

VACCINATION CONTRE LA SOUCHE INFLUENZA PR8 A L'AIDE D'UN VACCIN RECOMBINANT SG33-M2e

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Guillaume Mathieu BOYER
Né le 06 Avril 1984, à Tassin-La-Demi-Lune

Directeur de thèse : Mme le Docteur Boullier Séverine

JURY

PRESIDENT :
M. LIBLAU Roland

Professeur des Universités – Praticien hospitalier

ASSESEUR :
Mme BOULLIER Séverine
Mme CAMUS Christelle

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine, Ophtalmologie*

PROFESSEURS CERTIFIES 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 (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle **BUCK-ROUCH**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
M. **SEGUELA Jérôme**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **GIN Thomas**, *Production et pathologie porcine*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

REMERCIEMENTS

A notre président de thèse

Monsieur LIBLAU Roland

Professeurs de Universités – Praticien hospitalier
Immunologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse
Hommage respectueux

A notre jury de thèse

Madame BOULLIER Séverine

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Immunologie générale et médicale

**Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de notre thèse et nous a
témoigné sa confiance.**

**Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance et de toute
notre gratitude.**

Madame CAMUS Christelle

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Biologie cellulaire et moléculaire

Qui nous a guidé tout au long de ce travail.

Pour sa disponibilité et ses conseils.

Qu'elle trouve ici la marque de toute notre considération.

A Laurine

Mon amour, ma p'tite puce.
Merci de ta patience, de ton soutien et de ton amour.
Je ne sais pas où j'en serais sans toi.
Je t'aime

A mes parents

Pour leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi et font encore.
Je vous dédie cette thèse, car ce métier que j'aime, je vous le dois en grande partie.
Merci pour tout, mes fous !

A mes frères : Mickaël, qui est parigot et Rémy, qui est bête.

« L'amitié de deux frères est plus solide qu'un rempart » (Antisthène, IV^{ème} s. av. JC)
Vous m'avez toujours soutenu pendant toutes ces années.
Maintenant, je suis docteur, et pas seulement pour la journée !

A tout le reste de ma famille

Pour m'avoir encouragé dans mes études.
Même si je suis un peu loin, je pense à vous.

A Guillaume et toute l'équipe du laboratoire

Merci pour votre bonne humeur.
Merci Guillaume d'avoir vu toutes les fautes « d'aurtaugrafes » ou presque...

A tous mes amis et notamment mon trinôme d'Apro

Merci pour ces folles années et les bons moments passés à l'école.
En espérant que nos routes se recroisent le plus souvent possible.

A ma Calamity

Qui est vraiment la meilleure de toutes les chouchounes.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	- 4 -
TABLES DES ILLUSTRATIONS	- 8 -
INTRODUCTION.....	- 10 -
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	- 11 -
PRINCIPE DE LA VACCINATION.....	- 12 -
1. <i>LES DEFENSES DE L'ORGANISME</i>	- 12 -
1.1. Principes généraux.....	- 12 -
1.2. Les intervenants lors de la réponse immunitaire	- 12 -
1.3. L'immunité antivirale	- 15 -
2. <i>STIMULATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE LORS DE LA VACCINATION</i>	- 16 -
2.1. La vaccination.....	- 16 -
2.2. Les différents types de vaccin	- 16 -
LES POXVIRUS : SUPPORT DES VIRUS RECOMBINANTS.....	- 17 -
1. <i>GENERALITES</i>	- 17 -
1.1. Classification	- 17 -
1.2. Transmission.....	- 17 -
1.3. Structure des Poxvirus	- 19 -
1.4. Cycle répliatif.....	- 22 -
2. <i>INTERET DES POXVIRUS EN VACCINATION</i>	- 24 -
2.1. Utilisation des Poxvirus	- 24 -
2.2. Avantages et inconvénients des Poxvirus en tant que vaccin.....	- 25 -
2.3. Méthodes de construction d'un virus recombinant vaccinal	- 26 -
3. <i>LA SOUCHE SG33 : UNE SOUCHE VIRALE A LA BASE DES VIRUS RECOMBINANTS</i>	- 28 -
3.1. Un virus myxomateux modifié.....	- 28 -
3.2. Utilisation actuelle du virus myxomateux SG33.....	- 28 -
3.3. Réaction de l'organisme face au virus myxomateux souche SG33.....	- 29 -
LES ORTHOMYXOVIRIDAE : A LA RECHERCHE D'UN ANTIGENE VACCINAL	- 30 -
1. <i>GENERALITES</i>	- 30 -
1.1. Classification	- 30 -
1.2. Transmission.....	- 30 -
1.3. Structure des Virus Influenza.....	- 30 -
1.4. Cycle répliatif.....	- 34 -
1.5. Evolution des Virus Influenza.....	- 35 -
2. <i>VACCINATION CONTRE LES VIRUS INFLUENZA</i>	- 36 -
2.1. Vaccins actuels	- 36 -
2.2. Absence d'immunité durable	- 36 -
3. <i>LA PROTEINE M2 : UNE PROTEINE COMMUNE A L'ENSEMBLE DES VIRUS INFLUENZA</i>	- 37 -
3.1. Localisation et structure.....	- 37 -
3.2. Rôle dans le cycle viral	- 40 -
3.3. Immunogénicité de la protéine M2	- 41 -

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE	- 42 -
INTRODUCTION.....	- 43 -
MATERIELS ET METHODES.....	- 44 -
1. <i>VIRUS</i>	- 44 -
1.1. Souches virales utilisées.....	- 44 -
1.2. Méthode d'insertion de la protéine étrangère et obtention des virus recombinants.....	- 44 -
2. <i>SOURIS</i>	- 46 -
3. <i>PROTOCOLE D'INOCULATION</i>	- 46 -
3.1. Expérience n°1.....	- 46 -
3.2. Expérience n°2.....	- 47 -
4. <i>SUIVI CLINIQUE DES ANIMAUX</i>	- 47 -
5. <i>TECHNIQUES UTILISEES LORS DE CET ESSAI</i>	- 48 -
5.1. Infection virales in vitro.....	- 48 -
5.2. Western Blot	- 48 -
5.3. Immunofluorescence.....	- 49 -
5.4. ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	- 50 -
5.5. Statistiques.....	- 50 -
RESULTATS	- 51 -
1. <i>LE PEPTIDE M2E INDUIT UNE REPONSE PROTECTRICE CONTRE LE VIRUS PR8</i>	- 51 -
1.1. Suivi clinique.....	- 51 -
1.2. Suivi sérologique	- 52 -
2. <i>LE VIRUS RECOMBINANT EXPRIME LE PEPTIDE M2E</i>	- 54 -
2.1. Western Blot	- 54 -
2.2. Immunofluorescence.....	- 56 -
3. <i>VALIDATION IN VIVO DE NOTRE VECTEUR VIRAL</i>	- 58 -
3.1. Mortalité	- 58 -
3.2. Perte de poids.....	- 59 -
4. <i>LE VIRUS RECOMBINANT N'INDUIT PAS DE REPONSE HUMORALE SPECIFIQUE DU PEPTIDE M2E</i>	- 60 -
4.1. Réaction immunitaire face au peptide M2e.....	- 60 -
4.2. Réaction immunitaire face au SG33.....	- 61 -
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	- 63 -
CONCLUSION.....	- 66 -
REFERENCES.....	- 68 -

Tables des illustrations

Figure 1 : Schéma simplifié de la coopération des défenses de l'organisme

Figure 2 : L'immunité antivirale

Tableau 1 : Classification des *Chordopoxvirinae*

Tableau 2 : Les membres du genre *Léporipoxvirus* et les pathologies associées

Figure 3 : Schéma d'un Poxvirus

Figure 4 : Schéma de la dissémination des Poxvirus dans l'organisme

Figure 5 : Schéma du génome d'un Poxvirus

Figure 6 : Schéma récapitulatif des facteurs de virulence du virus myxomateux

Figure 7 : Schéma de l'organisation génomique du virus Myxomateux souche Lausanne

Figure 8 : Le cycle de réplication des Poxvirus

Figure 9 : Modèle d'entrée d'un Poxvirus : exemple du virus de la Vaccine

Figure 10 : Méthode de construction de Poxvirus recombinés

Figure 11 : Mécanismes de résistance vis-à-vis d'une infection avec le virus SG33

Figure 12 : Observation d'un virus Influenza en microscopie électronique

Figure 13 : Schéma d'un *Influenzavirus* de type A

Figure 14 : Schéma des 8 segments d'ARN d'un *Influenzavirus* A et des protéines associées

Figure 15 : Schéma du cycle viral d'un *Influenzavirus*

Figure 16 : Schéma de la cassure antigénique

Figure 17 : Schéma des protéines du segment 7 d'un *Influenzavirus* A

Figure 18 : Schéma de la protéine M2 d'un virus Influenza A

Figure 19 : Séquences des acides aminés de l'ectodomaine de la protéine M2 de souches représentatives de souches virales Influenza A

Figure 20 : Rôle de la protéine M2 lors de la fusion membranaire entre le virus Influenza et l'endosome

Figure 21 : Schéma du plasmide de transfert utilisé lors de la fabrication du virus recombinant VM M2e-M022L

Figure 22 : Représentation de la séquence de la protéine M2e-M022L

Figure 23 : Le système de sélection gpt

Tableau 3 : Système de notation de l'aspect du pelage

Figure 24 : Pourcentage de survie (expérience n°1)

Figure 25 : Variations du pourcentage de perte de poids (expérience n°1)

Figure 26 : Courbe étalon du test ELISA permettant de déterminer la présence d'anticorps anti-M2e

Tableau 4 : Résultats de la plaque ELISA de la réponse immunitaire contre le peptide M2e à la dose de 2,5 µg par puits

Figure 27 : Résultats du Western Blot

Figure 28 : Résultats de l'Immunofluorescence

Figure 29 : Pourcentage de survie (expérience n°2)

Figure 30 : Variations du pourcentage de perte de poids (expérience n°2)

Figure 31 : Concentrations en anticorps anti-M2e après vaccination à l'aide d'un recombinant M2e-M022L

INTRODUCTION

Les virus Influenza sont les agents responsables des gripes humaines et animales. Ces maladies évoquent presque immédiatement des symptômes tels de la fièvre, de la toux, du jetage et de l'abattement. On les associe fréquemment à l'image des grandes pandémies : la grippe espagnole, la grippe mexicaine ou encore l'Influenza aviaire. Notre objectif principal est la lutte contre cette dernière affection en permettant la vaccination du réservoir sauvage et plus particulièrement du réservoir canard.

Dans cette étude, l'idée de départ est de se servir d'un *Léporipoxvirus* atténué, souche vaccinale utilisée pour la protection contre la Myxomatose, en fusionnant l'un des antigènes commun aux virus Influenza avec une protéine d'enveloppe de ce Poxvirus. Cette méthode de construction ayant fait ces preuves dans d'autres modèles (par exemple avec le virus de l'Hépatite B [1]), nous souhaitons valider ce procédé dans une autre composition.

