

CONSTRUCTION ET CARACTERISATION D'UN VIRUS MYXOMATEUX EXPRIMANT UNE PROTEINE DE FUSION SERP2-GFP : A LA POURSUITE DU VIRUS VERT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Anne DELANNAY

Née, le 14 juillet 1972 à BAYONNE (Pyrénées-Atlantiques)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Frédérique MESSUD-PETIT

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

Mme Frédérique MESSUD-PETIT

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mlle Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. **P. BENARD**
Directeurs honoraires..... : MM. **R. FLORIO**
R. LAUTIE
J. FERNEY
G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires..... : MM. **A. BRIZARD**
L. FALIU
C. LABIE
C. PAVAUX
F. LESCURE
A. RICO

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

Mme **BURGAT-SACAZE Viviane**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **CAZIEUX André, (sur nombre)** *Pathologie chirurgicale*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BENARD Patrick**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **GRIESS Daniel**, *Alimentation*
M. **GUEIFI Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEUR CERTIFIE DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES 1^{ère} CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*

MAITRES DE CONFERENCES 2^e CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **HAY Magali**, *Zootecnie*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*
M. **MAREnda Marc**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

A notre président de thèse,

Monsieur le professeur Blancher,
Professeur des Universités
Praticien hospitalier en Immunologie Option Biologique
à l'université Paul Sabatier

qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse,

Madame le Docteur MESSUD-PETIT,
Maître de conférences en Pathologie Infectieuse
à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ainsi que

Mademoiselle le Docteur BOULLIER,
Maître de conférences en Immunologie Générale et Médicale
à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

qui nous ont guidé dans l'élaboration de ce travail.

Qu'elles trouvent ici la marque de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A mes parents, pour n'avoir jamais douté.

A Colette et Maurice, pour leur lutte acharnée contre la mal bouffe à grands coups de poulets 100% fermier.

A mon Doudou, pour avoir gardé son humour malgré mon humeur massacrate.

A mon nouveau petit frère, pour être venu animer nos soirées.

A ma petite grand-mère, à Flora et à Olivier, je dédie cette thèse.

A mon grand frère, qu'il trouve ici une marque de ma reconnaissance.

A la mémoire de mon père, j'espère que cette thèse s'inscrit dans sa lignée.

A Yvette, Aimé et Virgile, chez qui j'ai trouvé la vocation.

Merci à tous ceux qui m'ont aidée et soutenue lors de la réalisation de ce travail : ceux qui hantent quotidiennement les couloirs de l'UMR 960, Brigitte, Josiane, Jacqueline, Robert, Jean-Luc, Frédérique, Stéphane et Sylvie et aussi ceux du haut.

Merci à ceux qui ont collaboré à la rédaction, je veux parler surtout de Pascale pour ses talents d'illustratrice, de Frédéric et de Fabien pour avoir désamorcé des soirées catastrophes.

Merci aux lapins... J'espère qu'Eliot et Flocon couleront une retraite paisible dans leur nouveau logis.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
TABLE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION.....	11
PREMIERE PARTIE.....	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. LE VIRUS MYXOMATEUX : UN POXVIRUS	15
1) CLASSIFICATION	15
2) STRUCTURE ET MORPHOLOGIE DU VIRUS MYXOMATEUX.....	15
3) PATHOGENIE	16
II. LES FACTEURS DE VIRULENCE.....	18
1) PROTEINES VIRALES EXTRACELLULAIRES	18
@Virocepteurs :.....	18
@Viokines :	19
2) PROTEINES VIRALES INTRACELLULAIRES	20
@Viromitigators : inhibiteurs d'apoptose.....	20
@Virostealth : échapper à l'immunosurveillance	22
III. STRUCTURE ET MODE D'ACTION DES SERPINS	23
1) CARACTERISATION ET MODE D'ACTION DES SERPINS.....	23
2) PRESENTATION DES SERPINS VIRALES	27
3) PARTICULARITES DE SERP2	27
DEUXIEME PARTIE.....	31
ETUDE EXPERIMENTALE	31
I. MATERIEL ET METHODES	33
1) CELLULES.....	33
2) PRODUCTION DE VIRUS.....	33
3) TITRAGE DE VIRUS	33
4) CINETIQUE VIRALE SUR CELLULES ALEXIS.....	34
5) MARQUAGE DE L' APOPTOSE DES CELLULES ALEXIS	34
6) RECOMBINAISON VIRALE.....	34
7) CRIBLAGE PURIFICATION ET AMPLIFICATION D'UN VIRUS RECOMBINANT SERP2-GFP	36
8) TEST DE FONCTIONNALITE <i>IN VIVO</i> DU RECOMBINANT	37
9) ADN PLASMIDIQUE.....	37
• Préparation d'ADN par minipreps (petit volume) :	37
• Purification d'ADN sur colonne (grand volume) :	38
• Purification et stérilisation d'ADN plasmidique :.....	38
• Test d'expression transitoire de la GFP plasmidique (transfection):.....	39
• Réaction de polymérisation en chaîne (PCR):	39
• Analyse de l'ADN par électrophorèse :	40

10)	PROTEINES	40
•	Purification de Serp2 :.....	40
•	Dosage des protéines par la technique de Bradford :.....	40
•	Préparation d'anticorps polyclonaux anti-Serp2 :.....	41
•	Séparation des protéines par électrophorèse :.....	41
•	Western Blot :	42
•	Préparation et solubilisation de membranes :	42
•	Préparation de protéines virales marquées ³⁵ S :.....	43
•	Préparation de cytosols :	43
•	Immunoprécipitation des protéines :.....	43
•	Transcription/traduction <i>in vitro</i> :.....	44
•	Interactions protéine/protéine sur membrane :.....	44
•	Interactions protéine/protéine en milieu liquide :	45
II.	RESULTATS ET DISCUSSION	47
1)	CONSTRUCTION D'UN PLASMIDE PORTANT LA PROTEINE DE FUSION SERP2-GFP	47
2)	VERIFICATION DE LA CONSTRUCTION PAR PCR.....	49
3)	VERIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA GFP PAR TRANSFECTION SUR CELLULES RK13	50
4)	VERIFICATION DE LA CONSTRUCTION PAR SEQUENÇAGE.....	51
5)	VIRUS RECOMBINANT	51
6)	EXPRESSION DE LA PROTEINE DE FUSION.....	54
7)	FONCTIONNALITE DE LA PROTEINE DE FUSION	54
a)	Test <i>in vivo</i> de fonctionnalité du recombinant :.....	54
b)	Résultats histologiques :.....	55
8)	UTILISATION DU VIRUS RECOMBINANT T1-[Serp2-GFP]	56
a)	Microscopie confocale :.....	56
b)	Repérage des populations de cellules infectées en cytométrie de flux :.....	57
c)	Comparaison du virus T1-[Serp2-GFP] avec un autre mutant, MV-LAP ⁻ :.....	59
9)	PRODUCTION ET UTILISATION D'ANTICORPS ANTI-SERP2	60
a)	Production d'anticorps anti-Serp2 et vérification de leur efficacité :.....	60
b)	Utilisation des anticorps :.....	61
10)	REPERER LES PROTEINES CIBLES GRACE A SERP2 RADIOMARQUEE	63
a)	Transcription/traduction <i>in vitro</i> de Serp2 radiomarquée, Serp2* :.....	63
b)	Utilisation de Serp2* :.....	63
11)	CINETIQUE COMPARATIVE SUR FIBROBLASTES PRIMAIRES DE LAPINS INFECTES T1 ET T1ΔSerp2	65
12)	MESURE D'APOPTOSE SUR FRIBROBLASTES PRIMAIRES DE LAPINS INFECTES T1, T1ΔSerp2 ET T1[Serp2-GFP]	66
a)	Mesure d'apoptose sur lame :	66
b)	Mesure d'apoptose en milieu liquide :	66
	CONCLUSION.....	67
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	69

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures :

Figure 1 : Représentation schématique de l'ADN du virus myxomateux.	16
Figure 2 : Morphologie d'un poxvirus [52].	16
Figure 3 : Cycle de réplication du virus de la vaccine [47].	17
Figure 4 : Schéma récapitulatif des facteurs de virulence du virus myxomateux.....	23
Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'une serpin.....	25
(exemple de l' α -1 antitrypsine).	25
Figure 6 : Schéma d'interaction entre une serpin et son enzyme cible.....	26
Figure 7 : Déclenchement de la cascade apoptotique [60].....	29
Figure 8 : Schéma explicatif du fonctionnement du cytomètre de flux.	35
Figure 9 : Description du plasmide vecteur pEGFP-F.	47
Figure 10 : Construction d'un plasmide portant la protéine de fusion Serp2-GFP.....	48
Figure 11 : Analyse PCR de l'ADN plasmidique Serp2-GFP.	50
Figure 12 : Séquençage de l'insert L de pSerp2-GFP (amorçe 5'L-Nhe1).	51
Figure 13 : Séquençage de l'insert R de pSerp2-GFP (amorçe 3'R-Pst1).	51
Figure 14 : Obtention du virus recombinant T1-[Serp2-GFP].....	52
Figure 15 : Principe de la purification de la souche T1-[Serp2-GFP].	53
Figure 16 : Test de pureté par PCR.	53
Figure 17 : Gel d'électrophorèse de la protéine Serp2 purifiée.	60
Figure 18 : Immunoprécipitation de protéines en RIPA.	62
Figure 19 : Immunoprécipitation de Serp2 et de ses cibles à partir de cellules RK13.	63
Figure 20 : Principe du biacore.	65

Graphiques :

Graphique 1 : Comparaison de l'intensité de fluorescence des lymphocytes activés/monocytes d'un lapin non infecté et des lymphocytes activés/monocytes d'un lapin infecté par du virus recombinant à J10 post inoculation.....	58
Graphique 2 : Comparaison de l'intensité de fluorescence de lymphocytes activés non infectés et de lymphocytes activés infectés in vitro par du virus recombinant.	58

Photos :

Photo 1 : Lapin à J12 post inoculation par du virus T1-[Serp2-GFP].	54
Photo 2 : Coupes histologiques de myxomes primaires à J8 post inoculation.	56
Photo 3 : Cellules RK13 infectées par du virus T1-[Serp2-GFP] à T36h post infection et observées au microscope confocal.....	57

Tableaux :

Tableau 1 : Classification des poxvirus des vertébrés (Chordopoxvirinae) [43].	15
Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés en PCR (température d'hybridation, durée de l'hybridation).	39
Tableau 3 : Comparaison clinique de l'infection par T1, T1 Δ Serp2 et T1-[Serp2-GFP].	55

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BGMK : baby green monkey kidney, cellules rénales de singe vert

CD : classe de différenciation

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CrmA : cytokine response modifier A

EGF : epidermal growth factor, facteur de croissance épidermique

GFP : green fluorescent protein

ICE : interleukin-1 β -converting enzyme, enzyme de conversion de l'interleukine-1 β

IFN : interféron

IL1 β : interleukine-1 β

kDa : kilo dalton

kpb : kilo paire de bases

ORF : open reading frame, cadre de lecture ouvert

PCR : polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaîne

RIT : répétition inversées terminales

RK : rabbit kidney, cellules rénales de lapin

SVF : sérum de veau fœtal

TNF : tumor necrosis factor, facteur de nécrose tumorale

UFP : unité formant plaque

VEE : virus extracellulaire enveloppé

VIM : virus intracellulaire mature

VM : virus myxomateux

INTRODUCTION

Initialement découverte par SANARELLI en 1896 en URUGUAY, la myxomatose est une maladie spécifique du lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*. Le réservoir originel est le lapin américain, *Sylvilagus*, qui est porteur du virus mais insensible à la maladie. Utilisée comme arme biologique dès 1950 en Australie, la myxomatose provoque une hécatombe parmi les lapins de garenne importés qui, en l'absence de prédateurs, pullulent sur ce continent. C'est en 1952 que le virus est introduit en France et l'année suivante la maladie atteint toute l'Europe. En effet, la transmission horizontale, assurée par des arthropodes vecteurs (puces, tiques, moustiques), permet une propagation très rapide de la myxomatose. Ravageant les lapins de garenne et les élevages cynicoles, cette maladie est aujourd'hui encore un fléau que l'on souhaite éradiquer sur le territoire français et dans la plupart des pays d'Europe.

Après une période d'incubation de 4 à 6 jours, le virus myxomateux induit l'apparition de pseudotumeurs cutanées, appelées myxomes, sur la face, en région anogénitale puis dorsolombaire, aboutissant à la mort par un affaiblissement extrême et des surinfections bactériennes.

Le virus myxomateux, gros virus à ADN enveloppé, appartient à la famille des *Poxviridae*, genre *leporipoxvirus*. Son ADN linéaire double brin comprend des répétitions inversées terminales (RIT) en épingle à cheveux. La portion centrale du génome code pour les protéines essentielles à la réplication et à la transcription. Les portions terminales renferment les gènes de virulence et de spectre d'hôte codant pour les protéines non essentielles. L'étude du pouvoir pathogène du virus myxomateux a montré que ces protéines non essentielles sont destinées à assurer la survie du virus en milieu dysgénésique. Parmi ces protéines figure Serp2, appartenant à la famille des serpins (SERine Proteinase INhibitors), qui est indispensable à la complète virulence du virus myxomateux. L'action de Serp2 consiste à bloquer la réaction inflammatoire et à diminuer l'apoptose des cellules infectées. Cependant, la (ou les) cible(s) cellulaire(s) de Serp2 dans ces mécanismes complexes n'est (ne sont) pas connue(s).

La première partie de ce manuscrit permet de situer Serp2 parmi les facteurs de virulence du virus myxomateux. Puis nous exposons notre étude expérimentale qui consiste à créer de nouveaux outils de recherche en vue d'identifier la (ou les) cible(s) cellulaire(s) de Serp2. Les résultats de ces travaux sont discutés en fonction des cibles potentielles de Serp2.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE VIRUS MYXOMATEUX : UN POXVIRUS

1) CLASSIFICATION

C'est à partir de considérations morphologiques, des espèces animales qu'ils infectent et de l'existence de protection croisée chez l'animal, que s'établit la classification des *Poxviridae* [20]. Cette famille de virus à ADN bicaténaire linéaire, considérés comme les plus gros virus animaux, se subdivise en deux sous-familles selon qu'ils affectent les insectes (*Entomopoxvirinae*), ou bien les vertébrés (*Chordopoxvirinae*). C'est parmi cette deuxième sous-famille que l'on retrouve le genre *leporipoxvirus* auquel appartient le virus myxomateux.

Tableau 1 : Classification des poxvirus des vertébrés (*Chordopoxvirinae*) [43].

Genre	Espèce type	Principales autres espèces
<i>orthopoxvirus</i>	Virus de la vaccine	Mousepox, cowpox, virus de la variole du buffle, rabbitpox, virus de la variole humaine
<i>parapoxvirus</i>	Orf virus	Virus de l'ecthyma contagieux, virus de la stomatite papuleuse, pseudopoxvirus
<i>avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire	Virus de la variole du canari, dindon pigeon et caille
<i>capripoxvirus</i>	Virus de la clavelée	Virus de la variole caprine
<i>leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose	Virus du fibrome de Shope, virus du fibrome du lièvre
<i>suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	
<i>molluscipoxvirus</i>	Virus du molluscum contagiosum	
<i>yatapoxvirus</i>	Tanapoxvirus de l'homme	

2) STRUCTURE ET MORPHOLOGIE DU VIRUS MYXOMATEUX

Les poxvirus sont les plus gros virus à ADN connus. Ils sont de forme grossièrement parallélépipédique et mesurent de 200 à 400nm de long [8].

Le virus myxomateux est un virus possédant un ADN bicaténaire unique de 160 à 163 kpb (figure 1). Les deux brins à leurs extrémités sont reliés par des liaisons covalentes donnant un aspect en épingle à cheveux [52]. Le génome est linéaire et l'on y distingue différentes zones :

- La zone centrale fortement conservée dans le genre ; elle correspond aux gènes essentiels pour le cycle viral.
- Les régions terminales constituées de RIT, ou Répétitions Inversées Terminales (les RIT droite et gauche sont identiques mais inversées l'une par rapport à l'autre), qui contiennent 9 gènes chez le virus myxomateux. Ces gènes sont numérotés de T1 à T9 en fonction de la position de leur séquence codante (séquence ORF) par rapport à la boucle terminale. Ces gènes codent pour les facteurs de virulence.

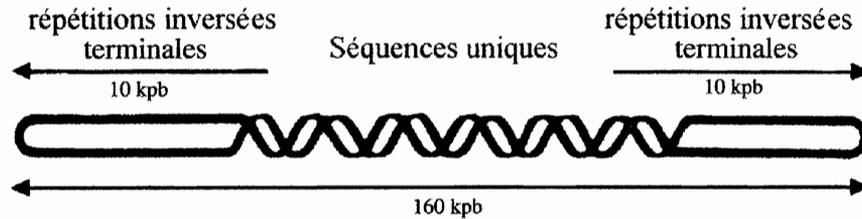


Figure 1 : Représentation schématique de l'ADN du virus myxomateux.

Le génome est abrité dans une structure protéique centrale biconcave appelée le core (figure 2) [43]. Une membrane composée de phospholipides et de protéines entoure le core [47]. La composition de cette membrane diffère de celle de la cellule. La face externe de la membrane virale est tapissée d'éléments tubulaires arrangés de façon aléatoire et possède au moins six protéines de surface exposées aux anticorps [8].

Pour le virus de la vaccine, deux formes virales infectieuses coexistent. Il s'agit des VIM (virions intracellulaires matures), et des VEE (virions extracellulaires enveloppés). La forme VEE possède une enveloppe supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi [56]. Elle est minoritaire (environ 1%, mais ce pourcentage dépend du type cellulaire) et semble impliquée dans la dissémination à longue distance du virus [57].

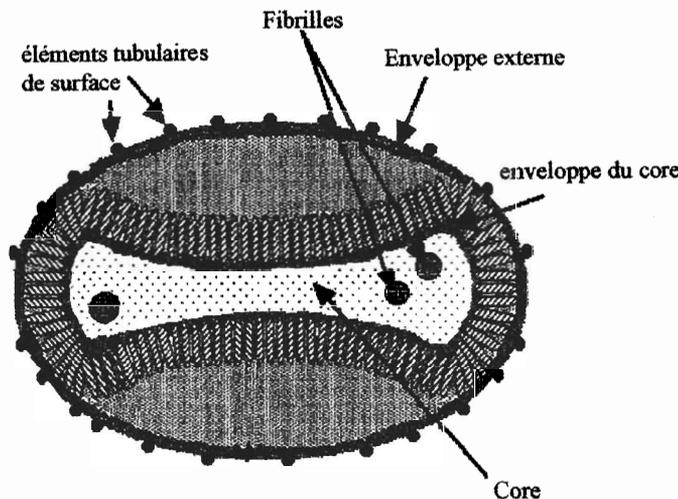


Figure 2 : Morphologie d'un poxvirus [52].

3) PATHOGENIE

Le cycle de réplication du virus myxomateux, strictement cytoplasmique, est semblable à celui des poxvirus en général [47 bis]. L'exemple type est celui du virus de la vaccine pour lequel on distingue classiquement cinq étapes (figure 3) :

- Entrée du virus dans la cellule : il y a adsorption, puis pénétration du virus dans la cellule. Pour l'adsorption du virus de la vaccine, deux types de récepteurs ont été identifiés [28,29]. Pour le virus myxomateux, il semble que les récepteurs, impliqués dans l'adsorption, appartiennent à la famille des récepteurs aux chimiokines [45]. Le mécanisme de virocytose est peu connu.

Endocytose [13] et fusion membranaire [11] semblent coexister, mais on ne connaît pas l'importance relative de chacun de ces deux modes de pénétration. Cette phase peut durer de trente minutes à quatre heures et le déshabillage de l'ADN aboutit à sa libération dans le cytoplasme de la cellule hôte.

- Transcription des gènes viraux précoces : grâce à un système complet de transcription présent dans le virion (dont une ARN polymérase ADN-dépendante), il y a transcription de gènes précoces moins d'une heure après la pénétration totale du virus dans la cellule [47 bis]. Les premières protéines synthétisées sont des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN viral, notamment l'ADN polymérase, et certains facteurs de virulence.
- Réplication du génome : c'est la phase d'éclipse car le virus n'existe plus en tant qu'entité. Elle dure entre deux et douze heures et est permise grâce à l'ADN polymérase et aux enzymes précoces [47 bis]. La réplication se déroule dans des sites précis du cytoplasme que l'on appelle virosomes.
- Transcription des gènes intermédiaires et tardifs : il s'agit de la synthèse des différents constituants du futur virion et d'autres facteurs de virulence [4]. Au cours de cette phase, il y a synthèse des protéines indispensables à la transcription des gènes précoces qui sont présentes dans le virion.
- Maturation des virions : il y a assemblage des constituants des virions, au niveau des virosomes, puis bourgeonnement à la surface de la cellule. Cette phase dure entre quatre et vingt heures et aboutit à la lyse de la cellule.

Le cycle de réplication est très productif. En effet, une particule virale de vaccine donne deux à trois mille virions au cours d'un seul cycle, ce qui permet une dissémination importante du virus.

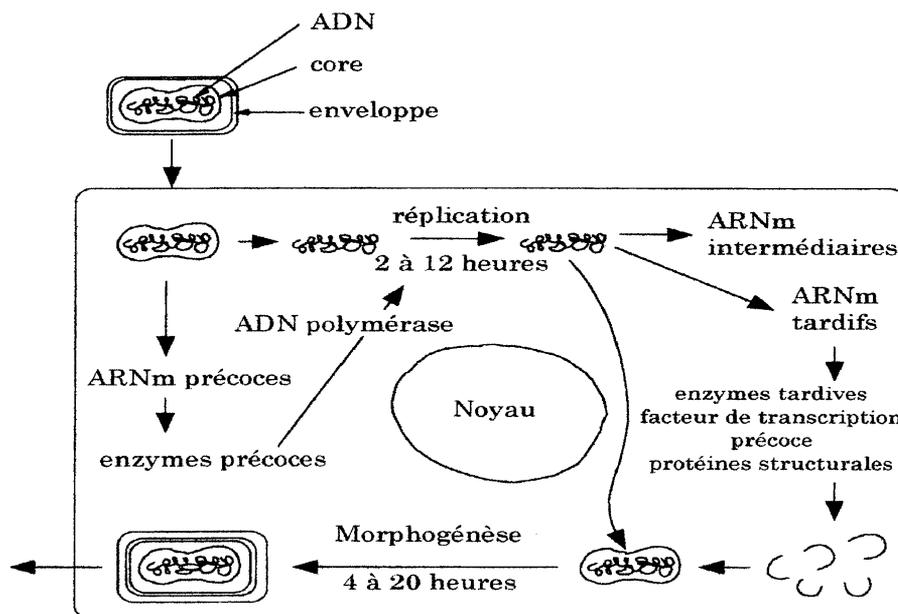


Figure 3 : Cycle de réplication du virus de la vaccine [47].

II. LES FACTEURS DE VIRULENCE

Afin d'assurer leur pérennité les virus ont développé de nombreuses stratégies. En ce qui concerne les poxvirus ces stratégies peuvent être divisées en deux grandes catégories (figure 4) [60] :

- Production de protéines virales extracellulaires pour bloquer les signaux nécessaires à l'élimination du virus et créer ainsi un environnement local favorable au virus :
 - les virocepteurs miment les récepteurs à cytokines de l'hôte.
 - les virokines miment les cytokines.
- Production de protéines intracellulaires chargées de retarder les réponses cellulaires antivirales telles que l'apoptose et d'empêcher la cellule infectée de communiquer avec les cellules du système immunitaire (modification des molécules de surface).

La mutation d'un de ces facteurs entraîne, le plus souvent, une importante modification du pouvoir pathogène avec une survie plus élevée des animaux infectés.

1) PROTEINES VIRALES EXTRACELLULAIRES

@Virocepteurs :

Les virocepteurs sont des protéines virales sécrétées ou transmembranaires qui miment les récepteurs à cytokines de l'hôte.

*M-T2 : Le facteur de nécrose tumorale (ou TNF) est une cytokine impliquée dans les activités cellulaires antivirales : cytolysse des cellules infectées, induction de l'apoptose, inhibition de la réplication virale. Le TNF existe sous deux formes, α et β , qui ont des récepteurs de surface distincts, TNFR1 et TNFR2, mais dont les activités biologiques sont très proches.

Grâce au séquençage des RIT du génome du virus du fibrome de Shope, le gène T2, codant pour le premier virocepteur connu, a été identifié [77]. La protéine soluble produite révèle une forte homologie avec la partie extracellulaire des TNFR2 [68]. Les récepteurs au TNF β sont caractérisés par la présence de domaines N-terminaux riches en cystéines (ou CRD) qui interagissent avec le ligand. Cette séquence se retrouve sur la protéine T2 et permet de la rattacher à la famille des récepteurs au TNF β [69]. Des mutations dans cette région se traduisent par une incapacité de T2 à fixer le TNF [64].

Par la suite, un gène correspondant à T2 a été identifié sur le génome de certains orthopoxvirus (virus de la vaccine [27], virus du cowpox [30], virus de la variole [65]) et sur le génome d'un autre *leporipoxvirus*, le virus myxomateux [80]. L'homologie entre les protéines présentes sur ces différents virus n'est pas de 100% car il y a une grande adaptation des récepteurs solubles au TNF de l'espèce infectée. Par exemple la protéine M-T2, produite par le virus myxomateux, fixe le TNF α et le TNF β de lapin mais pas le TNF murin ou humain.

La protéine M-T2 est sécrétée sous forme de dimère ou de monomère, la forme dimérique semblant plus apte à inhiber la cytolysse TNF-dépendante [63].

