est de loin supérieur au plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en combinaison avec pcDNA3/IL2.



**FIGURE 7 : Profil électrophorétique des maxipréparations plasmidiques de pcDNA3/gp51, pcDNA3/IL2 et pcDNA3**

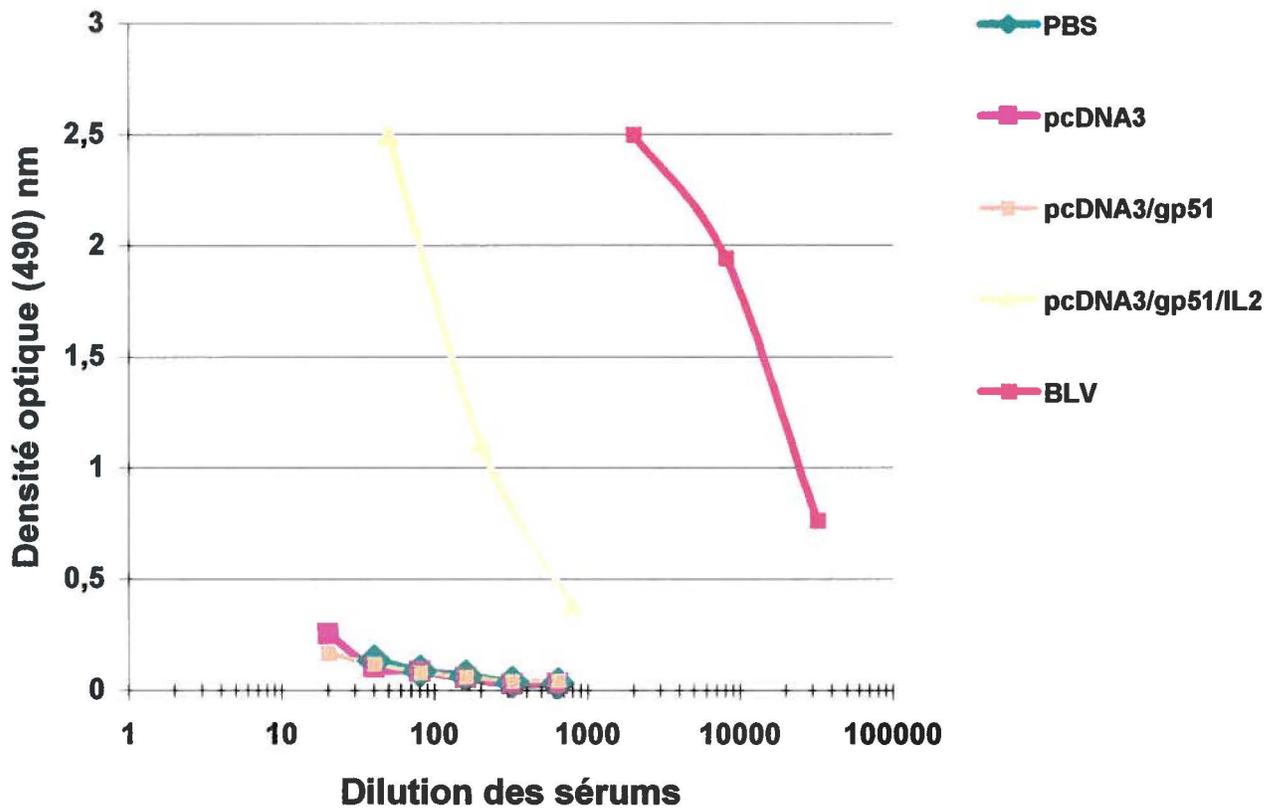
Les plasmides recombinants ont été digérés par les endonucléases de restriction pour libérer l'amplicon cloné et analysé sur gel d'agarose à 0,8 %.

**M** : Marqueurs de taille moléculaire (1kb)

**Piste 1** : Maxipréparation du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 digéré par les endonucléases de restriction *HindIII* et *XbaI*. Le vecteur pcDNA3 est à la taille de 5400 pb et l'amplicon gp51 est à la taille de 902 pb.

**Piste 2** : Maxipréparation du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 digéré par l'endonucléase de restriction *BamHI*. Le vecteur pcDNA3 est à la taille de 5400 pb et l'amplicon IL2 est à la taille de 930 pb.

**Piste 3** : Maxipréparation du plasmide pcDNA3 digéré par l'endonucléase de restriction *BamHI* à la taille de 5400 pb.



**Figure 8 : Titre ELISA de la réponse en anticorps obtenue suite à différentes immunisations.**

Densité optique obtenue à la longueur d'onde de 492 nm après une seconde dose de rappel avec les immunogènes suivant:

- PBS:** témoin négatif
- BLV:** virus entier inactivé utilisé comme témoin positif
- pcDNA3:** plasmide seul utilisé comme contrôle négatif
- pcDNA3/gp51:** plasmide recombinant seul
- pcDNA3/gp51/IL2:** plasmide recombinant exprimant la gp51 co-injecté avec le plasmide recombinant exprimant l'IL-2 murine.

Ce résultat particulièrement élevé est attribuable principalement au procédé expérimental. En effet, pour détecter les anticorps produit contre le virus complet, nous avons fait un test ELISA dans lequel, l'antigène fixé au fond du puits était du virus complet. Ainsi tous les anticorps produits contre les différentes protéines virales ont été détectés qui évidemment faisait croître la valeur de la réponse obtenue.

#### **4.5.2 Cinétique de production d'anticorps**

L'étude de la cinétique visait à évaluer l'augmentation du titre d'anticorps suite aux 3 séries d'injection du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2. Les sérums des souris injectés avec le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 seul et BLV ont servi de témoin pour l'évaluation de cette cinétique. Comme démontré sur la figure 9, les courbes d'absorbance des sérums du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 ne montre aucune variation significative au fil des immunisations. Tel qu'attendu, l'injection du virus a entraîné une augmentation significative du titre d'anticorps en fonction des immunisations. La figure 10 montre ainsi la cinétique de production d'anticorps associé à l'injection du plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2. De façon générale, nous avons observé un profil comparable avec celui du virus avec une légère déformation au niveau de la 3<sup>ème</sup> immunisation. Nous ne pouvons pas expliquer la logique de ce résultat mais il est plausible de penser que cette déformation est probablement causée par une mauvaise injection. En effet les résultats provenant d'une 4<sup>ème</sup> série d'immunisation (résultats non présentés) montrent une augmentation de la courbe au-delà de celle de la 2<sup>ème</sup> série d'immunisation.

#### **4.5.3 Évaluation du titre d'anticorps**

Le titre des anticorps a été évalué à partir des courbes d'absorbance obtenues pour chaque type d'immunisations et ce pour les 3 séries d'injection. Ces courbes d'absorbance représentaient la densité optique obtenue en fonction du logarithme de la dilution de sérum. Les courbes de ces graphiques semi-log ont pour formule :  $y = mx^a$  soit "m" la

penne, "x" la dilution et "y" la densité optique. La formule des courbes a été obtenue à l'aide du logiciel Microsoft ®Excel. Une densité optique de 0,3 est la valeur de référence qui a été déterminée comme densité optique significative. Ainsi, le titre d'anticorps d'un sérum donné correspond à la dilution à laquelle on obtient la densité optique de 0,3 qui est la valeur de base (bruit de fond) du test ELISA que nous avons développé.

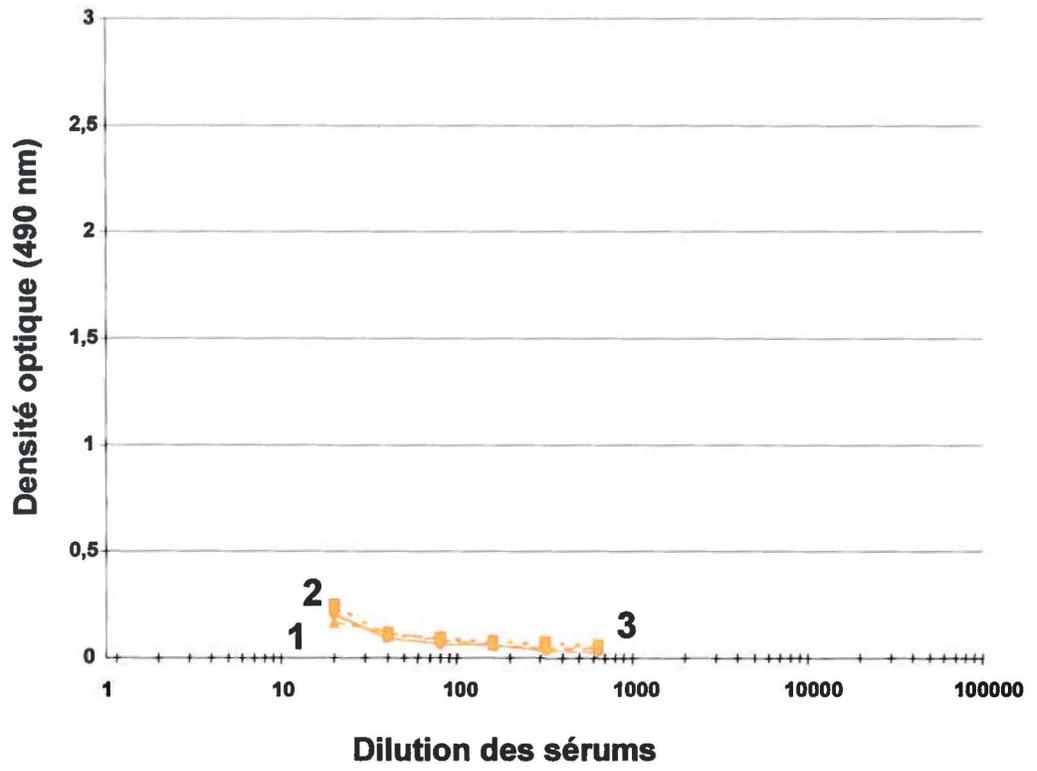
### **Figure 9 : Cinétique de production d'anticorps**

Évaluation qualitative de l'augmentation du titre d'anticorps en fonction de la série d'immunisation avec le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 (A) et le virus complet BLV (B). Le sérum est prélevé selon ci-dessous :

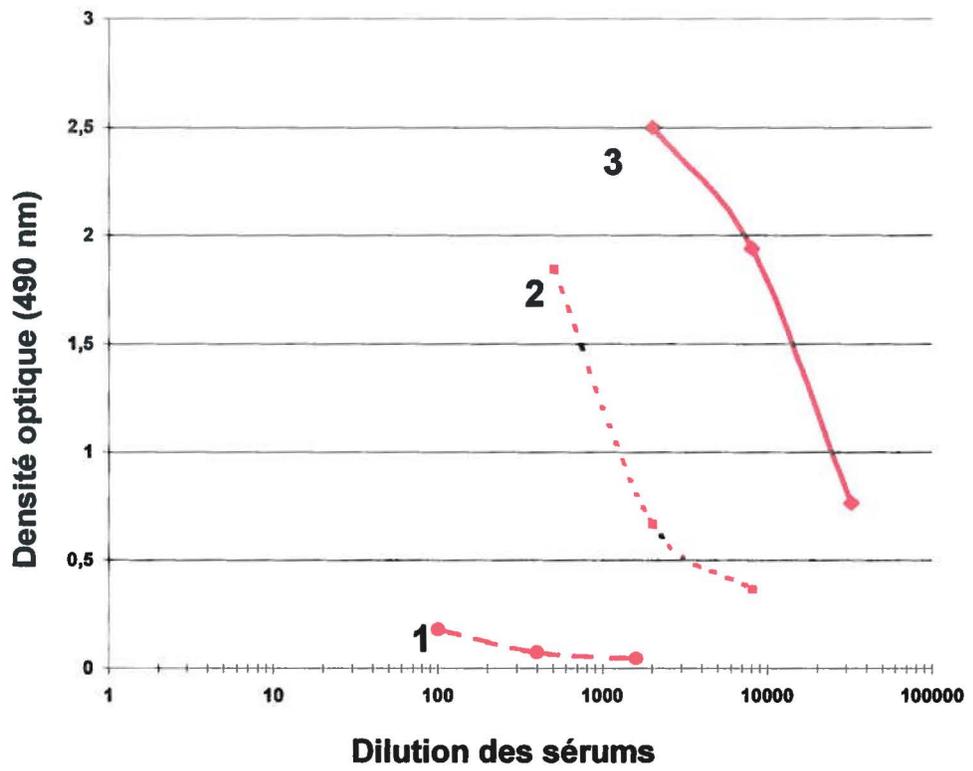
- (1) Prélèvement suite à la première immunisation : 14 jours suivant la première injection
- (2) Prélèvement suite à la deuxième immunisation : 28 jours suivant la première injection
- (3) Prélèvement suite à la troisième immunisation : 42 jours suivant la première injection