Pour valider le concept, nous devons d'abord tester notre vaccin sur des animaux de laboratoire, en l'occurrence la souris. Cette première étape est essentielle afin de perfectionner notre vaccin. Comme antigène, nous avons choisi l'ectodomaine de la protéine M2, nommé M2e. Il s'agit d'un peptide présent chez tous les *Influenzavirus* de type A. La séquence de ce dernier est relativement bien conservée. Pour notre expérience, nous avons décidé d'utiliser un peptide M2e provenant d'un virus Influenza spécifique des mammifères. Après avoir entériné la méthode de construction, nous pourrons alors construire un virus recombinant à l'aide du peptide M2e aviaire et le tester sur des canards.

La présente étude propose, dans un premier temps, de faire le point sur le principe de la vaccination, sur les Poxvirus et leurs utilisations en tant que vecteurs vaccinaux et sur les virus Influenza. Dans un deuxième temps, nous verrons les effets protecteurs du peptide M2e et nous évaluerons les capacités de notre virus recombinant à induire une réponse immunitaire chez des souris.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Principe de la vaccination

1. LES DEFENSES DE L'ORGANISME

1.1. Principes généraux

Les défenses de l'organisme permettent de lutter contre les infections en détruisant tous les pathogènes (virus, bactéries, molécules étrangères, ...) mais également en luttant contre les dysfonctionnements cellulaires (cellules cancéreuses). On peut diviser les défenses de l'organisme en 2 types de mécanisme :

- Les premières lignes de défense non-spécifique comme la protection de la peau et les muqueuses, l'acidité gastrique, les cellules phagocytaires, protéines antimicrobiennes, ...
- Les mécanismes de défense spécifique (ou système immunitaire) comme l'action des lymphocytes et la production d'anticorps spécifiques

Le système immunitaire se distingue des défenses non-spécifiques par quatre caractéristiques : la spécificité, la diversité, la reconnaissance du soi et du « non-soi » et la faculté de mémoire. En effet, le système immunitaire réagit à un antigène (Ag) donné en produisant des lymphocytes spécialisés et des anticorps particuliers. La mémoire fait référence au fait que le système immunitaire enregistre chaque antigène qu'il a rencontré. Subséquemment, lors d'une agression contre un antigène connu, l'organisme pourra répondre plus rapidement et plus efficacement. Comme nous le verrons dans la suite de l'exposé, cette caractéristique sert de base lors de la vaccination.

1.2. Les intervenants lors de la réponse immunitaire

Les premières cellules en contact avec les substances étrangères (virus, bactéries, champignons, ...) sont les cellules phagocytaires. Ces dernières (cellules présentatrices d'antigène ou CPA, granulocytes et macrophages) représentent environ 60-70% des leucocytes. Leur rôle est de détruire ces substances. Par la suite, les CPA vont présenter ces antigènes à d'autres cellules immunitaires.

En parallèle, les agents infectieux déclenchent l'activation du système complémentaire ou complément. C'est un système biologique complexe présent à l'état normal chez tous les vertébrés. Il est constitué de 15 protéines sériques et de protéines portées par les membranes cellulaires. La mise en place de ce système induit le recrutement des cellules phagocytaires, une inflammation et la formation d'un Complexe d'Attaque des Membranes (CAM) détruisant les membranes cellulaires des cellules infectées.

Les lymphocytes T auxiliaires ou « helper » (lymphocytes T CD4+) vont ensuite reconnaître ces antigènes, présentés par les CPA, et orienter la réponse d'autres lymphocytes, les lymphocytes T cytotoxiques ou lymphocytes T CD8+. Ces cellules, après reconnaissance des antigènes présentés à la surface des cellules infectées par le CMH-I, vont détruire les cellules infectées.

Dans le même temps, les lymphocytes B sont activés. Après identification de l'antigène, ces cellules se multiplient et se transforment en plasmocytes qui sécrètent les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig). Ces molécules sont capables de se fixer sur l'antigène initial (soit sur la cellule infectée, soit directement sur l'agent infectieux) bloquant ainsi l'agent pathogène : ce sont des anticorps neutralisants. Ces assemblages Antigène-Anticorps sont reconnus par des cellules tueuses ou « Natural Killer Cells » qui détruisent les cellules sur lesquelles les anticorps sont fixés. Les anticorps concourent également au phénomène d'opsonisation en améliorant la phagocytose.

En conclusion, toutes ces cellules interviennent dans trois grandes voies de réponse immunitaire :

- L'immunité non spécifique avec l'action des cellules phagocytaires
- La réponse immunitaire à médiation cellulaire (type Th1), qui fait intervenir les lymphocytes T, les macrophages et les cellules tueuses (Natural Killer Cells)
- La réponse immunitaire à médiation humorale (type Th2), qui correspond à la production d'anticorps par les plasmocytes, issus des lymphocytes B

Il est à noter que cette dichotomie est théorique. L'immunité repose avant tout sur la complémentarité des systèmes (figure 1).

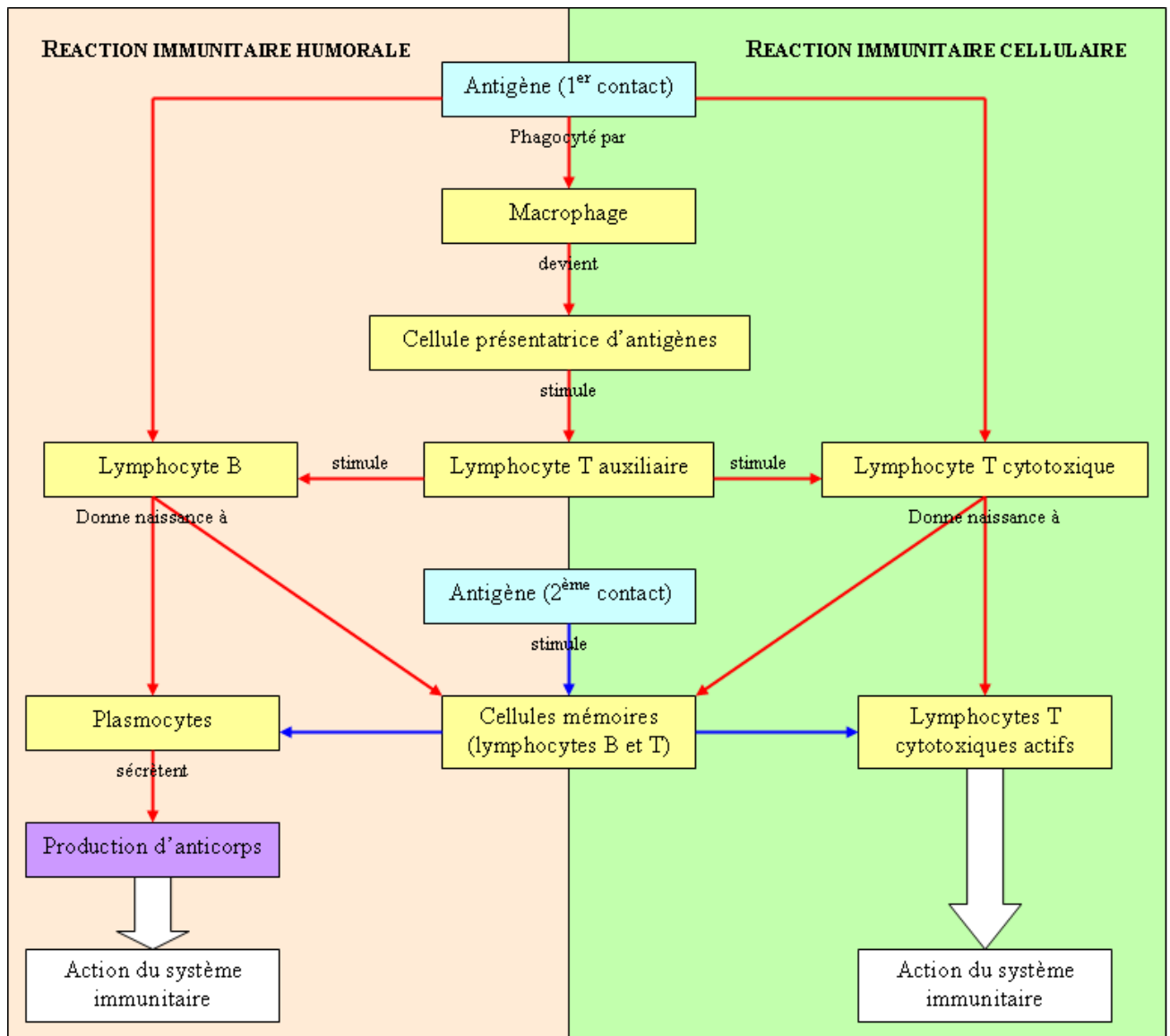


Figure1 : Schéma simplifié de la coopération des défenses de l'organisme

D'après Campbell, 2004 [4]

Une fois l'antigène entré dans l'organisme, il est phagocyté par un macrophage qui se transforme alors en cellule présentatrice d'antigène. Cette action permet le déclenchement de la réponse immunitaire par activation des lymphocytes B et des lymphocytes T cytotoxiques via un lymphocyte T auxiliaire. L'antigène est alors détruit par les anticorps (produits par des plasmocytes) et/ou par des lymphocytes T cytotoxiques activés.

En parallèle, l'activation des lymphocytes B et des lymphocytes T cytotoxiques donne naissance à des cellules mémoires. Celles-ci conservent la trace de l'antigène. Lors d'un second contact avec ce dernier, la réponse immunitaire sera plus rapide (shunt des premières étapes).

1.3. L'immunité antivirale

Lors d'une infection virale, l'organisme met en jeu l'ensemble de ses défenses. Tout d'abord, il y a sécrétion de cytokines spécifiques : les interférons de type I ou IFN I. Ces glycoprotéines entraînent le « blocage » de la cellule infectée (et son apoptose) et l'augmentation de la présentation des antigènes viraux via les cellules présentatrices d'antigène. A ce système se rajoute l'action du système du complément ainsi que la mise en place d'un système de reconnaissance des micro-organismes par les Toll-Like Receptors (TLR). Ces TLR se trouvent au niveau des cellules présentatrices d'antigène. Ils permettent au système immunitaire d'identifier précisément la nature du micro-organisme présent.