Le rôle pathogène de la protéine M-T2 est indéniable puisqu'une inoculation de virus mutant T2⁻ à des lapins permet la survie des deux tiers d'entre eux contre 100% de mortalité avec la souche sauvage.

*M-T1 : La sous famille des CC-chimiokines, petites cytokines pro-inflammatoires, est spécialement importante dans l'activation et la mobilisation des monocytes et des macrophages vers les sites d'infection virale [1,39]. La protéine M-T1 appartient à la famille de protéines poxvirales des T1/35kDa inhibiteurs solubles de CC-chimiokines [25]. M-T1 est sécrétée, dans le milieu de culture de cellules infectées par du virus myxomateux, dès 2 à 4 heures post-infection et cette sécrétion persiste jusqu'en phase tardive. M-T1 est une glycoprotéine inhibitrice qui fixe les CC-chimiokines, avec une forte affinité, et empêche leur fixation sur les récepteurs cellulaires [34]. Des études *in vitro* montrent une forte affinité de M-T1 pour de nombreuses CC-chimiokines (telles que MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein) quelle que soit leur origine [34]. Cependant il n'y a pas de correspondance structurale entre M-T1 et les récepteurs physiologiques à chimiokines [70]. On ne constate pas non plus, *in vivo*, de différence entre le taux de survie de lapins infectés par le virus myxomateux sauvage et celui de lapins infectés par un virus mutant n'exprimant plus M-T1. Mais le schéma pathologique de ces deux infections est différent : on observe, avec le mutant, un afflux de cellules monocytaires et macrophagiques au site d'inoculation [35], absentes lors d'infection avec le virus sauvage.

*M-T7 : L'interféron- γ (IFN- γ) est une cytokine sécrétée par les lymphocytes. La fixation de l'IFN- γ à son récepteur entraîne l'activation de la voie JAK/STAT qui aboutit à l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'état antiviral de la cellule. Protéine majeure de 37kDa, M-T7 possède un domaine ayant une forte analogie avec le domaine de fixation du ligand des récepteurs à IFN- γ [81]. En effet, il a été prouvé que M-T7 se fixe, avec une forte affinité, à l'IFN- γ de lapin ce qui a pour effet d'abolir toutes les activités antivirales de ce dernier [81]. M-T7 est sécrétée, dans le milieu de culture de cellules infectées par le virus myxomateux, dès la phase précoce et persiste dans le surnageant longtemps après l'infection. Comme pour M-T2, la spécificité est stricte puisque M-T7 ne fixe que l'IFN- γ de lapin et non celui d'origine murine ou humaine [48]. L'inoculation d'un virus mutant M-T7 à des lapins aboutit à la guérison alors que le taux de mortalité est de 100% avec le virus sauvage. M-T7 est un facteur de virulence majeur du virus myxomateux [49]. L'analyse histologique du derme au point d'inoculation, montre qu'en l'absence de M-T7 l'afflux des leucocytes est beaucoup plus important [49]. Cet afflux leucocytaire est permis par des chimiokines qui créent un gradient d'attraction. En effet, les chimiokines possèdent un domaine C-terminal de fixation de l'héparine ou des glycosaminoglycannes, qui interagit avec la matrice extracellulaire pour créer un gradient d'attraction des leucocytes. Cela suggère la fixation par M-T7 de certaines chimiokines. Des expériences *in vitro* confirment cette hypothèse [33]. M-T7 peut interagir avec le domaine C-terminal de plusieurs sous familles de chimiokines : CXC (IL8), CC (RANTES), C (lymphotactine). La fixation par M-T7 ne semble pas spécifique : M-T7 fixe aussi bien les chimiokines de lapin que celles d'origine murine ou humaine [33]. Il n'y a pas d'analogie structurale entre M-T7 et les récepteurs à chimiokines. Il semble donc que M-T7 a une double fonction : homologue du récepteur à l'interféron- γ et inhibiteur de chimiokines. Cependant, le rôle de M-T7 comme inhibiteur de chimiokines nécessite d'être confirmé.

@Virokines :

Les virokines sont des protéines virales qui miment les cytokines et en empêchent les effets en se fixant sur les récepteurs cellulaires.

*MGF : L'EGF (Epidermal Growth Factor) est une cytokine qui, après fixation sur un récepteur (erbB), régule la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales [9,36]. Les structures secondaires et tertiaires de l'EGF reposent sur la présence de six résidus

cystéine permettant, par la formation de ponts disulfures, un repliement caractéristique de la protéine. Ce motif est totalement conservé chez les homologues poxviraux de l'EGF : SFGF (Shope Fibroma Growth Factor) [12], VGF (Vaccinia Growth Factor) [7], VAGF (Variola Growth Factor) et MGF (Myxoma Growth Factor) [78]. Le gène codant pour MGF est situé à l'extrémité gauche du génome et il n'est représenté qu'en un seul exemplaire. MGF est sécrété dès la phase précoce de l'infection. L'inoculation d'un virus mutant MGF⁻ à des lapins provoque l'apparition des signes cliniques classiques mais atténués. L'histologie montre que le virus mutant provoque une prolifération des cellules épithéliales beaucoup moins importante que celle obtenue après infection par du virus sauvage [55]. On note aussi une réduction des surinfections de l'appareil respiratoire par les bactéries Gram⁻. D'autre part, la pleine virulence du virus est restaurée lors du remplacement de MGF par SFGF ou VGF. Des souris transgéniques, exprimant MGF, développent une prolifération et une arborisation des acini mammaires et une hyperplasie de l'épithélium gastrique [72]. MGF possède la même fonction biologique que EGF : il stimule la prolifération et la différenciation des épithéliums. MGF se fixe sur les récepteurs erbB avec une moins forte affinité que EGF, mais MGF ne déclenche aucun rétrocontrôle ce qui entraîne un signal de prolifération plus puissant [76]. Par la stimulation des biosynthèses des cellules réceptives, infectées ou non, MGF semble créer un environnement favorable à la réplication virale.

*SERP1 : Les serpins (SERin Proteinase INhibitors) sont un groupe de protéines qui régulent de nombreux processus complexes protéase dépendants : renouvellement de la matrice extracellulaire, modulation de la réponse inflammatoire, fibrinolyse, activation du complément et coagulation sanguine. SERP1, glycoprotéine sécrétée par le virus myxomateux, appartient à la famille des serpins [40]. Elle est considérée comme une virokinine car elle modifie la communication intercellulaire. Le taux de survie de lapins inoculés par un virus mutant SERP1⁻ est beaucoup plus élevé et les surinfections bactériennes respiratoires sont moins nombreuses que lors d'infection par un virus sauvage [79]. SERP1 possède une activité anti-inflammatoire très marquée. En effet, l'étude histopathologique met en évidence une réaction inflammatoire plus efficace et plus rapide lors d'une infection par un virus mutant SERP1⁻. Des études *in vitro* montrent que SERP-1 forme un complexe stable avec plusieurs protéases : l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), l'activateur du plasminogène de type tissulaire (tPA), la plasmine, la thrombine et le facteur Xa [38,53]. Cependant, les cibles réelles de SERP1, *in vivo*, ne sont toujours pas connues.

Molécules initialement destinées au maintien de l'homéostasie de la cellule eucaryote, les serpins ont trouvé chez les poxvirus une nouvelle fonction, celle de participer activement à la création d'un environnement favorable à la multiplication virale.

2) PROTEINES VIRALES INTRACELLULAIRES

@Viromitigators : inhibiteurs d'apoptose

En plus des stratégies virales consistant à lutter contre la réponse immune, il existe des mécanismes permettant de contrôler la capacité de la cellule infectée à entrer en apoptose ou mort cellulaire programmée. En effet cette possibilité pourrait, si elle intervenait avant la maturation des virions, enrayer la propagation de l'infection. Or, chez le virus myxomateux on dénombre cinq protéines capables d'inhiber l'apoptose, notamment la voie Fas/TNF. Il s'agit de Serp2, M11L, M-T2, M-T5 et M-T4.

*Serp2: Le déclenchement de l'apoptose met en jeu une succession de phénomènes complexes où les caspases jouent un rôle central [73]. Les poxvirus ont développé des

stratégies leur permettant de bloquer cette cascade de réactions [44]. Chez le virus du cowpox, un gène codant pour une serpin de 38kDa, CrmA (cytokine response modifier A) a été identifié [59]. CrmA empêche la maturation de la pro-interleukine-1 β inhibant l'enzyme de conversion caspase1 ou ICE (Interleukin1 β Converting Enzyme) [62]. Deux autres protéases intervenant dans le déclenchement de l'apoptose, la caspase 8 (FLICE) [71] et le Granzyme B [61], sont aussi inhibées par CrmA. Chez le virus myxomateux, le gène *serp2* code pour une protéine de 333 acides aminés, ayant une forte homologie avec CrmA. Serp2, deuxième serpin identifiée chez le virus myxomateux, est exprimée en phase précoce de l'infection ainsi qu'en phase tardive. Serp2 est détectée sous forme de monomère ou de dimère et reste strictement intracellulaire tout au long du cycle viral. Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence la capacité de Serp2 à inhiber l'activité de la caspase1 [58] mais cette capacité inhibitrice est beaucoup moins efficace que celle de CrmA [75] sur l'ICE d'origine humaine. Cependant, la médiocre inhibition de l'ICE humaine par Serp2 n'est peut-être due qu'à la stricte spécificité du virus myxomateux. L'étude de la maladie provoquée, chez des lapins, par le mutant Serp2⁻ révèle une forme beaucoup moins virulente avec un taux de survie bien plus élevé [46]. L'analyse histologique des lésions montre que la réponse inflammatoire n'est plus bloquée en phase vasculaire, contrairement à ce qu'on observe lorsque Serp2 est exprimée ; ceci est compatible avec la théorie de l'inhibition de la caspase 1 par Serp2 [58]. De plus, un taux élevé d'apoptose des lymphocytes est constaté dans les nœuds lymphatiques drainant le site d'inoculation du virus mutant, confirmant le rôle anti-apoptotique de Serp2 *in vivo*.

*M11L : Le gène *M11L* du virus myxomateux code pour une protéine de 15kDa exprimée en phase précoce du cycle viral [24]. M11L possède une hélice transmembranaire du côté carboxy-terminal et un domaine extracellulaire du côté amino-terminal. Les virus mutants n'exprimant plus la portion C-terminale de M11L ont un pouvoir pathogène réduit [55] et la guérison complète survient, en moyenne, dans les 30 jours. L'analyse histologique des myxomes montre qu'ils sont davantage infiltrés par des macrophages et des cellules polynucléées. La réaction inflammatoire est donc amplifiée par rapport à une infection par la souche sauvage, ce qui suggère un rôle anti-inflammatoire pour M11L, sans qu'une cible potentielle ne puisse être proposée. *In vitro*, l'apoptose de lymphocytes T de lignée RL5 survient dans les heures qui suivent une infection par un virus M11L⁻ [41] ; M11L semble donc impliquée dans la prévention de l'apoptose mais les mécanismes ne sont pas encore connus.

*M-T2 : Déjà identifiée en tant qu'homologue du récepteur au TNF, M-T2 est aussi impliquée dans l'inhibition de l'apoptose de certaines cellules. En effet, l'infection *in vitro* de lymphocytes T de la lignée RL5, par le virus mutant M-T2⁻, induit l'apoptose des cellules, contrairement à une infection par le virus sauvage [5]. Le mutant M-T2⁻ est donc incapable de se répliquer efficacement dans ces cellules. Cette fonction anti-apoptotique est indépendante de la fixation extracellulaire du TNF par M-T2 puisqu'elle persiste lors de l'ajout de M-T2 exogène au milieu de culture. M-T2 possède donc au moins deux rôles distincts : fixation extracellulaire du TNF, et action anti-apoptotique vraisemblablement intracellulaire [64].

*M-T5 : La protéine M-T5 possède des motifs ankyrines répétés. Ces motifs sont constitués d'environ 30 acides aminés impliqués dans les interactions entre macromolécules et dans le repliement de la protéine. Cependant la présence de ces motifs ne permet pas de conclure à une fonction précise de M-T5. L'absence de domaines hydrophobes sur la séquence indique que M-T5 est probablement intracytoplasmique [50]. L'étude du virus M-T5⁻ sur culture de cellules RL5 a montré un arrêt rapide de toutes les synthèses protéiques (cellulaires et virales) aboutissant à la mort cellulaire par apoptose [50]. Par contre, le virus

mutant M-T5⁻ n'induit pas l'apoptose des fibroblastes de lapins. La protéine M-T5 semble impliquée dans la spécificité cellulaire du virus myxomateux. L'inoculation du virus mutant M-T5⁻ à des lapins provoque une maladie très atténuée avec un taux de survie de 100%. L'infection par le virus mutant se limite à l'apparition de myxomes primaires dont l'analyse histologique révèle qu'ils sont très peu oedémateux et non hémorragiques. Il n'y a pas de myxomes secondaires ni de surinfections bactériennes de la sphère respiratoire [50]. M-T5 est donc un facteur de virulence très important du virus myxomateux et détermine les types cellulaires cibles ; cependant les mécanismes d'action ne sont pas élucidés.

*M-T4 : La protéine M-T4, synthétisée par le virus myxomateux, est localisée dans le réticulum endoplasmique. En effet, M-T4 possède une séquence C-terminale particulière, RDEL, qui retient la protéine dans le réticulum [3]. M-T4 n'a pas d'homologue cellulaire connu. L'infection de lymphocytes de lapins (RL5 ou lymphocytes périphériques) par un virus mutant M-T4⁻ déclenche une apoptose rapide de ces cellules. M-T4 est la seule protéine virale, située dans le réticulum, qui a pour rôle d'empêcher les lymphocytes d'entrer en apoptose [3]. L'inoculation du mutant M-T4⁻ à des lapins provoque une maladie très atténuée avec 100% de guérison. M-T4 est un facteur de virulence majeur du virus myxomateux dont le mode d'action est inconnu.

@Virostealth : échapper à l'immunosurveillance

Les lapins infectés par le virus myxomateux sauvage succombent, le plus souvent, à des surinfections secondaires respiratoires à bactéries Gram⁻. Les sujets sont fortement immunodéprimés. Cette immunodépression proviendrait d'une modification du nombre des molécules de surface présentatrices d'antigènes. La diminution des molécules du CMH1 (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 1) permettrait d'abaisser la capacité de présentation des antigènes viraux et donc l'efficacité de la réponse à médiation cellulaire. Des expériences *in vitro* sur des cellules de singe (lignée BGMK) ont montré une baisse significative de l'expression des marqueurs membranaires CMH1 [5]. Alors que mon travail de thèse au laboratoire était terminé, un facteur impliqué dans la dérégulation des molécules du CMH1 a été identifié au laboratoire (voir résultats et discussion). Il s'agit du gène MV-LAP (GUERIN et al, manuscrit en préparation).

L'infection par le virus myxomateux de lymphocytes CD4⁺ de lapins (lignée RL5) est suivie d'une chute rapide du nombre des molécules CD4 à la surface des cellules [2]. Ce phénomène n'est pas la conséquence d'une baisse généralisée des synthèses protéiques, car les autres types de molécules de surface ne sont pas affectés. Les CD4 sont la cible des vésicules lysosomiales qui les internalisent avant de les dégrader. Mais les mécanismes de ces phénomènes restent à élucider.

Récemment, le séquençage de la RIT droite du génome du virus myxomateux, a permis d'identifier une séquence ORF de 801pb [26]. Cette séquence, située entre les gènes *serp1* et *serp2*, code pour une protéine de 30kDa qui appartient à la famille des serpins. Appelée Serp3, cette serpin est atypique car elle présente des délétions importantes mais conserve, cependant, un grand polymorphisme compatible avec une activité inhibitrice potentielle. Des lapins infectés par un virus mutant Serp3⁻ ont un taux de survie de 40% au lieu de 0% lors d'infection par le type sauvage. Sur le plan histologique, il n'y a pas de différence notable au niveau de l'apoptose des cellules infectées par le type sauvage ou par le mutant Serp3⁻ mais on remarque l'absence totale de myxomes secondaires au sein des nœuds lymphatiques drainant la lésion primaire des lapins infectés par le mutant Serp3⁻. Serp3 est un nouveau facteur de virulence du virus myxomateux dont le rôle est encore inconnu.

l'angiotensine), ne servent que de substrats protéiques et n'ont pas d'effet inhibiteur de protéinase à sérine.

Cependant, tous les membres de la famille des serpins possèdent des structures secondaires et des séquences protéiques communes : deux feuillets β (appelés A et C) et un segment d'une vingtaine d'acides aminés représentant le site actif proche de la région C-terminale [18] (figure 5). L'identité de séquence entre deux serpins se situe aux alentours de 30% si l'on considère l'intégralité de la protéine. La spécificité d'une serpin donnée, pour une protéinase particulière, est associée au résidu P1 (nomenclature de SCHECHTER & BEYER, 1967). Une mutation de P1, ou d'un résidu à proximité, provoque une diminution de l'activité inhibitrice ou une modification de la spécificité [82]. La plupart du temps le résidu P'1 est une sérine. Le site de clivage est situé entre les résidus P1 et P'1. L'interaction entre la serpin et son enzyme cible entraîne un changement conformationnel de la serpin dans lequel le résidu P14 joue un rôle crucial. P14 est toujours un acide aminé non chargé de petite taille chez les serpins inhibitrices. La formation d'un complexe stable enzyme-serpin est la phase inhibitrice car l'évolution de ce complexe est lente (de quelques heures à quelques jours). Cette phase aboutit à la libération de l'enzyme active et de la serpin clivée.

Différentes études, dont la cristallographie, ont permis de montrer que l'activité des serpins est directement liée à leur grand polymorphisme et à la variabilité de leur stabilité thermodynamique. Elles sont capables de subir un repliement spatial spécifique qui induit un changement majeur de conformation [18]. Ce mécanisme d'action particulier les distingue des inhibiteurs classiques pour lesquels on observe une conformation rigide [19].

- **Forme clivée :** L' α -1 antitrypsine, après interaction avec la chymotrypsine, est clivée entre les résidus P1 et P'1 [10,84]. Chaque brin, issu du clivage, est inséré dans un feuillet β : le brin situé du côté du C-terminal dans le feuillet C et celui du côté N-terminal dans le feuillet A. De ce fait, la serpin apparaît sous une forme inactive et très stable. De plus le passage à la forme clivée est irréversible. Ce changement de conformation a été, par la suite, mis en évidence pour d'autres serpins comme l' α -1-antichymotrypsine [23].
- **Forme latente :** Certaines serpins sont d'abord synthétisées sous forme inactive que l'on appelle latente, qui nécessite une réaction d'activation comme par exemple, pour la PAI 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) protéine diminuant la dissolution du clou plaquettaire par la plasmine. D'autres peuvent se retrouver sous forme latente lors de passage en conditions dénaturantes, c'est le cas de l'antithrombine III et l' α -1 antitrypsine [51]. L'état latent n'est pas actif mais est réversible. Il se situe entre la forme native (cf. infra) et la forme clivée du point de vue de la stabilité thermodynamique. La boucle du site réactif est intacte mais elle est insérée entre les feuillets β , grâce à sa grande flexibilité, ce qui l'empêche d'interagir avec sa cible.
- **Forme native/active :** Les serpins sont directement synthétisées sous leur forme active avec un site actif P1-P14 prêt à fonctionner exposé au solvant. Diverses études ont été menées pour éclairer la structure et le mécanisme de ce segment [19,84]. On remarque que pour l'ovalbumine, serpin inactive, le segment P1-P14 est hors du feuillet A. Il semble que l'insertion d'un petit nombre d'acides aminés du segment P1-P14 soit intimement liée à la conformation active de la serpin [22,84]. Mais on ne sait pas, encore aujourd'hui, à quel moment intervient l'insertion partielle du site actif dans le feuillet A [23,84]. Est-elle une condition préalable à la fixation et à l'inhibition de la protéinase ? Ou bien, est-ce une modification induite par l'interaction serpin-protéinase ? Cette deuxième hypothèse est soutenue par le fait que l'insertion partielle

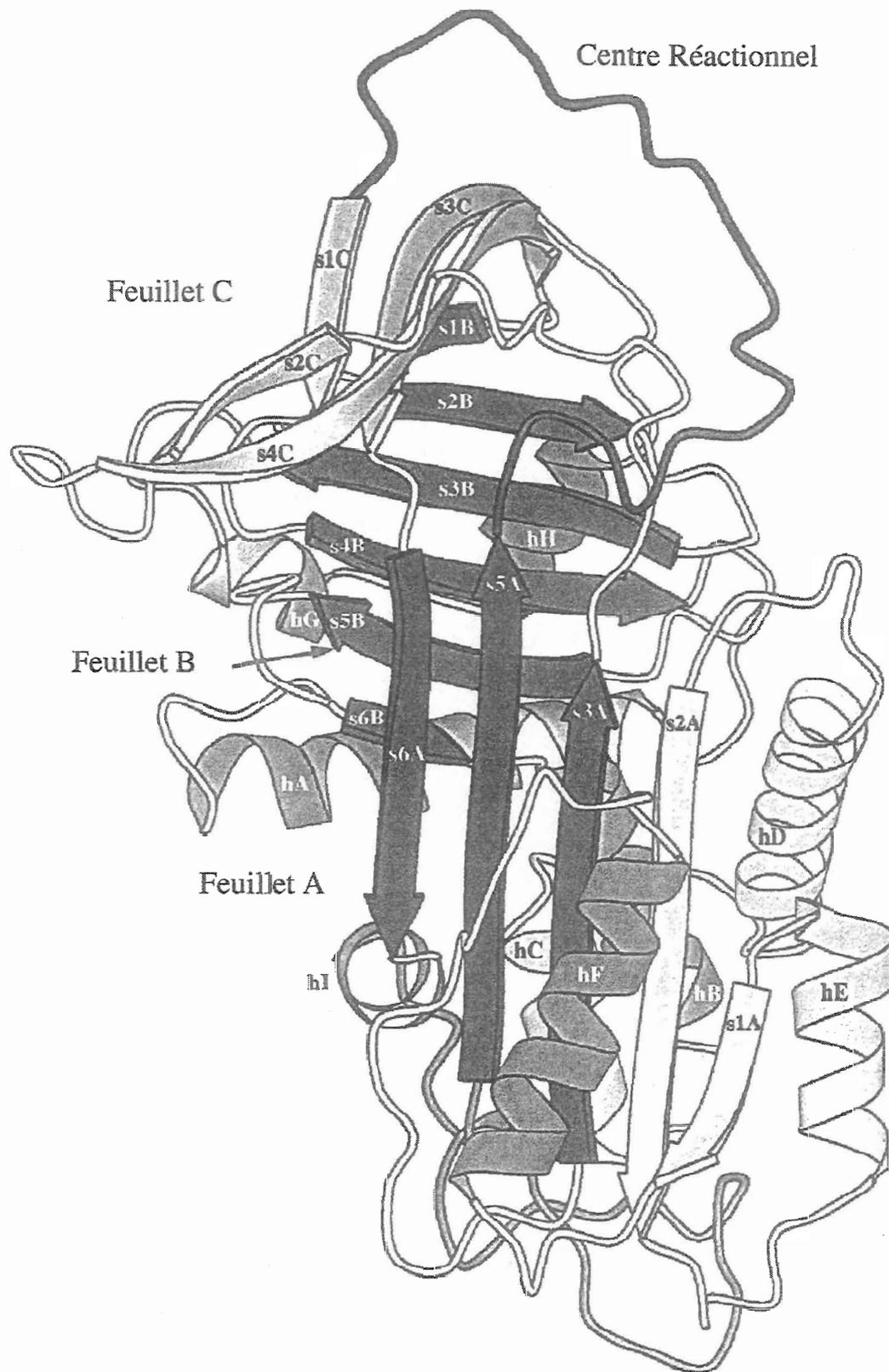


Figure 5 : Représentation schématique de la structure d'une serpin (exemple de l' α -1 antitrypsine).

du segment P1-P14 n'est pas spontanée mais nécessite une certaine énergie d'activation permettant d'ouvrir le feuillet A [84].

- **Forme complexée :** Lorsque la serpin interagit avec sa protéinase cible, elle forme un complexe intermédiaire non covalent et réversible (figure 6) qui ensuite évolue lentement soit vers le clivage de la serpin, soit vers un complexe stable (avec inhibition de la serpin) et apparition de liaisons covalentes, mais le passage vers cette stabilité reste encore obscur [23].