Après les prélèvements de sérum, ceux-ci sont analysés par ELISA selon le protocole décrit à la section 3.8.1 de la partie matériels et méthodes

**A**



**B**



### **FIGURE 10 : Cinétique de production d'anticorps**

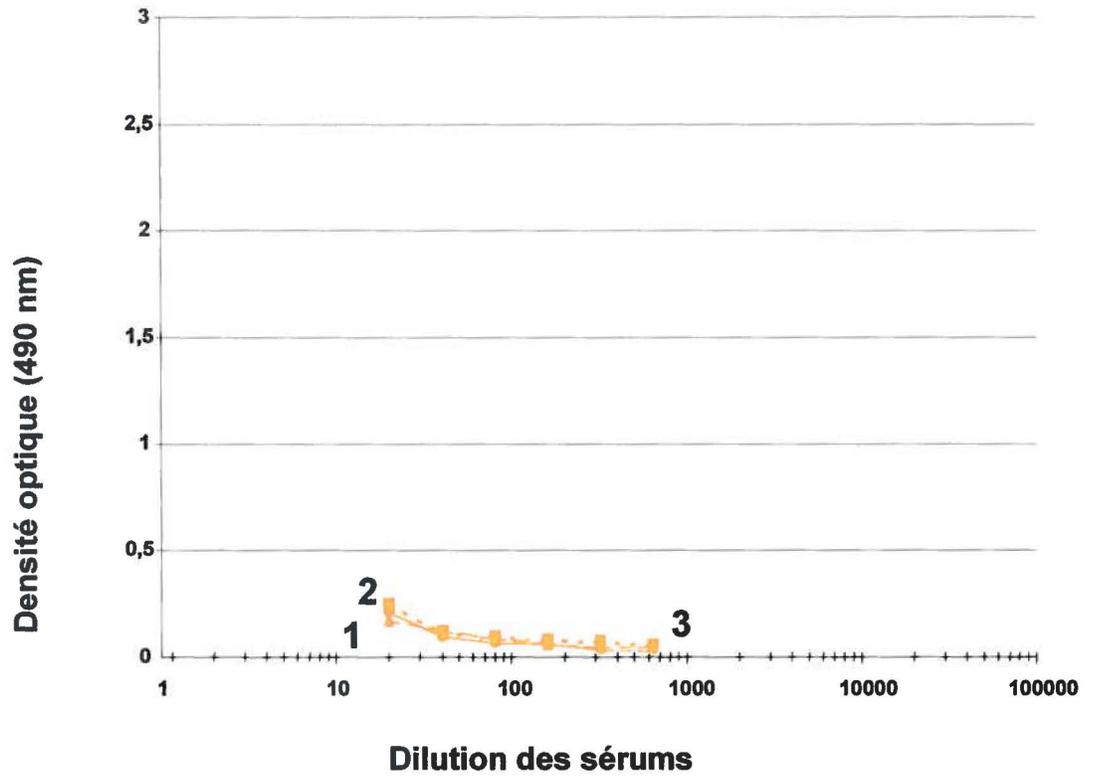
Évaluation qualitative de l'augmentation du titre d'anticorps en fonction de la série d'immunisation avec le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 (A) et du virus complet BLV (B).

Pour les figures A et B:

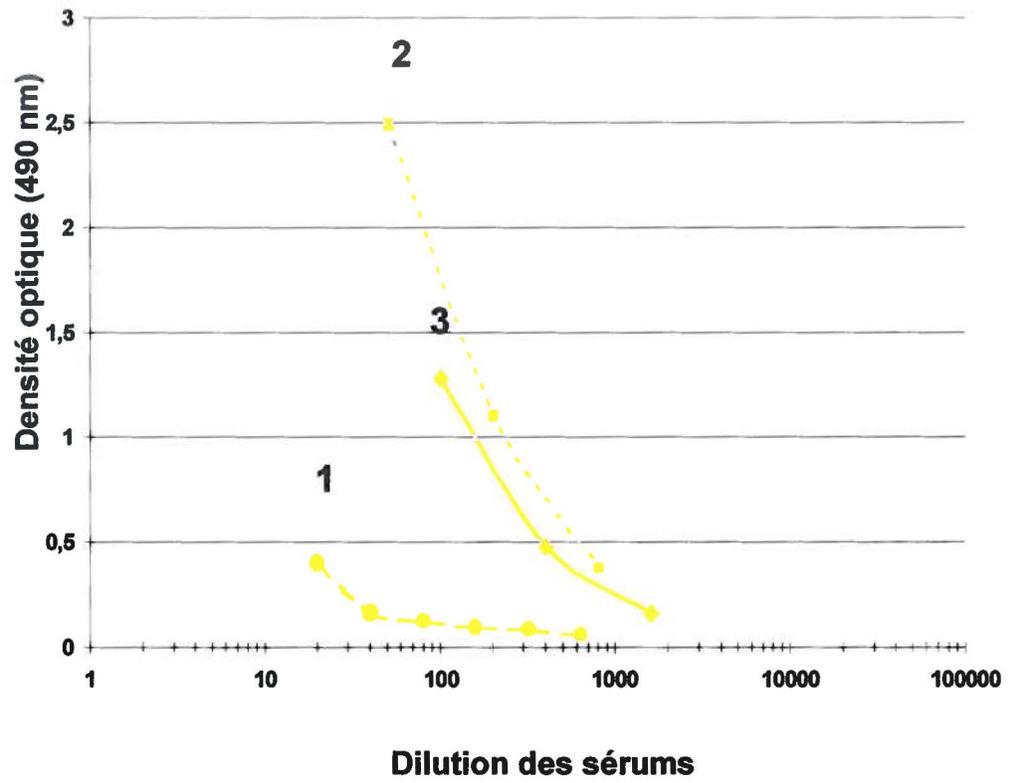
- (2) Prélèvement suite à la première immunisation : 14 jours suivant la première injection
- (2) Prélèvement suite à la deuxième immunisation : 28 jours suivant la première injection
- (3) Prélèvement suite à la troisième immunisation : 42 jours suivant la première injection

Après les prélèvements de sérum, ceux-ci sont analysés par ELISA selon le protocole décrit à la section 3.8.1 de la partie matériels et méthodes

**A**



**B**



Comme illustré sur la figure 11, les sérums des souris de témoin négatif qui ont reçu des injections de PBS ou de pcDNA 3 n'ont pas d'anticorps dirigés contre la gp51 du BLV. Les titres observés sont négligeables ( $\leq 10$ ). Étonnamment, les sérums de souris injectés avec le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 et celles qui ont reçu le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence d'adjuvant de Freund ont également des titres d'anticorps négligeable. Pour leur part, les sérums des souris qui ont reçu des injections de plasmides recombinants pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2 ont démontré des titres de l'ordre de 100 fois supérieur aux témoins négatifs. Tel qu'attendu les sérums des souris immunisés avec le BLV montrent des titres d'anticorps élevés, de l'ordre de 10 000 fois supérieure aux témoins négatifs. Le tableau 2 résume les formules des courbes d'absorbance utilisées pour chaque injection ainsi que les valeurs des titres obtenus.

#### **4.6 Évaluation de la spécificité des anticorps suscités par les différents types d'injection par immunobuvardage de type "Western".**

L'étude de la spécificité des anticorps produits suite à l'immunisation a été réalisée par immunobuvardage. Ainsi, les sérums de souris provenant de la 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> série d'injection ont été testés. Dans un premier temps les sérums de souris ayant reçu le virus ont été analysés. Dans la figure 12 A, sont représentés les résultats d'immunobuvardage. De façon générale, tous les sérums ayant reçu le virus ont réagi fortement contre la glycoprotéine de surface (gp51) et ses sous-produits de dégradation ainsi que contre la protéine majeure de la capsid p24. Tel qu'attendu, les souris ayant reçu du PBS comme témoin négatif n'ont montré aucune réactivité contre la suspension virale. Finalement, les sérums de souris ayant reçu des injections de plasmides ont été testés (figure 12 B).

Les sérums de souris immunisés avec le plasmide pcDNA3 n'ont évidemment pas montré de réactivité contre la suspension virale. Ceux des souris ayant reçu des injections de plasmide recombinant pcDNA3/gp51 ou de plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence d'adjuvant de Freund n'ont également pas montré de réactivité contre la

suspension virale. Seuls les sérums des souris ayant reçu des injections de plasmide recombinant en présence du plasmide recombinant exprimant l'IL2 ont montré une réaction contre la suspension virale.

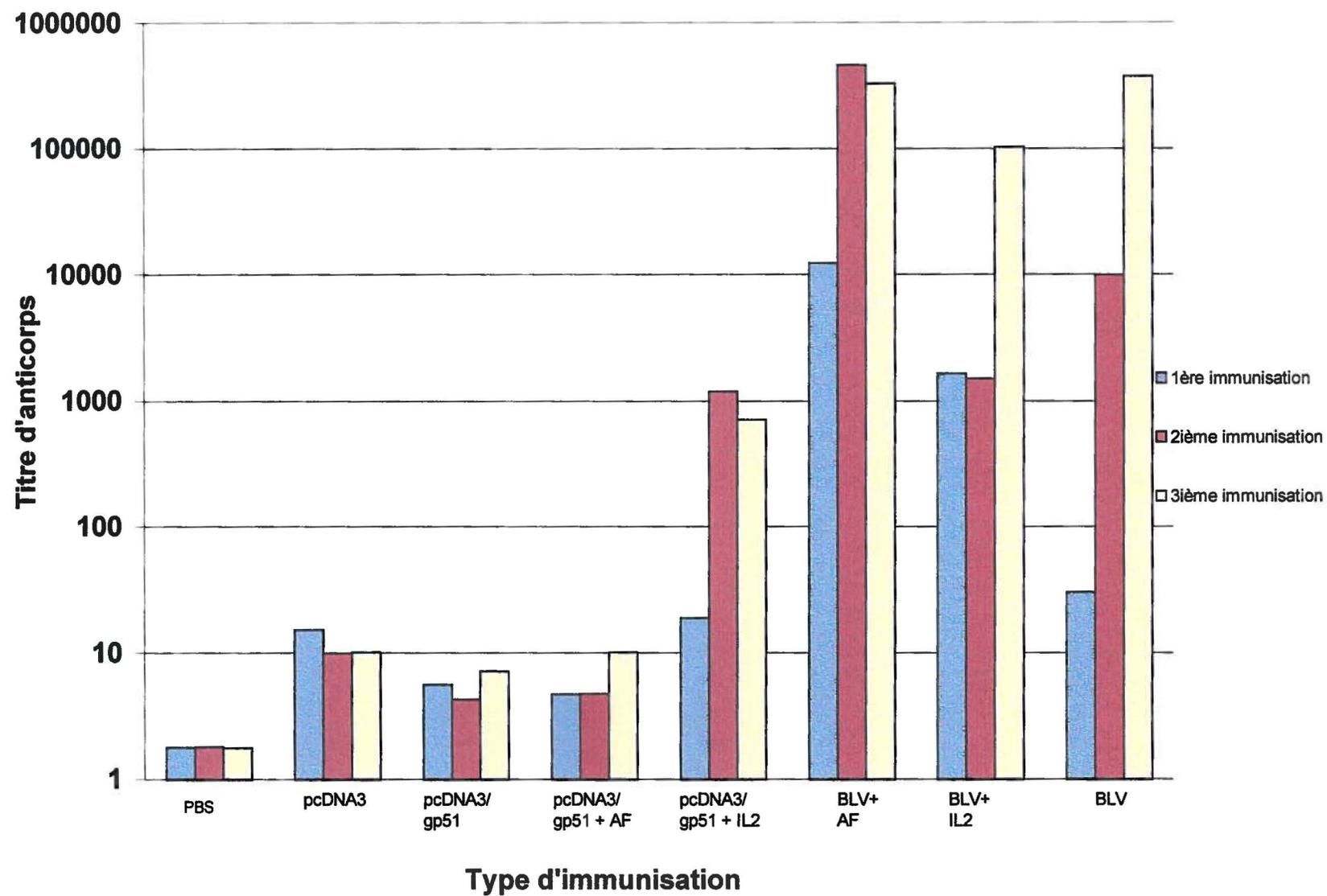
Les travaux d'immunobuvardage ont clairement indiqué que seule la gp51 est reconnue de façon spécifique. De plus on constate que cette réaction est plus intense et plus élargie, détectant également les sous-produits de dégradation de la gp51, avec le sérum provenant de la 3<sup>ième</sup> série d'injection.