L'ensemble de ces informations a pour but d'orienter la réponse immunitaire spécifique (profil lymphocytaire de type Th1 ou de type Th2). Au final, de nombreuses possibilités de réponse contre les virus (figure 2) existent :

- Synthèse d'interférons et blocage de la cellule infectée
- Phagocytose non spécifique via les macrophages
- Destruction des cellules et des virus via le système complémentaire
- Production de lymphocytes T cytotoxiques (destruction des cellules infectées)
- Synthèse d'anticorps de type IgG2a (destruction des cellules infectées et des formes libres du virus par phagocytose)

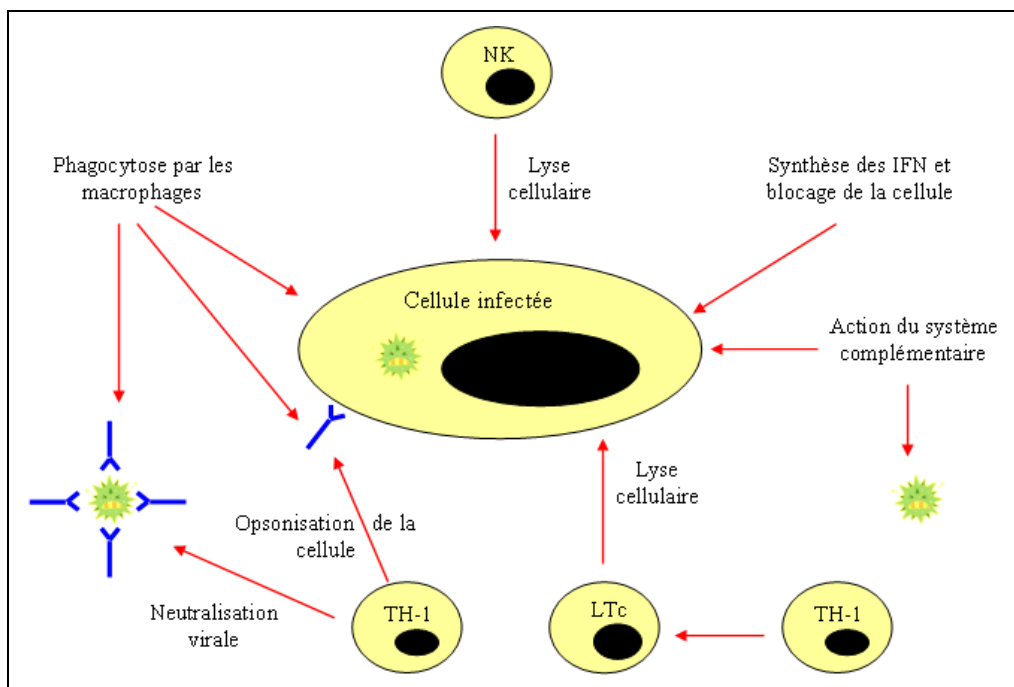


Figure 2 : L'immunité antivirale

Ce schéma regroupe les différentes possibilités du système immunitaire face à une cellule infectée par un virus.

Lexique : NK = cellule Natural Killer, LTc = Lymphocytes T cytotoxique, IFN = Interféron

2. STIMULATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE LORS DE LA VACCINATION

2.1. La vaccination

Le but principal des vaccins est d'induire la production par l'organisme de cellules mémoires (réponse de type Th1 ou de type Th2) vis-à-vis d'éléments pathogènes identifiés. Un vaccin est donc spécifique d'un agent infectieux.

Lors de la vaccination, l'organisme est donc en contact avec un agent pathogène modifié (dont la pathogénicité aura été contrôlée, cf. infra) ou une partie de celui-ci. Les défenses immunitaires ainsi « stimulées » par le vaccin préviennent l'attaque ultérieure par ce même agent pathogène sauvage. L'efficacité de la vaccination dépend donc de la reconnaissance des antigènes du vaccin par l'organisme et de la nature de la réponse immunitaire induite par le vaccin. Les antigènes du vaccin doivent donc être identiques aux antigènes naturels.

2.2. Les différents types de vaccin

Il existe trois grands types de vaccin :

- Les vaccins à agents vivants, atténués ou modifiés : ils conservent un certain pouvoir infectieux et induisent ainsi une excellente imprégnation immunitaire ; par contre, l'existence d'un pouvoir pathogène résiduel n'est pas à exclure
- Les vaccins à agents tués ou inactivés : il y a abolition pure et simple de toute virulence, toutefois l'immunité doit être soutenue par une augmentation des titres antigéniques, l'addition d'un adjuvant ou la multiplication des sollicitations vaccinales
- Les vaccins dits purifiés ou sous-unités : la réaction immunitaire induite est faible et leur coût est élevé mais ils sont relativement sûrs d'emploi (utilisation chez les femmes gravides par exemple)

A l'heure actuelle, on s'oriente vers des vaccins obtenus par génie génétique, des vaccins à ADN ou des vaccins recombinants. Ils cumulent les avantages des vaccins atténués et inactivés (coût, sécurité d'emploi, activation du système immunitaire, ...).

Les Poxvirus : support des virus recombinants

1. GENERALITES

1.1. Classification

Les *Poxviridae* forment une grande famille de virus responsables de nombreuses maladies (Variole chez l'Homme, Myxomatose chez le Lapin, Variole aviaire, ...). Cette famille se divise en deux sous-familles : les *Chordopoxvirinae* qui affectent les Vertébrés et les *Entomopoxvirinae* qui touchent les Invertébrés.

Parmi les *Chordopoxvirinae*, on distingue huit genres (tableau 1). Le chef de file historique est le virus de la Vaccine du genre des *Orthopoxvirus*. Dans cet exposé, nous allons nous intéresser au virus myxomateux, appartenant au genre des *Léporipoxvirus* (tableau 2).

1.2. Transmission

Les Poxvirus du genre *Orthopoxvirus*, *Cowpoxvirus*, *Parapoxvirus* et *Monkeypoxvirus* ont en général un spectre d'hôte large en raison de récepteurs viraux polyvalents. Cependant, certains genres sont plus spécifiques d'espèces (comme le virus myxomateux avec le Lapin européen) même s'il est possible d'infecter artificiellement des espèces non-hôtes. La transmission naturelle s'effectue par passage transcutané (peau ou muqueuse avec des microlésions) mais également passivement par le biais d'arthropodes hématophages.

Genre	Espèce type	Principales autres espèces virales
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la vaccine	Mousepox (ectromélie) Cowpox virus Virus de la variole du chameau Virus de la variole du singe Virus de la variole humaine Raccoonpox virus Taterapox virus Volepox virus Uasin Gihu Smallpox Shunkpox
<i>Parapoxvirus</i>	Orf virus	Virus de la stomatite papuleuse des bovins Pseudocowpox virus Squirrel parapoxvirus Parapoxvirus du cerf commun Ecthyma contagieux du chamois Maladie d'Auzduk
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille + virus spécifiques d'autres espèces d'oiseaux
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la clavelée	Virus de la variole caprine Lumpy skin disease virus
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose	Virus du fibrome de Shope Virus du fibrome malin du lapin Virus du fibrome du lièvre Virus du fibrome de l'écureuil
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus du Molluscum contagiosum	
<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapox virus	Virus Yaba de la tumeur du singe
Non déterminé	Crocodilepox virus	

Tableau 1 : Classification des *Chordopoxvirinae*
D'après Fiels Virology, 2007 [7] et Van Regenmortel, 2000 [8]

Virus	Pathologie chez l'hôte naturel	Pathologie chez le Lapin européen
Virus de la Myxomatose	Sylvilagus sp : myxome bénin localisé	Myxomatose généralisée et immunodépression
Virus du Fibrome de Shope	Sylvilagus floridanus : fibrome bénin localisé	Fibrome bénin localisé Généralisation chez les nouveau-nés
Virus du Fibrome malin du Lapin	Non déterminé	Nodules dermiques
Virus du Fibrome de l'Écureuil	Sciurus sp : fibromes multiples	Non sensible
Virus du Fibrome du Lièvre	Lepus sp : fibromes cutanées localisées	Fibromes bénins localisés

Tableau 2 : Les membres du genre *Léporipoxvirus* et les pathologies associées
D'après Fields Virology 2007 [7]

1.3. Structure des Poxvirus

L'ensemble des Poxvirus se présente sous la forme de particules enveloppées à symétrie complexe (parallélépipèdes, ovale, ...) de très grande taille (300 x 250 x 200 nm pour les *Léporipoxvirus*). Ils font partie des plus gros virus animaux connus.

L'organisation des virions se base sur la présence d'un core biconcave, d'un ou de deux corps latéraux et d'un nombre variable d'enveloppes (figure 3).

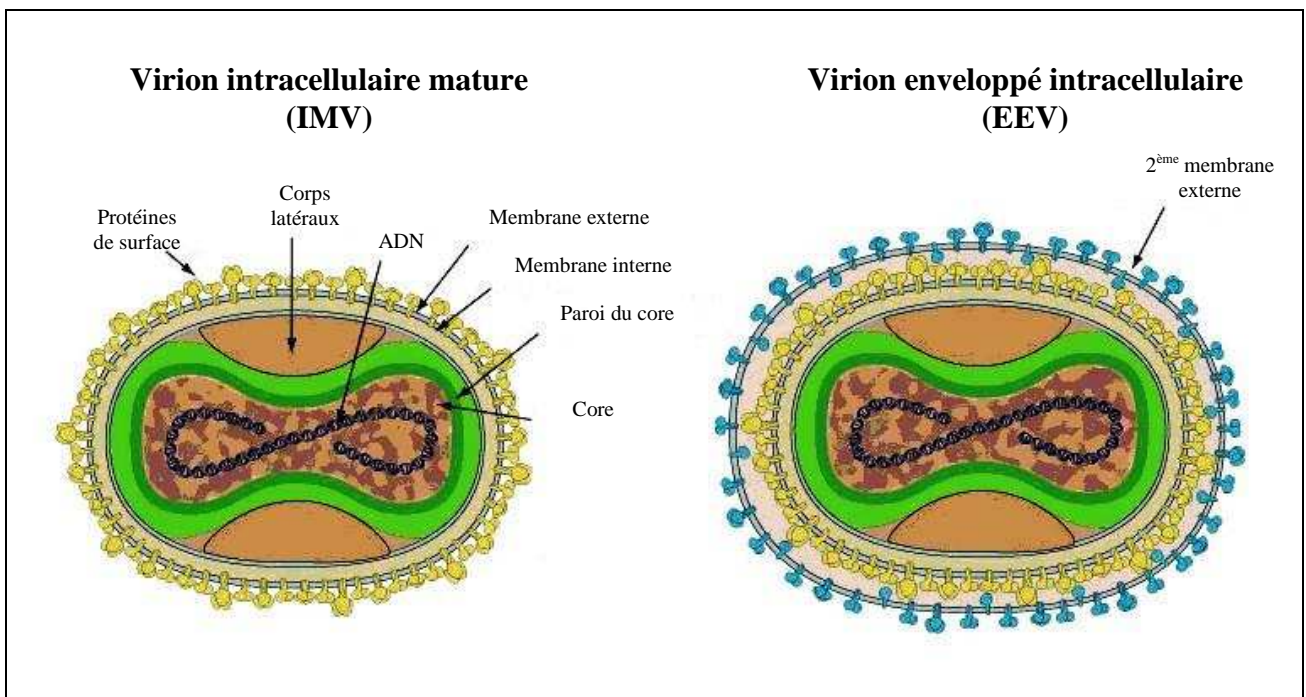


Figure 3 : Schéma d'un Poxvirus
D'après Swiss Institute of Bioinformatics [9]

On distingue plusieurs formes : [8/10]

- Les virions intracellulaires matures (IMV en anglais) avec une seule enveloppe externe
- Les virions intracellulaires enveloppés (IEV en anglais) avec 3 enveloppes
- Les virions enveloppés intracellulaires (EEV en anglais) et les virions enveloppés extracellulaires (CEV en anglais) avec 2 enveloppes externes

Les IMV sont les formes les plus présentes dans la cellule et sont libérés lors de la lyse cellulaire. C'est la forme de résistance qui assurerait la transmission entre individus. Les EEV jouent un rôle dans la dissémination virale au sein de l'organisme tandis que les CEV ont une action sur l'infection de proche en proche [11] (figure 4).