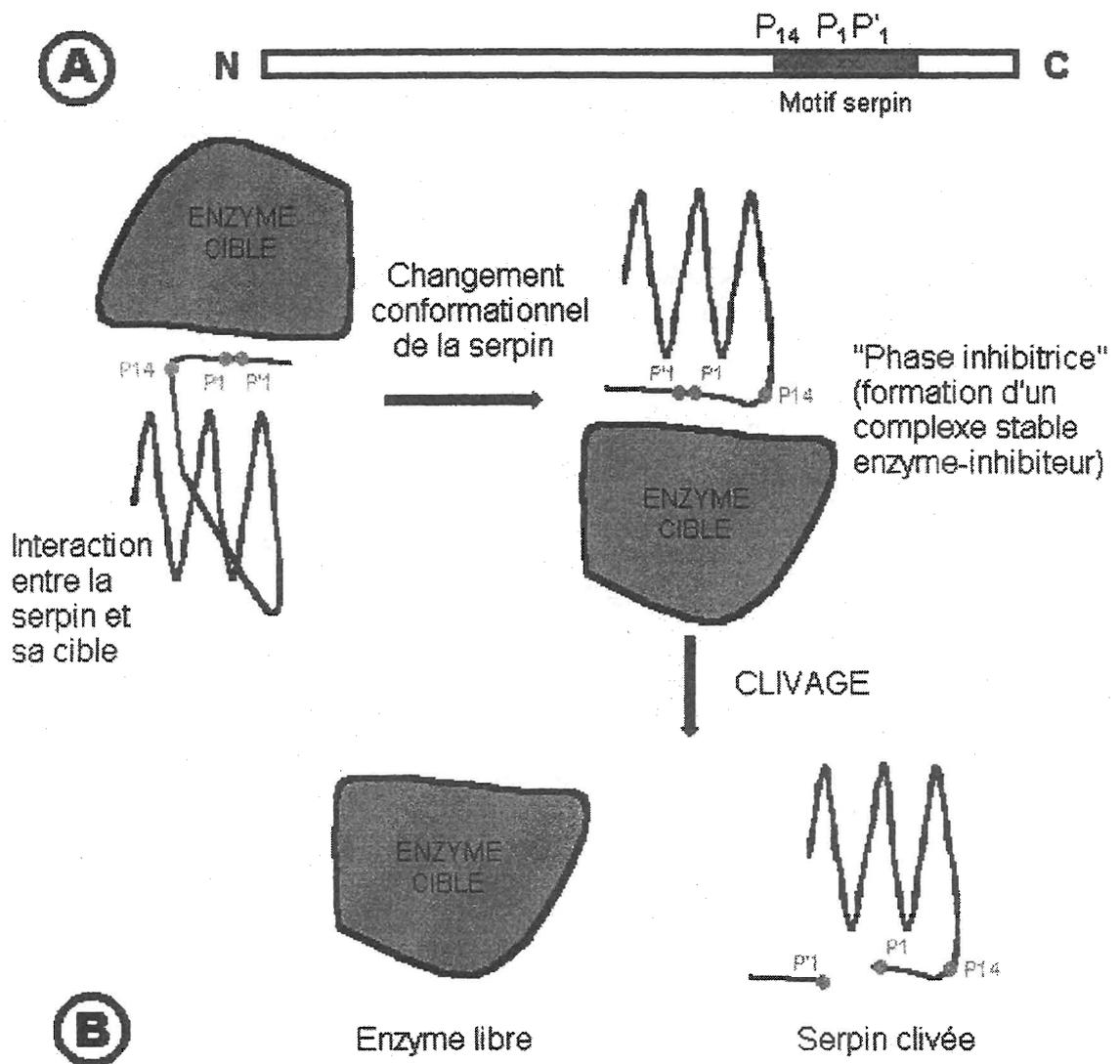


Figure 6 : Schéma d'interaction entre une serpin et son enzyme cible.

A) Représentation schématique d'une serpin : le site de clivage de la serpin est situé près de l'extrémité C-terminale de la protéine. Le clivage a lieu entre les résidus P1 et P'1.

B) Interaction de la serpin avec sa cible : l'interaction entre la serpin et son enzyme cible entraîne un changement conformationnel de la serpin, processus dans lequel le résidu P14 joue un rôle crucial. Après formation d'un complexe inhibiteur, la serpin est clivée ce qui entraîne la perte totale de sa capacité inhibitrice.

Les diverses formes structurales des serpins sont à l'origine de leur possibilité ou non d'interagir avec leur enzyme cible. Etant donné la diversité des mécanismes dans lesquels les serpins interviennent, il n'est pas étonnant de trouver des représentants de cette famille parmi les facteurs de virulence de certains virus.

2) PRESENTATION DES SERPINS VIRALES

Les poxvirus sont les seuls virus chez qui des serpins ont été identifiées. Trois serpins sont connues chez les *orthopoxvirus*, il s'agit de SPI1, SPI2, SPI3.

SPI1 semble impliquée dans les mécanismes de spécificité d'hôte et est capable de bloquer l'apoptose de certaines cellules infectées [6]. Cependant, la délétion de SPI1 sur le génome du virus de la vaccine, n'entraîne pas de modification notable du pouvoir pathogène du virus [31].

SPI2 (appelée CrmA chez le cowpoxvirus) inhibe l'enzyme de conversion (caspase1 ou ICE) de la pro-interleukine-1 β , inactive, en interleukine-1 β (IL-1 β), active [62]. C'est un exemple d'inhibition cross-class [32] puisque la caspase1 est une protéinase à cystéine et non une protéinase à serine (cible habituelle des serpins). Les avantages de l'inhibition de la caspase1 par cette serpin virale sont nombreux car IL-1 β est une cytokine impliquée dans de multiples fonctions biologiques : activation des lymphocytes B, production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, induction de la fièvre et de la production d'autres cytokines par diverses cellules. Des études ont montré que CrmA pouvait empêcher l'apoptose médiée par la caspase 1 en culture cellulaire [44]. D'autre part, le granzyme B, protéase à sérine est également la cible de CrmA [61]. Le granzyme B est présent dans les granules des lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (Natural Killer) ; il induit rapidement l'apoptose des cellules visées [66].

SPI3 inhibe la fusion cellule-cellule pendant le cycle infectieux du virus de la vaccine et du virus du cowpox et donc SPI1 empêche la formation de vastes syncytiums [37,74,85].

Chez le virus myxomateux, on connaît déjà bien la protéine codée par le gène SERP1(cf.II) qui a un fort effet anti-inflammatoire [40] d'où son utilisation en médecine humaine pour lutter contre l'athérosclérose et l'arthrite. En 1996, une deuxième serpin a été mise en évidence sur le génome du virus myxomateux [58]. Appelée Serp2, cette protéine de 34kDa présente une forte ressemblance avec CrmA du virus du cowpox.

Tout récemment, une troisième serpin, Serp3, intervenant comme facteur de virulence du virus myxomateux, a été caractérisée [26]. Serp3 est une serpin présentant d'importantes délétions par rapport à la serpin de référence qu'est l' α -1 antitrypsine mais Serp3 conserve une possibilité de repliement spatial compatible avec une action inhibitrice de protéases.

3) PARTICULARITES DE SERP2

La comparaison des brins d'ADN de la souche sauvage, T1, et de la souche vaccinale, SG33, montre l'absence de certaines séquences sur le génome vaccinal. Parmi ces délétions, on trouve une séquence ORF proche de la portion C-terminale qui code pour une protéine de 34kDa. Cette protéine présente les caractéristiques des serpins. Etant la deuxième serpin découverte sur le génome du virus myxomateux, elle est appelée Serp2.

Serp2 est une protéine intracellulaire, non glycosylée, exprimée dès la phase précoce de l'infection puis tout au long du cycle viral (cinétique déterminée par immunoprécipitation de protéines radiomarquées récoltées à différents temps) [58]. L'utilisation d'un virus mutant Serp2⁻ a permis de montrer que Serp2 est essentielle pour la complète virulence du virus : un taux de survie élevé est constaté chez des lapins européens infectés par le mutant Serp2⁻ [58].

L'analyse de la séquence de Serp2 dans la région du site actif a montré une forte homologie avec celle de CrmA notamment la présence d'un résidu acide aspartique à la position P1. Cependant, si l'on considère la totalité de la séquence, l'homologie entre ces deux serpins n'excède pas 35%.

CrmA est une protéine précoce et intracellulaire de 38kDa. Il a été prouvé que CrmA inhibe ICE (caspase1) [32,62] et donc la production d'IL1 β . De plus, d'autres études ont montré que CrmA inhibe granzyme B [61]. La caspase 1 et le granzyme B ont en commun une affinité spécifique pour l'acide aminé aspartique de leur substrat (résidu P1 de CrmA). CrmA inhibe d'une part une protéase à sérine, granzyme B et, d'autre part, la caspase1, une protéase à cystéine. Une deuxième inhibition de type « cross-class » a été attribuée à CrmA, il s'agit de l'inhibition de la caspase 8 (FLICE) [71]. Caspase 8 intervient dans la cascade de réactions de la voie calcium-indépendante de l'apoptose déclenchée à l'extérieur de la cellule.

- Conséquences de l'inhibition de la caspase 1 :

La formation d'un complexe CrmA/ICE empêche la production IL1 β active et donc le déclenchement de la cascade inflammatoire et immunitaire. De plus, CrmA empêche l'apoptose médiée par IL1 β (apoptose initiée de l'intérieur de la cellule en réaction à une infection virale).

- Conséquences de l'inhibition de granzyme B :

Granzyme B, enzyme présente dans les granules des lymphocytes T cytotoxiques et dans les cellules Natural Killers, induit rapidement l'apoptose des cellules dans lesquelles elle pénètre. L'entrée du granzyme B, au niveau des canaux à perforine, nécessite la présence de calcium. L'inhibition du granzyme B par CrmA entraîne le blocage de la voie de la cytolysse calcium-dépendante.

- Conséquences de l'inhibition de caspase 8 :

L'inhibition de la caspase 8 par CrmA conduit au blocage de l'apoptose médiée par deux types de récepteurs cellulaires membranaires : les récepteur au Fas et les récepteurs au TNF α (voie de la cytolysse calcium-indépendante) (figure 7).

L'homologie de séquences du site actif, entre CrmA et Serp2, fait penser à une similitude des cibles de ces deux serpins. C'est pourquoi la capacité de Serp2 à inhiber ICE a été testée. L'utilisation d'extraits non purifiés de baculovirus recombinants exprimant Serp2 a permis de montrer la formation d'un complexe Serp2-ICE humain [58]. Cependant, ces résultats sont à nuancer car la concentration de Serp2 dans les échantillons utilisés n'a pas pu être mesurée [75]. De nouvelles tentatives de mise en évidence de la présence d'un complexe Serp2/ICE ont été négatives aux concentrations où CrmA se fixe de façon stable à ICE (forte affinité). De plus, Serp2 n'est pas capable de remplacer CrmA sur le génome du cowpox virus [75]. Contrairement aux cellules infectées par le type sauvage, l'apoptose a été facilement observée dans les cellules infectées par le cowpox recombinant délété en CrmA et exprimant Serp2. Les résultats montrent que Serp2 est incapable de remplacer CrmA sur le plan fonctionnel, dans le contexte du cowpox virus. Donc deux hypothèses sont à envisager : soit les spectres d'inhibition de Serp2 et CrmA sont distincts, soit la spécificité stricte de Serp2 l'empêche d'agir sur des cibles issues d'autres espèces que son hôte naturel.

Malgré leur homologie structurale (résidu acide aspartique en position P1 et ressemblance des séquences C-terminales), Serp2 et CrmA n'ont peut-être pas les mêmes rôles et donc pas les mêmes cibles. Par ailleurs, leur cinétique d'expression diffère puisque Serp2 est exprimée dès la phase précoce de l'infection (comme CrmA) puis tout au long du

cycle viral. Le fait que Serp2 soit également exprimée en phase tardive suggère un autre rôle biologique pour cette protéine. Mais aucune cible potentielle n'a encore été proposée.

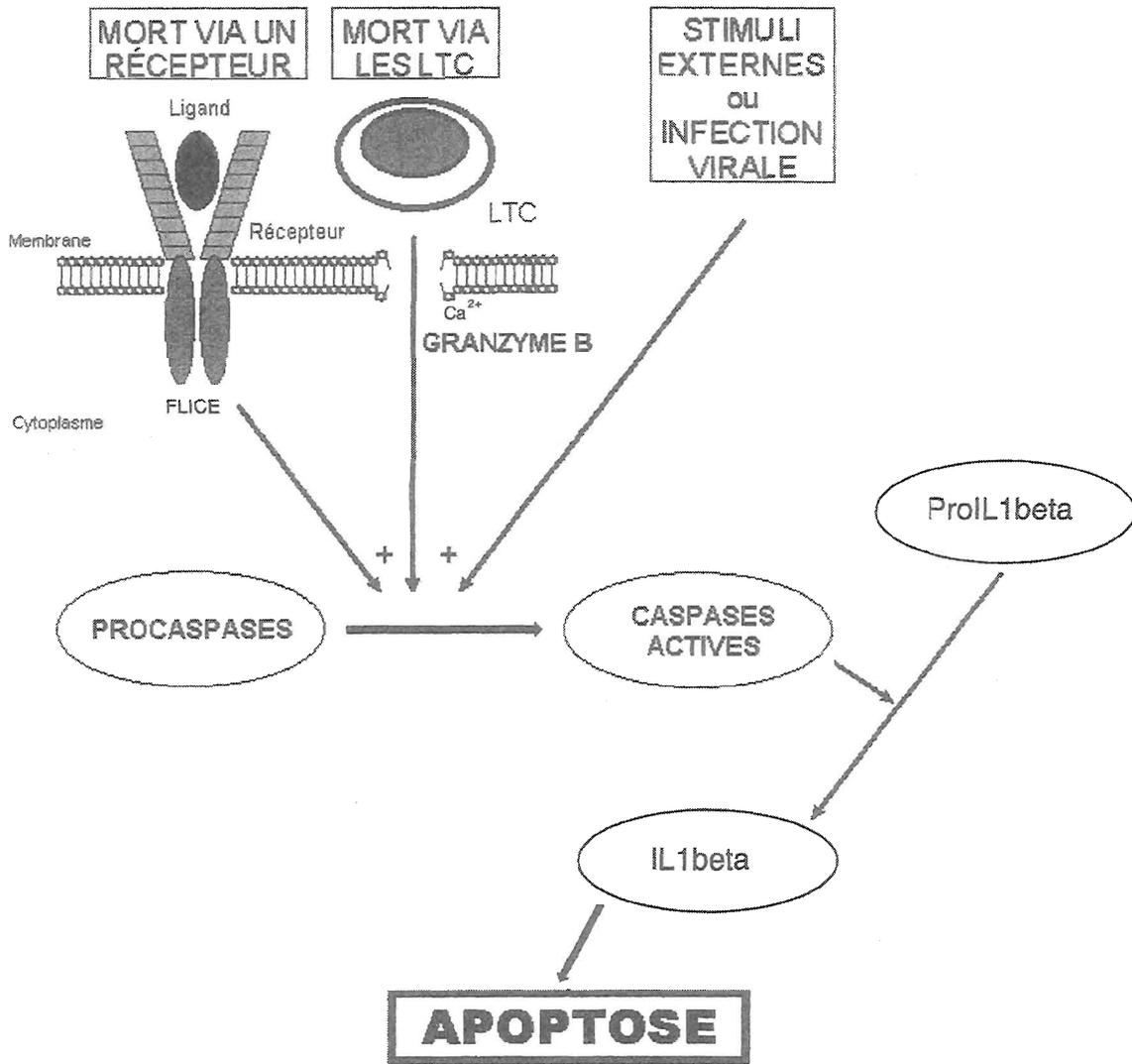


Figure 7 : Déclenchement de la cascade apoptotique [60].

La cascade protéolytique conduisant à l'apoptose peut être induite par différentes voies. Une des mécanismes passe par une interaction ligand-récepteur de la superfamille TNF ou Fas. Cette interaction entraîne l'activation de quelques caspases (dont FLICE) puis l'activation d'un autre groupe de caspases (dont ICE) conduisant à l'apoptose. Cette cascade peut également être activée par le granzyme B, produit par les lymphocytes T cytotoxiques, et introduit dans la cellule cible via un canal à perforine. Une troisième voie d'activation de l'apoptose fait suite à une réponse à une infection virale ou à une variété de stimuli externes.

Cette première partie de rappels bibliographiques a permis de rappeler le rôle de Serp2 dans le pouvoir pathogène du virus myxomateux mais on ne sait toujours pas, à l'heure actuelle, avec quelle(s) cible(s) cellulaire(s) cette protéine interagit. L'objectif de notre travail est de découvrir la destination cellulaire de Serp2 et de caractériser sa cible potentielle. Tout d'abord, nous avons décidé de marquer cette protéine afin de pouvoir la suivre dans la cellule. Pour ce faire, un virus myxomateux contenant la protéine de fusion Serp2-GFP (Green Fluorescent Protein) a été construit. Les propriétés de fluorescence de la GFP, en microscopie confocale, permettent de repérer le virus recombinant dans les différents compartiments cellulaires. Une autre technique d'approche a été de produire des anticorps anti-Serp2 pour précipiter le complexe Serp2/cible. Enfin, l'utilisation de Serp2 radiomarquée permet d'autres expériences visant à caractériser cette cible. En parallèle, des études portant sur la comparaison de la virulence (*in vivo*) des souches sauvage (T1), recombinante (T1-[Serp2-GFP]) ou délétée (T1 Δ Serp2) ont été menées. *In vitro*, le taux d'apoptose, induit par chacune de ces trois souches, sur différentes lignées cellulaires, a été mesuré afin de préciser le rôle anti-apoptotique de Serp2.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

1) CELLULES

Deux types cellulaires sont utilisés : des cellules rénales de lapin (lignée RK13) et des fibroblastes primaires de lapin (cellules Alexis).

Les cellules RK13 sont entretenues dans du milieu de Dulbecco (DMEM) additionné de pénicilline et de streptomycine (100UI/ml et 100µg/ml) (PS) contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF). Elles sont placées à l'étuve à 37°C en atmosphère enrichie à 5% en CO₂. Les cellules sont multipliées tous les 3 à 4 jours par action de la trypsine et dissociation à la pipette puis reprises dans du milieu contenant 10% de SVF. Il est possible de multiplier le nombre de boîtes de 2 à 5 à chaque passage.

Les cellules Alexis proviennent d'un lapin sain (New Zealand White) âgé de 5 semaines. Après sacrifice du lapin, un lambeau de peau épilé est prélevé sur le dos de l'animal puis est agité pendant 15mn à 37°C dans un mélange de trypsine (3g/l) contenant du MEME et 20% de SVF. Le jus, filtré à travers une gaze, est ensuite centrifugé 10mn à 1500rpm afin d'obtenir une première récolte. Le reste de la peau est soumis à une nouvelle trypsination pendant 20mn dans les mêmes conditions afin de constituer une seconde récolte. Les 2 récoltes sont maintenues en culture dans du MEME contenant de la PS, 25mM d'Hépès, de la glutamine et 10% de SVF.

2) PRODUCTION DE VIRUS

Deux souches virales, produites en routine au laboratoire, sont utilisées. La souche T1 (Toulouse 1), représente le virus myxomateux sauvage ; le virus T1ΔSerp2 est un mutant dans lequel le gène codant pour Serp2 n'est plus fonctionnel.

Les virus sont produits sur des flacons de 175cm² (F175) de cellules RK13 confluentes (âgées de 48h). Les cellules sont infectées à 0,1UFP (Unité Formant Plage)/cellule dans 5 à 10ml d'OptiMEM contenant 2% de sérum de veau fœtal. Le contact virus-cellules pendant 1 à 2 heures à 37°C permet l'adsorption des particules virales ; l'inoculum est ensuite retiré et le tapis cellulaire est rincé avec de l'OptiMEM. L'incubation se poursuit dans 40ml d'OptiMEM à 37°C en atmosphère enrichie à 5% en CO₂.

Lorsque l'effet cytopathique est jugé suffisant, en moyenne 24 à 48 heures plus tard, les cellules sont détachées mécaniquement dans le milieu de culture. La suspension est centrifugée à 10000xg pendant 10mn et est rincée deux fois en PBS1X-EDTA 40mM. Le culot subit 3 cycles de congélation/décongélation puis est repris dans un petit volume de PBS-EDTA avant d'être clarifié à 3000xg pendant 10mn. Le surnageant est titré puis stocké à -80°C.

3) TITRAGE DE VIRUS

Le titrage de virus s'effectue sur plaques de 6 cupules (P6) de cellules RK13 confluentes. Des dilutions de la suspension virale à titrer sont préparées dans de l'OptiMEM sans SVF, puis 200µl de chaque dilution sont déposés en double dans chaque cupule. Après 2h d'adsorption à l'étuve, l'inoculum est remplacé par 2ml d'OptiMEM à 2% de SVF. Les cellules sont replacées à l'étuve 5% de CO₂. La lecture est effectuée 48h plus tard, par comptage manuel des plages de lyse. Pour la plus grande dilution, notée d , produisant des plages de lyse, le nombre de plages est compté sur les deux cupules et est noté p . Alors, $n=2,5 \times p \times 10^d$ est une estimation du titre de la solution initiale, en UFP/ml.

4) CINETIQUE VIRALE SUR CELLULES ALEXIS

Onze boîtes de 3cm de diamètre (BP30) de cellules Alexis sont nécessaires. L'infection d'une BP30 se fait sous 200µl. Les dilutions des suspensions virales sont réalisées dans du MEM Hépès à 5% de SVF car les fibroblastes Alexis ne supportent pas l'OptiMEM. 5 boîtes sont infectées par du virus T1, 5 autres sont infectées par du virus T1ΔSerp2 et la dernière n'est pas infectée (témoin cellule).

Un couple de boîtes (l'une infectée T1 et l'autre infectée T1ΔSerp2) est placé à -20°C à T0 (contact + 1 heure), T4h, T8h, T24h et T48h après infection. Le surnageant, recueilli sous hotte stérile après trois cycles de congélation/décongélation, est titré sur P6 de cellules RK13. La courbe est tracée sur papier semi-log.

5) MARQUAGE DE L'APOPTOSE DES CELLULES ALEXIS

- Sur lame (labtek) :

Chaque labtek comprend 8 cupules de cellules Alexis à infecter sous un volume de 200µl. 8h ou 24h après infection, les tapis cellulaires sont rincés avec du PBS1X puis avec un mélange éthanol-acétone 1/1 froid. Chaque cupule reçoit 500µl de mélange éthanol-acétone (pour fixer les cellules) puis la lame est rapidement placée à -20°C pendant 2h minimum. Par la suite, les tapis sont rincés trois fois avec du PBS 1X puis les cloisons de la labtek sont enlevées pour permettre la lecture des lames au microscope.

- En milieu liquide :

Des flacons de 25cm² (F25) de fibroblastes Alexis sont infectés de façon classique. Le lendemain chaque flacon est rincé deux fois avec du PBS1X puis reçoit 10ml de PBS. Les cellules sont récoltées par centrifugation après grattage du flacon. Le culot est lavé une fois dans du tampon annexinV 1X puis repris dans ce tampon de façon à avoir 1ml final/tube. Chaque tube reçoit 5µl d'annexinV puis 20µl de 7AAD. Après un contact de 15mn à 4°C, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS1X + Actinomycine D. Les cellules sont fixées par 1ml de paraformaldéhyde pendant 1 heure à 4°C. Avant l'acquisition au cytomètre de flux (figure 8), les cellules sont lavées avec du PBS1X puis filtrées.

6) RECOMBINAISON VIRALE

Trois boîtes de 6 cm de diamètre (BP60) de cellules RK13 âgée de 24h sont nécessaires. 1 BP60 contient environ 2.10^6 cellules et l'infection se fait sous un volume de 1ml. On désire infecter à 0,3 à 0,4 UFP/cellule afin de laisser des cellules vierges pour la propagation du recombinant. Les dilutions des suspensions virales sont réalisées dans de l'OptiMEM à 2% de SVF (sérum de veau fœtal).

- 1 BP60 est infectée par le virus T1 et ne sera pas transfectée, elle sert de témoin d'infection.

- 1 BP60 est infectée par le virus T1 puis est transfectée. C'est la boîte où s'effectue la recombinaison.

- 1 BP60 n'est pas infectée (dépôt d'OptiMEM à 2% de SVF) mais uniquement transfectée pour servir de témoin de toxicité de l'agent de transfection, la lipofectamine.

Après le dépôt des suspensions virales, les 3 boîtes sont placées à l'étuve (37°C) à 5% de CO₂. Après 2 heures d'adsorption, les inoculum viraux sont ôtés, les boîtes sont rincées 3

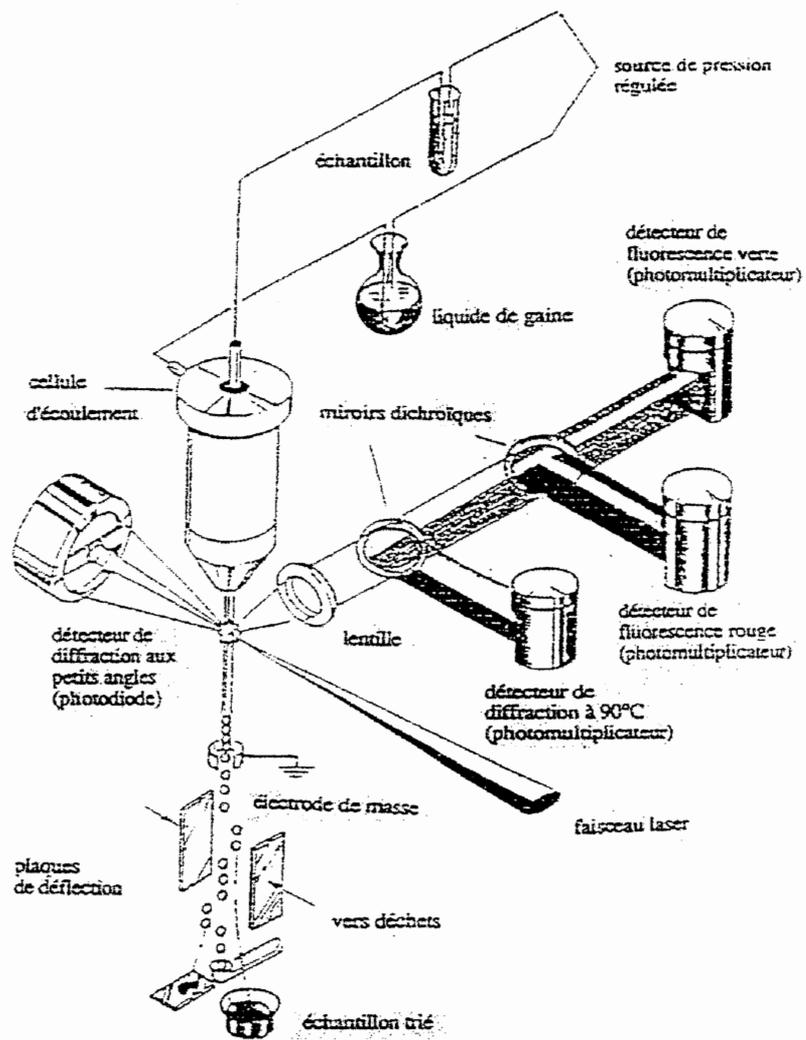


Figure 8 : Schéma explicatif du fonctionnement du cytomètre de flux.

fois avec de l'OptiMEM (sans sérum ni antibiotique) puis les mélanges de transfection y sont déposés. La préparation du mélange de transfection commence 20mn avant la fin de l'adsorption. Le milieu utilisé pour les dilutions du plasmide est l'OptiMEM sans sérum ni antibiotique.