**Tableau 2 : Formules des courbes d'absorbance et des titres d'anticorps obtenus en fonction des différents types d'injection.**

Le protocole expérimental suivi a été décrit à la section 3.7.1 de Matériel et Méthodes (tableau 1)

Type d'injection	1 <sup>ère</sup> immunisation	2 <sup>ème</sup> immunisation	3 <sup>ème</sup> immunisation
PBS	$y=5,4064x^{-0,6997}$ 1,7948	$y=0,2074x^{-0,2224}$ 0	$y=0,0772x^{0,0765}$ 0
pcDNA3	$y=1,3459x^{-0,5494}$ 15,3657	$y=1,0363x^{-0,5365}$ 10,0035	$y=1,1954x^{-0,5971}$ 10,1278
pcdNA3/gp51	$y=0,5823x^{-0,3826}$ 5,6599	$y=0,5515x^{-0,4185}$ 4,2839	$y=0,9104x^{-0,562}$ 7,2086
pcdNA3/gp51 + adjuvant de Freund	$y=0,5445x^{-0,3862}$ 4,6808	$y=0,5954x^{-0,4399}$ 4,7503	$y=1,2765x^{-0,6252}$ 10,1372
pcdNA3/gp51 + pcDNA3/IL2	$y=1,3062x^{-0,996}$ 19,0020	$y=37,295x^{-0,68}$ 1202,7911	$y=40,728x^{-0,7476}$ 712.5655
BLV + adjuvant de Freund	$y=34,843x^{-0,5038}$ 12555,5982	$y=65,635x^{-0,413}$ 463333,8514	$y=232,23x^{-0,5232}$ 332201,1433
BLV + pcDNA3/IL2	$y=62,904x^{-0,7207}$ 1664,3818	$y=37,222x^{-0,638}$ 1520,1349	$y=71,001x^{-0,4736}$ 103031,8046
BLV	$y=1,6051x^{-0,4911}$ 30,4202	$y=64,543x^{-0,5831}$ 10012,95645	$y=72,199x^{-0,427}$ 377635,1663

**FIGURE 11 : Titre d'anticorps en fonction des types d'injection**



**FIGURE 12 : Détection de protéines virales par Immunobuvardage de type "Western" à l'aide des sérums provenant des 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup> séries d'immunisation.**

**A**

**M** : Marqueurs de masse moléculaire

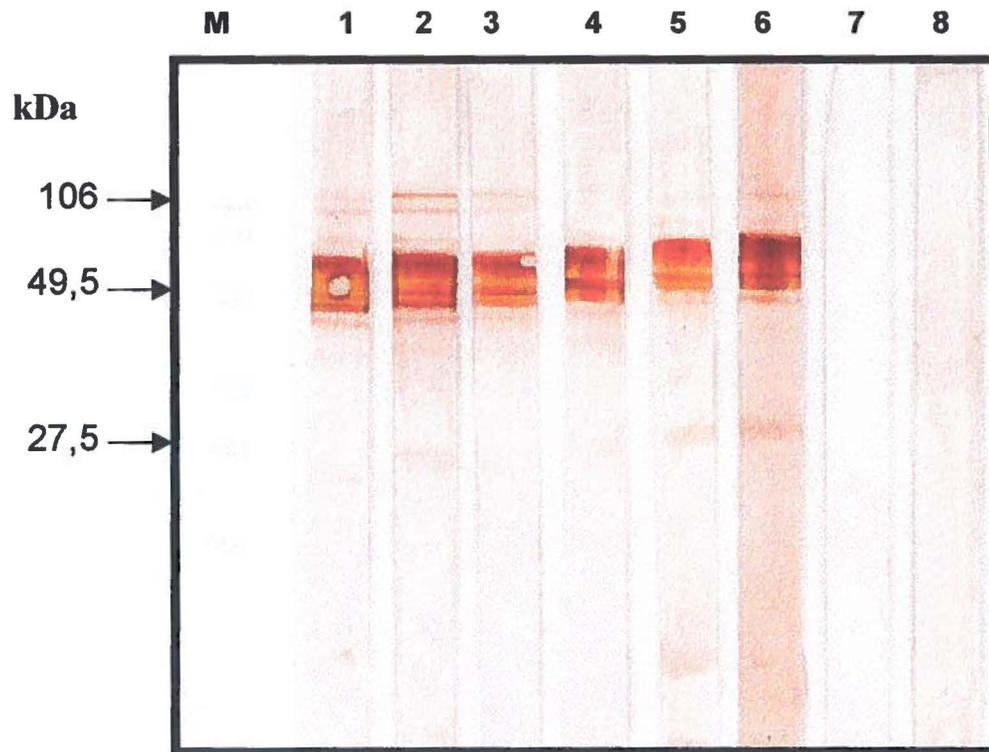
- Bande 1** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec BLV + adjuvant de Freund
- Bande 2** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec BLV + adjuvant de Freund
- Bande 3** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec BLV + pcDNA3/IL2
- Bande 4** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec BLV + pcDNA3/IL2
- Bande 5** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec BLV
- Bande 6** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec BLV
- Bande 7** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec PBS
- Bande 8** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec PBS

**B**

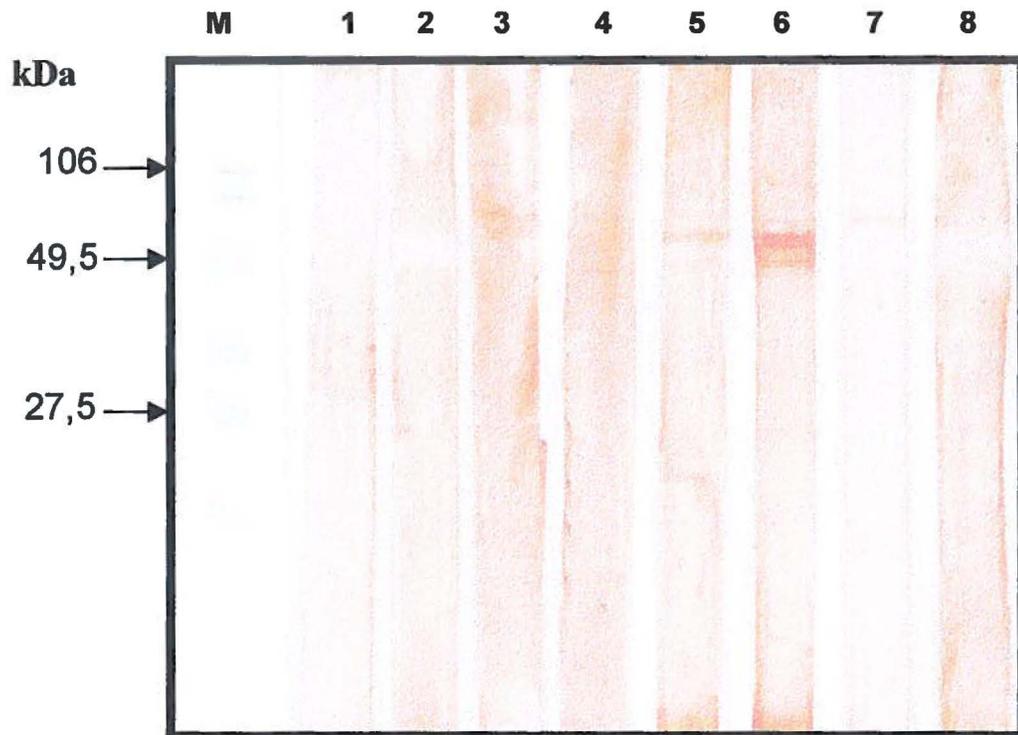
**M** : Marqueurs de masse moléculaire

- Bande 1** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3
- Bande 2** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3
- Bande 3** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3/gp51
- Bande 4** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3/gp51
- Bande 5** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2
- Bande 6** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2
- Bande 7** : Sérum de souris de la 2<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3/gp51 + adjuvant de Freund
- Bande 8** : Sérum de souris de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation injecté avec pcDNA3/gp51 + adjuvant de Freund

**A**



**B**



#### 4.7 Immunoprécipitation

La confirmation de l'identification de la gp51 par les antisérums provenant de l'immunisation génétique a été réalisée par immunoprécipitation. Subséquemment à l'immunoprécipitation, nous avons effectué un immunobuvardage de type Western en utilisant comme antisérum les sérums ayant servi à la précipitation. De plus, nous avons ajouté le sérum provenant de la souris immunisée avec le BLV en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2.

Tel que prévu, nous n'avons pas observé de réaction avec les précipités obtenus avec le sérum de la souris injecté avec le vecteur (témoin négatif) pcDNA3 (bandes 1 à 4). Dans le cas du témoin positif, précipité avec les sérums provenant de souris injecté avec le BLV en présence de l'adjuvant de Freund (bandes 9 à 12), il y a eu détection, tel qu'attendu, d'un précipité à la taille de 51 KDa correspondant à la gp51. Cette détection a pu être observée à l'aide des antisérums suivants : pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2, BLV+AF, BLV+IL2. Cette même réaction a été également observée sur les bandes 7 à 9 qui contenaient la réaction d'immunoprécipitation avec le sérum de souris injecté avec le plasmide pcDNA3/gp51 en présence du plasmide recombinant pcDNA3/IL2. (Figure 13).

**FIGURE 13 : Détection des protéines virales immunoprécipitées par immunobuvardage de type "Western".**

Les sérums provenant de la 3<sup>ième</sup> série d'immunisation des souris injectés soit avec le pcDNA3, le pcDNA3/gp51 en présence de pcDNA3/IL2 et le BLV en présence d'adjuvant de Freund, ont été utilisés pour précipiter les protéines virales. De plus, du sérum de la souris injecté avec le BLV + pcDNA3/IL2, les sérums utilisés pour la précipitation ont été utilisés pour la détection lors de l'immunobuvardage de type "Western". La flèche à droite indique la position de la gp51 précipitée.