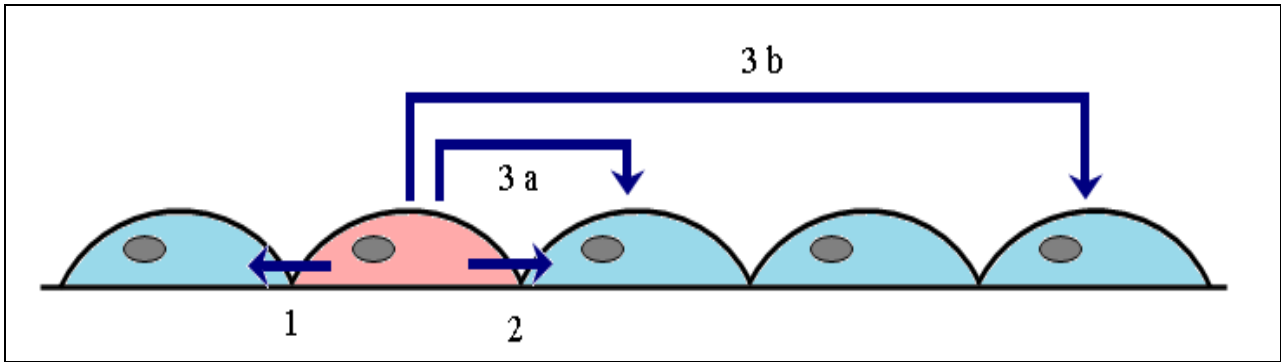


Figure 4 : Schéma de la dissémination des Poxvirus dans l'organisme

D'après Smith, 2002 [11]

- 1 : libération des IMV après lyse cellulaire et entrée dans une cellule voisine
- 2 : propulsion des CEV par une queue d'actine dans la cellule voisine
- 3 : libération des EEV et infection des cellules voisines (3a) ou lointaines (3b)

Le génome des Poxvirus est composé d'une seule molécule d'ADN bicaténaire linéaire, aux extrémités liées par des liaisons covalentes. Le génome est composé en moyenne de 245 kpb (de 130 à 375 kpb selon les Poxvirus). Par exemple, le virus myxomateux contient 162 kpb. Cela représente 171 gènes du fait des lectures de l'ADN dans les deux sens.

L'organisation générale est la même pour tous les *Poxviridae*. Au centre se trouvent les gènes essentiels à la réplication. Les deux régions terminales répétées inversées ou RIT ainsi que les régions proches codent pour les facteurs de pathogénicité [7]. Le schéma ci-dessous (figure 5) représente la forme du génome des Poxvirus (exemple de la Vaccine).

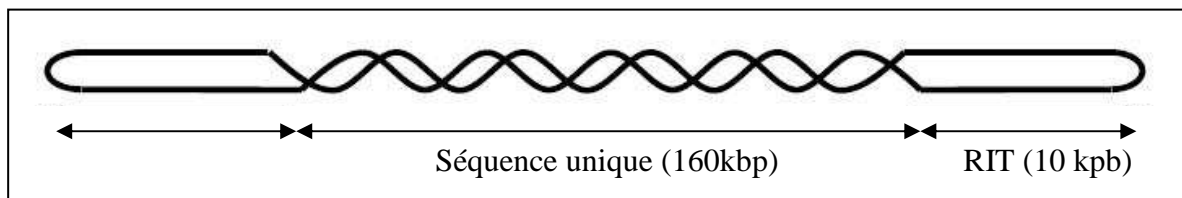


Figure 5 : Représentation schématique du génome d'un Poxvirus

Exemple du virus de la Vaccine

Proportions non respectées

RIT : Répétitions Inversées Terminales

Dans le virus myxomateux, on retrouve de nombreux gènes non essentiels à la réplication mais codant pour des facteurs immunomodulateurs : virokines et virocepteurs (figure 6). Les virokines (serpines, MGF) sont des analogues structuraux de molécules déjà présentes dans l'organisme. Les virocepteurs (M-T1, M-T2, M-T7) sont des leurres pour les cytokines de l'organisme. L'ensemble de ces molécules va induire le blocage des signaux extracellulaires visant à éliminer le Poxvirus et créer en conséquence un environnement favorable pour la croissance de ce dernier.

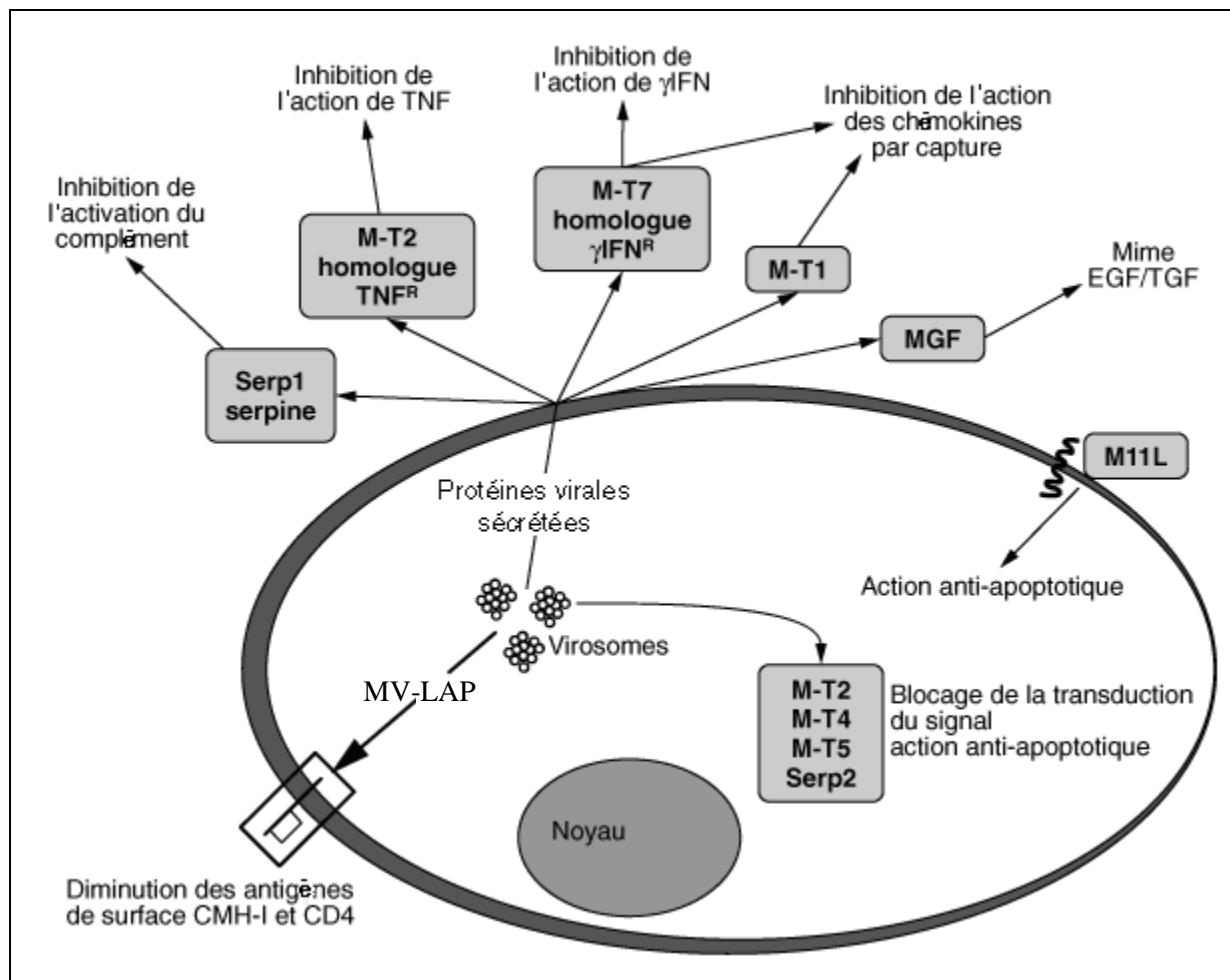


Figure 6 : Schéma récapitulatif des facteurs de virulence du virus myxomateux

D'après Messud-Petit, 2000 [12] et Collin, 2005 [13]

Le virus myxomateux, une fois entré dans une cellule, va produire de nombreux facteurs lui permettant de se protéger du système immunitaire de l'hôte. Ces facteurs sont des immunomodulateurs qui vont ainsi induire un blocage de la réponse protectrice de l'hôte.