- Pour le témoin d'infection, il faut préparer 200µl d'OptiMEM.
- Pour la boîte infectée puis transfectée, il faut mettre en contact 10µg de plasmide stérile et 40µg de lipofectamine dans 200µl finaux d'OptiMEM.
- Pour le témoin de toxicité, il y a uniquement 40µg de lipofectamine dans 200µl finaux d'OptiMEM.

Ces mélanges sont observés sur fond noir pour vérifier l'absence de précipité qui nuirait à la pénétration du complexe dans les cellules, ils doivent rester 20mn à température ambiante (temps de formation du complexe lipofectamine-plasmide). Puis ces mélanges sont rallongés à 3ml juste avant d'être déposés sur les boîtes. Les boîtes sont ensuite replacées à l'étuve pendant 5heures30. Au bout de ce laps de temps, on rajoute sur chaque boîte 3ml d'OptiMEM à 5% de SVF (pour avoir 2,5% de SVF final).

Enfin, les boîtes sont placées 48 heures à l'étuve puis subiront 3 cycles de congélation/décongélation afin de faire éclater les cellules pour récupérer 6ml de produit de recombinaison que l'on conserve à -80°C .

7) CRIBLAGE PURIFICATION ET AMPLIFICATION D'UN VIRUS RECOMBINANT SERP2-GFP

Le produit de recombinaison est utilisé pour infecter des boîtes de cellules RK13 de 10cm de diamètre (BP100). L'infection d'une BP100 se fait sous 2ml d'OptiMEM à 2% de SVF (avec antibiotique). Le titre du produit de recombinaison est estimé à 10^6 UFP/ml (6ml total) donc le produit de recombinaison est dilué au $1/200^{\circ}$ afin d'obtenir 5000 à 10000 plages de lyse/boîte.

Après avoir vidé les BP100, 2ml de produit de recombinaison dilué sont déposés sur les tapis cellulaires puis les boîtes sont placées deux heures à l'étuve et remuées en croix toutes les 10mn. L'inoculum est ensuite remplacé par 15ml d'OptiMEM 2% SVF/boîte. Les boîtes restent 48 heures à l'étuve avant d'être observées au microscope à fluorescence (en lumière bleue). Les plages de lyse vert fluorescent sont repérées au marqueur. Un milieu gélosé est coulé sur les boîtes contenant des plages de lyse vertes : on mélange une solution d'agarose 2% (eau stérile) avec du MEME 2X (tamponné bicarbonate 7,5%+Hépès 1M) à 4% de SVF. La gélose doit prendre sur paillasse avant de pouvoir placer les boîtes une nuit à l'étuve à 5% de CO_2 .

Le lendemain, les plages repérées au marqueur sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et déposées dans 500µl d'OptiMEM 2% SVF (conservation à -80°C).

Pour la purification, les recombinants prélevés sont étalés sur des plaques à 6 cupules (P6) de RK13 à raison de deux cupules par dilution ($1/2$, -1, -2). Les plages vertes les plus isolées sont repérées et prélevées comme précédemment. L'opération est répétée 4 fois pour obtenir une purification totale.

L'amplification se fait sur P6 de cellules RK13 âgées de 48h. Après une infection classique, la plaque est laissée à l'étuve jusqu'à ce que tout le tapis cellulaire soit lysé (environ 3 à 4 jours). Le virus amplifié est libéré par 3 cycles de congélation/décongélation. Pour augmenter le volume, l'amplification est réalisée sur F25 (infection sous 1ml d'inoculum puis 5ml de milieu neuf) puis sur F75 (3ml d'inoculum puis 20ml de milieu neuf).

Le virus amplifié est conservé à -80°C .

8) TEST DE FONCTIONNALITE IN VIVO DU RECOMBINANT

Les expériences sont réalisées sur des lapins mâles New Zealand White âgés de six semaines. L'inoculation est faite par injection intradermique à la face externe de l'oreille droite.

- Suivi clinique :

10 lapins sont inoculés à J0 avec chacun 5.10^3 UFP de virus : 2 lapins reçoivent du virus T1, 2 lapins reçoivent du virus mutant T1 Δ Serp2, 6 lapins reçoivent du virus recombinant T1-[Serp2-GFP].

Un examen clinique quotidien de chaque lapin permet de noter l'apparition des différents symptômes. L'examen porte sur l'évolution de la lésion primaire (point d'inoculation), l'apparition éventuelle de myxomes secondaires, la présence de symptômes respiratoires, oculaires ou génitaux et sur l'évaluation de l'état général.

Afin d'éviter une contamination des différents lots, l'examen commence toujours par le lot inoculé avec T1 Δ Serp2 puis se poursuit par le lot T1-[Serp2-GFP] pour se terminer par le lot T1.

- Etude anatomopathologique :

7 lapins sont utilisés dans cette expérience. Ils sont inoculés à J0 avec 5.10^3 UFP de virus chacun. 2 lapins sont inoculés avec du virus T1, 2 lapins avec du virus mutant T1 Δ Serp2, 2 lapins avec du virus recombinant T1-[Serp2-GFP]. Le dernier lapin reste sain.

A J8, les lapins sont sacrifiés par injection intracardiaque de T61. La lésion primaire à l'oreille droite et le nœud lymphatique drainant sont prélevés et conservés dans du formol pour subir une analyse histologique.

- Repérage des populations de cellules infectées dans la lignée blanche :

Durant l'expérience de suivi clinique, 2 lapins, choisis au hasard dans le lot inoculé avec du virus T1-[Serp2-GFP], subissent des prises de sang à l'oreille gauche. Le sang est prélevé sur héparinate de lithium à J3, J4, J10 et J12. On effectue en parallèle une prise de sang sur un lapin sain.

3ml de tampon de lyse des globules rouges (8,29g NH₄Cl, 37mg EDTA, 1g KHCO₃ dans 1 litre d'eau distillée pH=7,4) est ajouté à 100 μ l de chaque échantillon de sang. Après 10mn de contact à 4°C, l'échantillon est centrifugé à 1500tr pendant 10mn. Le culot est rincé deux fois dans du PBS1X avant d'être repris dans 1ml de PBS1X. L'échantillon est conservé à 4°C jusqu'à l'acquisition au cytomètre de flux.

9) ADN PLASMIDIQUE

- Préparation d'ADN par minipreps (petit volume) :

L'ADN plasmidique est préparé en utilisant le kit minipreps de chez Proméga, à partir de 3 ml culture bactérienne sur la nuit (milieu LB + 30 μ g/ml de kanamycine).

Centrifuger 3ml de culture bactérienne 1 à 2mn à 10000xg. Eliminer le surnageant et égoutter sur papier. Remettre en suspension avec 200 μ l de solution de resuspension (10mM

Tris pH7.5, 0.1mM EDTA). Ajouter 200µl de solution de lyse (0.2M NaOH, 1% SDS, 10mM EDTA) et mélanger par renversement 4 fois. Au bout de 5mn, ajouter 200µl de solution de neutralisation (3M KAc pH4.8). Mélanger par renversement 4 fois et laisser sur glace 5mn. Centrifuger 10000xg pendant 5mn. Monter la minicolonne sur le corps d'une seringue 2ml (après avoir ôté le piston). Ajouter 1ml de résine dans la minicolonne et verser le surnageant, remonter le piston et pousser. Démontez la seringue avant d'ôter le piston. Verser 2ml de solution de lavage (additionnée d'éthanol) et pousser le piston. Oter la seringue et transférer la minicolonne sur un eppendorf de 1,5ml, centrifuger à 10000xg pendant 2mn pour sécher la résine. Transférer la minicolonne sur un eppendorf neuf, ajouter 50µl d'eau stérile dans la minicolonne et centrifuger 20 secondes à 10000xg pour éluer l'ADN.

- Purification d'ADN sur colonne (grand volume) :

L'ADN plasmidique est préparé en utilisant le kit QIAGEN, à partir de 100 ml culture bactérienne sur la nuit (milieu LB + 30µg/ml de kanamycine).

Culotter 100ml de culture bactérienne sur la nuit (6000xg pendant 15mn). Vider le surnageant et resuspendre le culot dans 4ml de tampon P1 (100µg/ml RNaseA, 50mM Tris-Cl pH8, 10mM EDTA). Ajouter 4ml de tampon P2 (200mM NaOH, 1% SDS). Retourner le tube 10 fois. Incuber 5mn à température ambiante.

Ajouter 4ml de tampon P3 (3M KAc pH5.5). Retourner le tube et incuber sur glace pendant 20mn. Centrifuger à 10000xg pendant 30mn à 4°C. Pendant ce temps équilibrer une colonne « Tip 100 » avec 4ml de tampon d'équilibration QBT (750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% éthanol, 0.15% TritonX100, pH7). Laisser la colonne se vider par gravité, mais elle ne doit pas sécher.

Après centrifugation, appliquer le surnageant limpide sur la colonne. Rincer 2 fois avec 10ml de tampon de lavage QC (1M NaCl, 50mM MOPS, 15% éthanol, pH7). Eluer avec 5ml de tampon d'élution QF (1.25M NaCl, 50mM Tris-Cl pH8.5, 15% éthanol).

Précipiter l'ADN avec un volume égal d'isopropanol. Laisser sur glace 15mn puis centrifuger à 10000xg pendant 30mn à 4°C. Jeter le surnageant. Rincer le culot avec 5ml d'éthanol 70%, centrifuger à 10000xg pendant 10mn. Sécher le culot et reprendre l'ADN dans de l'eau distillée. Quantifier.

- Purification et stérilisation d'ADN plasmidique :

Afin d'obtenir un ADN pur et stérile pour effectuer les transfections, l'ADN préparé sur colonne subit une étape supplémentaire de purification.

Ajouter un volume égal de phénol à l'ADN obtenu par QIAGEN, vortexer 1mn puis centrifuger à 8000xg pendant 5mn. Récupérer la phase supérieure à la pipette et la transférer dans un nouvel eppendorf. Ajouter un volume de phénol et un volume de chloroforme, vortexer 1mn puis centrifuger à 8000xg pendant 5mn. Récupérer la phase aqueuse délicatement et la répartir dans deux eppendorfs (300µl maximum par tube). Ajouter 1.3ml de chloroforme par eppendorf. Vortexer 1mn puis centrifuger à 8000xg pendant 5mn. Mettre la phase aqueuse dans des eppendorfs neufs (aucune trace de chloroforme ne doit persister). Précipiter avec 1/10^e de NaAc 3M et 2,5 volume d'éthanol 100%. Laisser à -20°C pendant 30mn puis centrifuger à 15000xg pendant 30mn. La stérilité doit être assurée par la suite (sous hotte). Eliminer le surnageant, rincer le culot avec 1ml d'éthanol 70% puis centrifuger à 15000xg pendant 10mn. Eliminer le surnageant et laisser sécher le culot sous hotte à flux laminaire jusqu'à disparition complète de l'éthanol. Reprendre le culot dans 100µl d'eau stérile et quantifier (sur gel). Le plasmide stérile est conservé à -20°C. Un parafilm est placé autour du couvercle de l'eppendorf pour assurer la stérilité en dehors de la hotte.

- Test d'expression transitoire de la GFP plasmidique (transfection):

Des labteks de cellules RK13, âgées de 24h, sont transfectées par du plasmide portant la protéine GFP. Le protocole est celui utilisé lors de la recombinaison virale (mais il n'y a pas d'infection préalable). Au bout de 24 et 48h, chaque cupule de labtek est rincée trois fois avec du PBS1X puis reçoit 500µl de PBS à 4% de paraformaldéhyde (PFA) pour la fixation des cellules. Après deux heures à température ambiante, chaque cupule est rincée trois fois avec du PBS1X, puis les cloisons de la labtek sont ôtées. 1 goutte de PBS glycérol puis une lamelle sont déposées sur la lame avant l'observation au microscope à fluorescence. Une fluorescence verte des cellules est caractéristique de l'expression de la GFP.

- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR):

Les amorces utilisées ont été synthétisées à façon par la société Isoprim. Le tableau 2 indique les noms, les utilisations et les séquences des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

Pour 10 PCR, 200µl de mélange réactionnel sont préparés avec 20µl de tampon de réaction 10X (Proméga), 3µl de MgCl₂ à 50mM, 2µl de dNTP 100X (solution à 20mM), 20µl de chaque amorce 10X (à 5µM), 2µl de Taq polymérase à 5U/µl (Proméga). Le mélange est complété à 200µl avec de l'eau nanopure.

Le mélange est réparti dans dix eppendorfs. 10ng d'ADN à tester sont rajoutés par tube (un témoin positif et un témoin négatif sont à prévoir).

Dans le thermocycleur, les échantillons sont d'abord dénaturés 7mn à 95°C puis subissent 35 cycles d'amplification : 1mn à 95°C, 1 ou 2mn à la température d'hybridation déterminée en fonction du pourcentage de liaisons GC des amorces, 2mn d'élongation à 72°C.

5µl des produits obtenus sont déposés sur gel d'agarose. Le pourcentage d'agarose du gel varie en fonction de la taille attendue pour l'amplicon.

Tableau 2 : Oligonucléotides utilisés en PCR (température d'hybridation, durée de l'hybridation).

Nom des amorces	Utilisation	Séquence 5'>3'
5'R-BglII	Présence du fragment R 55°C, 1mn	AACAAGAGATCTCTCCAATCGACAGCG
3'R-PstI		GTACCACCTGCAGAAACGTGGGTTTTATATCC
5'L-NheI	Présence du fragment L 55°C, 1mn	GGACGCTAGCCGAGTTATCTTGGTG
3'L-NheI		TGGAGGGCTAGCTTGAAAAGCTCCAT
jlp-gauche	Présence du fragment L 50°C, 1mn	TTGGTGTAACGAAATACAAA
jlp-droit		AACTAAATCCTTGTTGGTTAGT
gfp-anti	Sens d'insertion du fragment L (associée à 5'L-NheI) 50°C, 1mn	GACTTGAAGAAGTCGTGCTG
Zézette fin	Pureté du recombinant Serp2-gfp (associée à jlp-gauche) 51°C, 2mn	ACCTTCATAAGCGACAGATG

- Analyse de l'ADN par électrophorèse :

Les gels d'électrophorèse sont préparés avec 0,7 à 1,5% d'agarose (Proméga) et 0,5mg/ml de bromure d'éthidium (BET) en tampon TBE1X (Tris Borate EDTA). Après fusion, la solution est coulée sur un support plastique muni d'un peigne servant à former les puits. Lorsque le gel a refroidi, le peigne est ôté et le gel immergé dans du TBE1X.

Les échantillons sont préparés en ajoutant 1/10^e du volume de tampon de charge 10X (200mM EDTA, 50% de glycérol et 0,2% de bleu de bromophénol). Les échantillons sont chargés dans les puits. Un des puits est réservé au marqueur de poids moléculaire (marqueur 1kb Gibco BRL). Après migration à 80 volts pendant 30mn, le gel est observé sous rayonnement UV puis photographié.

10) PROTEINES

- Purification de Serp2 :

La solution contenant la protéine Serp2 (produite au laboratoire grâce à un système baculovirus recombinant), est débarrassée des acides nucléiques qui la composent, par l'utilisation du kit centricon Y10.

La protéine est remise en suspension et 1ml de cette suspension est déposé dans le réservoir à échantillon du kit monté sur le filtrate vial.

1ml de Tris 50mM pH 7 contenant des inhibiteurs de protéases, sont rajoutés avant de centrifuger la suspension à 5000xg pendant 2 heures. L'opération est recommencée 3 fois.

Après 8 heures de centrifugation, on estime que la protéine est correctement lavée. Serp2 est remise en suspension dans du Tris puis, le retental vial est ajouté sur le montage qui est renversé et centrifugé à 10000xg pendant 2mn. La protéine purifiée est récupérée dans 800µl de Tris puis elle est quantifiée par la méthode de Bradford.

- Dosage des protéines par la technique de Bradford :

On utilise une gamme étalon (Sérum Albumine Bovine : BSA) : tube A : 100µg/ml, tube B : 75µg/ml, tube C : 50µg/ml, tube D : 40µg/ml, tube E : 30µg/ml, tube F : 20µg/ml, tube G : 10µg/ml, tube H : eau distillée.

100µl de la dilution, dont la lettre correspond aux puits A à H d'une microplaque, sont déposés en double dans les rangées 1 et 2. Les échantillons à doser sont dilués 100 fois de façon à obtenir 600µl de chaque. Puis 200µl d'échantillon sont déposés en triple exemplaire, dans les cupules A de la microplaque (A3-A5 pour l'échantillon n°1, A6-A8 pour le suivant, etc.). 100µl d'eau distillée sont déposés dans les cupules B à H. On effectue des dilutions de 1/2 en 1/2 : 100µl de la cupule A sont mélangés aux 100µl d'eau de la cupule B, puis 100µl de la cupule B sont prélevés et ajoutés aux 100µl d'eau de la cupule C, et ainsi de suite jusqu'à la cupule G. Il reste 200µl dans cette cupule : il faut en jeter la moitié ; la cupule H ne contient que de l'eau.

Le réactif de Bradford (BioRad) est dilué au 1/5^e (5ml de réactif pour 20ml d'eau distillée). 200µl de réactif ainsi préparé sont ajoutés dans chacune des cupules. 15mn plus tard, la plaque est lue dans le lecteur ELISA à 595nm.

La courbe DO= f(quantité) permet de déduire la concentration des échantillons par une règle de trois.

- Préparation d'anticorps polyclonaux anti-Serp2 :

Les anticorps sont préparés en système homologe (lapin) et en système hétérologue (mouton) par injection sous-cutanée de la protéine Serp2, purifiée et dosée précédemment. Une prise de sang est effectuée sur les animaux, avant injection de Serp2, pour obtenir du sérum préimmun T0. Trois injections de protéine sont effectuées à trois semaines d'intervalle sur chaque animal.

- lapins :

Deux lapins mâles New Zealand White, âgés de 2 mois, reçoivent une 1^{ère} injection de 250µg de Serp2 purifiée mélangés volume/volume avec de l'adjuvant complet de Freund. Les 2^e et 3^e injections se composent chacune de 100µg de Serp2 purifiée mélangés volume/volume avec de l'adjuvant incomplet de Freund.

- mouton :

Une brebis Lacaune, âgée de 3 mois, reçoit une 1^{ère} injection de 2mg de Serp2 purifiée mélangés volume/volume avec de l'adjuvant complet de Freund. Les 2^e et 3^e injections se composent chacune de 1mg de Serp2 purifiée mélangé volume/volume avec de l'adjuvant incomplet de Freund.

Trois semaines minimum après la dernière injection de Serp2, une prise de sang sur tube sec est réalisée. Le sang recueilli est laissé 2 heures à 37°C puis les tubes sont placés 24 heures à 4°C. Les sérums sont récupérés par centrifugation à 800xg pendant 10mn et sont conservés à -20°C. L'efficacité de la réponse en anticorps est vérifiée en Western Blot.

- Séparation des protéines par électrophorèse :

Les plaques de verre, de l'appareil à électrophorèse, sont nettoyées 3 fois avec de l'eau additionnée de détergent en alternance avec de l'éthanol, puis sont rincées à l'eau distillée.

Après avoir monté les plaques et vérifié leur étanchéité, le gel de séparation est préparé. Pour un gel de séparation à 10%, on mélange 10ml d'acrylamide 30% bisacrylamide 0,8% (12ml pour un gel 12% etc.), 3,75ml de Tris-HCl 3M pH8,8, 150µl de SDS 20%, 225µl de persulfate d'ammonium 10% (préparé extemporanément) et on complète à 30ml avec de l'eau distillée. Juste avant de couler le gel, il faut rajouter 15µl de TEMED. Une fois que ce gel est polymérisé, le gel de concentration est préparé en mélangeant 2,5ml d'acrylamide 30% bisacrylamide 0,8%, 5ml de Tris-HCl 0.5M pH6,8, 100µl de SDS 20% et 120µl de persulfate d'ammonium 10%. Le volume est complété à 20ml avec de l'eau distillée. Juste avant de couler le gel, il faut rajouter 15µl de TEMED. Après la polymérisation, les puits du gel sont rincés à l'eau distillée puis les plaques sont montées sur l'appareil à électrophorèse (les joints du corps central doivent être humidifiés). La plaque inutilisée est également montée.

1/3 de tampon 4X (0,3M Tris-HCl pH6,8, 10%SDS, 40% glycérol, 20% β-mercaptoéthanol, 0,1% bleu de bromophénol) est ajouté à chaque échantillon de protéines. Les échantillons doivent bouillir 5mn à 100°C (il faut prévoir les marqueurs de poids moléculaire). Les échantillons sont déposés dans les puits et le corps central est placé dans la cuve.

On remplit la cuve supérieure puis la cuve inférieure avec du tampon de cuve 1X (0.025M Tris-Cl pH8.3, 0.192M glycine, 0.1 SDS). La migration s'effectue à 70-120V pour le gel de concentration, puis à 180-250V dans le gel de séparation. Si le gel migre la nuit, il faut limiter à 130V. La migration se termine quand le bleu est à 0,5 cm du bas. Le gel est démoulé et le sens est marqué par découpage du coin en bas à droite. Le gel est fixé dans du méthanol 30%-acide acétique 10% pendant 30mn.

Puis, éventuellement, le gel est coloré dans 0,3% de bleu de Coomassie, 30% de méthanol, 10% d'acide acétique pendant 30mn à 37°C ou pendant 1h à température ambiante. Le gel est ensuite décoloré dans du méthanol 30%-acide acétique 10% avant d'être séché 1 heure sous vide à 80°C.

- Western Blot :

Les protéines sont séparées sur un gel 10% qui n'est pas coloré car il faut transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose pour effectuer la détection immunologique.

Le gel de protéines est immergé 10mn dans du tampon de transfert (Glycine 39mM, Tris 48mM, SDS 0.0375% dans méthanol). La membrane de nitrocellulose, découpée à la taille du gel, est immergée 30mn dans ce même tampon. 18 papiers-filtre whatman 1 chr de la taille du gel à transférer sont découpés.

La cathode de l'appareil de transfert est humidifiée avec de l'eau distillée. 6 papiers-filtre, imbibés par capillarité dans du tampon de transfert, sont placés au centre de la cathode. Les bulles d'air sont enlevées. Une 2^e couche de 3 papiers-filtre, puis la membrane de nitrocellulose sont déposées. Le gel est placé sur la membrane. Le coin en bas à droite du gel et celui de la membrane sont découpés pour les orienter. Les autres papiers-filtre, 3 puis 6, sont placés par-dessus. Aucune bulle d'air ne doit persister. L'anode, humidifiée avec de l'eau distillée, est placée sur l'ensemble. Le transfert s'effectue à 0,8 mA/cm² pendant 2h.

Après transfert, la piste correspondant aux marqueurs est découpée. Le reste de la membrane est bloqué pendant 1h à température ambiante dans du PBS1X pH7,2, 0,2% Tween 20 et 0,25% de gélatine. Puis, la membrane est lavée 3 fois pendant 15mn dans du PBS/Tween 0,05%. La membrane est incubée une nuit à +4°C avec le sérum à tester dilué au 1/200^e dans PBS/Tween 0,05% (le sérum préimmun sert de témoin négatif ; un sérum polyclonal anti-myxomatose, dilué au 1/500^e, sert de témoin positif). Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois pendant 15mn dans du PBS/Tween 0,05%. Puis elle est incubée 1 heure à température ambiante dans l'anticorps secondaire marqué.

Le sérum anti-lapin est un sérum Biorad à diluer au 1/2000^e et qui est couplé à la peroxydase. Le sérum anti-mouton est à diluer au 1/3000^e et il est couplé à la phosphatase alcaline.

Après l'incubation, on effectue 3 lavages de 10mn dans du PBS/Tween 0,05% et un 4^e dans du PBS normal (sans Tween) puis on procède à la révélation de la membrane avec le révélateur approprié.

Les anticorps anti-lapin sont révélés grâce au TABLET de Sigma (dissoudre une tablet argent et une tablet dorée dans 5 ml d'eau distillée et utiliser immédiatement) ; les anticorps anti-mouton sont révélés grâce au révélateur de phosphatase alcaline de Sigma (BICP/NBT FAST Tablets).

- Préparation et solubilisation de membranes :

Deux flacons de 175cm² (F175) de cellules RK13 et deux F175 de cellules Alexis sont nécessaires. L'un des 2 flacons de chaque type cellulaire est activé par 100ng de LPS. Après une nuit de contact, chaque flacon est rincé 3 fois avec du PBS1X puis 20ml d'eau stérile sont ajoutés. Au bout de 30mn à 1 heure à température ambiante, le lysat, récupéré dans des tubes en verre, est centrifugé à 2000rpm pendant 10mn à 4°C. Le surnageant opalescent reçoit des inhibiteurs de protéases et le culot est repris dans 1ml de [Tris 20mM pH8,5, 1% Triton X₁₀₀, inhibiteurs de protéases]. Les deux échantillons sont conservés sur glace. Le surnageant est ultracentrifugé pendant 1h à 27000rpm à 4°C et le culot obtenu est repris dans 300µl de RIPA contenant des inhibiteurs de protéases avant d'être mélangé au premier culot. Le mélange des

deux culots est laissé une nuit en chambre froide. Le lendemain, ce mélange est ultracentrifugé à 35000rpm pendant 15mn, le surnageant obtenu est dosé par la méthode de Bradford et conservé à -20°C .