**M** : Marqueurs de Masse Moléculaire

**Bande 1** : Immunoprécipité et testé avec sérum de référence de souris injecté avec pcDNA3

**Bande 2** : Immunoprécipité avec sérum pcDNA3 et testé avec sérum pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2

**Bande 3** : Immunoprécipité avec sérum pcDNA3 et testé avec sérum de souris immunisés par BLV + adjuvant de Freund

**Bande 4** : Immunoprécipité avec sérum pcDNA3 et testé avec sérum BLV + pcDNA3/IL2

**Bande 5** : Immunoprécipité avec sérum pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2 et testé avec sérum pcDNA3

**Bande 6** : Immunoprécipité et testé avec sérum pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2

**Bande 7** : Immunoprécipité avec sérum pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2 et testé avec sérum BLV + adjuvant de Freund

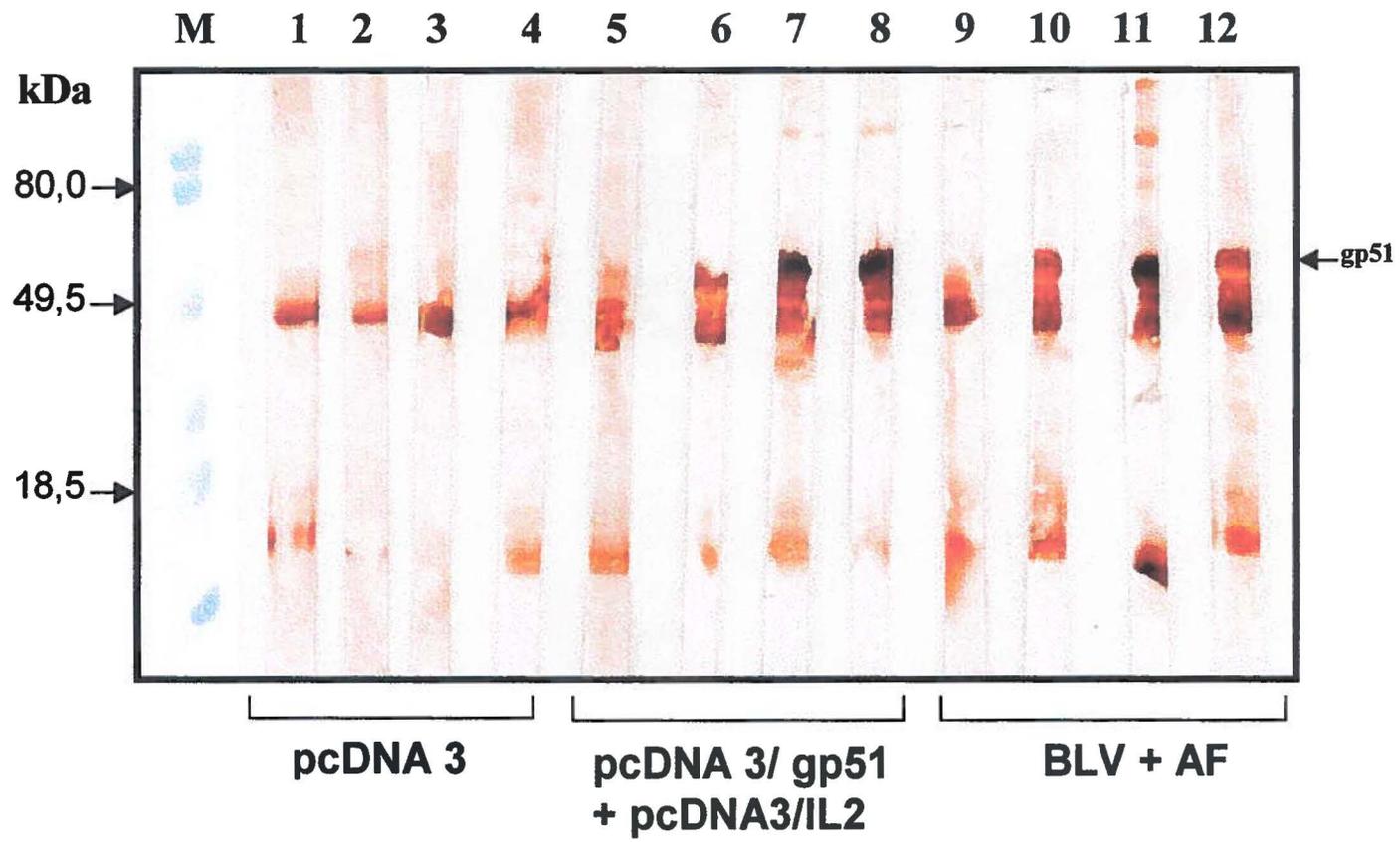
**Bande 8** : Immunoprécipité avec sérum pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2 et testé avec sérum BLV + pcDNA3/IL2

**Bande 9** : Immunoprécipité avec sérum BLV + adjuvant de Freund et testé avec sérum pcDNA3

**Bande 10** : Immunoprécipité avec sérum BLV + adjuvant de Freund et testé avec sérum pcDNA3/gp51 + pcDNA3/IL2

**Bande 11** : Immunoprécipité et testé avec sérum BLV + adjuvant de Freund

**Bande 12** : Immunoprécipité avec sérum BLV + adjuvant de Freund et testé avec  
sérum BLV + pcDNA3/IL2



## **5. DISCUSSION**

Ce projet de recherche avait comme but à long terme d'évaluer si la technologie de la vaccination par ADN pouvait être applicable dans le domaine de la vaccination contre le BLV. Pour ce faire, nous avons choisi le gène codant pour la glycoprotéine majeure de l'enveloppe du BLV, soit la gp51. En effet, les glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus jouent un rôle crucial dans le cycle de réplication viral, et sont responsables du tropisme cellulaire (Vonèche *et al.*, 1992). De plus, elles sont les cibles naturelles des anticorps neutralisants à cause de leur situation à la surface des particules virales (Mamoun *et al.*, 1990).

Pour améliorer l'efficacité de notre vaccin ADN, nous avons co-injecté un plasmide exprimant l'interleukine 2 (IL-2). Cette cytokine est intéressante car c'est celle qui agit sur le plus grand nombre de sous population de cellules T quelles que soit leur fonction ou leur état de différenciation (Lin *et al.*, 1995). Elle joue par conséquent un rôle central dans l'expansion des cellules T activées. L'IL-2 est ainsi reconnu comme étant un puissant stimulateur de l'immunité cellulaire qui induit la prolifération et la différenciation des cellules T et B, et également la croissance des cellules NK ( Janeway *et al.*, 1994).

Le premier volet de ce projet consistait à produire notre matériel biologique (ADN de la gp51 et de l'IL-2) pour la vaccination expérimentale. Afin de construire notre plasmide recombinant exprimant la gp51, nous avons amplifié le cadre de lecture ouvert de cette glycoprotéine de surface et l'avons ensuite séquencé afin d'en vérifier l'intégrité. L'analyse de la séquence a révélé une homologie de plus de 99% avec la souche de référence publiée par Sagata et al. (1985). Nous avons observé 2 substitutions localisées aux acides aminés 123 et 252 (figure 5). Ces substitutions ont déjà été rapportées par Fechner et son équipe (1997) et sont donc reconnues comme n'ayant pas d'influence sur la structure antigénique de la gp51. Ces mutations observées chez un virus isolé d'un bovin allemand, BLV-D3, sont les résultats entre autres du taux de mutation *in vivo* du gène *env* et des séquences terminales répétitives (LTR) évaluées respectivement à 0,009% et 0,034% changements de nucléotide par année (Willem *et al.*, 1993) ainsi que du taux

d'erreurs par la transcriptase inverse du BLV évaluée à  $4,8 \times 10^{-6}$  mutations par paire de base par cycle (Mansky et Temin, 1994).

Tel que précédemment décrit, étant donné la faible diversité génétique du BLV (Fechner *et al.*, 1997), et par le fait que les mutations n'altèrent en rien le caractère hydrophobique de la protéine, nous avons considéré ces mutations négligeables. En effet dans le premier cas où l'on observe le changement d'un acide glutamique pour un acide aspartique n'affecte pas les propriétés ou conformation de la protéine, car ces acides aminés sont classés dans la même famille soit celle des acides aminés acides par le caractère acide de leurs chaînes latérales (Alberts *et al.*, 1990). De même, dans le cas de la seconde mutation où il y a une thréonine au lieu d'une serine, ces acides aminés faisant partie du groupe des acides aminés avec des chaînes latérales polaires non-chargées (Alberts *et al.*, 1990).

Afin de comparer la réponse immunitaire suscitée par notre plasmide recombinant (pcDNA3/gp51), nous avons injecté les souris avec une suspension virale purifiée inactivée. Tel qu'attendu, nous avons observé une production d'anticorps comparable à celle d'une immunisation classique avec un vaccin tué ou inactivé. Le virus n'est plus capable de se multiplier, mais les protéines constitutives ont conservé leur pouvoir immunogène intact. Ainsi, nous observons une production d'anticorps résultant de la sélection clonale provenant du contact des différentes protéines virales (antigènes) et des cellules T et B du système immunitaire de la souris.

Par ailleurs, nous avons également observé que l'ajout de l'adjuvant de Freund a contribué à augmenter le titre des anticorps obtenu par l'injection du virus entier inactivé de façon significative. L'adjuvant a exercé donc son effet et nous présumons qu'il a agit en formant un dépôt d'antigène au site d'injection permettant ainsi le relargage de petites quantités d'antigène pendant une longue période de temps (Kaeberle, 1986). Ensuite l'adjuvant sert de véhicule pour la livraison des antigènes aux nœuds lymphatiques où ils seront captés par les follicules dendritiques (Kaeberle, 1986). C'est à cet endroit que se passe la majorité des interactions cellulaires menant à la formation de plasmocytes.

Finalement cet adjuvant, par les mycobactéries et le surfactant qu'il contient, active les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire de manière directe ou indirecte (Cox et Coulter, 1997).

Nos travaux ont montré que le plasmide recombinant pcDNA3/gp51 injecté en présence de l'adjuvant de Freund n'a pas entraîné de production d'anticorps de façon significative. Cette faible réponse était prévisible en tenant compte du mode d'action de l'adjuvant. La formation de dépôt au site d'injection relâche de petites quantités d'ADN plasmidique qui doivent être prise en charge par les myocytes où il y aura transcription, traduction et présentation de la protéine virale aux acteurs de la réponse immunitaire (Kucerova 1998). Tout ce processus prend un certain nombre de temps et d'ailleurs les résultats de la quatrième immunisation, 8 semaines suivant la première injection (résultats non présentés), ont démontré une augmentation du titre d'anticorps. L'absence d'Ac suite à l'immunisation par le pcDNA3 seul n'est pas surprenante et elle est conforme aux principaux résultats rapportés dans la littérature (Chow *et al.*, 1997; ).

Quant au plasmide recombinant pcDNA3/gp51 injecté, il n'a pas entraîné de production d'anticorps. Les mécanismes expliquant les différences d'efficacité des vaccins ADN ne sont pas clairement élucidés. Néanmoins, nous pouvons relier ces dernières à l'efficacité de transfection, l'expression et la nature antigénique de l'antigène encodé, et la capacité de la protéine à être présentée au système immunitaire de façon appropriée (Chow *et al.*, 1997). Un autre facteur qui peut influencer l'efficacité d'un vaccin est la quantité d'ADN injecté. Nous avons effectué des injections de 50 µg de plasmide purifié. Dans la littérature, les paramètres de quantité d'ADN à être injecté sont très variables (Cohen *et al.*, 1998). Il est plausible de penser qu'en injectant une quantité supérieure à 50 µg, nous pourrions observer une réponse immunitaire, mais cela dépend de plusieurs facteurs à la fois du gène injecté ainsi que du site d'injection, du protocole d'immunisation répétée et de l'espèce hôte (modèle) animal à l'étude (Cohen *et al.*, 1998)

Dans une expérience simultanée, ce même plasmide recombinant pcDNA3/gp51 co-injecté avec le plasmide exprimant l'interleukine 2 murine (pcDNA3/IL2) a entraîné une forte production d'anticorps, de l'ordre de 100 fois supérieur au plasmide injecté seul. Cette forte réponse démontre clairement le rôle de l'interleukine 2 comme activateur de la réponse immunitaire dans le cas de vaccination à ADN. Dans ce cas, l'ADN plasmidique codant pour l'interleukine 2 est pris en charge par la cellule musculaire, transcrit et traduit (Cohen *et al.*, 1998). La protéine ainsi exprimée peut exercer son action biologique par l'entremise d'un système de récepteurs spécifiques retrouvés principalement sur les cellules T, B, NK et LAK (Lymphokine Activated killers). Cette molécule active directement les monocytes et contribue à l'induction des autres fonctions des macrophages (Malkovski *et al.*, 1987; Belosevic *et al.*, 1990). De plus, le relargage de médiateurs secondaires tels que le GM-CSF est déclenché par l'IL-2 et ceci contribue également à l'activation des macrophages (Oppenheim *et al.*, 1991). Ainsi, l'IL-2 peut être une puissante cytokine capable d'augmenter les réponses des cellules T et B contre la glycoprotéine d'enveloppe gp51, lorsqu'elle est co-administrée sous forme d'ADN cloné dans un plasmide d'expression au site de la présentation de l'antigène. Ces résultats appuient l'hypothèse que l'action de l'IL-2 est locale et potentialise les activités des cellules présentatrices d'antigène (APC), des macrophages et des cellules T au site de l'immunisation (Kucerova 1998). Dans notre modèle, ces événements cellulaires rendent plus performant l'activation de cellules B spécifiques à la gp51 ce qui explique la forte réponse en Ac observée. D'autres équipes de chercheur ont obtenu des résultats similaires. Parmi celles-ci, nous pouvons citer l'équipe de Chow qui ont démontré que l'interleukine 2 co-exprimée avec le gène de la glycoprotéine de l'enveloppe du virus de l'hépatite B entraînait une augmentation du titre d'anticorps et de la prolifération cellulaire (Chow *et al.*, 1997).