Inhibition du système immunitaire : Serp1, MGF, M-T1, M-T7 et MV-LAP

Blocage de l'apoptose cellulaire : Serp2, M11L, M-T2, M-T4 et M-T5

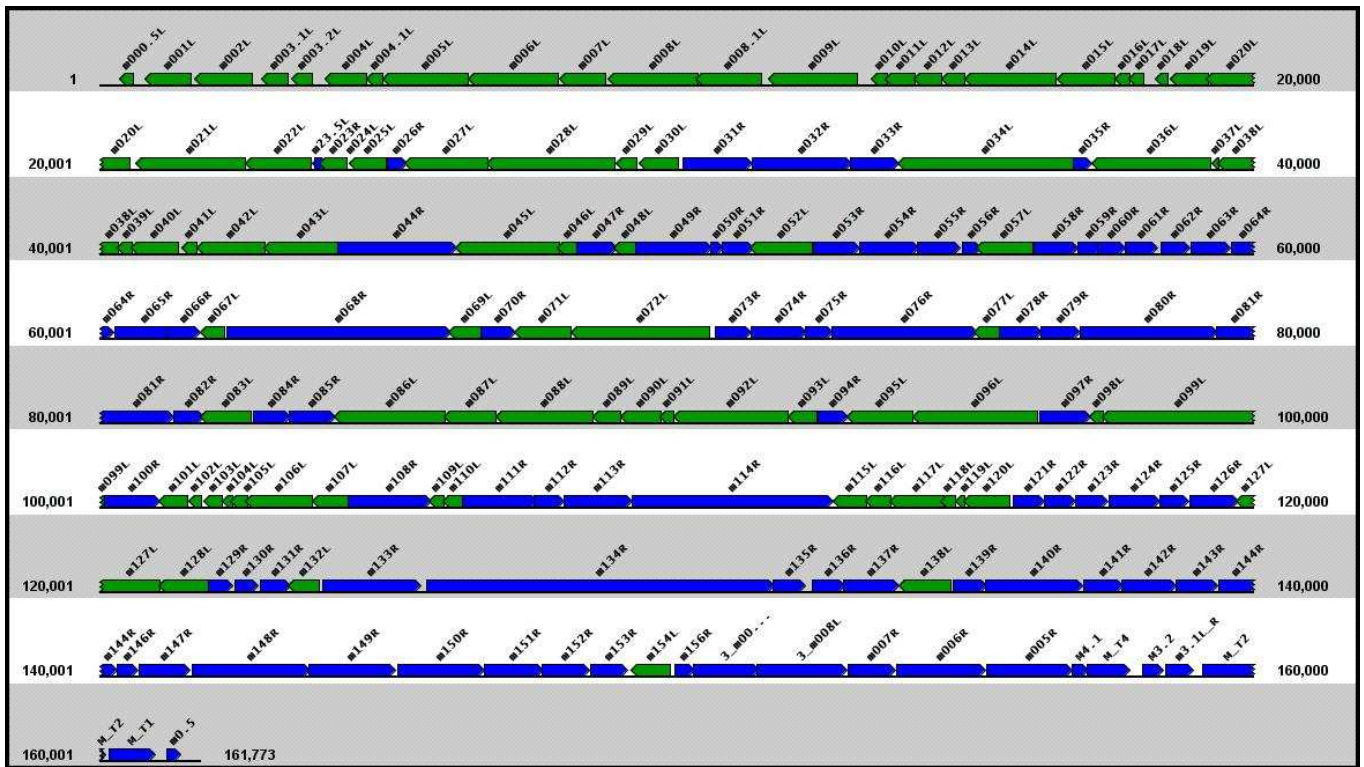


Figure 7 : Schéma de l'organisation génomique du virus Myxomateux souche Lausanne

De The Poxvirus Bioinformatics Resource Center [14]

Les rectangles verts représentent les gènes transcrits vers la gauche et les rectangles bleus les gènes transcrits vers la droite.

Les nombres indiqués au début et à la fin de chaque ligne correspondent au nombre de bases.

1.4. Cycle répliatif

Les Poxvirus ont une répliation exclusivement cytoplasmique. Le modèle est le virus de la Vaccine avec un cycle compris entre 12 et 24 heures. Pour le virus Myxomateux, le cycle répliatif dure environ 16 heures [15].

On peut découper la répliation des Poxvirus en 6 étapes [16] : figure 8

- L'entrée du virus dans la cellule : il y a fusion membranaire entre l'IMV et la cellule ou endocytose des formes EEV (figure 9) [17]
- Expression de gènes précoces (avant la répliation de l'ADN viral) : synthèse d'ARNm précoces codant pour des protéines modulant la réponse immunitaire ainsi que des éléments nécessaires à la répliation et la transcription de l'ADN viral
- Répliation de l'ADN viral à l'aide d'une ADN polymérase d'origine virale
- Expression des gènes tardifs codant principalement pour des protéines de structure
- Assemblage et maturation des virions ce qui aboutit à la formation des IMV
- Libération des virions néoformés

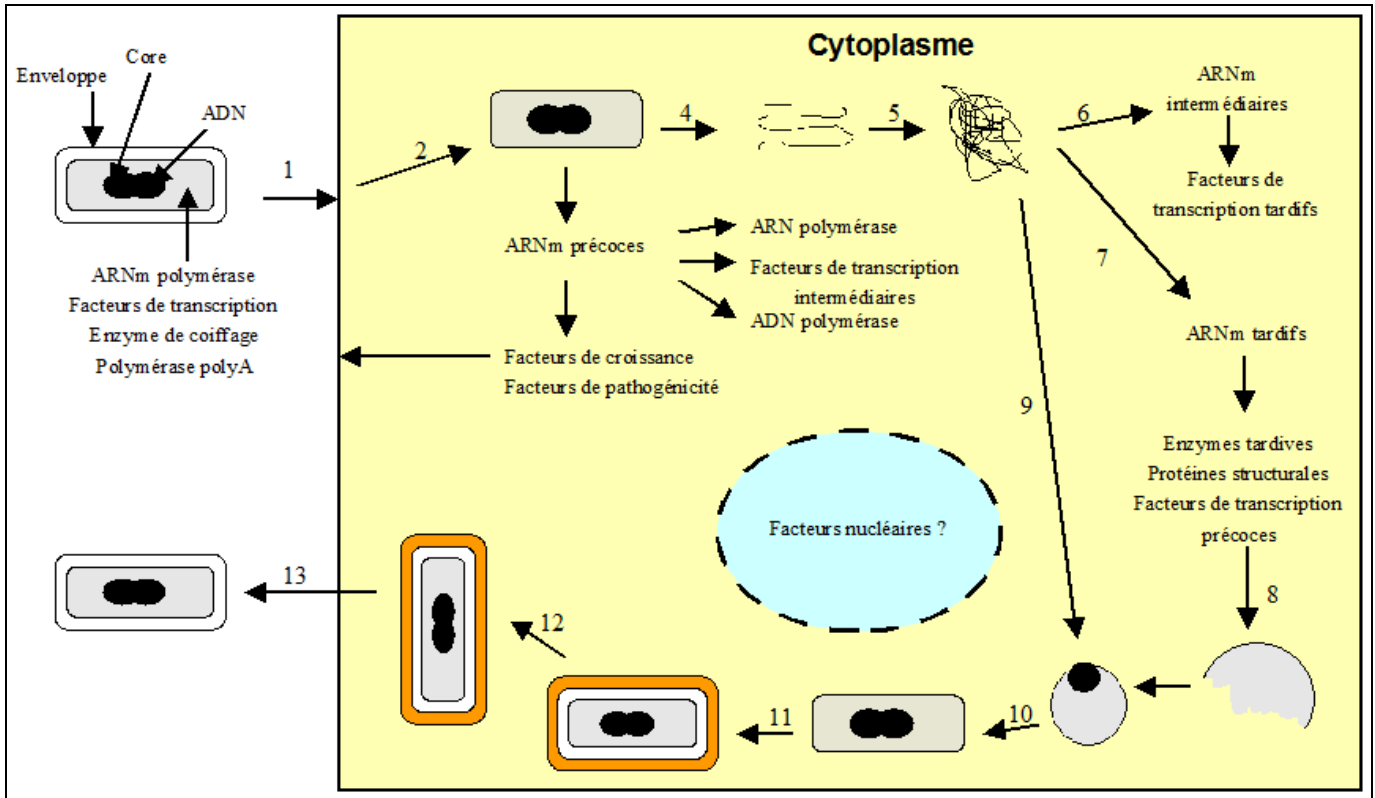


Figure 8 : Le cycle de réplication des Poxvirus

D'après Fields Virology, 2007 [7]

1 : attachement à la cellule / 2 : pénétration dans la cellule et libération du core dans le cytoplasme / 3 : transcription des gènes précoces / 4 : déshabillage du core / 5 : réplication de l'ADN et formation de concatémères / 6 : transcription des gènes intermédiaires / 7 : transcription des gènes tardifs / 8 : début de l'assemblage avec les premiers fragments de membrane / 9 : résolution des concatémères et incorporation d'ADN / 10 : maturation et formation des IMV / 11 : acquisition d'une double enveloppe (IEV) / 12 : migration vers la surface cellulaire à l'aide du cytosquelette / 13 : Fusion avec la membrane cellulaire et formation des CEV et libération des EEV

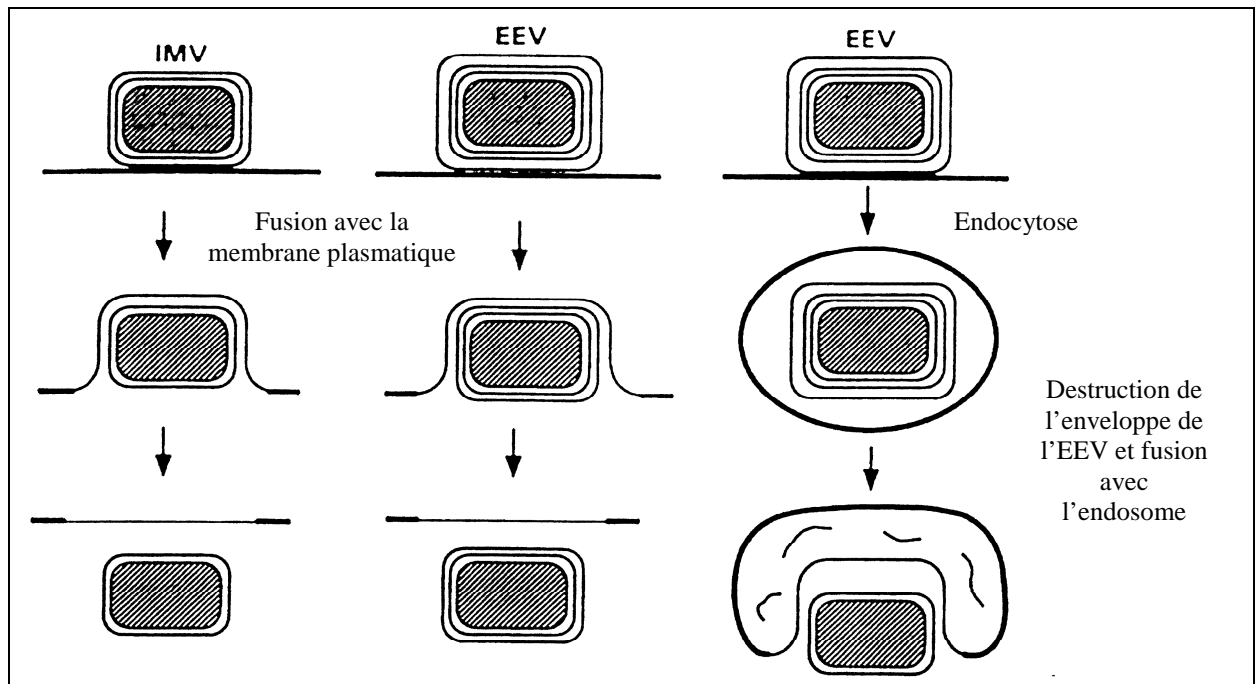


Figure 9 : Modèle d'entrée d'un Poxvirus : exemple du virus de la Vaccine

D'après Vandersplassen, 1998 [17]

2. INTERET DES POXVIRUS EN VACCINATION

Les vaccins classiques présentent de nombreux inconvénients limitant leur utilisation. Les souches atténuées présentent le risque d'une réversion et peuvent ainsi reprendre leur virulence initiale. D'autres possèdent un pouvoir pathogène résiduel non négligeable ce qui limite leur utilisation (individus immunodéprimés, femelles gravides, ...). D'un autre côté, les vaccins à agents inactivés sont en général moins immunogènes et induisent essentiellement une réponse de type humorale. Toutefois, des alternatives existent pour combler ces lacunes.