- Préparation de protéines virales marquées ^{35}S :

Des cellules RK13 ou Alexis confluentes sont infectées, sous 1ml, par du virus T1 ou T1ΔSerp2 avec une MOI de 5 à 10, dans des boîtes de Pétri de 6cm de diamètre (BP60). Les milieux utilisés sont différents selon la souche cellulaire de la boîte, en effet les fibroblastes primaires (Alexis) ne supportant pas l'OptiMEM à 2% de SVF, on utilise du DMEM à 5% de SVF pour ces cellules. Les boîtes sont laissées 1h30mn à l'étuve sous 5% de CO_2 en agitant toutes les 10mn. L'inoculum est enlevé, les tapis cellulaires sont rincés avec du milieu sans sérum puis 3ml de milieu (contenant du SVF) avec 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS (activation des cellules) sont déposés sur chaque boîte. Après 2 heures de contact à l'étuve, le tapis cellulaire est rincé avec du MEM sans méthionine, puis 3ml de MEM sans méthionine sans SVF sont ajoutés (étape de déplétion). Les boîtes sont laissées 1h à l'étuve puis l'étape de marquage est réalisée en remplaçant 1,5ml de milieu par 1,5ml de MEM sans méthionine à 4% de SVF et contenant 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de méthionine ^{35}S . Les boîtes sont laissées une nuit à l'étuve sous une atmosphère à 5% de CO_2 .

- Préparation de cytosols :

La récolte de cytosols se fait soit après une simple infection soit après une infection et un marquage radioactif. Le surnageant des BP60 est remplacé par 3ml de RIPA (10mM de Tris-HCl pH=8 ; Triton 0,2X ; 15mM de NaCl ; 600mM de KCl ; 0,4mM de MgCl_2) contenant des inhibiteurs de protéases. Les boîtes sont laissées 3 heures sur un lit de glace. Les lysats visqueux sont récoltés et centrifugés à 10000xg pendant 90mn à 4°C . Les surnageants, contenant les protéines virales et cellulaires, sont récupérés dans un nouvel eppendorf et conservés à -20°C .

Par la suite les échantillons sont lavés avec du Tris pH7,5 50mM, 500mM de DTT et contenant des inhibiteurs de protéases (kit centricon YM-3), ou bien reçoivent du DTT 500mM pour les renaturer.

- Immunoprécipitation des protéines :

Chaque échantillon de protéines marquées est divisé en deux parties avant d'être mis en contact avec le sérum : 20% de chaque échantillon est mis au contact du sérum anti-T1 (1% de sérum par échantillon) et 80% d'échantillon protéique est mis en contact avec du sérum anti-Serp2 issu de lapin (8% de sérum par échantillon). Les mélanges antigène-anticorps sont laissés en contact deux heures en agitation douce à température ambiante.

80 μl de suspension de protéineA-Sépharose (Pharmacia) sont prélevés et mélangés à 1ml de Tris-HCl 50mM pH8, 0,5M NaCl + aprotinine. Puis le mélange est centrifugé pendant 5mn à 3500rpm. Le surnageant est éliminé de façon à ce que chaque tube eppendorf contienne 40 μl de protéineA-Sépharose.

Le mélange antigène-anticorps est ajouté aux 40 μl de culot protéineA-Sépharose et est laissé en contact à température ambiante pendant 1 heure, en agitation douce, en vortexant toutes les 15mn. Les mélanges sont ensuite centrifugés pendant 5mn à 3500rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé 6 fois avec 1ml de RIPA + aprotinine. Un dernier rinçage est effectué avec 1ml de Tris-HCl 50mM pH8, 0,5M NaCl + aprotinine. Le culot est

repris dans 25µl de tampon échantillon 1X (0,1M de Tris-HCl pH6,8 ; 2% SDS ; 10% glycérol ; 5% β-mercaptoéthanol ; 0,05% bleu de bromophénol)

On fait bouillir les échantillons pendant 3mn avant de les centrifuger 5mn à 3500rpm. Les surnageants sont déposés sur gel de protéine avec un marqueur de poids moléculaire précoloré et radioactif (Amersham).

Après migration, le gel est démoulé, orienté et fixé puis séché 1h à 80°C. Le gel est ensuite exposé à un filmβ-Max dans une cassette radio. Au bout des 15 jours d'exposition, le film est révélé par passages successifs dans un révélateur, un bain d'arrêt et un fixateur. Le film est lavé et séché à l'air libre avant d'être observé.

- Transcription/traduction *in vitro* :

On utilise le kit TNT de chez Proméga. En parallèle de la transcription/traduction de Serp2 radioactive (Serp2*), on réalise également la transcription/traduction de luciférase (luciférase*) pour avoir un contrôle négatif.

Pour obtenir 100µl finaux par réaction, on mélange 50µl de lysat de réticulocytes, 4µl de tampon de réaction, 2µl de RNA polymérase de T3 pour l'obtention de Serp2 (RNA polymérase T7 pour l'obtention de luciférase), 2µl d'acides aminés sans méthionine à 1mM, 10µl de méthionine ³⁵S à 14mCi/m, 4µl d'inhibiteurs de ribonucléases à 40U/µl, 12µl d'eau distillée. On mélange doucement en tapotant le tube avant d'ajouter 2µg d'ADN du plasmide portant *serp2* (obtenu par la méthode QIAGEN) sous un volume de 16µl ou 4µl de Control DNA luciféraseT7 sous 16µl pour la traduction de la Luciférase. Les échantillons sont placés deux heures dans un bain-marie à 37°C. L'ARN résiduel est éliminé des échantillons par un traitement par RnaseA pendant 15mn.

L'efficacité de la réaction est vérifiée en déposant 5µl de produit de traduction sur un minigel de protéine 10% qui est exposé 8 jours à un filmβ-Max.

- Interactions protéine/protéine sur membrane :

- * Dot blot :

2 morceaux de membrane de nitrocellulose sont découpés et mis à tremper dans du tampon de transfert (cf. western-blot) pendant 30mn. Puis les membranes sont placées sur l'appareil à Dot Blot et les autres trous sont occultés par un film plastique. Après avoir fait le vide, les échantillons de protéines, dilués dans du Tris 20mM pH8,6, DTT 5mM et inhibiteurs de protéases, sont déposés sur les membranes. On dépose également un spot de Serp2 purifiée. Les membranes sont ensuite rincées deux fois avec du PBS1X. Après un séchage de 15mn, les membranes sont bloquées 1h dans du tampon de blocage (cf. western-blot). Chaque membrane est rincée deux fois avec du Tris10mM pH7,5. Puis elle est mise en contact, une nuit à 4°C dans un petit sac scellé, avec le produit de traduction qui est dilué dans du Tris 10mM pH7,5, DTT 10mM pour obtenir un volume suffisant pour le contact (environ 1ml). Le lendemain, on effectue 3 rinçages de 10mn avec du Tris 10mM pH7,5 puis les membranes sont séchées sur un papier whatman. Les membranes sont enveloppées dans du film plastique avant d'être exposées 8 jours à un filmβ-Max.

- * Far Western :

Deux gels de protéines identiques à 12% sur lesquels migrent les échantillons protéiques sont réalisés.

Deux membranes PVDF (Immobilon – Millipore) sont découpées à la dimension des gels, et immergées 2 secondes dans du méthanol 100% puis 5mn dans l'eau déionisée. Puis les membranes sont imprégnées pendant 10mn dans du tampon de transfert.

Le transfert des protéines des gels sur les membranes est réalisé (cf. western-blot) puis les membranes sont séchées à l'air ambiant. Les protéines sont renaturées en incubant les membranes une nuit à 4°C dans du tampon SB (Hépès 10mM pH 7,2, MgCl₂ 10mM, NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, DTT 1mM, glycérol 10%).

Le lendemain, les membranes sont saturées dans du tampon SB à 5% de BSA pendant 1 heure à température ambiante. Du tampon SB à 5% de BSA frais est préparé pour diluer d'une part la protéine Serp2* et d'autre part la luciférase * (témoin négatif). Les membranes sont incubées une nuit à 4°C, chacune dans un des deux produits radioactifs. Après 5 rinçages dans du tampon SB à 0.25% de BSA, les membranes sont séchées puis exposées 8 jours à un film β -Max.

- Interactions protéine/protéine en milieu liquide :

Chaque extrait protéique est dilué dans du Tris 10mM pH7,5, 0,1% de CHAPS, 10mM de DTT pour obtenir un volume final de 25 μ l.

Chaque échantillon reçoit 10 μ l de Serp2* (produit de traduction) puis est mis à incuber 1 heure à 30°C (bain-marie).

Après avoir ajouté un mélange de bleu glycérol, les échantillons sont déposés sur un gel non dénaturant (sans SDS). Après migration, le gel est démoulé, orienté, fixé et séché. Le gel est exposé 10 jours à un film β -Max.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

1) CONSTRUCTION D'UN PLASMIDE PORTANT LA PROTEINE DE FUSION SERP2-GFP

La construction d'un plasmide, portant la protéine de fusion Serp2-GFP, a déjà été réalisée lorsque nous débutons notre travail de thèse au laboratoire. Cependant, pour plus de clarté, les étapes de la construction sont exposées.

La construction s'effectue à partir d'un vecteur, le plasmide pEGFP-F (CLONTECH). Ce plasmide (figure 9) code pour une protéine, la GFP (green fluorescent protein), qui apparaît vert fluorescent lorsqu'elle est exposée à une longueur d'onde de 488nm (lumière bleue). A l'extrémité C-terminale de la séquence de EGFP se situe un signal farnésyl qui dirige la protéine GFP dans la cellule. La face interne de la membrane plasmique est la destination habituelle de la GFP. Le signal farnésyl doit être supprimé pour permettre à la protéine de fusion d'être dirigée par Serp2.

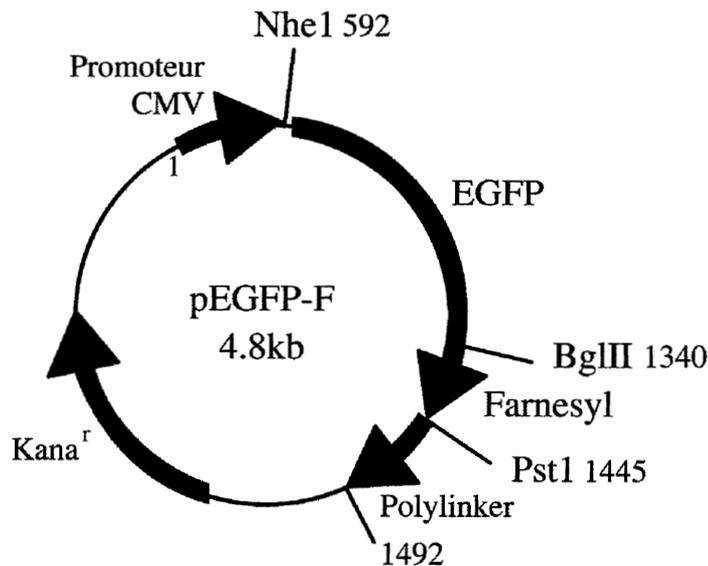


Figure 9 : Description du plasmide vecteur pEGFP-F.

Le promoteur est CMV (cytomégalovirus). Le plasmide présente une résistance à la kanamycine.

Le plasmide pEGFP-F est digéré par l'enzyme BglII, ce qui a pour effet de linéariser l'ADN. Le site de restriction de BglII est situé à l'extrémité 5' de la séquence farnésyl. Puis le plasmide linéarisé est ensuite digéré par l'enzyme PstI dont le site de restriction est situé à l'extrémité 3' de la séquence farnésyl. L'ADN plasmidique est ainsi débarrassé de la séquence farnésyl et ses extrémités sont prêtes pour une ligation avec les amplicons d'ADN viral.

L'ADN génomique du virus T1 est extrait de cellules infectées. La région d'ADN viral longue de 200pb, situées après le promoteur de Serp2, est appelée R. Ce fragment R est amplifié par PCR. Les amorces, 5'R-BglII et 3'R-PstI, sont dessinées de façon à contenir un site de restriction enzymatique. L'amplicon est double digéré par les enzymes BglII et PstI. Cet amplicon est prêt pour une ligation avec le plasmide double digéré.

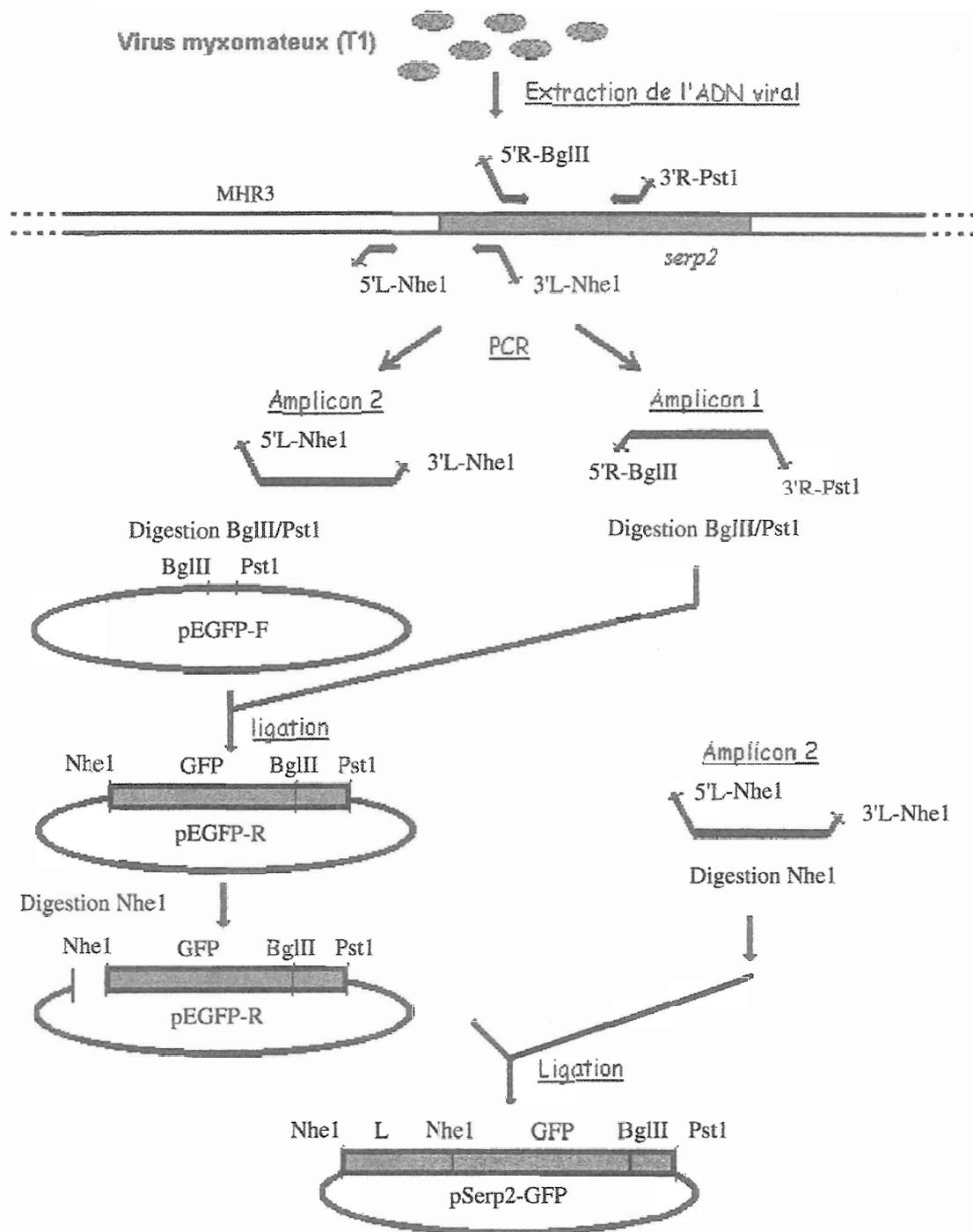


Figure 10 : Construction d'un plasmide portant la protéine de fusion Serp2-GFP.

Le transformant, appelé pEGFP-R, est sélectionné par PCR (amorces 5'R-BglII et 3'R-Pst1) puis digéré par Nhe1.

La portion du génome du virus myxomateux, constituée de 270pb comprenant la fin de la séquence de MHR3 et les trois premiers acides aminés de Serp2, est appelée L. Cette séquence est amplifiée par PCR (amorces 5'L-Nhe1 et 3'L-Nhe1). Puis l'amplicon est digéré par Nhe1 pour permettre son insertion sur pEGFP-R déjà digéré par Nhe1.

Cette deuxième ligation permet l'obtention d'un plasmide recombinant portant le fragment L de Serp2 (contenant le promoteur) en amont de la GFP et le fragment R en aval. Ce plasmide, qui ne contient plus de signal farnésyl, est appelé pSerp2-GFP (figure 10).

8 clones bactériens potentiels sont ainsi obtenus. Ils sont remis en culture puis l'ADN est extrait par miniprep.

La validité de la construction est vérifiée de trois façons :

- Par PCR : il s'agit de vérifier que les deux séquences d'ADN viral (R et L) sont bien insérées sur le plasmide et, en ce qui concerne la séquence L, qu'elle est dans le même sens que la GFP.
- Par transfection des plasmides pEGFP-F et pEGFP-R (où GFP conserve son promoteur) sur labteks de cellules RK13, on désire observer l'expression de la protéine GFP sauvage et de la GFP en fusion avec le fragment R, au microscope à fluorescence.
- Par séquençage (GENOME-EXPRESS) on vérifie que la construction obtenue est bien celle attendue sans décalage de phase et sans mutation.

2) VERIFICATION DE LA CONSTRUCTION PAR PCR

* Présence du fragment R :

La PCR utilise les amorces 5'R-BglII et 3'R-Pst1. La mise en évidence de la présence d'un fragment de 217pb prouve la présence de l'insert droit, R, sur le plasmide et ce fragment comportant deux extrémités différentes il ne peut s'insérer que dans le même sens que la GFP. On obtient ainsi 8 clones ayant inséré le fragment R.

* Présence du fragment L :

La PCR utilise les amorces 5'L-Nhe1 et 3'L-Nhe1. Ces deux amorces permettent simplement de mettre en évidence la présence ou l'absence du fragment L que l'on attend à 270pb. La présence du fragment L avec les amorces 5'L-Nhe1 et 3'L-Nhe1, n'a pas été mise en évidence. Ce couple d'amorces donne de mauvais résultats à la PCR, cela est peut-être dû au fait qu'elles sont situées à cheval sur le site de clivage et que, de ce fait, une grande partie de l'amorce ne s'hybride plus. C'est pourquoi deux autres amorces situées dans le fragment L, aux extrémités gauche et droite, sont utilisées pour valider la présence de L : jlp-gauche et jlp-droit. Elles montrent que 4 des 8 clones de départ portent, en plus du fragment R, le fragment L. Mais les deux extrémités du fragment L étant identiques (simple digestion par Nhe1) celui-ci peut s'insérer de deux façons sur le pEGFP-R, donc il faut vérifier le sens d'insertion de L.

* Sens du fragment L (figure 11) :

Pour cela, on effectue une première PCR avec les amorces jlp-gauche et gfp-anti (une nouvelle amorce située dans le cadre de lecture de la GFP et qui amplifie vers l'extrémité 5'). Si le fragment L est inséré dans le bon sens alors on attend un fragment amplifié à 520pb. Deux plasmides (a et b) sont testés en PCR avec les amorces jlp-gauche et gfp-anti (pistes 2 et 3). On n'obtient aucun amplicon donc soit la PCR n'a pas marché soit le fragment L est

inséré dans le mauvais sens. Une deuxième PCR de vérification du sens du fragment L sur ces deux même plasmides est réalisée avec les amorces 5'L-Nhe1 et gfp-anti. On attend la présence d'un amplicon à 540pb si le fragment L est dans le bon sens. Sur les deux plasmides testés avec 5'L-Nhe1 et gfp-anti (pistes 4 et 5), un seul révèle la présence d'un fragment amplifié à 540pb (piste 5) et donc, ce plasmide porte le fragment L dans le même sens que la GFP.

Par ailleurs, une PCR de vérification de la présence du fragment R sur ces deux plasmides est réalisée avec les amorces 5'R-BglII et 3'R-Pst1 (pistes 6 et 7). Les deux plasmides portent effectivement le fragment R (fragment amplifié à 217pb).

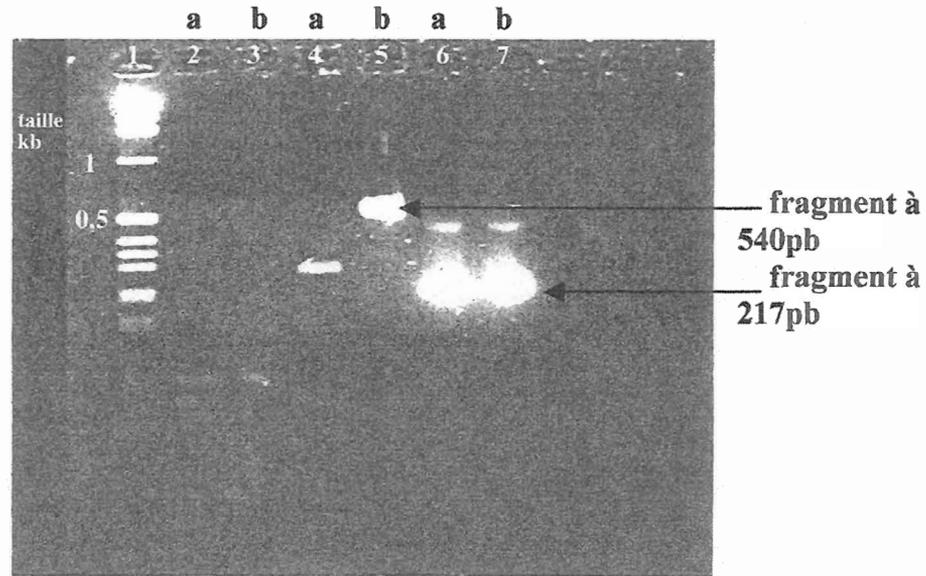


Figure 11 : Analyse PCR de l'ADN plasmidique Serp2-GFP.

Le premier puits contient le marqueur de poids moléculaire. Deux plasmides (notés a et b) sont testés avec trois couples d'amorces. Les pistes 2 et 3 utilisent les amorces jlp-gauche et gfp-anti ; les pistes 4 et 5 les amorces 5'L-Nhe1 et gfp-anti ; les pistes 6 et 7 les amorces 5'R-BglII et 3'R-Pst1. Les deux premières PCR sont destinées à tester les sens d'insertion du fragment L et la dernière permet de vérifier que les deux plasmides portent effectivement le fragment R.

Sur les 8 clones, un seul porte R et L dans le même sens que la GFP.

3) VERIFICATION DE L'EXPRESSION DE LA GFP PAR TRANSFECTION SUR CELLULES RK13

On réalise des transfections sur labteks de cellules RK13 avec le plasmide pEGFP-F (sauvage) qui sert de témoin positif et avec le plasmide pEGFP-R.

Aucune fluorescence verte, caractéristique de l'expression de la GFP, n'est observée.

Le plasmide pEGFP-R porte, à la place du signal farnésyl, le fragment R du gène de Serp2 mais le promoteur de la GFP n'est pas modifié par rapport au plasmide sauvage. Un repliement spatial de la protéine de fusion GFP-R, empêchant l'expression de la GFP, semble peu probable car le fragment R n'est long que de 200pb.

Deux hypothèses restent à envisager : soit les nombreuses contraintes techniques de la transfection ne sont pas contournées ; soit la protéine de fusion du plasmide ne s'exprime pas par suite d'une mutation intervenue sur le génome. En effet, la méthode PCR qui permet l'obtention des inserts peut introduire des mutations dans les séquences amplifiées.

Pour écarter cette deuxième hypothèse, le séquençage des inserts du plasmide pSerp2-GFP est réalisé.

4) VERIFICATION DE LA CONSTRUCTION PAR SEQUENÇAGE

Le séquençage des inserts (GENOME-EXPRESS) montre que la phase est bien respectée et qu'il n'y a pas de mutation. La construction est bien telle qu'on l'attend.

```
5'AAATACAAACATTACAAAAGATACATCGACAAGGCCATTAAGAAAATATCGAA
CCGTTACGCGAACGTTCTACAAGCCATCGACCGCATCAACGACGTCTGTGAAGGA
AACACAATCGTTGGAACGACATCCCTCCGGAGATCAAATTTAAAATCCTTAATA
ACCTAACCAACAAGGATTTAGTTTTTTTTAAATGAAAATAAAGTAGAGTATAATGT
ATAAGTGCGATTATGGAGCTTTTCAAGCTAGCGCTACCGGTCCGACCATGGTGA
GCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACG
GCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCG 3'
```

Figure 12 : Séquençage de l'insert L de pSerp2-GFP (amorce 5'L-Nhe1).

La séquence L qui comprend la fin de la séquence de MHR3 (sur fond gris) et le début de la séquence de Serp2 (sur fond noir) s'enchaîne sur la séquence de la GFP (sur fond blanc).

```
5'AGTCTCCAGTCGCCATATACTCTGGATGCGACGGTACTTTATCCAAATGGGAA
TATCTCGGCTCTAGGGCGAGACGTAATTGCGCGGCAGTGCGTCCCTTTGCCCTTC
CAATAATACGGCGAGAACCCTGAAATGGATACGGGAGAAACGAAGACGTCCGA
CGCTGTCGATTGGAGAGATCTGAGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA
GTGATCCCGGCGGCGGTCACGAACTCCAGCAGGACCATGTGATCGCGCTTCTCGT
TGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAG
CACGGGGCCGTCG 3'
```

Figure 13 : Séquençage de l'insert R de pSerp2-GFP (amorce 3'R-Pst1).