Dans notre étude, la co-injection de l'interleukine 2 toujours sous forme plasmidique, n'a pas contribué à l'augmentation du titre d'anticorps dirigés contre le virus purifié. En effet, il a déjà été démontré que lorsque l'animal reçoit une dose de rappel trop

tôt après avoir réagit de façon maximale à l'injection d'un antigène, comme c'est le cas avec un vaccin à base d'une suspension de virus entier inactivé, on peut observer une suppression de la réponse immunitaire (Hanly *et al.*, 1994). Il est évident que l'expression locale de l'IL-2 au site d'injection n'a pas bénéficié à l'accroissement de la réponse immunitaire humorale contre les protéines du virus purifié. Plusieurs explications sont plausibles pour ces résultats. D'une part la réponse immunitaire est déjà maximale avec les protéines du virus intact et d'autre part il est possible qu'en présence d'un fort niveau d'Ac de haute affinité pour l'antigène on ne puisse détecter l'apparition d'autres nombreux Ac de faible affinité (Kim *et al.*, 1974).

La technique ELISA que nous avons employé pour détecter nos anticorps anti-BLV n'était pas conçue pour détecter les anticorps de faible affinité, ce qui nous permet pas de statuer sur leur présence ou absence dans les souris immunisés.

Les expériences d'immunobuvardage de type "Western" et d'immunoprécipitation ont été effectuées dans le but de confirmer que les anticorps produits au cours des différentes expériences d'immunisation, étaient spécifiques aux protéines virales du BLV. Les résultats obtenus suite à l'utilisation de ces deux méthodes ont confirmé que les titres élevés d'anticorps, observés chez les animaux immunisés avec les virus, étaient dus à une réaction immunitaire contre la plupart des antigènes viraux. Comme nous avons démontré, plusieurs protéines virales sont détectées avec les antisérums provenant d'animaux immunisés avec la suspension virale purifiée. Plus particulièrement, nous pouvons identifier la glycoprotéine de l'enveloppe gp51 et ses sous-produits de dégradation et la protéine majeure de la capsid, p24, qui sont les protéines les plus immunogéniques du virus (Portetelle *et al.*, 1989; Ban *et al.*, 1990; Orlik *et al.*, 1997). Tel qu'attendu, les réactions observées dans le cas de notre plasmide recombinant (pcDNA3/gp51) en présence du plasmide exprimant l'IL-2 étaient spécifiques à la glycoprotéine du BLV. De plus, nous avons observé une augmentation dans l'intensité de la réaction entre la deuxième et troisième immunisation démontrant bien l'évolution de la réponse immunitaire en fonction des immunisations répétées. Ces résultats confirment

l'importance de la présence du gène de l'IL-2 dans la préparation d'immunisation à base d'ADN plasmidique.

L'immunobuvardage nous a permis de voir si les anticorps produits détectaient les épitopes linéaires de la gp51. Nous avons voulu vérifier que ces anticorps pouvaient également reconnaître la gp51 sous sa forme native. Suite à l'immunoprécipitation nous avons testé les précipités en faisant un immunobuvardage de type "Western", ce qui a de nouveau confirmé la spécificité des anticorps produits.

La partie la plus frappante de nos résultats a été l'accroissement de la réponse immunitaire humorale dirigée contre la gp51 lorsque l'acide nucléique (plasmide pcDNA3/gp51) a été co-injectée avec le plasmide exprimant l'interleukine 2 murine (pcDNA/IL-2). Cet accroissement exponentiel de la réponse immunitaire peut dépendre de l'action biologique de la cytokine *in vivo* une fois injectée dans le muscle de l'animal, et ainsi augmenter la réponse immunitaire contre la protéine antigénique (gp51) (Raz *et al.*, 1993). Plusieurs laboratoires ont également rapporté que la co-injection de plasmide codant pour des cytokines ont un effet marquant sur la réponse immunitaire dirigée contre un plasmide codant pour un antigène. Nous pouvons citer les travaux de Watanabe et ses collaborateurs (1993) qui démontrent une augmentation de 5 fois de la réponse en anticorps dirigé contre la chaîne L Kappa du gène V lorsque le plasmide codant pour l'IL-2 est co-injecté avec le plasmide codant pour le gène V.

Les travaux de Chow et ses collaborateurs (1997) ont démontré que l'injection d'un plasmide codant pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B et de l'IL-2 a induit une augmentation marquée de la production d'anticorps et de la prolifération de cellules T si l'on compare avec les résultats obtenus avec l'injection du plasmide codant pour l'antigène de surface uniquement (Chow *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été rapportés dans les travaux de Geissler et son équipe (1997) où ils observaient une augmentation important de l'activité CTL dirigé contre la protéine de la capsid du virus de l'hépatite C lors de la co-injection du gène l'IL-2.

Plus récemment, les études sur le virus de la stomatite vésiculaire (VS) (Cantlon *et al.*, 2000) ont démontré que la co-injection du plasmide codant pour la glycoprotéine de l'enveloppe (G) et d'un plasmide codant pour le gène de l'interleukine 2 entraînait une augmentation significative du titre d'anticorps lorsque l'on compare avec la réponse obtenue par le plasmide codant pour la glycoprotéine G seule.

Tous ces résultats suggèrent que la co-injection du gène codant pour l'interleukine 2 soit capable d'augmenter l'immunité cellulaire et humorale obtenue lors d'immunisation à base d'ADN.

## **6. CONCLUSION**

L'objet de notre étude a porté sur l'évaluation du rôle immunomodulateur de l'interleukine 2 (IL-2), injectée sous forme d'ADN plasmidique, dans le cadre de la vaccination génétique contre le virus de la leucose bovine (BLV). Pour atteindre notre objectif, nous avons d'abord amplifié et cloné le cadre de lecture ouvert de la gp51 du BLV, gène essentiel à l'induction d'une réponse immunitaire, dans le vecteur eucaryotique pcDNA3. Ce plasmide recombinant ainsi construit nous a servi pour l'immunisation des souris.

L'évaluation du rôle immunomodulateur de l'IL-2 a été principalement observé par la détection d'anticorps anti-BLV à l'aide de la technique ELISA que nous avons développée pour ce projet. Ainsi, nos résultats nous ont permis de démontrer que l'interleukine 2 est capable d'accroître significativement la réponse humorale associée à l'injection de notre plasmide recombinant. De plus, nous avons pu observer que cette réponse devient significative uniquement en présence de l'ADN codant pour l'interleukine 2.

Nous avons également démontré que les anticorps produits étaient spécifiques à la gp51 du BLV. Les expériences d'immunobuvardage de type "Western" confirmées par l'immunoprécipitation ont permis de démontrer que les anticorps produits suite à l'injection de notre plasmide recombinant pcDNA3/gp51 en présence de l'IL-2, détectent spécifiquement la gp51.

D'autres travaux sont présentement en cours au laboratoire sur l'évaluation du caractère neutralisant des anticorps produits par notre système de vaccination BLV gp51. La séroneutralisation et l'étude de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps sont des propriétés essentielles pour l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin. L'étude de l'immunité cellulaire conférée par l'injection de notre plasmide recombinant serait une étape logique subséquente à nos travaux car il a été démontré que l'IL-2 est capable de moduler aussi bien la réponse de type TH1 que TH2.

Si ces expériences s'avèrent concluantes, nous pourrons passer au modèle ovin, qui est le modèle animal attitré pour les études faites sur le BLV. Ainsi nous pourrons subséquemment vérifier la protection conférée, suite à une épreuve virale, et aboutir finalement à la mise au point d'un vaccin à ADN BLVgp51.

Nous sommes confiants que la démonstration dans ce travail de recherche, de l'ajout du fragment codant pour l'IL-2, sera essentielle pour la mise au point de ce vaccin ADN anti-BLV.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier mon directeur de projet, le docteur Maximilien Arella qui avec ses idées géniales m'ont permis de mener à bien ce travail. Son dynamisme et son enthousiasme ont été pour moi une source d'énergie positive.

J'aimerais également adresser mes remerciements au docteur Abderrazzak Merzouki qui a assuré la co-direction de ce travail. Ces heures de discussions m'ont été très profitables.

De même je voudrais exprimer toute ma gratitude à ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux de maîtrise et qui ont rendu mon séjour à l'INRS-Institut Armand-Frappier dès plus agréable.

Il n'y a point de mot assez fort pour exprimer toute ma reconnaissance envers mes parents et ma famille qui tout au long de mes études m'ont encouragé et soutenu. Merci.

## RÉFÉRENCES

- Aida Y, Okada K, Amanuma H (1993) Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Cancer Res* 53(2):429-37.
- Aida Y, Nishino Y, Amanuma H, Murakami K, Okada K, Ikawa Y (1997) The role of tumor-associated antigen in bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Leukemia* 11 Suppl 3:216-8.
- Ahlers JD, Dunlop N, Alling DW, Nara PL, Berzofsky JA (1997) Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 158(8): 3947-58.
- Alber G, Kim KM, Weiser P, Reth M. (1993) Signalling function of the B-cell antigen receptors. *Immunol Rev.* 132:125-46
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1990) *Biologie Moléculaire de la cellule*, Deuxième édition.
- Alexandersen, Workshop on the pathogenesis of animal retrovirus, La Rochelle, France, 1993
- Altanerova V, Ban J, Altaner C.B (1989) Induction of immune deficiency syndrome in rabbits by bovine leukaemia virus AIDS. 3(11):755-8.
- Babiuk LA (1999) Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine* 17(13-14): 1587-95.
- Bagarazzi ML, Boyer JD, Javadian MA, Chattergoon M, Dang K, Kim G, Shah J, Wang B, Weiner DB (1997) Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. *J Med Primatol* Feb-;26(1-2):27-33
- Ban J, Gieciova E, Orlik O, Altaner C. (1990) Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnosis of bovine leukaemia virus infection. *J Virol Methods.* 30(1):7987.

- Ban J, Czene S, Altaner C, Callebaut I, Krchnak V, Merza M, Burny A, Kettmann R, Portetelle D (1992) Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukaemia virus external glycoproteins expressed in *Escherichia coli* by means of antipeptide antibodies. *J Gen Virol* 73 (9): 2457-61.
- Ban J, Hlavaty J, Orlik O, Splitter GA, Altaner C (1999) The human homologue of the bovine leukemia virus receptor BLVRcp1 is the delta-subunit of adaptor-related AP-3 protein that does not bind the BVL gp51. *Arch Virol* 144(10): 2013-22.
- Belosevic M, Nacy CA. (1990) Interleukin-2, anti-interleukin-2 receptor antibody, and activation of macrophages. *Cell Immunol.*;128(2):635-40.
- Boris-Lawrie K, Altanerova V, Altaner C, Kucerova L, Temin HM (1997) In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack *tax* and *rex*. *J Virol* 71(2): 1514-20.
- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W (1985) A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 1985 41(2): 521-30
- Bossmann H, Siakkou H, Ulrich R, Uckert W, Kraft R, Rosenthal S, Rosenthal HA (1989) A radioimmunoassay detecting the bovine leukaemia virus transmembrane protein gp30 and anti-gp30 antibodies in the serum of cattle. *Acta Virol* 33(2):113-20
- Bourne N, Milligan GN, Schleiss MR, Bernstein DI, Stanberry LR.(1996) DNA immunization confers protective immunity on mice challenged intravaginally with herpes simplex virus type 2. *Vaccine*. 14(13):1230-4.
- Brandon RB, Naif H, Daniel RC, Lavin MF (1991) Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Res Vet Sci* 50(1):89-94.
- Brillowska A, Dabrowski S, Rulka J, Kubis P, Buzala E, Kur J (1999) Protection of cattle against bovine leukemia virus (BLV) infection could be attained by DNA vaccination. *Acta Biochim Pol* 46(4): 971-6
- Bronte V, Tsung K, Rao JB, Chen PW, Wang M, Rosenberg SA, Restifo NP (1995) IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases. *J Immunol* 154(10): 5282-92.
- Brown F. (1994) Recombinant vectors in vaccine development. *Developments in biological Standardization*.