2.1. Utilisation des Poxvirus

Comme nous avons pu le voir précédemment, les connaissances sur les Poxvirus sont très complètes (cycle, hôte, pouvoir pathogène, ...).

Le premier Poxvirus utilisé comme vaccin a été celui de la Vaccine par Edward Jenner en mai 1796 [18]. Ce virus a servi comme antivariolique (du fait d'une protection croisée avec le virus de la variole humaine) et permis l'éradication de cette maladie en 1980. C'est un virus très attractif du fait de son cycle court, de sa facilité de purification et de son effet considérable sur le développement d'une immunité (humorale et cellulaire). Par la suite, il fut utilisé comme vecteur de vaccins recombinants par insertion dans le génome de gènes codant des protéines d'autres virus. On peut citer notamment le vaccin antirabique Raboral® (recombinant Vaccine-glycoprotéine G du virus rabique) qui est utilisé chez les coyotes et les ratons laveurs en Amérique du Nord [19].

Les Poxvirus ont de nombreuses utilisations. On peut citer par exemple l'obtention en grande quantité de protéines mais également l'établissement de banques d'ADNc permettant d'identifier des antigènes tumoraux [20]. Actuellement, une des voies de recherches concerne l'emploi des Poxvirus comme vecteurs vaccinaux [21].

La grande taille du génome des Poxvirus, et notamment la présence de nombreux gènes codant pour des facteurs de virulence, est un atout majeur dans l'emploi de ceux-ci. Ces gènes (gènes de spectre d'hôte, gènes codant pour des facteurs immunomodulateurs, ...), autrement appelés gènes non-essentiels, ont peu d'influence sur le cycle répliatif du virus *in vitro* [22] et peuvent facilement être éliminés ou modifiés par recombinaison homologue avec un plasmide adéquat.

2.2. Avantages et inconvénients des Poxvirus en tant que vaccin

L'intérêt des Poxvirus est lié à leur biologie et à leur grande plasticité. En effet, les recombinants obtenus présentent un certain nombre d'avantages :

- La réplication est exclusivement cytoplasmique : l'intégration du génome viral est donc improbable
- La taille importante des Poxvirus autorise l'insertion de grands fragments (> 25 kpb d'ADN étranger) mais aussi la suppression des fragments non essentiels (notamment les facteurs régulant la virulence et la réponse immunitaire)
- La transcription est indépendante de la cellule : les protéines sont synthétisées de manière autonome
- L'activité des protéines recombinantes est très proche de la protéine d'origine [23]
- De très nombreux Poxvirus sont non-pathogènes pour l'Homme
- La fabrication est compatible avec une utilisation à grande échelle :
 - o Coût de production faible
 - o Stabilité importante : résistance à la congélation, à la lyophilisation et la réhydratation
 - o Facilité d'administration : voie intradermique ou voie orale (comme par exemple le vaccin recombinant Vaccine-Rage [24])

A contrario, l'utilisation de vecteurs vaccinaux vivants peut poser des problèmes liés à la cytotoxicité associée à l'infection mais aussi à la pathogénicité résiduelle (concerne principalement les individus immunodéprimés). Cet aspect, marqué dans le cadre de recombinants issus du virus de la Vaccine, n'est pas visible avec le virus myxomateux sauvage. En revanche, ce dernier pourrait avoir un effet délétère sur le système immunitaire, réduisant ainsi l'efficacité du virus en tant que vecteur vaccinal.

Afin de résoudre ces difficultés, l'utilisation de Poxvirus à spectre d'hôte très étroit, l'exploitation de souches totalement apathogènes ou l'emploi de souches modifiées (comme le SG33) devraient réduire l'impact de ces inconvénients.

2.3. Méthodes de construction d'un virus recombinant vaccinal

En fonction du virus recombinant souhaité, on peut opter pour trois sites d'insertion d'ADN étranger : l'insertion intergénique, l'insertion intragénique et l'insertion en fusion protéique. La première stratégie consiste à intégrer le génome souhaité dans une zone ne modifiant pas les gènes du virus de base. On insère alors le gène désiré dans une partie non-codante. La majorité des virus recombinants Poxvirus est formée à partir de ce procédé. En intégrant l'antigène en position intragénique, on modifie le vecteur en remplaçant une protéine structurale du virus par l'antigène d'intérêt.

Les techniques actuelles utilisent les virus afin de coupler l'antigène d'intérêt à une protéine porteuse : c'est la fusion protéique. L'objectif de ces vaccins est de modifier les protéines structurales du virion en intégrant l'antigène souhaité. De la sorte, on modifie une protéine d'enveloppe, élément essentiel du virion, afin d'exprimer l'antigène désiré à la surface des virions recombinants. Cette technique pourrait améliorer l'immunogénicité de l'antigène intégré, surtout dans le cas de protéines de petites tailles ou de peptides. Ce procédé a été exploité sur d'autres virus comme celui de l'hépatite B [1]. Cependant, à l'heure actuelle, peu d'études ont été menées dans ce sens sur les Poxvirus [25].

L'équipe de Heesun Kwak [26] s'est servi de la protéine BR5 de l'enveloppe du virus de la Vaccine pour exprimer des antigènes du HIV-1. Sur le virus de la Myxomatose, une étude de l'INRA [27] s'est basée sur les protéines M022L et M071L. M022L est une protéine majoritairement présente sur les enveloppes des formes virales EEV. Il s'agit d'un peptide de 371 acides aminés et d'un poids moléculaire approchant les 41.5 kDa. M022L appartient à la famille des phospholipases et joue en rôle dans l'infectivité du virus.

Pour intégrer l'antigène souhaité, on utilise le principe de la construction par recombinaison homologue : (figure 10)

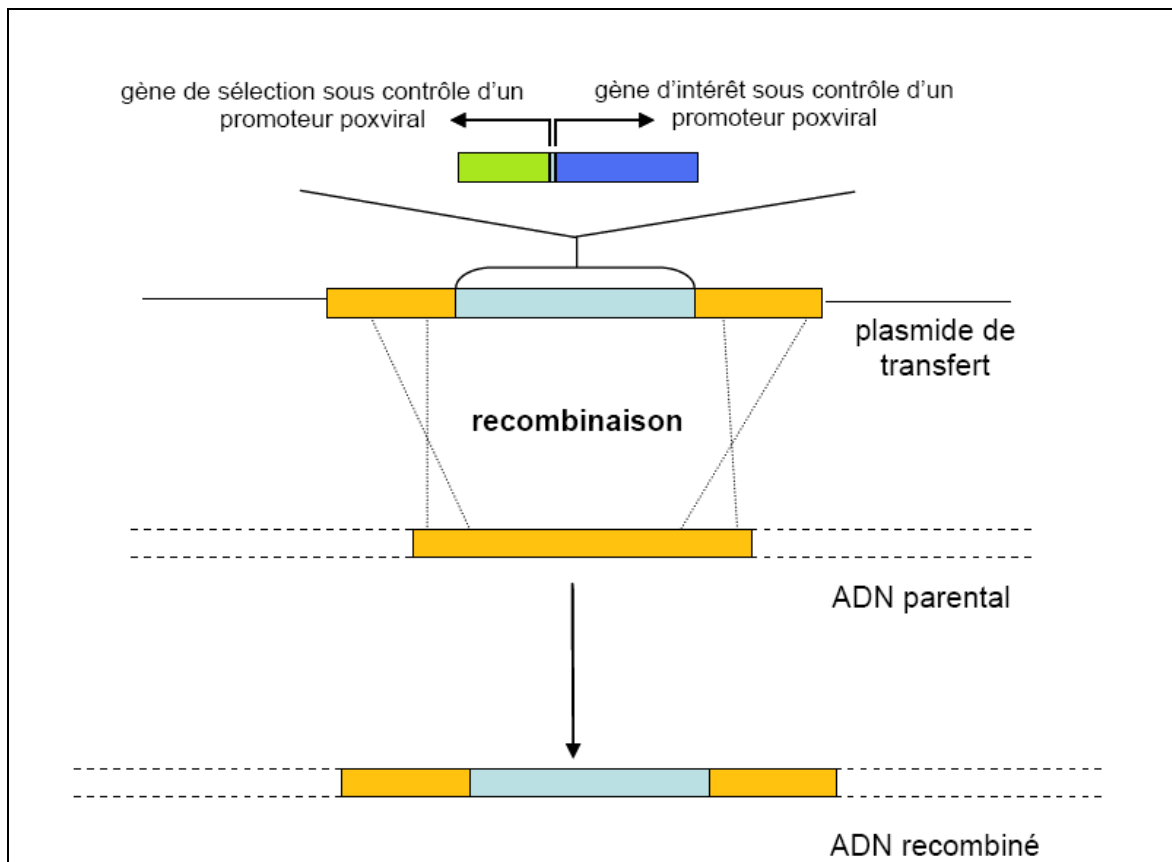


Figure 10 : Méthode de construction de Poxvirus recombinés

D'après Pignolet, 2007 [27]

La recombinaison homologue s'effectue entre 2 séquences d'ADN identiques. Lors d'un cycle de réplication, l'incorporation du gène souhaité, porté par le plasmide de transfert, peut se produire entre les séquences d'ADN parental.

3. LA SOUCHE SG33 : UNE SOUCHE VIRALE A LA BASE DES VIRUS RECOMBINANTS

3.1. Un virus myxomateux modifié

La souche atténuée SG33 a été mise au point en 1978 par Saurat et Gilbert au laboratoire de Maladies Contagieuses de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse par passages répétés du virus sur cellules de rein de lapin et sur fibroblastes d'embryon de poulet à température suboptimale (33°C).

La carte du génome myxomateux a été établie par Russell et Robins en 1989 [28]. En comparaison, le SG33 a perdu 15kpb dans la partie droite du génome [29]. Cette délétion est située au niveau des RIT avec notamment la disparition de plusieurs facteurs de pathogénicité. Les 6 gènes (Serp 2, Serp 3, MHR 1, MH R 2, MHR 3 et MV-LAP) codent pour des protéines immunomodulatrices (cf. supra). L'absence de ceux-ci explique la sécurité d'emploi du SG33 car la pathogénicité résiduelle est très faible, même dans l'espèce cible.