La séquence R est sur fond gris et la séquence de la GFP sur fond blanc.

Etant donné les résultats du séquençage, la transfection pour la recombinaison avec le virus T1 est réalisée.

5) VIRUS RECOMBINANT

L'obtention d'un virus recombinant (figure 14) exprimant la protéine de fusion Serp2-GFP nécessite d'infecter des cellules RK13 par le virus T1 sauvage et de les transfecter avec le plasmide portant la protéine de fusion. L'événement de recombinaison produit des virus recombinants avec une fréquence de 3 à 4 pour 100000 plages de lyse. Il importe donc d'avoir un crible de sélection pour repérer les virus recombinants. Chaque plage de lyses est observée au microscope à fluorescence en lumière bleue. L'expression de la GFP est repérée par une fluorescence verte des plages de lyses. Sur 10 BP100 observées, 29 plages vertes sont prélevées.

5 des 29 recombinants potentiels prélevés sont étalés sur P6, un seul donne effectivement des plages vertes spécifiques qui sont prélevées puis réétalées. On prélève les plages fluorescentes aux dilutions les plus fortes pour éviter au maximum la persistance du

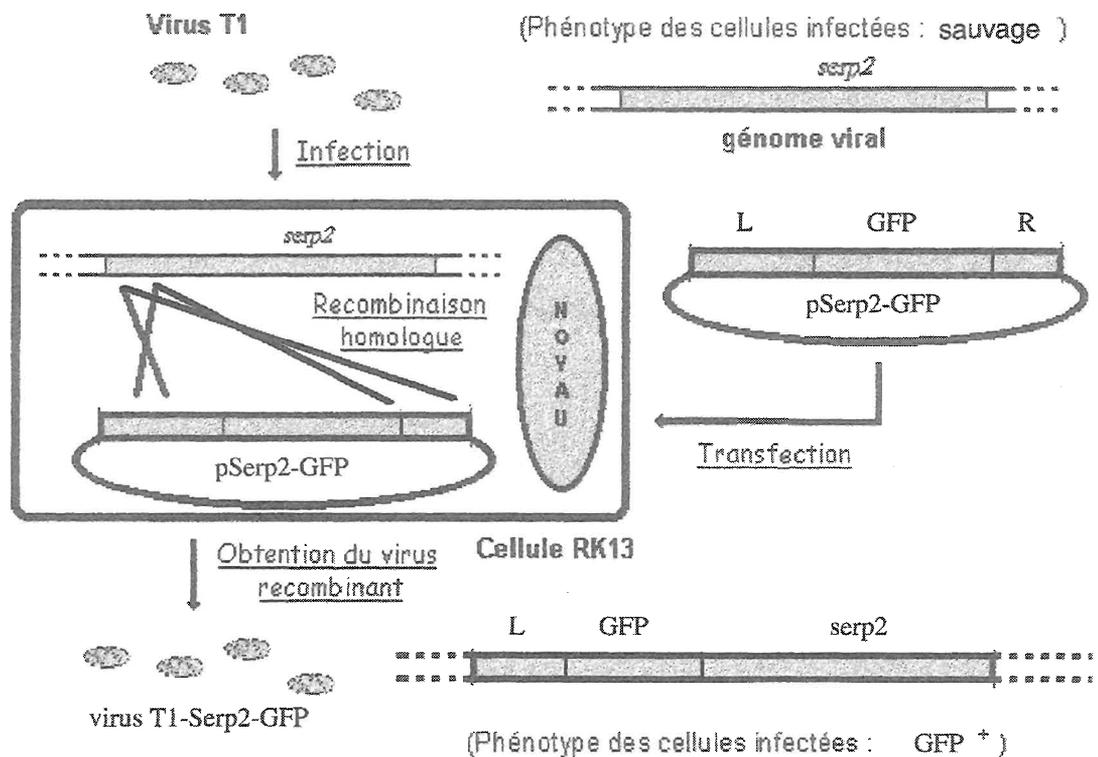


Figure 14 : Obtention du virus recombinant T1-[Serp2-GFP].

virus sauvage. Après la 5^e purification (figure 15), on réalise trois amplifications avec les 5 dernières plages de recombinants prélevées pour obtenir le virus grande quantité. Les 5 produits de la dernière amplification sont appelés J, K, L, M et N. Cependant, la contamination par le virus sauvage est toujours possible. Le recours à la PCR permet de vérifier la présence ou l'absence d'ADN de type sauvage dans les recombinants amplifiés.

La PCR se fait avec une amorce dans le fragment L et une amorce dans le fragment R. Il s'agit d'amplifier l'ADN, du virus recombinant, de part et d'autre de la GFP. La différence de longueur du fragment amplifié chez le virus sauvage et chez le recombinant est de 750pb (correspondant à la GFP), elle est observable sur gel.

En raison des mauvais résultats obtenus en PCR, deux couples d'amorces sont utilisés : 5'L-Nhe1 et 3'R-Pst1 ou jlp-gauche et Zézette fin. L'amplicon sauvage est attendu aux alentours de 470pb avec le premier couple d'amorces (ou 950pb avec le 2^e couple) alors que le recombinant doit montrer un fragment de 1220pb (ou 1700pb). Si seul le long fragment est représenté alors le recombinant n'est pas contaminé par du virus sauvage.

La PCR utilisant les amorces 5'L Nhe1 et 3'R Pst1 montre que 3 recombinants J, K et M sont contaminés. L et N ne donnent aucun résultat avec ce couple d'amorces.

La PCR avec les amorces jlp-gauche et Zézette fin (figure 16) met en évidence la pureté du recombinant N (piste 6) et confirme la contamination de K et M (piste 3 et 5) par du virus sauvage. J et L (piste 2 et 4) ne donnent aucun résultat avec ce couple d'amorces.

Sur 5 recombinants testés en PCR, 1 recombinant pur est identifié (N) ; 3 recombinants (J, K et M) sont contaminés par du virus sauvage ; le 5^e (L) ne donne aucun résultat.

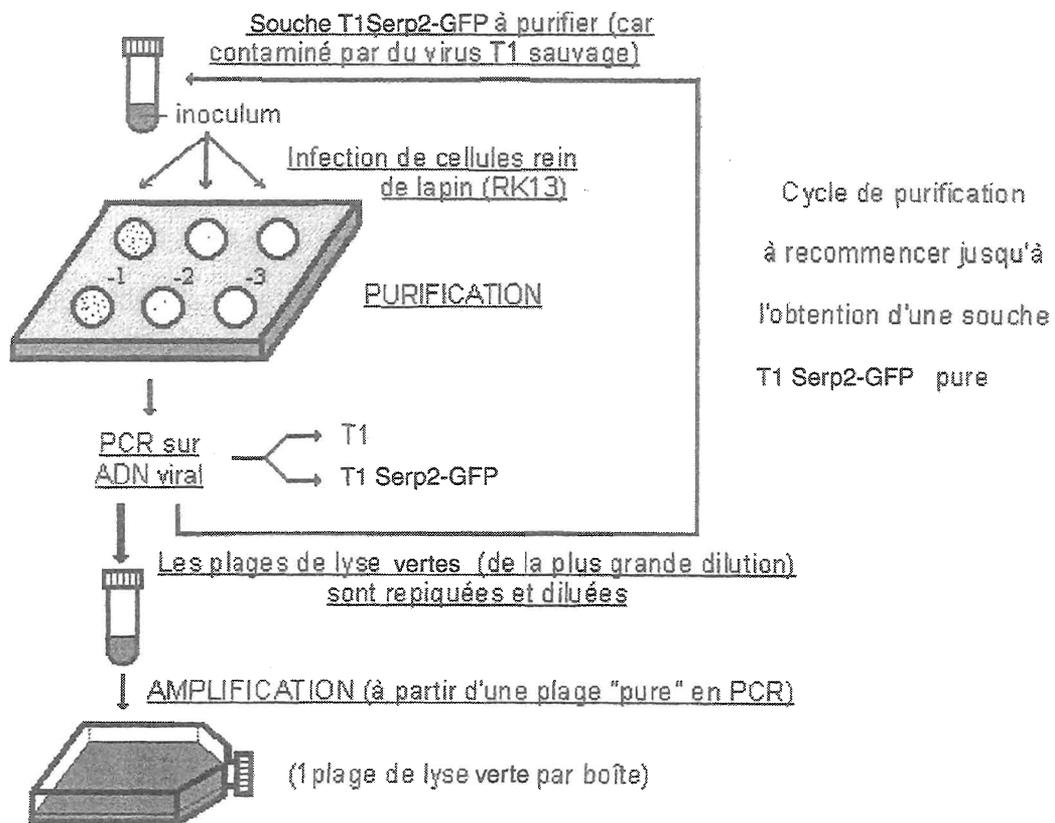


Figure 15 : Principe de la purification de la souche T1-[Serp2-GFP].

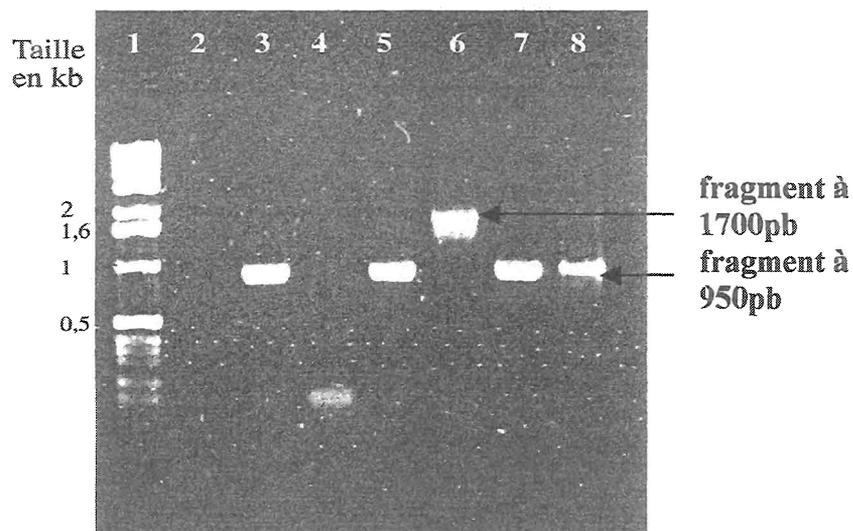


Figure 16 : Test de pureté par PCR.

Le premier puits contient le marqueur de poids moléculaire. Les pistes 2, 3, 4, 5 et 6 contiennent de l'ADN de J, K, L, M et N (plages vertes prélevées après 5 cycles de purification) amplifié avec les amorces jlp-gauche et Zézette fin. Les pistes 7 et 8 contiennent de l'ADN T1 qui sert de témoin positif.

6) EXPRESSION DE LA PROTEINE DE FUSION

La vérification de l'expression de la protéine de fusion portée par le virus recombinant, T1-[Serp2-GFP], s'effectue par immunoprécipitation.

Des cellules RK13 sont infectées par du virus T1, T1 Δ Serp2 et par du virus recombinant T1-[Serp2-GFP] (on utilise les recombinants N et L). On procède au marquage ³⁵S des protéines puis à l'immunoprécipitation avec du sérum anti-Serp2 issu de lapin.

Lors de la révélation du film, on observe une bande aux alentours de 60kDa, sur les 2 pistes contenant des protéines de cellules RK13 infectées par les virus recombinants N et L, qui correspond au poids moléculaire attendu pour la protéine de fusion Serp2-GFP. De plus, il n'y a pas de bande aux environs de 34kDa (Serp2 sauvage) sur ces deux pistes alors que cette bande apparaît sur la piste contenant des protéines de cellules RK13 infectées par du virus T1.

Deux virus recombinants T1-[Serp2-GFP], N et L, non contaminés par du virus sauvage et exprimant la protéine de fusion Serp2-GFP, sont obtenus.

7) FONCTIONNALITE DE LA PROTEINE DE FUSION

a) Test *in vivo* de fonctionnalité du recombinant :

Afin de vérifier que l'introduction de la séquence de la GFP sur le génome du virus myxomateux n'a pas entravé la fonctionnalité de Serp2, l'inoculation du virus recombinant T1-[Serp2-GFP] à des lapins, est réalisée. L'évolution de la maladie est comparée à celle d'un lot de lapins inoculés avec du virus sauvage et d'un lot inoculé avec du virus mutant délété en Serp2. Le but est de rapprocher, de l'une de ces deux évolutions, le lot de lapins inoculés avec le recombinant.

L'évolution clinique est suivie quotidiennement.



Photo 1 : Lapin à J12 post inoculation par du virus T1-[Serp2-GFP].

La photo 1 montre l'évolution de la maladie chez les lapins inoculés avec le virus recombinant. Les symptômes observés (blépharoconjonctivite, œdème génital) sont typiques de la myxomatose classique.

Tableau 3 : Comparaison clinique de l'infection par T1, T1ΔSerp2 et T1-[Serp2-GFP].

	Lot N°1 : deux lapins inoculés avec du virus T1	Lot N°2 : deux lapins inoculés avec du virus T1ΔSerp2	Lot N°3 : six lapins inoculés avec du virus T1-[Serp2-GFP]
J3 à J5	Les lésions sont localisées au point d'inoculation. Il n'y a pas de différence notable entre les trois lots de lapins à ce stade.		
J6 à J7	La lésion du point d'inoculation est ronde, chaude et œdémateuse. Une baisse de l'état général est observée (œdème génital, dyspnée).	La lésion du point d'inoculation est ronde, diffuse et de 3 cm de diamètre. L'état général est normal.	Les lapins du lot N°3 présentent, en majorité, un œdème génital et une respiration bruyante. Ils se différencient du lot N°2. Les symptômes se rapprochent de ceux observés dans le lot N°1.
J8	De très importantes surinfections bactériennes des muqueuses nasales entraînent une dyspnée profonde. Les animaux présentent une blépharoconjonctivite purulente.	L'inflammation est diffuse sur les oreilles. Il n'y a pas de surinfection bactérienne de l'appareil respiratoire. Les animaux présentent un début de blépharoconjonctivite.	Des écoulements purulents au niveau des muqueuses nasales et oculaires sont observés. L'appétit est très diminué et les animaux sont affaiblis.
J9 à J12	Les yeux sont fermés. Les myxomes secondaires apparaissent sur les oreilles, la face, le dos, les pattes et les organes génitaux. Les animaux sont prostrés et ne s'alimentent plus.	On observe des surinfections bactériennes des muqueuses nasales et respiratoires. Les myxomes secondaires sont absents ou très peu nombreux.	L'oreille droite est entièrement épaissie. Des myxomes secondaires apparaissent sur le pavillon ainsi que sur les pattes. L'œdème génital est très prononcé. Les yeux et les narines sont fermés par du pus. La respiration est difficile. Les animaux sont très abattus, l'appétit baisse et un faciès léonin est observé. A ce stade, l'évolution est typique de la myxomatose.
J13	100% de mortalité	On observe une régression des symptômes avec un taux de survie de 70%.	100% de mortalité

In vivo (tableau 3), le virus recombinant se comporte comme du virus sauvage et non comme T1ΔSerp2. L'introduction de la séquence de la GFP, sur le génome du virus myxomateux, n'empêche pas le fonctionnement de Serp2.

b) Résultats histologiques :

L'analyse histologique du myxome primaire (photo 2 A et C), prélevé à J8 sur des lapins infectés par du virus T1, révèle une dermatite périvasculaire marquée. Un œdème diffus et une mucinose sévère ainsi que des hémorragies interstitielles sont observés. Des cellules hétérophiles s'accumulent dans le myxome. En revanche, les myxomes primaires issus de lapins infectés par du virus T1ΔSerp2 (photo 2 B et D), sont moins développés que ceux du lot T1. Les lésions sont moins hémorragiques. La réaction inflammatoire passe rapidement en phase cellulaire. On constate une importante infiltration de cellules mononucléées (histiocytes et lymphocytes) à J8.

Les nœuds lymphatiques issus du lot infecté par T1, présentent une lymphadénite marquée avec la présence de myxomes secondaires alors que dans le lot T1 Δ Serp2, on constate une très forte diminution du nombre de lymphocytes et l'absence de myxomes secondaires.

L'analyse histologique des prélèvements effectués sur des lapins inoculés avec le virus recombinant T1-[Serp2-GFP], montre des lésions identiques à celles constatées sur le lot T1. Le virus recombinant se comporte comme le virus sauvage au niveau des tissus. L'introduction de la GFP sur le génome du virus myxomateux n'entrave pas le fonctionnement de Serp2. Le virus recombinant, T1-[Serp2-GFP], est un virus myxomateux de phénotype sauvage.

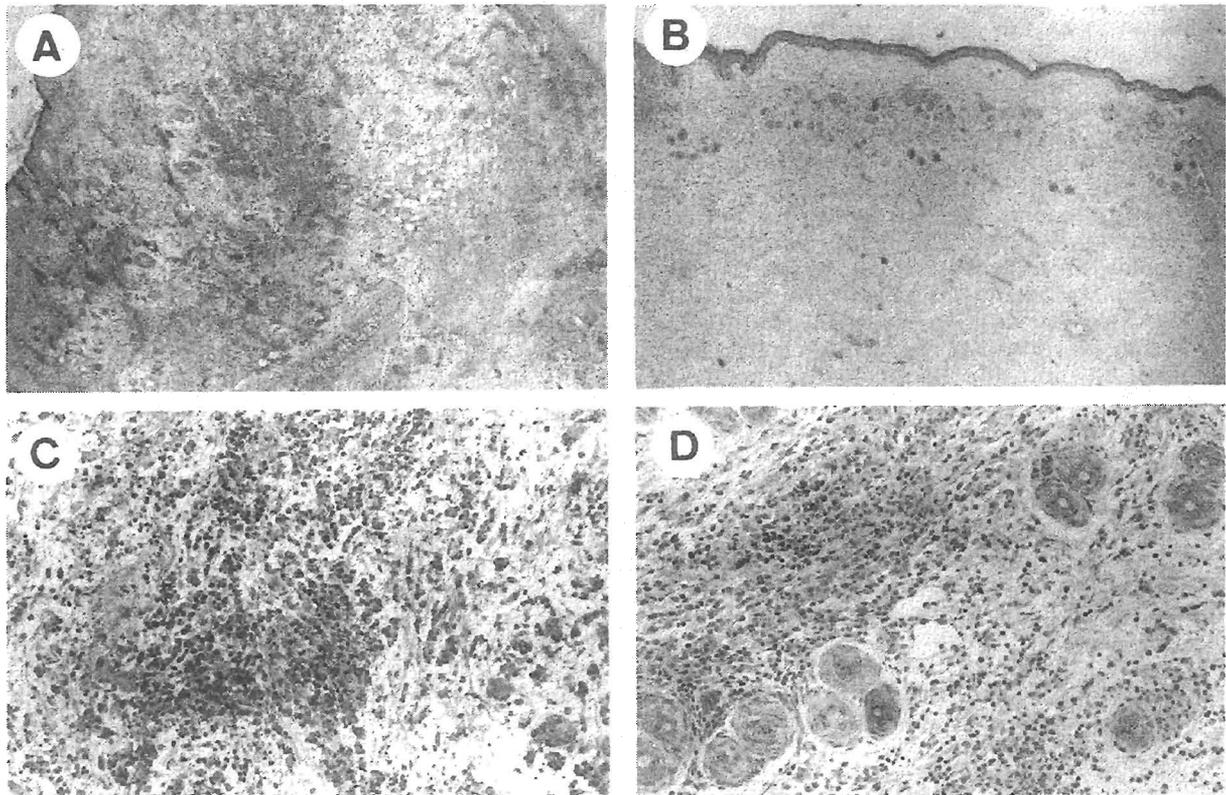


Photo 2 : Coupes histologiques de myxomes primaires à J8 post inoculation.

A et C : Myxomes de lapins infectés par du virus T1 ou T1-[Serp2-GFP].

B et D : Myxomes de lapins infectés par du virus T1 Δ Serp2.

8) UTILISATION DU VIRUS RECOMBINANT T1-[Serp2-GFP]

a) Microscopie confocale :

Après une infection par le virus myxomateux, l'ADN viral est transcrit puis traduit dans le cytoplasme de la cellule. Les protéines virales ainsi synthétisées se dirigent vers leurs cibles cellulaires. Le virus recombinant T1-[Serp2-GFP] permet la synthèse de la protéine Serp2 présentant une fluorescence verte et toutes ses capacités d'origine. L'observation de préparations de cellules, infectées par ce recombinant, au microscope confocal doit permettre de définir la destination cellulaire de Serp2. Les propriétés de Serp2 n'étant pas altérées par la

présence de la GFP, la destination de Serp2 du virus mutant ne doit pas être modifiée par rapport à la destination de la protéine Serp2 sauvage.

Deux labteks de cellules RK13 et deux de cellules Alexis sont préparées pour être infectées par du virus recombinant T1-[Serp2-GFP]. La cinétique de propagation du virus étant mal connue, les temps de fixation (T6h, T15h) sont choisis au hasard. L'observation des lames au microscope confocal permet de visualiser les différentes structures cellulaires ainsi que la fluorescence éventuelle de la GFP.

Il n'y a pratiquement pas de fluorescence spécifique sur les lames de cellules Alexis. Alors, on peut émettre deux hypothèses : soit les cellules Alexis ne sont pas des cibles du virus recombinant (ce qui est peu probable étant donné les caractéristiques de la maladie) soit les temps de fixation ne sont pas adaptés à la cinétique de propagation virale dans ce type cellulaire.

Sur les cellules RK13, la fluorescence est facilement observée. A T6h, Serp2 est cytoplasmique (elle n'a certainement pas encore interagit avec sa cible). A T15h, Serp2 est à nouveau cytoplasmique (l'interaction Serp2/cible a déjà eu lieu).

Les deux illustrations ci-dessous représentent des préparations de cellules RK13 infectées par du virus recombinant T1-[Serp2-GFP] et photographiées à T36h post infection : la fluorescence de la GFP est cytoplasmique.

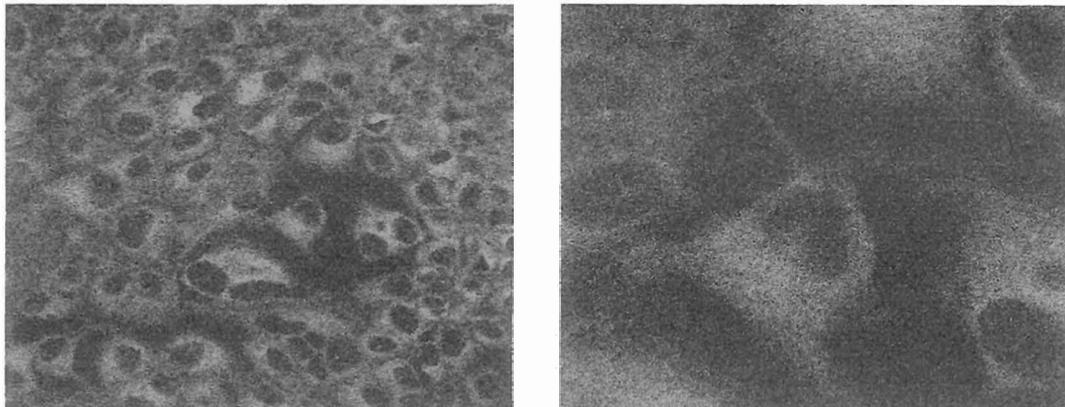


Photo 3 : Cellules RK13 infectées par du virus T1-[Serp2-GFP] à T36h post infection et observées au microscope confocal.

A gauche : Vision globale du tapis cellulaire.

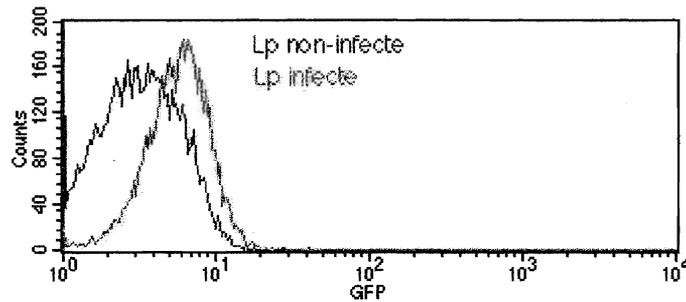
A droite : Fort grossissement.

b) Repérage des populations de cellules infectées en cytométrie de flux :

Afin d'approfondir les connaissances sur le tropisme cellulaire du virus myxomateux, des prises de sang sont réalisées, sur les lapins infectés par le virus recombinant, lors de l'expérience de suivi clinique (cf. 7a). Après une lyse des globules rouges les échantillons sont analysés par un cytomètre de flux (FACS Calibur TM de chez Becton Dickinson) pour mettre en évidence la fluorescence de la GFP, et donc la présence du virus, dans la lignée blanche. Les prises de sang sont réalisées à J3, J4, J10 et J12. Un échantillon de sang, prélevé sur un lapin sain, est lu au cytomètre afin de calibrer l'appareil, c'est à dire de fixer le seuil d'autofluorescence des cellules vierges. Le cytomètre permet de distinguer, en fonction de la taille et de la granulométrie, 3 types de populations cellulaires : les lymphocytes (au repos ou activés ; les lymphocytes activés et les monocytes sont confondus), les polynucléaires et les macrophages.

Lors des prises de sang réalisées à J3 et J4, une seule fluorescence est observée, il s'agit de l'autofluorescence des cellules. Il n'y a pas de fluorescence spécifique de la GFP.