- Bruck C, Mathot S, Portetelle D, Berte C, Franssen JD, Herion P, Burny A (1982) Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology* 122(2): 342-52.
- Bubenik J, Simova J, Jandlova T (1990) Immunotherapy of cancer using local administration of lymphoid cells transformed by IL-2 cDNA and constitutively producing IL-2. *Immunol Lett* 23(4): 287-92.
- Burny A, Bex F, Chantrenne H, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Leclercq M, Leunen J, Mammerickx M, Portatelle D (1978) Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv Cancer Res* 28: 251-311.
- Burny Mammerickx M, Portetelle D, A, Leunen J. (1980) Detection by immunodiffusion- and radioimmunoassay-tests of antibodies to bovine leukemia virus antigens in sera of experimentally infected sheep and cattle. *Zentralbl Veterinarmed [B]*. 27(4):291-303
- Burny A, Bruck C, Cleuter Y, Couez D, Deschamps J, Ghysdael J, Gregoire D, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, et al (1985) Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species. *Cancer Res* 45(9 Suppl): 4578s-4582s.
- Burny A (1996) Comparative approach to retroviral vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(5): 389-92.
- Burridge MJ. (1981) The zoonotic potential of bovine leukemia virus. *Vet Res Commun.* 5(2):117-26.
- Callebaut I, Burny A, Krchnak V, Gras-Masse H, Wathelet B, Portetelle D (1991) Use of synthetic peptides to map sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukemia virus external glycoprotein. *Virology* 185(1): 48-55.
- Callebaut I, Voneche V, Mager A, Fumiere O, Krchnak V, Merza M, Zavada J, Mammerickx M, Burny A, Portetelle D (1993) Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol* 67(9): 5321-7.
- Callebaut I, Portetelle D, Burny A, Mornon JP (1994) Identification of functional sites on bovine leukemia virus envelope glycoproteins using structural and immunological data. *Eur J Biochem* 222(2): 405-14.
- Cantlon JD, Gordy PW, Bowen RA. (2000) Immune responses in mice, cattle and horses to a DNA vaccine for vesicular stomatitis. *Vaccine*. 18(22):2368-74.

- Cerretti DP, McKereghan K, Larsen A, Cantrell MA, Anderson D, Gillis S, Cosman D, Baker PE (1986) Cloning, sequence, and expression of bovine interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10): 3223-7.
- Cherney TM, Schultz RD (1996) Viral status and antibody response in cattle inoculated with recombinant bovine leukemia virus-vaccinia virus vaccines after challenge exposure with bovine leukemia virus-infected lymphocytes. *Am J Vet Res* 57(6): 812-8.
- Chevalier N, Berthelemy M, Le Rhun D, Laine V, Levy D, Schwartz-Cornil I (1998) Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis and increased cell survival mainly involve the CD11b<sup>+</sup> B-lymphocyte subset in sheep. *J Virol* 72(5): 4413-20.
- Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. (1997) Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids co-expressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *J Virol* 71(1):169-78.
- Chow YH, Chiang BL, Lee YL, Chi WK, Lin WC, Chen YT, Tao MH. (1998) Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by co-delivery of various cytokine genes. *J Immunol* 160(3): 1320-9.
- Cockerell GL, Jensen WA, Rovnak J, Ennis WH, Gonda MA (1992) Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a dairy cattleherd. *Vet Microbiol* 1992 31(2-3): 109-16.
- Cohen AD, Boyer JD, Weiner DB (1998) Modulating the immune response to genetic immunization. *FASEB J* 12(15): 1611-26.
- Conry RM, LoBuglio AF, Loechel F, Moore SE, Sumerel LA, Barlow DL, Curiel DT (1995) A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine has *in vivo* antitumor activity. *Gene Ther* ;2(1):59-65
- Cox JC, Coulter AR (1997) Adjuvants-a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15(3): 248-56.
- Cresswell P, Russ G, Esquivel F, Yewdell JW , Spies T, Bennink JR (1995) Assembly, intracellular localization, and nucleotide binding properties of the human peptide transporters TAP1 and TAP2 expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Biol Chem* 270(36):21312-8
- Daniel RC, Gatei MH, Good MF, Boyle DB, Lavin MF (1993) Recombinant viral vaccines for enzootic bovine leucosis. *Immunol Cell Biol* 71 (5): 399-404.

- Danko I, Wolff JA (1994) Direct gene transfer into muscle. *Vaccine* 12(16): 1499-502
- Davis HL, Michel ML, Whalen RG. (1993) DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody *Hum Mol Genet.* 2(11):1847-51.
- Davis HL, Michel ML, Mancini M, Schleef M, Whalen RG (1994) Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 1994 12(16): 1503-9.
- Del Giudice G (1992) New carriers and adjuvants in the development of vaccines. *Curr Opin Immunol* 4(4): 454-9.
- Del Giudice G, Pizza M, Rappuoli R (1998) Molecular basis of vaccination. *Mol Aspects Med* 1998 19(1): 1-70.
- Dequiedt F, Cantor GH, Hamilton VT, Pritchard SM, Davis WC, Kerkhofs P, Burny A, Kettmann R, Willems L (1999) Bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased ex vivo survival of B lymphocytes. *J Virol* 73(2): 1127-37.
- Derse D. (1987) Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *J Virol.* 61(8):2462-71
- Derse D. (1988) trans-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA processing. *J Virol.* 62(4):1115-9.
- Derse D, Martarano L. (1990) Construction of a recombinant bovine leukemia virus vector for analysis of virus infectivity. *J Virol* 64(1):401-5
- De Souza JB, Playfair JH (1995) A novel adjuvant for use with a blood-stage malaria vaccine. *Vaccine* 1995 13(14): 1316-9.
- Djilali S, Parodi AL, Levy D (1987) Bovine leukemia virus replicates in sheep B lymphocytes under a T cell released factor. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23(1): 81-5.
- Domenech A, Llames L, Goyache J, Suarez G, Gomez-Lucia E (1998) Comparison of four tests to evaluate the reactivity of rabbit sera against envelope or Gag-related proteins of bovine leukemia virus (BLV). *Vet Microbiol* 60(1): 13-25.
- Domenech A, Goyache J, Llames L, Jesus Paya M, Suarez G, Gomez-Lucia E (2000) In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* 81 (1):109-18.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA (1998) DNA vaccines. *Dev Biol Stand* 95: 43-53.

- Dusinsky R, Bardotti M, Ponti W (2000) Decreased expression of L-selectin (CD62L) on lymphocytes in enzootic bovine leukaemia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47(2): 127-32.
- Engers HD, Brunner KT, Cerottini JC (1986) Cytolytic activity mediated by T-lymphocytes. *Methods Enzymol* 132: 437-45.
- Ertl HC, Xiang Z (1996) Novel vaccine approaches. *J Immunol* 156(10): 3579-82.
- Fechner H, Blankenstein P, Looman AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D (1997) Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237(2): 261-9.
- Felber BK, Derse D, Athanassopoulos A, Campbell M, Pavlakis GN. (1989) Cross-activation of the Rex proteins of HTLV-I and BLV and of the Rev protein of HIV-1 and nonreciprocal interactions with their RNA responsive elements. *New Biol.*;1(3):318-28.
- Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. (1997) Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol.* 158(5):2278-84.
- Fenton RG, Steis RG, Madara K, Zea AH, Ochoa AC, Janik JE, Smith JW 2nd, Gause BL, Sharfman WH, Urba WJ, Hanna MG, DeJager RL, Coyne MX, Crouch RD, Gray P, Beveridge J, Creekmore SP, Holmlund J, Curti BD, Sznol M, Longo DL (1996) A phase I randomized study of subcutaneous adjuvant IL-2 in combination with an autologous tumor vaccine in patients with advanced renal cell carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19(5): 364-74.
- Filice G, Carnevale G, Lanzarini P, Orsolini P, Soldini L, Trespi G, Cereda PM. (1988) The morphogenesis of BLV (bovine leukemia virus) cultivated on FLK (fetal lamb kidney): an ultrastructural study. *Microbiologica.*;11(1):1-5.
- Florent G, Delgoffe JC, Zygraich N (1988) Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal antibodies. *Vet Microbiol* 18(1): 89-93.
- Foecking MK, Hofstetter H. (1986) Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene.*;45(1):101-5.
- Fukuyama S, Kodama K, Hirahara T, Nakajima N, Takamura K, Sasaki O, Imanishi J. (1993) Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J Vet Med Sci* 55(1): 99-106.

- Fuller DH, Haynes JR. (1994) A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 10(11):1433-41.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. (1993) DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations Proc Natl Acad Sci U S A. 15;90(24):11478-82.
- Gately M Naume B, , Espevik T.(1992) A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells. *J Immunol*. 148(8):2429-36.
- Geissler M, Gesien A, Wands JR (1997) Inhibitory effects of chronic ethanol consumption on cellular immune responses to hepatitis C virus core protein are reversed by genetic immunizations augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 159(10): 5107-13.
- Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. (1997) Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 158(3): 1231-7.
- Goudsmit J, Back NK, Nara PL. (1991) Genomic diversity and antigenic variation of HIV-1: links between pathogenesis, epidemiology and vaccine development. *FASEB J* 5(10):2427-36
- Graves DC, Ferrer JF (1976) *In vitro* transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res* 36(11 Pt 1): 4152-9.
- Grifantini R, Finco O, Bartolini E, Draghi M, Del Giudice G, Kocken C, Thomas A, Abrignani S, Grandi G (1998) Multi-plasmid DNA vaccination avoids antigenic competition and enhances immunogenicity of a poorly immunogenic plasmid. *Eur J Immunol* 28(4):1225-32.
- Grimaldi MC, D'Ippolito S, Pica A, Della Corte F.(1983) Cytochemical identification of the leukocytes of torpedoes (*Torpedo marmorata* Risso and *Torpedo ocellata Rafinisque*). *Basic Appl Histochem*. 27(4):311-7.
- Haas L, Divers T, Casey JW (1992) Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J Virol* 66(10): 6223-5.

- Hatfield D, Feng YX, Lee BJ, Rein A, Levin JG, Oroszlan S. (1989) Chromatographic analysis of the aminoacyl-tRNAs which are required for translation of codons at and around the ribosomal frameshift sites of HIV, HTLV-1, and BLV. *Virology*. 173(2):736-42
- Heaton KM, Grimm EA (1993) Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review. *Cancer Immunol Immunother* 37(4): 213-9.
- Heufler C, Koch F, Schuler G. (1988) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*. 167(2):700-5.
- Hislop AD, Good MF, Mateo L, Gardner J, Gatei MH, Daniel RC, Meyers BV, Lavin MF, Suhrbier A (1998) Vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes protect against retroviral challenge. *Nat Med* 4(10): 1193-6.
- Hohlfeld R, Engel AG (1994) The immunobiology of muscle. *Immunol Today* 15(6): 269-74.
- Hopkins SG, DiGiacomo RF (1997) Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13(1): 107-28.
- Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U, Uberla K, Qin Z, Diamantstein T, Blankenstein T (1993) Vaccinations with tumor cells genetically engineered to produce different cytokines: effectivity not superior to a classical adjuvant. *Cancer Res* 53(4):714-6.
- Inabe K, Ikuta K, Aida Y (1998) Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. *Virology* 245(1): 53-64.
- Inabe K, Nishizawa M, Tajima S, Ikuta K, Aida Y (1999) The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J Virol* 73(2): 1293-301.
- ICTV, The International Committee on Taxonomy of Viruses (1993)
- Irvine KR, Rao JB, Rosenberg SA, Restifo NP (1996) Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases. *J Immunol* 156(1): 238-45.
- Itohara S, Oikawa I, Terui S, Mizuno Y (1985) Infectivities of bovine leukemia virus in peripheral blood lymphocytes from naturally infected cattle and their relation to persistent lymphocytosis and antibody titers. *Nippon Juigaku Zasshi* 47(5):807-10.