3.2. Utilisation actuelle du virus myxomateux SG33

A l'heure actuelle, le SG33 est la souche vaccinale utilisée pour protéger contre la myxomatose chez le lapin (Dervaximyxo SG33® et Dercunimix® du Laboratoire Merial [19]). Cette souche est également utilisée dans le vaccin mixte Myxomatose - virus de la maladie hémorragique du lapin (RHD) dont l'autorisation de mise sur le marché (AMM) n'a pas été encore validée. Dans ce vaccin, le virus SG33 exprime la protéine VP60 du calicivirus responsable du RHD (expression de la protéine en position intergénique).

Expérimentalement, la souche SG33 du virus myxomateux est utilisée dans la fabrication de virus recombinants. Comme nous l'avons dit précédemment, le spectre d'hôte étroit du SG33 (car issu du virus myxomateux) assure l'innocuité du virus en tant que vaccin du fait de l'absence de réplication chez un hôte non sensible. On peut citer par exemple le virus recombinant SG33-BTV2 (fièvre catarrhale ovine, Blue Tongue Virus souche Corse) [25]. Cette souche atténuée du virus myxomateux a été utilisée afin d'induire une immunité contre le virus de la fièvre catarrhale ovine.

On retrouve ce principe lors de la vaccination contre la grippe équine ou la leucose féline. Il s'agit de *Canaripoxvirus* recombinants exprimant les gènes HA de l'hémagglutinine de 2 souches virales de l'Influenza équine (Proteq-Flu®) ou les gènes GAG et ENV du FelV A (Purevax FelV®).

3.3. Réaction de l'organisme face au virus myxomateux souche SG33

La réponse de l'organisme face à une infection poxvirale se déroule en deux phases :

- Une réponse non spécifique et immédiate
- Une phase plus tardive dépendante des lymphocytes

On peut résumer cette réponse dans un schéma (figure 11) :

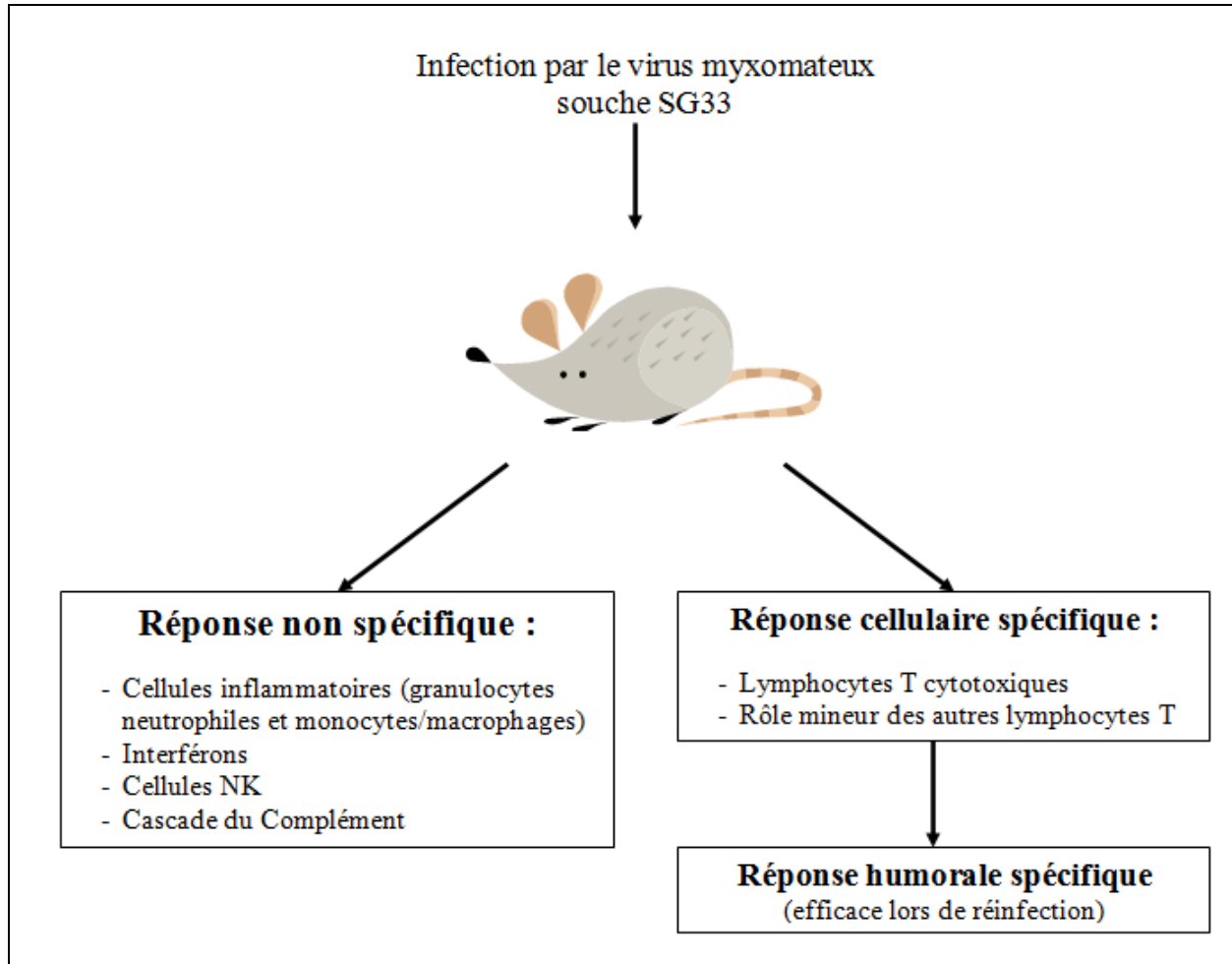


Figure 11 : Mécanismes de résistance vis-à-vis d'une infection avec le virus SG33

D'après Petit, 1997 [30]

La réponse non spécifique est un mécanisme de résistance immédiat face à un virus. Ce système intervient dans n'importe quelle infection virale.

La réponse cellulaire et humorale fait intervenir des effecteurs spécifiques du virus. La mise en place est plus tardive mais fait intervenir le système de mémoire immunitaire.

Les *Orthomyxoviridae* : à la recherche d'un antigène vaccinal

1. GENERALITES

1.1. Classification

Les *Orthomyxoviridae* comprennent les genres *Thogotovirus* et *Influenzavirus*. Ces derniers sont les agents responsables des Gripes. Il existe trois types d'*Influenzavirus* (A, B et C) : les *Influenzavirus* A regroupent des Gripes humaines et animales tandis que les *Influenzavirus* B et C uniquement des Gripes humaines.

La nomenclature des virus Influenza se base sur le genre, l'hôte, le lieu d'origine, le numéro du cahier et l'année d'isolement du virus. On peut citer par exemple les virus A/Sydney/5/93 ou B/Beijing/184/93. Dans le reste de notre exposé, nous parlerons principalement de la souche virale A/Porto Rico/8/34 (H1N1) autrement appelée PR8.

1.2. Transmission

Les *Orthomyxoviridae* se transmettent par des aérosols contaminés à partir des sécrétions (buccales ou nasales) ou des déjections d'animaux infectés. Les espèces cibles sont les Mammifères et les Oiseaux avec un spectre d'hôte restreint en fonction du type de virus.

1.3. Structure des Virus Influenza

L'ensemble des virus Influenza se présente sous la forme de particules enveloppées sphériques de diamètre compris entre 80 et 120 nm (figure 12 et 13).

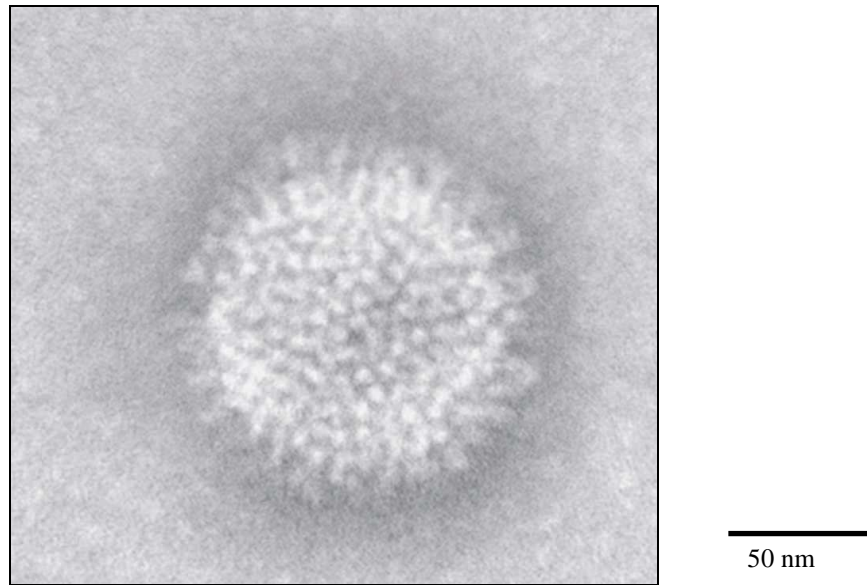


Figure 12 : Observation d'un virus Influenza en microscopie électronique
De Whittaker, 2001 [31]

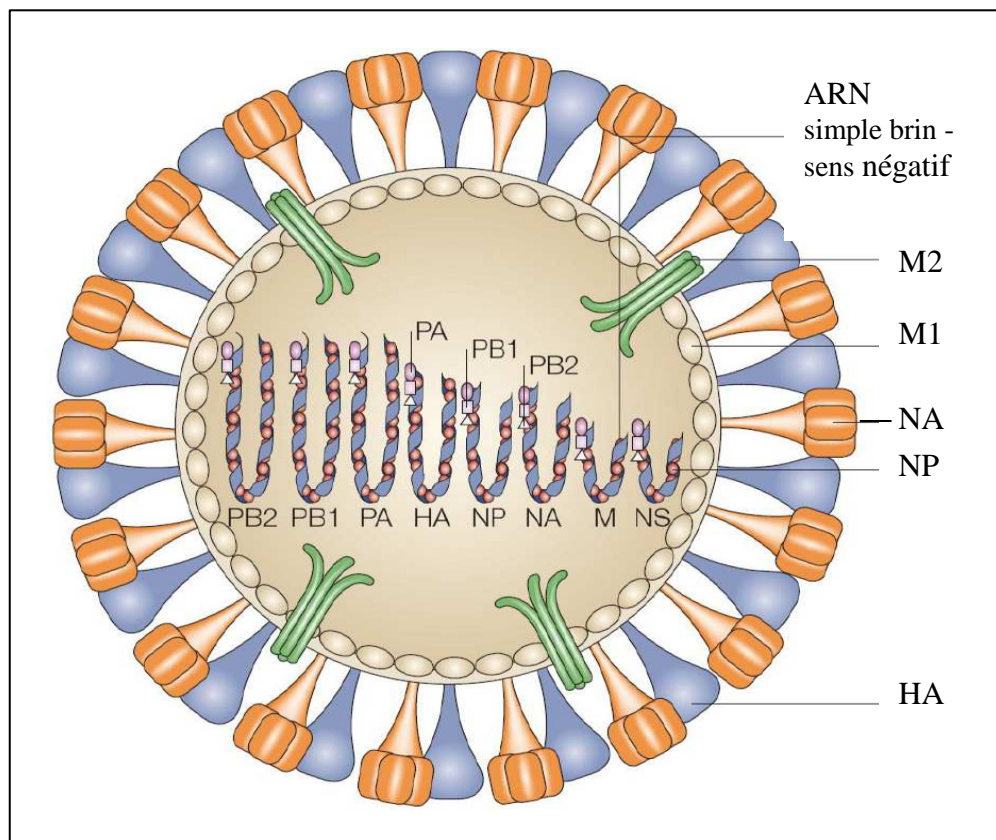


Figure 13 : Schéma d'un *Influenzavirus* de type A

D'après Horimoto, 2005 [32]

Les 8 segments d'ARN simple brin à polarité négative sont, par ordre croissant de taille : PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M et NS.