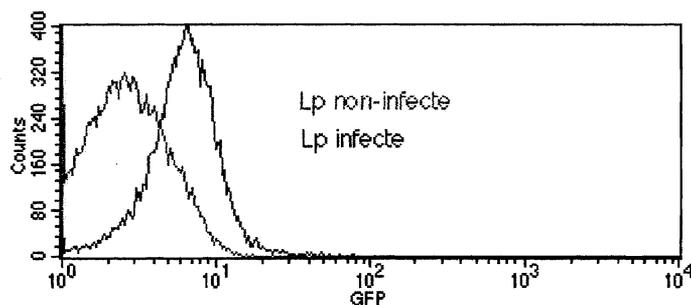
Lors des prises de sang réalisées à J10, les lymphocytes au repos ne présentent pas de fluorescence spécifique. Par contre, on note un net décalage entre le pic de fluorescence des lymphocytes activés/monocytes du lapin sain et le pic de fluorescence de ces cellules des lapins inoculés avec le recombinant (graphique 1). On peut donc conclure à la présence de virus recombinant soit dans l'un de ces deux types cellulaires soit dans les deux.



Graphique 1 : Comparaison de l'intensité de fluorescence des lymphocytes activés/monocytes d'un lapin non infecté et des lymphocytes activés/monocytes d'un lapin infecté par du virus recombinant à J10 post inoculation.

En abscisse, on mesure l'intensité de fluorescence et en ordonnée le nombre de cellules.

Les cellules du lapin sain (utilisées pour calibrer l'appareil) sont conservées pour être infectées par du virus recombinant *in vitro*. Puis, au bout de 24 heures, elles sont lues au cytomètre. On obtient alors deux signaux de fluorescence bien distincts (graphique 2). Le signal émis par la GFP se différencie nettement de l'autofluorescence des cellules. Les résultats quant aux types cellulaires infectés sont : 2.6% de lymphocytes au repos et 12.34% de lymphocytes activés (en effet le mode de culture fait que les monocytes restent collés au fond de la boîte et ne sont donc pas récupérés).



Graphique 2 : Comparaison de l'intensité de fluorescence de lymphocytes activés non infectés et de lymphocytes activés infectés *in vitro* par du virus recombinant.

En abscisse, on mesure l'intensité de fluorescence et en ordonnée le nombre de cellules.

Lors des prises de sang réalisées à J12, le décalage entre les deux pics de fluorescence est moins net qu'à J10. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les lapins sont dans le stade terminal de la maladie.

In vivo, le virus myxomateux présente un tropisme particulier pour les lymphocytes activés et/ou pour les monocytes. *In vitro*, le tropisme pour les lymphocytes activés est confirmé.

c) Comparaison du virus T1-[Serp2-GFP] avec un autre mutant, MV-LAP⁻:

Le gène MV-LAP est soupçonné d'être à l'origine d'une diminution du nombre des molécules du CMH1 à la surface des cellules infectées par le virus myxomateux (GUERIN et al, manuscrit en préparation). Afin de vérifier cette hypothèse, un virus mutant de phénotype MV-LAP⁻ est construit. Le gène MV-LAP est remplacé par le gène lacZ. Le gène lacZ présente l'avantage d'être repérable au cytomètre de flux (grâce à des anticorps anti-lacZ marqués). La lecture des échantillons de cellules infectées par le mutant lacZ permet d'obtenir le taux de molécules du CMH1 à la surface des cellules infectées par un virus de phénotype MV-LAP⁻. Ce taux doit être comparé à celui de cellules infectées par un virus de phénotype MV-LAP⁺ pour pouvoir conclure. Le virus mutant T1-[Serp2-GFP] est de phénotype MV-LAP⁺ et est repérable au cytomètre de flux grâce à la fluorescence FITC de la GFP. Le cytomètre peut ainsi mesurer le taux de molécules du CMH1 à la surface de cellules effectivement infectées par un virus MV-LAP⁺.

La comparaison entre les taux de molécules du CMH1 obtenus après infection par un virus MV-lacZ (de phénotype MV-LAP⁻) et un virus T1-[Serp2-GFP] (de phénotype MV-LAP⁺) permet de démontrer l'intervention du gène MV-LAP dans la régulation du nombre des molécules du CMH1 à la surface des cellules infectées par du virus myxomateux.

La construction d'un virus recombinant T1-[Serp2-GFP] fournit un nouvel outil de recherche très intéressant. En effet, les propriétés de fluorescence de la GFP permettent de repérer la présence du virus dans une cellule [16]. Ce repérage peut se faire avec différents appareils : un microscope confocal, un microscope à fluorescence (la GFP est visible à une longueur d'onde de 488nm) ou un cytomètre de flux (fluorescence de la GFP en FITC). Ces deux derniers appareils sont facilement accessibles contrairement au microscope confocal. Le microscope à fluorescence ne permet que l'observation de cultures monocouches de cellules fixées sur un support. Le cytomètre permet, lui, de lire des échantillons de cellules en suspension ce qui élargit le nombre de types cellulaires pouvant être analysés. Le cytomètre trie les types cellulaires et compte les cellules. Cela permet d'aboutir rapidement au pourcentage de cellules infectées par le virus recombinant dans tel ou tel type cellulaire.

De plus, l'introduction de la séquence de la GFP sur le génome du virus myxomateux ne modifie pas le pouvoir pathogène. *In vivo*, le virus myxomateux recombinant présente la virulence du type sauvage. La pureté du virus recombinant est avérée, la similitude du comportement des deux virus ne peut pas être due à une contamination du virus recombinant par le virus sauvage.

Ce virus recombinant va permettre d'approfondir les connaissances sur le tropisme cellulaire du virus myxomateux [67].

T1-[Serp2-GFP] a déjà été utilisé pour élucider le rôle de MV-LAP, un nouveau facteur de virulence du virus myxomateux (GUERIN et al, manuscrit en préparation).

9) PRODUCTION ET UTILISATION D'ANTICORPS ANTI-SERP2

a) Production d'anticorps anti-Serp2 et vérification de leur efficacité :

Une protéine Serp2, produite en baculovirus, est disponible au laboratoire. Elle est purifiée puis analysée sur gel de protéine pour vérifier son intégrité (poids moléculaire). On obtient une bande juste au-dessus de 32.7kDa qui correspond au poids moléculaire attendu pour Serp2 (figure 17). La protéine purifiée est ensuite dosée par la méthode de Bradford, on obtient une concentration de 5.3mg/ml. La quantité de départ était de 8mg donc il y a eu

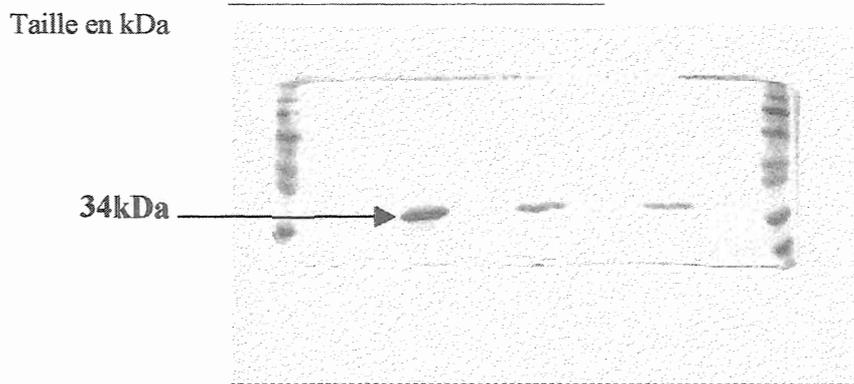


Figure 17 : Gel d'électrophorèse de la protéine Serp2 purifiée.

beaucoup de pertes au cours des rinçages successifs. Deux lapins et un mouton reçoivent la protéine purifiée. Un mois après la troisième injection, leurs sérums sont récoltés et testés en Western Blot pour leur capacité à reconnaître Serp2 virale.

Il s'agit de repérer une bande présente avec le cytosol de cellules infectées T1, absente sur les autres cytosols (cellules non infectées et cellules infectées T1 Δ Serp2) et qui se situe aux alentours de 34kDa. Aucune bande spécifique n'est observée ni avec les sérums de lapins ni avec le sérum de mouton (malgré la concentration des cytosols avant de tester le sérum de mouton). Un important bruit de fond est observé avec les sérums immuns.

Les quantités de protéines déposées sont peut-être insuffisantes ou les cytosols 10 heures ne permettent pas une synthèse de Serp2 assez importante pour pouvoir réagir. On ne sait pas non plus si l'anticorps apparaît bien en Western Blot. La dernière hypothèse est que Serp2 n'est peut-être pas immunogène.

Il faut donc tester l'anticorps avec la protéine qui a servi à sa production.

Deux quantités de Serp2 purifiée sont déposées sur un gel d'électrophorèse. Le Western Blot est réalisé avec les deux sérums de lapins, avec un sérum polyclonal anti-myxomatose (issu de lapin) et avec le sérum de mouton.

Cette fois on observe 2 bandes (avec les sérums de lapin et avec le sérum de mouton) : une bande aux alentours de 27kDa pouvant être une forme dégradée de Serp2, et une autre bande aux environs de 66kDa pouvant être un dimère de Serp2. On peut donc repousser les deux dernières hypothèses : Serp2 est immunogène et l'anticorps anti-Serp2 apparaît bien en Western Blot.

b) Utilisation des anticorps :

Une immunoprécipitation est réalisée dans deux types cellulaires (RK13 et Alexis), infectés par le virus sauvage T1 ou par le virus T1 Δ Serp2 (figure 18). Le virus mutant Serp2⁻ permet de révéler les interactions antigènes-anticorps non spécifiques ; donc seules les bandes n'apparaissant qu'avec le virus T1 représentent des cibles potentielles de Serp2. L'incertitude quant à la capacité des anticorps anti-Serp2, à reconnaître Serp2 virale, est levée par l'utilisation, en parallèle, d'anticorps polyclonaux anti-myxomatose.

Après le marquage des protéines virales à la ³⁵S méthionine, tous les échantillons sont renaturés par du DTT. Le DTT est un protecteur des groupements thiols. Ces groupements jouent un rôle important dans le repliement de Serp2 et sont donc essentiels pour conserver la capacité de Serp2 à interagir avec sa cible.

Sur les pistes correspondant aux cellules RK13, on observe un doublet migrant à 33 et 35 kDa pour les cellules infectées par du virus T1 et qui est absent sur les pistes de cellules RK13 infectées T1 Δ Serp2. Ces 2 bandes correspondent aux poids moléculaires attendus pour Serp2 et sa forme clivée (après interaction avec sa cible). Aucune autre bande spécifique n'est observée sur les pistes correspondant au virus T1.

Les cellules RK13 possèdent la cible de Serp2 mais l'immunoprécipitation des protéines en RIPA ne permet pas de conserver les interactions serpin/cible et donc d'identifier la (ou les) cible(s).

Sur les pistes correspondant aux cellules Alexis infectées T1, le doublet 33/35kDa n'est pas observé. Cela fait place à deux hypothèses : soit les cellules Alexis ne possèdent pas la cible de Serp2, soit la différence de cinétique de propagation virale entre les cellules RK13 et Alexis explique cette absence (le signal, plus précoce dans les cellules Alexis a déjà disparu).

L'immunoprécipitation en RIPA ne donne pas de résultat quant aux cibles potentielles de Serp2, une autre stratégie est adoptée en utilisant directement Serp2 radiomarquée.

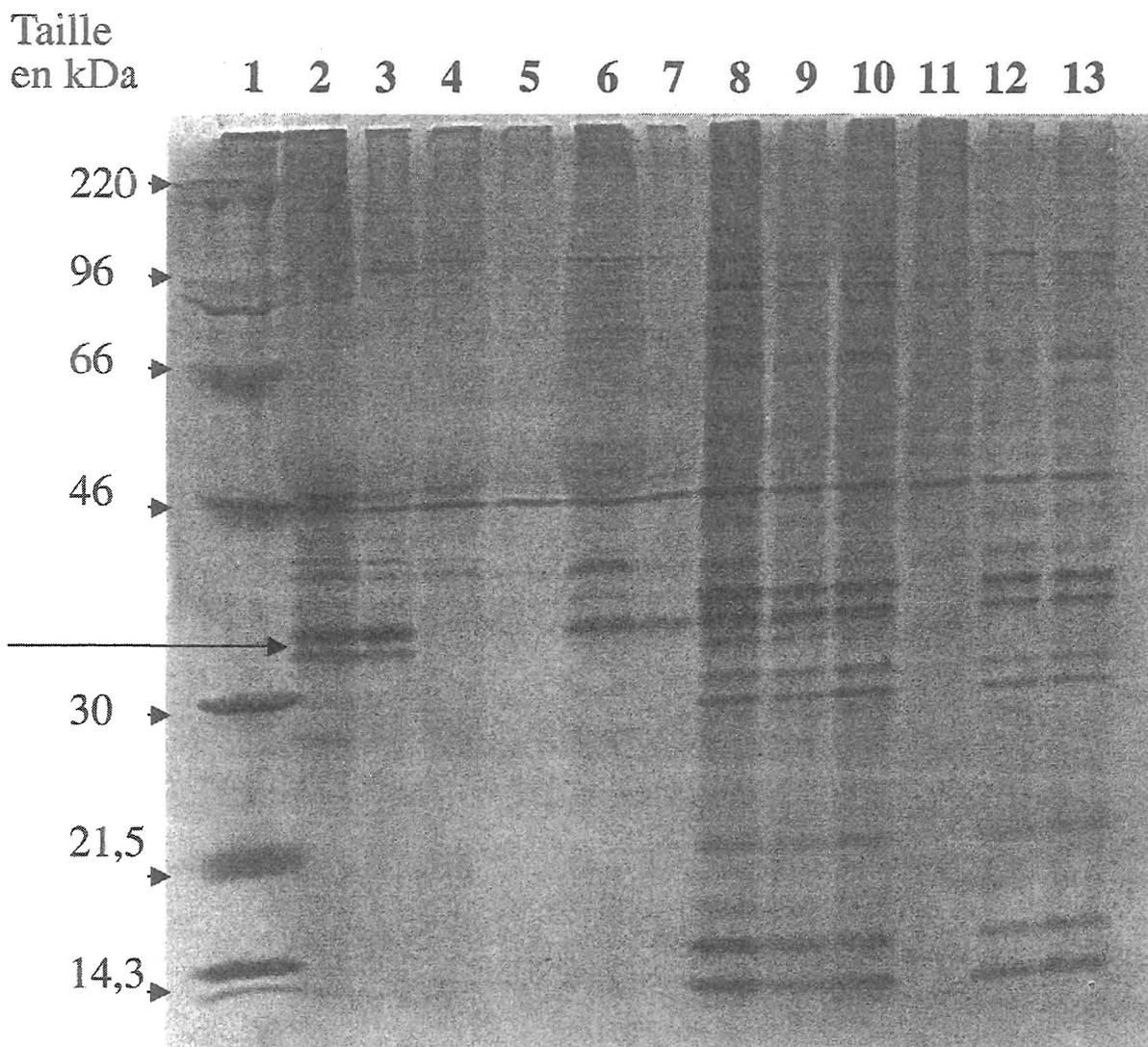


Figure 18 : Immunoprécipitation de protéines en RIPA.

La piste 1 contient un marqueur de poids moléculaire. Les pistes 2 et 3 contiennent des protéines de cellules RK13 infectées par du virus T1 (piste 3 : l'échantillon est rincé) ; la piste 4 des protéines de cellules RK13 infectées par du virus T1 Δ Serp2 ; la piste 5 sert de témoin (cellules RK13 non infectées) ; les pistes 6 et 7 contiennent des protéines de cellules Alexis infectées par du virus T1 (piste 7 : l'échantillon est rincé). Les pistes 2 à 7 sont immunoprécipitées par un anticorps anti-Serp2 de lapin. Les pistes 8 à 13 contiennent les mêmes échantillons mais l'immunoprécipitation se fait avec un anticorps anti-T1.

Une autre immunoprécipitation (figure 19) [15], réalisée avec du tampon NP40, permet de révéler des cibles potentielles de Serp2. Les pistes impaires contiennent des protéines de cellules RK13 infectées T1 et les pistes paires des protéines de cellules RK13 infectées T1 Δ Serp2. Les pistes 1 et 2 (tampon RIPA) servent de témoins.

La piste 3 présente des bandes à 43, 37, 20 et 16kDa qui sont absentes sur la piste 4. Ces protéines ont des poids moléculaires correspondants à ceux de certaines caspases [17] : 10, 16 ou 20kDa pour ICE ou caspase1 ; 35 ou 37kDa pour la caspase9 ; 43kDa pour la caspase8. Les caspases sont une famille de protéases dont le site actif contient une cystéine et

dont la cible protéique contient un acide aspartique. Les caspases interviennent dans le déroulement de la cascade protéolytique conduisant à l'apoptose.

Les pistes 5 et 6 (tampon NP+DMS) montrent que le cross-linking ne fait pas apparaître de cibles supplémentaires.

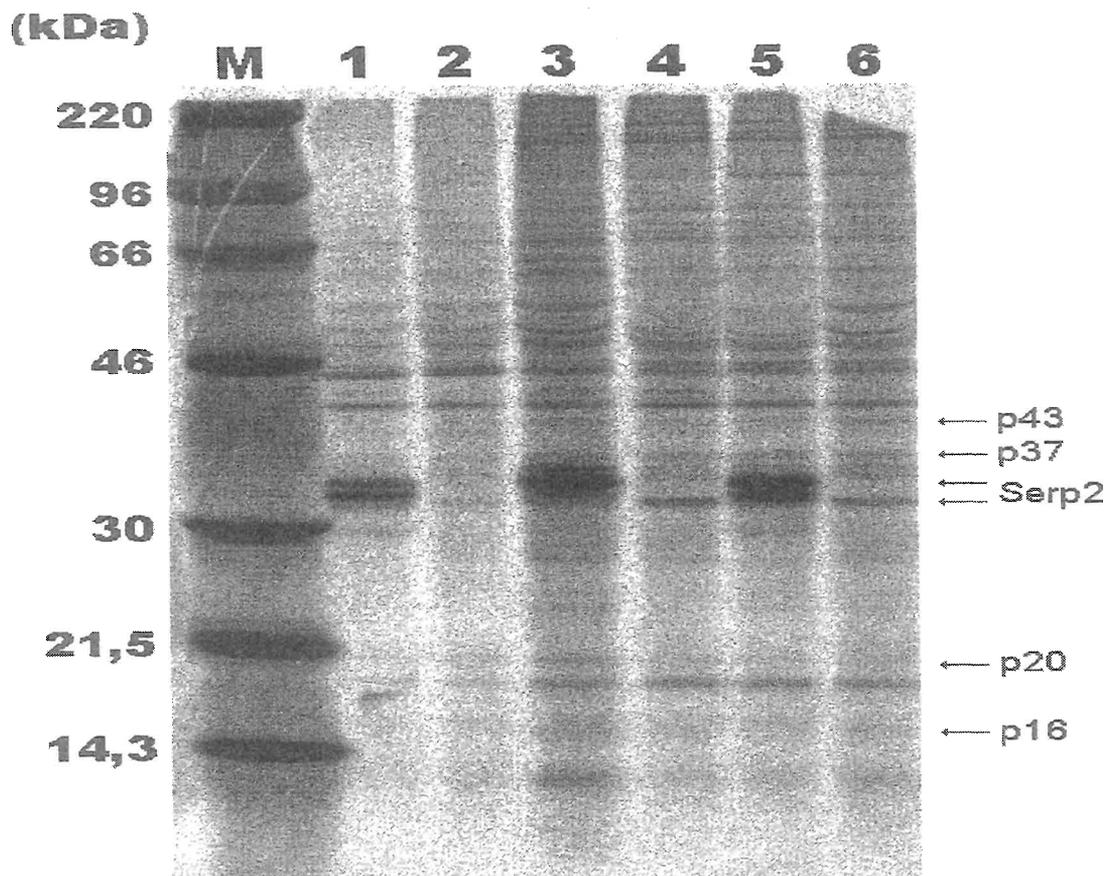


Figure 19 : Immunoprécipitation de Serp2 et de ses cibles à partir de cellules RK13 [15]. La piste 1 contient un marqueur de poids moléculaire. Les protéines de cellules RK13 infectées par du virus T1 (pistes 1, 3 et 5) ou du virus T1ΔSerp2 (pistes 2, 4 et 6) sont marquées à la ³⁵S méthionine et immunoprécipitées avec un anticorps anti-Serp2. Les tampons utilisés sont le RIPA dans les pistes 1 et 2 et le NP40 dans les pistes 3, 4, 5 et 6 ; Le DMS est utilisé pour réaliser un cross-linking (pistes 5 et 6).

10) REPERER LES PROTEINES CIBLES GRACE A SERP2 RADIOMARQUEE

a) Transcription/traduction in vitro de Serp2 radiomarquée, Serp2* :

Une quantité satisfaisante de Serp2 radiomarquée (Serp2*) est obtenue. La transcription/traduction de luciférase (61kDa, contrôle négatif) est correcte mais moins efficace que celle de Serp2 car il y a beaucoup de radioactivité libre.

b) Utilisation de Serp2* :

Différents échantillons protéiques cellulaires sont mis en contact avec Serp2*. Trois expériences permettant des interactions protéines/protéines ont été réalisées : un Dot Blot et

un Far Western (interactions sur membrane de nitrocellulose et membrane PVDF) et une interaction protéine/protéine en milieu liquide suivie d'une migration sur gel non dénaturant.

Lors de la réalisation d'un Dot Blot et d'un Far Western, les protéines sont déposées sur une membrane puis sont mises en contact avec Serp2*. L'inconvénient principal du Far Western est que les protéines cibles migrent sur un gel dénaturant (afin d'effectuer une séparation par les poids moléculaires). Cette dénaturation risque d'empêcher Serp2* de se fixer à sa cible. Cet inconvénient est évité lors de la réalisation d'un Dot Blot.

Dans la dernière expérience, les interactions Serp2*/protéines ont lieu en milieu liquide puis les éventuels complexes sont déposés sur un gel non dénaturant (sans SDS), les interactions Serp2*/cibles ne sont théoriquement pas gênées mais aucun poids moléculaire de cible ne peut-être avancé.

- Dot Blot :

Des préparations de membranes solubilisées de cellules RK13 et Alexis, activées ou non par du LPS, sont déposées sur une membrane de nitrocellulose pour réagir en Dot Blot avec Serp2*. En parallèle, les mêmes échantillons sont mis en contact avec de la luciférase* pour mettre en évidence les interactions non spécifiques.

Des problèmes techniques étant survenus au cours de la réalisation de la manipulation, aucune interaction visible n'a été observée. La manipulation n'a pas été refaite dans des conditions satisfaisantes dans le temps imparti. Les résultats ne sont pas interprétables.

- Far Western :

Des préparations de membranes et de cytosols sont testées en Far Western. Les échantillons sont élaborés à partir de cellules RK13 et Alexis. Les flacons sont soit simplement activés par du LPS soit infectés avec du virus T1ΔSerp2 afin que la cible de Serp2 reste disponible pour Serp2*. Tous les échantillons obtenus sont concentrés à l'aide du kit Centricon YM-3 (pour retenir les protéines de faible poids moléculaires) avant le Far Western.

Aucune bande spécifique n'est observée après un mois d'exposition du film quelle que soit la piste observée. Aucune hypothèse concernant le type cellulaire (RK13 et/ou Alexis), le compartiment cellulaire (cytosol et/ou membrane) ou le poids moléculaire de la cible de Serp2 ne peut être proposée.

- Interactions protéine/protéine en milieu liquide :

N'ayant obtenu aucun résultat en Far western, une autre manipulation, permettant cette fois des interactions protéine/protéine en milieu liquide, est exécutée avec ces mêmes échantillons.

Les complexes serpin/cibles migrent sur gel non dénaturant. La dernière piste contient uniquement Serp2* afin d'avoir une indication sur la migration Serp2 libre. Il s'agit de repérer le type de cellule ainsi que le compartiment cellulaire contenant la cible de Serp2. Le gel non dénaturant (sans SDS) ne permet pas de linéariser les protéines et donc ne les sépare pas selon leurs poids moléculaires.

Aucune bande particulière n'apparaît pour l'une des pistes.

Les techniques d'interaction protéine/protéine utilisées ici (Dot Blot, Far Western, interaction en milieu liquide) ne révèlent aucune cible potentielle pour Serp2.

Il existe un autre moyen d'étudier les partenaires de Serp2 : le BIACORE (figure 20) [21]. La protéine à étudier est fixée par des anticorps sur une plaque de verre recouverte d'un film d'or. La plaque de verre est mise en contact avec une phase liquide contenant des cibles potentielles de la protéine à étudier. Un faisceau lumineux, émis par l'appareil, interagit avec le film d'or recouvrant la plaque de verre. Un faisceau réfléchi est réémis et sa position, analysée par ordinateur, dépend des interactions moléculaires entre la protéine à étudier et des biomolécules cibles.

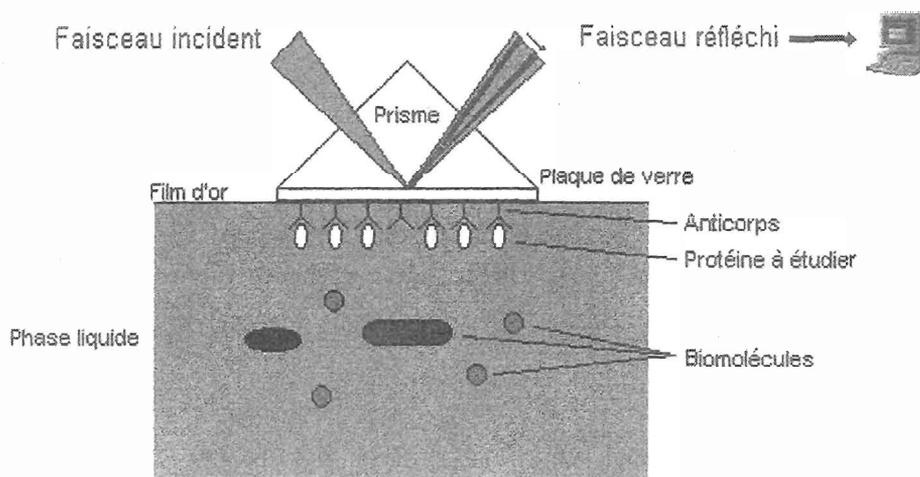


Figure 20 : Principe du biacore.