- Iwasaki Shoji J, Inada N, Saito K, Takaura N Y, Sawa M. (1997) Histological examination of lymphoid follicles in conjunctiva-associated lymphoid tissue in guinea pigs--Report 1. Histological characteristics of follicular dendritic cells *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 101(10):794-800
- Janeway CA, Travers P (1997) Immunobiology (Third Edition) Garland Publishing Inc. New York and London
- Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC (1998) Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev* 32(3): 173-186.
- Johnston ER, Radke K (2000) The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions. *J Virol* 2000 74(6): 2930-5
- Kabeya H, Ohashi K, Ohishi K, Sugimoto C, Amanuma H, Onuma M (1996) An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine* 14(12): 1118-22.
- Kaerberle ML Ryu H.,(1986) Immunogenicity of potassium thiocyanate extract of type A Pasteurella multocida. *Vet Microbiol.*;11(4):373-85.
- Kashima N, Nishi-Takaoka C, Fujita T, Taki S, Yamada G, Hamuro J, Taniguchi T (1985) Unique structure of murine interleukin-2 as deduced from cloned cDNAs. *Nature* 313(6001): 402-4.
- Katoh I, Ikawa Y, Yoshinaka Y. (1989) Retrovirus protease characterized as a dimeric aspartic proteinase. *J Virol*. 63(5):2226-32.
- Kedar E, Braun E, Rutkowski Y, Emanuel N, Barenholz Y (1994) Delivery of cytokines by liposomes. II. Interleukin-2 encapsulated in long-circulating sterically stabilized liposomes: immunomodulatory and anti-tumor activity in mice. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 16(2): 115-24.
- Kerkhofs P, Heremans H, Burny A, Kettmann R, Willems L (1998) In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J Virol* 72(3): 2554-9.
- Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M, Cleuter Y, Dekegel D, Galoux M, Ghysdael J, Burny A, Chantrenne H (1976) Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*;73(4):1014-8
- Kettmann R, Bruck C, Mammerickx M, Burny A. (1980) BLV proviral DNA in the genome of the target lymphocyte. *Arch Geschwulstforsch*. 50(8):735-42.

- Kettmann R, Westin EH, Marbaix G, Deschamps J, Wong-Staal F, Gallo RC, Burny A. (1983) Lack of expression of cellular homologues of retroviral onc genes in bovine tumors. *Haematol Bluttransfus*. 28:218-21.
- Kim YT, Siskind GW (1974) Studies on the control of antibody synthesis. VI. Effect of antigen dose and time after immunization on antibody affinity and heterogeneity in the mouse. *Clin Exp Immunol* 17(2): 329-38.
- Kim TY, Greenbaum D, Davis P, Fink SA, Werblin TP, Siskind GW (1975) Studies on the control of antibody synthesis. IX. Effect of boosting on antibody affinity. *J Immunol* 114(4): 1302-6.
- Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Dang K, Wang B, Boyer JD, Weiner DB (1997) In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J Immunol* 158(2): 816-26.
- Kim JJ, Nottingham LK, Wilson DM, Bagarazzi ML, Tsai A, Morrison LD, Javadian A, Chalian AA, Agadjanyan MG, Weiner DB (1998) Engineering DNA vaccines via co-delivery of co-stimulatory molecule genes. *Vaccine* 16(19): 1828-35.
- Kono Y, Arai K, Sentsui H, Matsukawa S, Itohara S. (1986) Protection against bovine leukemia virus infection in sheep by active and passive immunization. *Nippon Juigaku Zasshi*. 48(1):117-25.
- Koprowski H, Weiner D.B (1998) DNA Vaccination/Genetic vaccination Current Topics in Microbiology and Immunology 226
- Kozak M (1986) Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(9): 2850-4.
- Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196(4): 947-50.
- Kozak M (1989) Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* 9(11): 5134-42.
- Krieg AM, Yi AK, Schorr J, Davis HL (1998) The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol* 6(1): 23-7.
- Kucerova L (1998) DNA/genetic vaccination (minireview). *Viral Immunol* 11(2): 55-63.

- Kucerova L, Altanerova V, Altaner C, Boris-Lawrie K (1999) Bovine leukemia virus structural gene vectors are immunogenic and lack pathogenicity in a rabbit model. *J Virol* 1999 73(10): 8160-6.
- Kuhnle G, Collins RA, Scott JE, Keil GM (1996) Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. *J Gen Virol* 77 : 2231-40.
- Kumar S, Andrew ME, Boyle DB, Brandon RB, Lavin MF, Daniel RC (1990) Expression of bovine leukaemia virus envelope gene by recombinant vaccinia viruses. *Virus Res* 17(2): 131-42.
- Kuroki M, Nakamura M, Itoyama Y, Tanaka Y, Shiraki H, Baba E, Esaki T, Tatsumoto T, Nagafuchi S, Nakano S, et al (1992) Identification of new epitopes recognized by human monoclonal antibodies with neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity activities specific for human T cell leukemia virus type 1. *J Immunol* 149(3): 940-8.
- Lai WC, Bennett M (1998) DNA vaccines. *Crit Rev Immunol* 18(5): 449-84.
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol.* 1970 Jan 14;47(1):69-85.
- Larsen DL, Dybdahl-Sissoko N, McGregor MW, Drape R, Neumann V, Swain WF, Lunn DP, Olsen CW (1998) Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J Virol*;72(2):1704-8
- Letesson JJ, Van den Broecke A, Marbaix-Cleuter Y, Delcommenne M, Mager A, Mammerickx M, Burny A, Depelchin A (1991) FACS analysis of bovine leukemia virus (BLV)-infected cell lines with monoclonal antibodies (mAbs) to B cells and to monocytes/macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 27:207-13
- Levy D, Kettmann R, Marchand P, Djilali S, Parodi AL. (1987) Selective tropism of bovine leukemia virus (BLV) for surface immunoglobulin-bearing ovine B lymphocytes. *Leukemia* 1(5):463-5.
- Lewin HA Bernoco D.(1989) Genetic aspects of bovine leukaemia virus infection and disease progression. *Anim Genet.* 20(3):337-9
- Liberati AM, De Angelis V, Fizzotti M, Schippa M, Cecchini M, Adiuto D, Di Clemente F, Palmisano L, Micozzi E, Zuccaccia M, et al (1994) Natural-killer-stimulatory effect of combined low-dose interleukin-2 and interferon beta in hairy-cell leukemia patients. *Cancer Immunol Immunother* 38(5): 323-31.

- Lin R, Tarr PE, Jones TC (1995) Present status of the use of cytokines as adjuvants with vaccines to protect against infectious diseases. *Clin Infect Dis* 21(6):1439-49.
- Lindblad EB, Elhay MJ, Silva R, Appelberg R, Andersen P (1997) Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect Immun* 65(2): 623-9.
- Lofthouse SA, Andrews AE, Elhay MJ, Bowles VM, Meeusen EN, Nash AD (1996) Cytokines as adjuvants for ruminant vaccines. *Int J Parasitol* 26: 835-42.
- Mamoun RZ, Morisson M, Rebeyrotte N, Busetta B, Couez D, Kettmann R, Hospital M, Guillemain B (1990) Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol* 64(9): 4180-8.
- Mammerickx M, Portetelle D, de Clercq K, Burny A (1987) Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res* 11(4): 353-8.
- Mammerickx M, Palm R, Portetelle D, Burny A. (1988) Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to sheep: latency period of the tumoral disease. *Leukemia*. 2(2):103-7.
- Manickan E, Rouse RJ, Yu Z, Wire WS, Rouse BT.(1995) Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J Immunol*. 1;155(1):259-65.
- Mansky LM, Temin HM. (1994) Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J Virol*. 68(1):494-9.
- Mansky LM, Wisniewski RM (1998) The bovine leukemia virus encapsidation signal is composed of RNA secondary structures. *J Virol* 72(4): 3196-204.
- Marsolais G, Dubuc R, Bergeron J, Morrey JD, Kelly EJ, Jackson MK (1994) Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J Vet Diagn Invest* 6(3):297-301.
- McBratney S, Sarnow P (1996) Evidence for involvement of trans-acting factors in selection of the AUG start codon during eukaryotic translational initiation. *Mol Cell Biol* 16(7): 3523-34.
- McDonnell WM, Askari FK (1996) DNA vaccines. *N Engl J Med* 334(1): 42-5.
- Meirom R, Moss S, Brenner J, Heller D, Trainin Z (1997) Levels and role of cytokines in bovine leukemia virus (BLV) infection. *Leukemia* 11 Suppl 3:219-20.

- Merza M, Sober J, Sundquist B, Toots I, Morein B (1991) Characterization of purified gp 51 from bovine leukemia virus integrated into iscom. Physicochemical properties and serum antibody response to the integrated gp51. *Arch Virol* 120: 219-31.
- Merza M, Sundquist B, Sober J, Morein B (1991) Immunoaffinity purification of two major proteins of bovine leukemia virus (gp51 and p24) and their use for discrimination between vaccinated and infected animals. *J Virol Methods* 33(3): 345-53
- Moreau P, Hen R, Wasylyk B, Everett R, Gaub MP, Chambon P. (1981) The SV40 72 base repair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acids Res.* 25;9(22):6047-68.
- Morrissey PJ, Bressler L, Park LS, Alpert A, Gillis S. (1987) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. *J Immunol.* 15:1113-9.
- Mirsky ML, Olmstead CA, Da Y, Lewin HA (1996) The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J Virol* 70(4): 2178-83.
- Mond J, Kim YT, Siskind GW (1974) Studies on the control of antibody synthesis. V. Effect of nonspecific modification of the magnitude of the immune response on the affinity of the antibody synthesized. *J Immunol* 112(3):1255-63.
- Murovska MF, Chernobayeva LG, Miroshnichenko OI, Tomsons VP, Konicheva VV, Ivanova SV, Tikhonenko TI (1992) An investigation of the effect of antisense RNA gene on bovine leukaemia virus reproduction in cell culture. *Vet Microbiol* 33: 361-6.
- Ohishi K, Suzuki H, Yamamoto T, Maruyama T, Miki K, Ikawa Y, Numakunai S, Okada K, Ohshima K, Sugimoto M (1991) Protective immunity against bovine leukaemia virus (BLV) induced in carrier sheep by inoculation with a vaccinia virus-BLV env recombinant: association with cell-mediated immunity. *J Gen Virol* 72(8): 1887-92.
- Ohishi K, Ikawa Y (1996) T cell-mediated destruction of bovine leukemia virus-infected peripheral lymphocytes by bovine leukemia virus env-vaccinia recombinant vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(5): 393-8.
- Ohishi K, Kabeya H, Amanuma H, Onuma M (1996) Induction of bovine leukaemia virus Env-specific Th-1 type immunity in mice by vaccination with short synthesized peptide-liposome. *Vaccine* 14(12): 1143-8.

- Ohishi K, Kabeya H, Amanuma H, Onuma M (1997) Peptide-based bovine leukemia virus (BLV) vaccine that induces BLV-Env specific Th-1 type immunity. *Leukemia* 11 Suppl 3:223-6.
- Olson C.(1974) Bovine lymphosarcoma (leukemia)-a synopsis. *J Am Vet Med Assoc* 165(7):630-2
- Oppenheim JJ Cox GW, Chattopadhyay U, , Varesio L.(1991) IL-4 inhibits the costimulatory activity of IL-2 or picolinic acid but not of lipopolysaccharide on IFN-gamma-treated macrophages. *J Immunol.* 1;147(11):3809-14
- Orlik O, Ban J, Hlavaty J, Altaner C, Kettmann R, Portetelle D, Splitter GA (1997) Polyclonal bovine sera but not virus-neutralizing monoclonal antibodies block bovine leukemia virus (BLV) gp51 binding to recombinant BLV receptor BLVRcp1. *J Virol* 71(4): 3263-7.
- Oshima K Onuma M, Sagata N, Okada K, Ogawa Y, Ikawa Y. (1981) Integration of bovine leukemia virus DNA in the genomes of bovine lymphosarcoma cells. *Microbiol Immunol.* 26(9):813-20.
- Parant M (1994) Influence of synthetic adjuvants on nonspecific resistance to infections. *Int J Immunopharmacol* 16(5-6): 445-9.
- Pardoll DM (1993) Cancer vaccines. *Immunol Today* 14(6): 310-6.
- Pasquini S, Xiang Z, Wang Y, He Z, Deng H, Blaszczyk-Thurin M, Ertl HC (1997) Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants. *Immunol Cell Biol* 75(4): 397-401.
- Pearlman DS (1967) The influence of antibodies on immunologic responses. I. The effect on the response to particulate antigen in the rabbit. *J Exp Med* 126(1):127-48.
- Pelzer KD (1997) Economics of bovine leukemia virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13(1): 129-41.
- Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. (1996) Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol.*;70(9):6119-25.
- Peters JH (1975) Preparation of large quantities of pure bovine lymphocytes and a monolayer technique for lymphocyte cultivation. *Methods Cell Biol* 9(0): 1-23.

- Piera M, de Bolos C, Castro R, Real FX (1993) Cytokines as adjuvants: effect on the immunogenicity of NeuAc alpha 2-6GalNAc alpha-O-Ser/Thr (sialyl-Tn). *Int J Cancer* 55(1): 148-52.
- Pierce CW (1969) Immune responses in vitro. II. Suppression of the immune response in vitro by specific antibody. *J Exp Med* 130(2): 365-79.
- Pollari FL, Wangsuphachart VL, DiGiacomo RF, Evermann JF (1992) Effects of bovine leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can J Vet Res* 56(4): 289-95.
- Portetelle D, Bruck C, Mammerickx M, Burny A (1980) In animals infected by bovine leukemia virus (BLV) antibodies to envelope glycoprotein gp51 are directed against the carbohydrate moiety. *Virology* 105(1): 223-33.
- Portetelle D, Couez D, Bruck C, Kettmann R, Mammerickx M, Van der Maaten M, Brasseur R, Burny A (1989) Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH<sub>2</sub> part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology* 169(1): 27-33.
- Portetelle D, Limbach K, Burny A, Mammerickx M, Desmettre P, Riviere M, Zavada J, Paoletti E (1991) Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukaemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vaccine* 9(3): 194-200.
- Portetelle D, Willems L, Kettmann R, Dequiedt F, Voneche V, Cornil I, Kerkhofs P, Burny A, Mammerickx M (1993) In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. *J Virol* 67(7):4078-85
- Prayaga SK, Ford MJ, Haynes JR. (1997) Manipulation of HIV-1 gp120-specific immune responses elicited via gene gun-based DNA immunization. *Vaccine* 15(12-13):1349-52.
- Pyeon D, Splitter GA (1998) Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. *J Virol* 72(8): 6917-21.
- Pyeon D, Splitter GA (1999) Regulation of bovine leukemia virus tax and pol mRNA levels by interleukin-2 and -10. *J Virol* 73(10): 8427-34.
- Raz E, Watanabe A, Baird SM, Eisenberg RA, Parr TB, Lotz M, Kipps TJ, Carson DA (1993) Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(10): 4523-7.

- Raz E, Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA (1996) Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273(5273):352-4
- Reeves R, Spies AG, Nissen MS, Buck CD, Weinberg AD, Barr PJ, Magnuson NS, Magnuson JA (1986) Molecular cloning of a functional bovine interleukin 2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10): 3228-32.
- Reeves R, Elton TS, Nissen MS, Lehn D, Johnson KR (1987) Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(18): 6531-5.
- Reyes RA, Cockerell GL (1996) Unintegrated bovine leukemia virus DNA: association with viral expression and disease. *J Virol* 70(8): 4961-5.
- Rice NR, Stephens RM, Couez D, Deschamps J, Kettmann R, Burny A, Gilden RV (1984) The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus. *Virology* 138(1): 82-93.
- Rovnak J, Boyd AL, Casey JW, Gonda MA, Jensen WA, Cockerell GL(1993) Pathogenicity of molecularly cloned bovine leukemia virus. *J Virol* 67(12): 7096-105.
- Rovnak J, Quackenbush SL, Reyes RA, Baines JD, Parrish CR, Casey JW (1998) Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *J Virol* 72(5): 4237-42.
- Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa (1985) Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(3): 677-81.
- Sargeant JM, Kelton DF, Martin SW, Mann ED (1997) Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Prev Vet Med* 31(3-4): 211-21.
- Shettigara PT, Samagh BS, Lobinowich EM. (1986) Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. *Can J Vet Res.* 50(2):221-6
- Schödel F, Aguado M-T, Lambert P-H (1994) Introduction: Nucleic Acid Vaccines, WHO, Geneva 17-18 May 1994 *Vaccine*12(16):1491-2.

- Schwartz I, Bensaïd A, Polack B, Perrin B, Berthelemy M, Levy D (1994) In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J Virol* 68(7): 4589-96.
- Schwartz I, Levy D (1994) Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res* 25 (6): 521-36.
- Siakkou H, Ulrich R, Uelze A, Mohring R, Rosenthal S (1990) Immunological characterization of BLV proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Acta Virol* 34(3): 256-62.
- Slavikova K, Zajac V, Klobusicka M, Aida Y, Stevurkova V (1993) gp51 of bovine leukemia virus gene expression in hamster cells. *Int J Cancer* 53(4): 640-4.
- Sordillo LM, Hicks CR, Pighetti GM (1994) Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. *Proc Soc Exp Biol Med* 207(3): 268-73.
- Stone DM, Norton LK, Davis WC (1997) Modulation of bovine leukemia virus-associated spontaneous lymphocyte proliferation by monoclonal antibodies to lymphocyte surface molecules. *Clin Immunol Immunopathol* 83(2): 156-64.
- Suzuki T, Ikeda H (1998) The mouse homolog of the bovine leukemia virus receptor is closely related to the delta subunit of adaptor-related protein complex AP-3, not associated with the cell surface. *J Virol* 72(1): 593-9.
- Swain SL, Bradley LM, Duncan DD, Tonkonogy S. (1991) Characterization of antigen-specific CD4+ effector T cells in vivo: immunization results in a transient population of MEL-14-, CD45RB- helper cells that secrete interleukin 2 (IL-2), IL-3, IL-4, and interferon gamma. *J Exp Med.* 1;174(3):547-59
- Tajima S, Ikawa Y, Aida Y (1998) Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J Virol* 72(9): 7569-76.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356(6365): 152-4.
- Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J (1992) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. 1983. *Biotechnology* 24: 304-9.
- Temin HM, Jones JS, Allan RW. (1993) Alteration of location of dimer linkage sequence in retroviral RNA: little effect on replication or homologous recombination. *J Virol.* 67(6):3151-8

- Ozmen L, Aguet M, Trinchieri G, Garotta G. (1995) The in vivo antiviral activity of interleukin-12 is mediated by gamma interferon. *J Virol.*;69(12):8147-50
- Trueblood ES, Brown WC, Palmer GH, Davis WC, Stone DM, McElwain TF (1998) B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. *J Virol* 72(4): 3169-77.
- Twizere JC, Kerkhofs P, Burny A, Portetelle D, Kettmann R, Willems L (2000) Discordance between bovine leukemia virus tax immortalization In vitro and oncogenicity In vivo. *J Virol* 74(21): 9895-902
- Ulmer JB, Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, Perry HC, Friedman A, Martinez D, Donnelly JJ, Liu MA (1993) Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 12(9):777-83
- Ungar-Waron H, Paz R, Brenner J, Yakobson B, Partosh N, Trainin Z (1999) Experimental infection of calves with bovine leukemia virus (BLV): an applicable model of a retroviral infection. *Vet Immunol Immunopathol* 67(2): 195-201
- Valikhov AF, Grinenko NF, Tarasishin LA, Zajac V, Al'tshtein AD. (1984) Comparison of a few methods for detecting antibodies to the bovine leukemia virus *Vopr Virusol.* (3):281-4
- Van Der Maaten MJ, Miller JM, Boothe AD (1974) Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 52(2): 491-7.
- Van Der Maaten MJ, Miller JM (1975) Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl Haematol* (43): 360-2.
- Van Der Maaten MJ, Miller JM, Schmerr MJ. (1981) Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. *Am J Vet Res.* 42(9):1498-500.
- Von Beust BR, Brown WC, Estes DM, Zarlenga DS, McElwain TF, Palmer GH (1999) Development and in vitro characterization of recombinant vaccinia viruses expressing bovine leukemia virus gp51 in combination with bovine IL4 or IL12. *Vaccine* 17(4): 384-95.
- Voneche V, Callebaut I, Kettmann R, Brasseur R, Burny A, Portetelle D (1992) The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *J Biol Chem* 267(21): 15193-7.

- Voneche V, Callebaut I, Lambrecht B, Brasseur R, Burny A, Portetelle D (1993) Enhancement of bovine leukemia virus-induced syncytia formation by di- and tripeptides. *Virology* 192(1): 307-11.
- Wang B, Boyer J, Srikantan V, Coney L, Carrano R, Phan C, Merva M, Dang K, Agadjanian M, Gilbert L, (1993) DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol* 12(9):799-805
- Wang HJ, O'Brien WA, Grovit-Ferbas K, Namazi A, Ovcak-Derzic S, Park J, Yeramian C, Mao SH, Zack JA (1995) Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination *Blood* 86(3):1082-9
- Wang Y, Xiang Z, Pasquini S, Ertl HC. (1997) Immune response to neonatal genetic immunization. *Virology*. 228(2):278-84
- Warren HS, Kinnear BF, Kastelein RL, Lanier LL (1996) Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *J Immunol* 156(9): 3254-9.
- Watanabe A, Raz E, Kohsaka H, Tighe H, Baird SM, Kipps TJ, Carson DA. (1993) Induction of antibodies to a kappa V region by gene immunization. *J Immunol*. 151(5):2871-6.
- Weber AF, Meiske JC, Hooker EC, Haggard DL, Domagala AM, Sorensen DK, Buoen LC (1987) In vitro viral expression as a criterion for development of control procedures for enzootic bovine leukosis. *Am J Vet Res* 48(6): 899-903.
- Werner GH, Jolles P (1996) Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications. *Eur J Biochem* 242(1):1-19.
- Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, Hassett DE (1999) DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine* 17(13-14): 1612-9.
- Willems L, Kettmann R, Chen G, Portetelle D, Burny A, Derse D. (1992) A cyclic AMP-responsive DNA-binding protein (CREB2) is a cellular transactivator of the bovine leukemia virus long terminal repeat. *J Virol*. 66(2):766-72.
- Willems L, Heremans H, Chen G, Portetelle D, Billiau A, Burny A, Kettmann R. (1990) Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. *EMBO J* 9(5):1577-81

- Willems L, Kettmann R, Dequiedt F, Portetelle D, Voneche V, Cornil I, Kerkhofs P, Burny A, Mammerickx M (1993) In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. *J Virol* 67(7):4078-85.
- Willems L, Kerkhofs P, Dequiedt F, Portetelle D, Mammerickx M, Burny A, Kettmann R (1994) Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(24): 11532-6.
- Willems L, Kerkhofs P, Burny A, Mammerickx M, Kettmann R (1995) Lack of LTR and ENV genetic variation during bovine leukemia virus-induced leukemogenesis. *Virology* 206(1): 769-72.
- Xiang Z, Ertl HC (1995) Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2(2): 129-35.
- Xiang Z Pasquini S, , Wang Y, He Z, Deng H, Blaszczyk-Thurin M, Ertl HC.(1997) Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants. *Immunol Cell Biol.* 75(4):397-401.
- Xu L, Sanchez A, Yang Z, Zaki SR, Nabel EG, Nichol ST, Nabel GJ. (1998) Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med.* 4(1):37-42.
- Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z (2000) Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 23(3): 197-208.
- Yoshinaka Y, Katoh I, Copeland TD, Smythers GW, Oroszlan S. (1986) Bovine leukemia virus protease: purification, chemical analysis, and in vitro processing of gag precursor polyproteins *J Virol.* 57(3):826-32
- Zajac V, Slavikova K, Babusikova O (1994) Expression of env gene of bovine leukemia virus in rodent cells. *Arch Virol* 135(1-2): 201-7.
- Zandomeni RO, Carrera-Zandomeni M, Esteban E, Ferrer JF. (1991) The trans-activating C-type retroviruses share a distinct epitope(s) that induces antibodies in certain infected hosts. *J Gen Virol.*72 (9):2113-9.
- Zhang XQ, Yang L, Ho DD, Kuritzkes DR, Chen IS, Ching WT, Chen YM, Schooley RT (1992) Human T lymphotropic virus types I- and II-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity: strain specificity and epitope mapping. *J Infect Dis* 165(5): 805-12.

Zinkernagel RM (1994) Some general aspects of immunity to viruses. *Vaccine*  
12(16): 1493-4