11) CINÉTIQUE COMPARATIVE SUR FIBROBLASTES PRIMAIRES DE LAPINS INFECTÉS T1 ET T1ΔSerp2

Les fibroblastes primaires apparaissent comme une cible fort probable du virus myxomateux (les régions cutanées du lapin sont très touchées par la maladie).

Une comparaison de la cinétique de propagation virale des souches T1 et T1ΔSerp2, sur ce type cellulaire, est réalisée. Il s'agit de mettre en évidence une différence significative entre les cinétiques de propagation virale des souches T1 et T1ΔSerp2 sur les fibroblastes primaires.

Le titrage de la cinétique donne des résultats aberrants. Cependant, avant d'être placée au congélateur chaque boîte est observée au microscope. Une souffrance nettement plus marquée des fibroblastes primaires infectés par T1ΔSerp2 est constatée. Cette remarque est compatible avec l'hypothèse que Serp2 intervient pour bloquer les mécanismes d'apoptose cellulaire faisant suite à une infection virale. Afin de vérifier cette théorie, des comparaisons du taux d'apoptose des fibroblastes primaires infectés par le virus T1, T1ΔSerp2 ou T1-[Serp2-GFP] sont effectuées par la méthode TUNEL et par cytométrie de flux.

12) MESURE D' APOPTOSE SUR FIBROBLASTES PRIMAIRES DE LAPINS INFECTES T1, T1ΔSerp2 ET T1[Serp2-GFP]

a) Mesure d'apoptose sur lame :

Des manipulations sont réalisées sur des labteks de cellules Alexis afin de comparer le taux d'apoptose par la méthode TUNEL lors d'infection par le virus T1, T1ΔSerp2 ou T1-[Serp2-GFP].

Le TUNEL confirme la différence significative entre les taux d'apoptose des fibroblastes infectés par le virus T1 et ceux infectés par le virus T1ΔSerp2. Les fibroblastes primaires infectés par T1ΔSerp2 présentent un taux d'apoptose beaucoup plus élevé que ceux infectés par T1.

L'hypothèse de départ pour le virus recombinant T1-[Serp2-GFP] est que si Serp2 est fonctionnelle alors le virus recombinant se comporte comme du virus sauvage en inhibant l'apoptose des cellules infectées.

Les résultats du TUNEL réalisé sur des fibroblastes primaires infectés par du virus T1-[Serp2-GFP] ne sont pas interprétables. Le comportement du virus recombinant T1-[Serp2-GFP] ne peut pas être rapproché de celui de T1 ou de T1ΔSerp2.

La différence d'apoptose, mesurée en TUNEL, sur les fibroblastes primaires infectés T1 et T1ΔSerp2 montre que ces cellules possèdent la cible de Serp2. Cependant, les incertitudes persistant sur la cinétique de propagation virale, ont entravé les manipulations de mise en évidence de la cible. L'immunoprécipitation de protéines de cellules Alexis infectées par T1, ne révèle aucune bande aux alentours de 33/35kDa. Le signal de Serp2 semble déjà avoir disparu. Ce problème pourra être contourné par une meilleure connaissance de la cinétique de propagation virale sur les fibroblastes primaires.

b) Mesure d'apoptose en milieu liquide :

Des flacons, F25, de fibroblastes primaires sont infectés puis ils sont récoltés et marqués à l'annexinV/7AAD. L'annexinV/7AAD est un marqueur d'apoptose précoce dont l'immunofluorescence FITC est détectée au cytomètre de flux.

Le mode de récolte par grattage du flacon ne permet pas d'obtenir de cellules dans l'échantillon non infecté non marqué. Le cytomètre ne peut pas être calibré. Les mesures sont donc impossibles. Il faut récolter les cellules non infectées d'une autre façon (la trypsination est à envisager).

La poursuite des recherches, sur les cibles cellulaires de Serp2, nécessite tout d'abord de recommencer les manipulations de mesures comparatives du taux d'apoptose et de la cinétique de propagation virale des différentes souches en notre possession ainsi que la mise en œuvre de nouvelles techniques telles que le BIACORE. Une fois la protéine cible repérée, elle pourra faire l'objet d'un microséquençage afin de découvrir le gène correspondant. La maîtrise de techniques performantes de mesure des interactions protéine/protéine permettra d'authentifier la cible de Serp2. Le virus mutant T1ΔSerp2 fournira un témoin négatif.

CONCLUSION

Afin d'approfondir les connaissances sur les cibles cellulaires de Serp2, nous avons construit un nouvel outil de recherche : un virus recombinant T1-[Serp2-GFP]. Les propriétés de fluorescence de la GFP permettent de repérer la protéine de fusion dans la cellule.

La construction du virus recombinant T1-[Serp2-GFP] est réussie car ce virus, parfaitement pur, possède, *in vivo*, la même virulence que le virus myxomateux sauvage T1.

Par contre, le suivi de la fluorescence de la GFP n'a pas encore abouti car la cinétique de propagation virale, selon les types cellulaires, doit être élucidée pour pouvoir utiliser pleinement les capacités du virus recombinant T1-[Serp2-GFP].

La construction d'un virus recombinant T1-[Serp2-GFP] fournit un nouvel outil de recherche très intéressant. Ce virus recombinant va permettre d'approfondir les connaissances sur le tropisme cellulaire du virus myxomateux. De plus, le virus recombinant présente un phénotype sauvage repérable grâce à la GFP, et peut donc servir de « témoin d'infection par du virus T1 » dans l'étude d'autres facteurs de virulence.

Les techniques d'interaction protéine/protéine, sur membrane ou en milieu liquide, utilisant Serp2 radiomarquée n'apportent aucune réponse quant aux cibles potentielles de Serp2. Mais l'immunoprécipitation de protéines marquées donnent quelques indications sur les cibles potentielles. La poursuite de l'identification passe par la mise en œuvre d'une manipulation permettant d'identifier la cible en spectrométrie de masse et de mesurer les constantes d'association et de dissociation de l'interaction Serp2-cible. C'est le principe du BIACORE. Une fois les contraintes techniques contournées, cette manipulation pourra apporter les réponses attendues pour Serp2 mais également pour d'autres facteurs de pathogénicité tels que Serp3.

L'étude des facteurs de pathogénicité du virus myxomateux permet de mieux appréhender au final les mécanismes d'interaction hôte-microorganismes. D'un point de vue pratique, l'étude de tels mécanismes permet d'élaborer de nouvelles stratégies antivirales. Il est même envisageable d'utiliser des fonctions virales comme outils en médecine. Ce genre d'approche a été réalisée avec succès pour SERP1 dont les propriétés anti-inflammatoire sont utilisées dans le traitement de l'athérosclérose et de l'arthrite. Même si le niveau d'intervention de Serp2 dans la cascade protéolytique de l'apoptose demeure inconnu, le rôle majeur de Serp2 en tant qu'inhibiteur de l'apoptose est indéniable ; l'utilisation de Serp2 comme anti-apoptotique, en médecine humaine, est un des objectifs à long terme du laboratoire.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle DELANNAY Anne

a été admis(e) sur concours en : 1994

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 8 juillet 1999

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, F. MESSUD-PETIT, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, déclare que j'ai lu la thèse de :

Mlle DELANNAY Anne

intitulée :

Construction et caractérisation d'un virus myxomateux exprimant une protéine de fusion Serp2-GFP : à la poursuite du virus vert.

et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Docteur F. MESSUD-PETIT

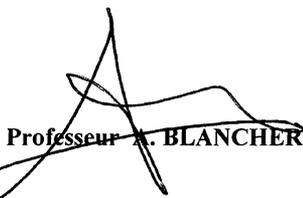
Vu :

**Le Directeur par intérim
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



Professeur Gilbert BONNES

**Vu :
Le Président de la thèse :**



Professeur A. BLANCHER

**Vu le 10 mai 2001
Le Président
de l'Université Paul Sabatier**



Professeur R. BASTIDE



Références bibliographiques :

1. BAGGLIONI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 1998, **392**, 436-445.
2. BARRY, M., LEE, S.F., BOSHKOV, L. *et al.* Myxoma virus induces extensive CD4 down regulation and dissociation of p56^{lck} in infected rabbit CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.*, 1995, **69**, 5243-5251.
3. BARRY, M., HNATIUK, S., MOSSMAN, K. *et al.* The myxoma virus M-T4 gene encodes a novel RDEL-containing protein that is retained within the endoplasmic reticulum and is important for the productive infection of lymphocytes. *Virology*, 1997, **239**, 360-377.
4. BLACK, P., CONDIT, R.C. Phenotypic characterization of mutants in vaccinia virus gene G2R, a putative transcription elongation factor. *J. Virol.*, 1996, **70**, 47-54.
5. BOSHKOV, L.K., MACEN, J.L., McFADDEN, G. Virus-induced loss of class I MCH antigens from the surface of cells infected with myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus. *J. Immunol.*, 1992, **148**, 881-887.
6. BROOKS, M.A., ALI, A.N., TURNER, P.C. *et al.* A rabbit virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells. *J. Virol.*, 1995, **69**, 7688-7698.
7. BROWN, J.P., TWARDZIK, D.R., MARQUARDT, H. *et al.* Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature*, 1985, **313**, 491-492.
8. BULLER, R.M.L., PALUMBO, G. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, 1991, **55**, 80-122.
9. CARPENTER, G., WHAL, M.L. The epidermal growth factor family. In : SPORN, M.B., ROBERTS, A.B. Peptide growth factors and their receptors. Ed. Springer Verlag, 1991, 69-170.
10. CARREL, R.W., TRAVIS, J. Alpha-1-antitrypsin and the serpins : variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.*, 1985, **10**, 20-24.
11. CHANG, A., METZ, D.H. Further investigations on the mode of entry of vaccinia virus into cells. *J. Gen. Virol.*, 1976, **32**, 275.
12. CHANG, W., UPTON, C., HU, S.L. *et al.* The genome of the Shope fibroma virus, a tumorigenic poxvirus, contains a growth factor gene with sequence similarity to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, **7**, 535-540.
13. DALES, S., KAJIOKA, R. The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells. I. Uptake and penetration. *Virology*, 1964, **24**, 278.
14. DENEUVILLE, F.P.J. Etude biochimique de Serp2, une serpin du virus myxomateux. Th. Med. Vet. : Toulouse : 1997-TOU 3, 4060.

15. DIAS, M. Serpins intracellulaires produites par le virus myxomateux : où ? Quand ? Pourquoi ? (Et comment le savoir ?) Mémoire de DEA de microbiologie, 2001, Toulouse III.
16. DOMINGUEZ, J., DEL MAR LORENZO, M., BLASCO, R. Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 1998, **220**, 115-121.
17. EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M., KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases : structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, **68**, 383-424.
18. ENGH, R.A., SCHULZE, A.J., HUBER, R. *et al.* Serpin structures. *W. Behring Inst. Mitt.*, 1993, **93**, 41-62.
19. ENGH, R.A., HUBER, R., BODE, W. *et al.* Divining the serpin inhibition mechanism : a suicide substrate “springe”? *Tibtech*, 1995, **13**, 503-510.
20. FENNER, F., BURNETT, F.M. A short description of the poxvirus group (vaccinia and related viruses). *Virology*, 1957, **4**, 305-314.
21. FIVASH, M., TOWLER, E.M., FISHER, R.J. Biacore for macromolecular interaction. *Curr. Opin Biotechnol.*, 1998, **9**, 97-101.
22. FLETTERICK, R.J., McGRATH, M.E. Deconvoluting serpins. *Structural Biology*, 1994, **1**, n° 4, 201-203.
23. GETTINS, P., PATSTON, P.A., SCHAPIRA, M. The role of conformational change in serpin structure and function. *Bioessays*, 1993, **15**, n° 7, 461-467.
24. GRAHAM, K.A., OPGENORTH, A., UPTON, C. *et al.* Myxoma virus M11L ORF encodes a protein for which cell surface localization is critical for manifestation of viral virulence. *Virology*, 1992, **191**, 112-124.
25. GRAHAM, K.A., LALANI, A.S., MACEN, J.L. *et al.* The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology*, 1997, **229**, 12-24.
26. GUERIN, J.L., GELFI, J., CAMUS, C. *et al.* Characterization and functional analysis of Serp3: a novel myxoma virus-encoded serpin involved in virulence. *J. Gen. Virol.*, (sous presse).
27. HOWARD, S.T., CHAN, Y.C., SMITH, G.L. Vaccinia virus homologues of the Shope fibroma virus inverted terminal repeat proteins and a discontinuous ORF related to the tumor necrosis factor receptor family. *Virology*, 1991, **180**, 633-647.
28. HSIAO, CHUNG, CHANG. A27 protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparin sulfate. *J. Virol.*, 1998, 1577-1585.
29. HSIAO, CHUNG, CHANG. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of IMV to cells. *J. Virol.*, 1999, 8750-8761.

30. HU, F.-Q., SMITH, C.A., PICKUP, D.J. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the Type II TNF receptor. *Virology*, 1994, **204**, 343-356.
31. KETTLE, S., BLAKE, N.W., LAW, K.M. *et al.* Vaccinia virus serpins B13R (SPI-2) and B22R (SPI1) encode Mr38.5 and 40K, intracellular polypeptides that do not affect virus virulence in a murine intranasal model. *Virology*, 1995, **206**, 136-147.
32. KOMIYAMA, T., RAY, C.A., PICKUP, D.J. *et al.* Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, n $^{\circ}$ 30, 19331-19337.
33. LALANI, A.S., GRAHAM, K., MOSSMAN, K. *et al.* The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J. Virol.*, 1997, **71**, 4356-4363.
34. LALANI, A.S. *et al.* Functional comparisons among members of the poxvirus T1/35kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Virology*, 1998, **250**, 173-184.
35. LALANI, A.S., MASTERS, J.M., GRAHAM, K. *et al.* Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology*, 1999, **256**, 233-245.
36. LAURENCE, D.J.R., GUSTERSON, B.A. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organisms and in cancer cells. *Tumor Biol.*, 1990, **11**, 229-261.
37. LAW, K.M., SMITH, G.L. A vaccinia serine protease inhibitor which prevents virus-induced cell fusion. *J. Gen. Virol.*, 1992, **73**, 549-557.
38. LOMAS, D.A., EVANS, D.L., UPTON, C. *et al.* Inhibition of plasmin, urokinase, tissue plasminogen activator, and C_{1s} by a myxoma virus serine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 516-521.
39. LUSTER, A.D. Chemokines : chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338**, 436-445.
40. MACEN, J.L., UPTON, C., NATION, N. *et al.* SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation. *Virology*, 1993, **195**, 348-363.
41. MACEN, J.L., GRAHAM, K.A., LEE, S.F. *et al.* Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor homologue (T2) and *MILL* genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T-lymphocytes. *Virology*, 1996, **218**, 232-237.
42. MACEN, J.L., GARNER, R.S., MUSY, P.Y. *et al.* Differential inhibition of the Fas and granule-mediated cytotoxicity pathways by the orthopoxvirus cytokine response modifier A/SPI-2 and SPI-1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 9108-9113.

43. MAURIN. Caractères généraux des poxviridés en virologie médicale. *Médecine Science Flammarion*, 1985, 310-319.
44. McFADDEN, G., BARRY, M. How poxviruses oppose apoptosis. *Semin. Virol.*, 1998, **8**, 429-442.
45. McFADDEN, G. *et al.* Use of chemokines receptors by poxviruses. *Science*, 1999, **286**, 1968-1971.
46. MESSUD-PETIT, F., GELFI, J., DELVERDIER, M. *et al.* Serp2, an inhibitor of the interleukin-1 β -converting enzyme, is critical in pathobiology of myxoma virus. *J. Virol.*, 1998, **72**, 7830-7839.
47. MOSS, B. Molecular biology of poxviruses. In : BINNS, M.M., SMITH, G.L. Editors. Recombinant poxviruses, Florida, CRC Press, Boca Raton, 1992, 45-80.
- 47.bis MOSS, B. Replication of poxviruses. In : FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. Editors. *Virology*, 3rd edition, New York, Lippincott Raven Press, 1996, 2637-2671.
48. MOSSMAN, K., UPTON, C., McFADDEN, G. The myxoma virus-soluble interferon- γ receptor homolog, M-T7, inhibits interferon- γ in a species-specific manner. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 3031-3038.
49. MOSSMAN, K., NATION, P., MACEN, J. *et al.* Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon- γ receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology*, 1996, **215**, 17-30.
50. MOSSMAN, K., LEE, S.F., BARRY, M. *et al.* Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of the poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *J. Virol.*, **70**, 4394-4410.
51. MOTTONEN, J. *et al.* Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature*, **355**, 270-273.
52. MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L. *et al.* Virus taxonomy. In : Classification and nomenclature of viruses, 6th report of the international committee on taxonomy of viruses, Ed. Springer Verlag, 1996.
53. NASH, P., WHITTY, A., HANDWERKER, J. *et al.* Inhibitory specificity of the anti-inflammatory myxoma virus serpin, SERP1. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, n° 33, 20982-20991.
54. NASH, P., McFADDEN, G., WHITTY, A. Application of linear free energy relationships to the serpin-proteinase inhibition mechanism. *FEBS Letters*, 2000, **475**, 1-6.
55. OPGENORTH, A., GRAHAM, K., NATION, N. *et al.* Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, *M11L* and *myxoma growth factor*. *J. Virol.*, 1992, **66**, 4720-4731.
56. PAYNE, L.G. Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus. *J. Virol.*, 1979, **31**, 147-155.

57. PAYNE, L.G. Significance of extracellular enveloped virus in the *in vitro* and *in vivo* dissemination of Vaccinia. *J. Gen. Virol.*, 1980, **50**, 89-100.
58. PETIT, F., BERTAGNOLI, S., GELFI, J. *et al.* Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Virol.*, 1996, **70**, 5860-5866.
59. PICKUP, D.J., INK, B.S., HU, W. *et al.* Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 7698-7702.
60. PIERS NASH, BARRET, J., CAO, J.-X. *et al.* Immunomodulation by viruses : the myxoma virus story. *Immuno. Rev.*, 1999, **168**, 103-120.
61. QUAN, L.T., CAPUTO, A., BLEACKLEY, R.C. *et al.* Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 10377-10379.
62. RAY, C.A., BLACK, R.A., KRONKHEIM, S.R. *et al.* Viral inhibition of inflammation : cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 1992, **69**, 597-604.
63. SCHREIBER, M., RAJARATHNAM, K., McFADDEN, G. Myxoma virus T2 protein, a tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, is secreted as a monomer and dimer that each bind rabbit TNF α , but the dimer is a more potent TNF inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 13333-13341.
64. SCHREIBER, M., SEDGER, L., McFADDEN, G. Distinct domains of M-T2, the myxoma virus TNF receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J. Virol.*, 1997, **71**, 2171-2181.
65. SHCHELKUNOV, S.N., BLINOV, V.M., SANDAKHCHIEV, L.S. Genes of variola and vaccinia viruses necessary to overcome the host protective mechanism. *FEBS Letters*, 1993, **319**, 80-83.
66. SHI, L., KAM, C.M., POWERS, J.C. *et al.* Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J. Exp. Med.*, 1992, **176**, 1521-1529.
67. SKUTA, O. Caractérisation du tropisme cellulaire du virus myxomateux, *in vivo* et *in vitro*. Th. Med. Vet. : Toulouse : 2000-TOU 3, 4012.
68. SMITH, C.A., DAVIS, T., ANDERSON, D. *et al.* A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*, 1990, **248**, 1019-1023.
69. SMITH, C.A., DAVIS, T., WIGNAL, J.M. *et al.* T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, **176**, 335-342.

70. SMITH, C.A., DAVIS-SMITH, T., SMOLAK, P.J. *et al.* Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits β chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology*, 1997, **236**, 316-327.
71. SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., FERNANDES-ALNEMRI, T. *et al.* Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway : the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 14486-14491.
72. STRAYER, D.S., YANG, S., SCHWARTZ, M.S. Epidermal growth factor-like growth factors. I. Breast malignancies and other epithelial proliferations in transgenic mice. *Lab. Invest.*, 1993, **69**, 660-673.
73. THORNBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. Caspases : enemies within. *Science*, 1998, **281**, 1312-1316.
74. TURNER, P.C., MOYER, R.W. An orthopoxvirus serpin like gene controls the ability of infected cells to fuse. *J. Virol.*, 1992, **66**, 2076-2085.
75. TURNER, P.C., CARMEN-SANCHO, M., THOENNES, S.R. *et al.* Myxoma virus Serp2 is a weak inhibitor of granzyme B and interleukin-1 β -converting enzyme *in vitro* and unlike CrmA cannot block apoptosis in cowpox virus-infected cells. *J. Virol.*, 1999, **73**, 6394-6404.
76. TZAHAR, E. *et al.* Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signalling network. *EMBO J.*, 1998, **17**, 5948-5963.
77. UPTON, C., DELANGE, A.M., McFADDEN, G. Tumorigenic poxviruses : genomic organization and DNA sequence of the telomeric region of the Shope fibroma virus genome. *Virology*, 1987, **160**, 20-30.
78. UPTON, C., MACEN, J.L., McFADDEN, G. Mapping and sequencing of a gene from myxoma virus that is related to those encoding epidermal growth factor and transforming growth factor α . *J. Virol.*, 1987, **61**, 1271-1275.
79. UPTON, C., MACEN, J.L., WISHART, D.S. *et al.* Myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus encode a serpin-like protein important for virus virulence. *Virology*, 1990, **179**, 618-631.
80. UPTON, C., MACEN, J.L., SCHREIBER, M., McFADDEN, G. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology*, 1991, **184**, 370-382.
81. UPTON, C., MOSSMAN, K., McFADDEN, G. Encoding of a homolog of the interferon- γ receptor by myxoma virus. *Science*, 1992, **258**, 1369-1372.
82. WEI, A., RUBIN, H., COOPERMAN, B.S. *et al.* Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop. *Nature struct. Biol.*, 1994, **1**, 251-257.
83. WHISSTOCK, J., SKINNER, R., LESK, A.M. An atlas of serpin conformations. *TIBS*, 1998, **23**, 63-67.

84. WRIGHT, H.T. The structural puzzle of how serpin serine proteinase inhibitors work. *Bioessays*, 1996, **18**, n° 6, 453-464.

85. ZHOU, J., SUN, X.Y., FERNANDO, G.J.P. *et al.* The vaccinia virus K2L gene encodes a serine protease inhibitor which inhibits cell-cell fusion. *Virology*, 1992, **189**, 678-686.

Toulouse, 2001

NOM : DELANNAY

PRENOM : Anne

TITRE : Construction et caractérisation d'un virus myxomateux exprimant une protéine de fusion Serp2-GFP : à la poursuite du virus vert.

RESUME :

La myxomatose représente actuellement une dominante pathologique du lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*. Provoquée par un virus de la famille des *Poxviridae*, genre *leporipoxvirus*, cette maladie est caractérisée par l'apparition de pseudotumeurs cutanées, les myxomes, en région céphalique puis rapidement sur le reste du corps.

Parmi les protéines non essentielles codées par le virus myxomateux, figure Serp2, appartenant à la superfamille des serpines (Serine Protease Inhibitors). Serp2 intervient pour bloquer la réaction inflammatoire et la cascade protéolytique de l'apoptose cellulaire qui surviennent lors d'une infection virale. Pour définir les cibles cellulaires de Serp2, nous avons construit un virus recombinant exprimant une protéine de fusion Serp2-GFP (green fluorescent protein). En effet, les propriétés de fluorescence de la GFP permettent de localiser la protéine de fusion au sein de la cellule. Au cours de cette thèse, la construction du recombinant a été réalisée avec succès, permettant l'obtention d'un virus traçable par fluorescence, et de même pouvoir pathogène que le virus sauvage. En revanche, la localisation cellulaire de Serp2 n'a pas été établie de manière définitive. Néanmoins, ce virus recombinant T1-[Serp2-GFP] offre de nouvelles perspectives permettant l'étude d'autres facteurs de virulence du virus myxomateux. Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps anti-Serp2 en immunoprécipitation donnent des résultats compatibles avec l'inhibition de la caspase1, enzyme de conversion de la proIL1 β , par Serp2.

MOTS-CLES : POXVIRUS – MYXOMATOSE – SERPIN – APOPTOSE – GREEN FLUORESCENT PROTEIN

ENGLISH TITLE : Construction and characterization of a recombinant T1-[Serp2-GFP] myxoma virus : romancing the virus.

ABSTRACT :

Myxomatosis is a major disease of the european rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, due to a poxvirus, belonging to the genus *leporipoxvirus*. The disease is characterized by skin pseudotumors, first on the head then covering the body.

Myxoma virus codes for several non essential proteins, including Serp2. Serp2 belongs to the serpin superfamily (serine protease inhibitors), and is involved in blocking the inflammation and apoptosis that follow the viral infection. In order to identify the cellular targets of Serp2, we constructed a recombinant virus expressing a Serp2-GFP (green fluorescent protein) fusion protein. The green fluorescence of GFP will help localize Serp2 – hence its targets – in the cell. In this work, a recombinant T1-[Serp2-GFP] myxoma virus was successfully engineered, giving raise to a fluorescent virus that could be traced in the rabbit, as virulent as a wild-type myxoma virus. Although the cellular localization of Serp2 could not be definitely established, such a traceable virus is an invaluable tool for the study of virulence factors of myxoma virus. Moreover, immunoprecipitation experiments using Serp2 antibodies gave results compatible with an anti-caspase 1 activity of Serp2.

KEY WORDS : POXVIRUS – MYXOMATOSIS – SERPIN – APOPTOSIS – GREEN FLUORESCENT PROTEIN