Les protéines issues de ces segments sont des protéines structurales de l'ARN (PA, PB1, PB2 et NP), des protéines d'enveloppes (M1, M2, NA, HA) ou des protéines non-structurales (NS1 et NEP-NS2).

Le génome des *Influenzavirus A* et *B* est composé de 8 segments d'ARN simple brin à polarité négative (c'est-à-dire complémentaire à l'ARNm). Les autres genres possèdent moins de segments (7 pour les *Influenzavirus C* et 6 pour les *Thogotovirus*). La longueur des segments est comprise entre 10 et 13.6 kb. [32]. Chaque segment est présent sous une forme circulaire stabilisée par des paires nucléotidiques entre les extrémités 3' et 5' [33]. L'ensemble du génome code pour 11 protéines (figure 14).

L'enveloppe des virions des *Influenzavirus A* et *B* dérive des membranes cellulaires par incorporation de glycoprotéines : les hémagglutinines et les neuraminidases. Les hémagglutinines (HA) sont formées d'un trimère de protéines codées par le segment 4 jouant un rôle dans la reconnaissance spécifique des acides sialiques. Les neuraminidases (NA) sont composées de quatre protéines issues du segment 6. Chez les *Influenzavirus A*, il existe 16 HA et 9 NA différentes à l'origine d'un grand polymorphisme (cf. infra). Chez les *Influenzavirus C*, ces glycoprotéines sont « regroupées » en une seule hémagglutinine-estérase HE.

De ce fait, une autre classification a été bâtie à partir de la répartition entre les HA et les NA (H1N1, H3N2, ...).

D'autres protéines sont intégrées à la membrane des virions. Les protéines M1 et M2 sont des protéines codées par le segment 7. La première, appelée protéine de matrice, est le polypeptide le plus abondant du virion. La protéine M2 est un canal à ions transmembranaire. La biologie de cette protéine est décrite plus en détail dans un prochain paragraphe.

Les autres protéines structurales du virion sont appelées les RiboNucléoProtéines (RNP). Elles sont formées des nucléoprotéines (NP) stabilisant le génome ainsi que de l'ARNpolymérase, constituée de trois protéines associées (PB1, PB2 et PA). Le segment 8 code pour deux autres protéines non-structurales (NS 1 et NEP-NS2).

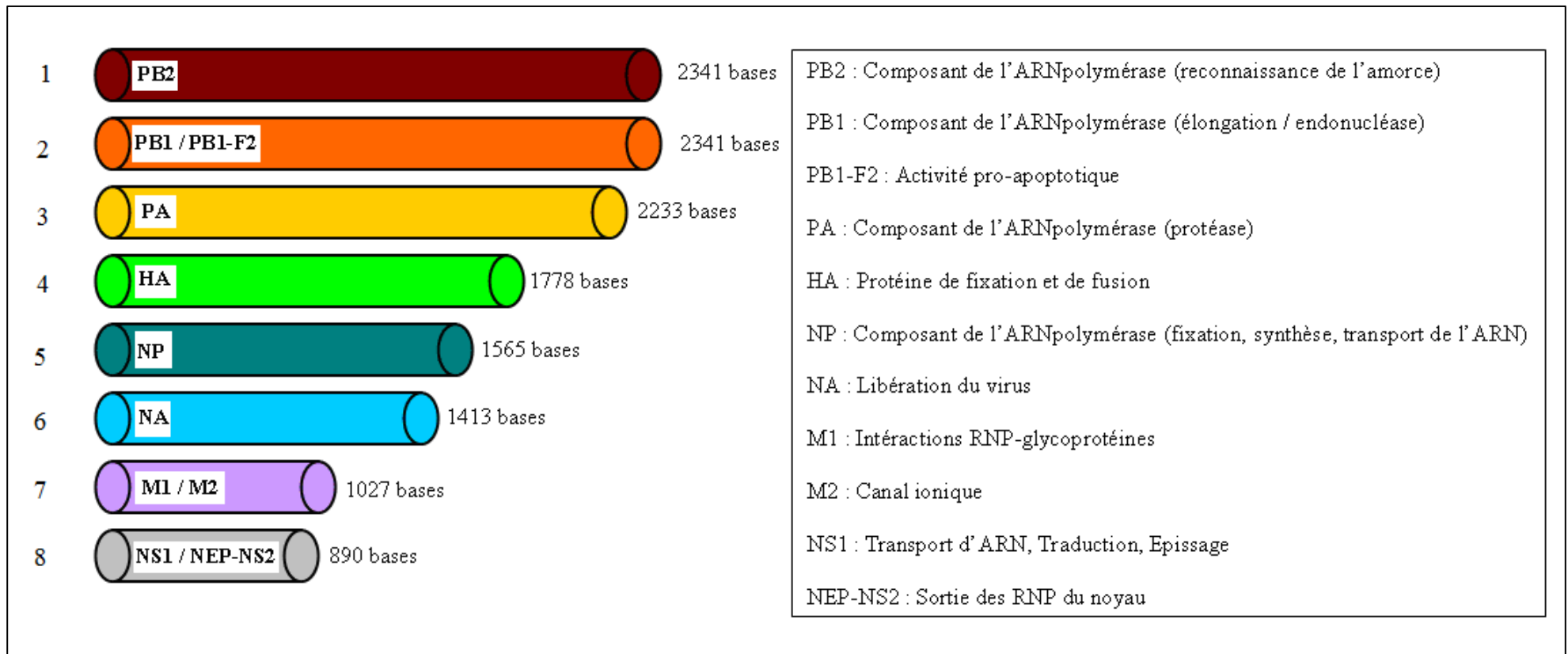


Figure 14 : Schéma des 8 segments d'ARN d'un *Influenzavirus A* et des protéines associées

A chaque segment correspond une ou deux protéines.

Les rôles de chacune des protéines sont définis dans le tableau à droite.

1.4. Cycle réplcatif

Le cycle réplcatif des virus Influenza peut se découper en 3 grandes étapes : l'entrée dans la cellule, la réplcation virale et le bourgeonnement des nouveaux virions (figure 15).

L'entrée dans la cellule du virion s'effectue par le biais des hémagglutinines et des neuraminidases. La protéine HA du virus se fixe soit sur des acides sialiques $\alpha 2,3$ (uniquement présents chez les Mammifères) ou $\alpha 2,6$ (récepteurs présents chez les Oiseaux et les Porcs). Puis, elle est clivée par une protéase cellulaire. Cela permet l'exposition du peptide de fusion. On assiste alors à la fixation et fusion du virus avec la cellule.

Le virus se retrouve dans un endosome où le pH faible entraîne la libération du génome viral dans le cytoplasme. Celui-ci migre vers le noyau de la cellule. A partir de là, l'ARNm est synthétisé puis traduit en protéines.

Enfin, les nouveaux virions sont assemblés dans le cytoplasme. Le bourgeonnement des virus s'effectue à la surface de la cellule grâce à la HA qui se fixe à nouveau sur l'acide sialique. Puis la NA dégrade l'acide sialique et provoque la libération du virus dans l'organisme.

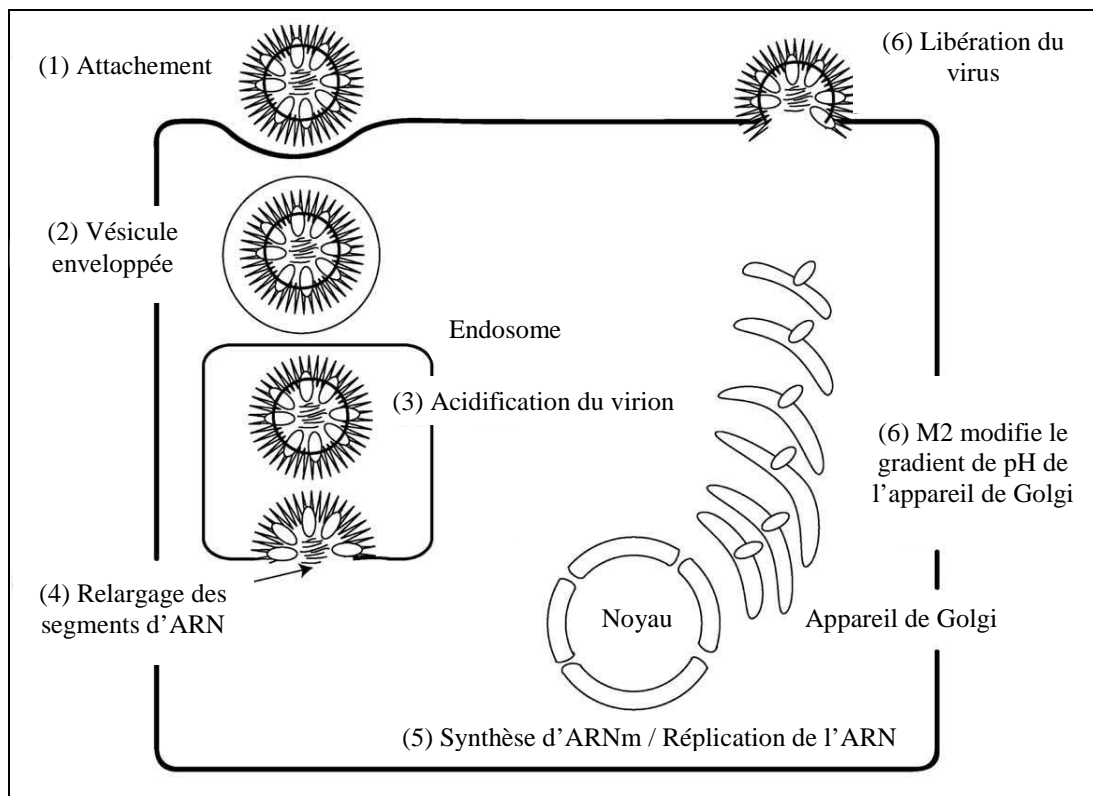


Figure 15 : Schéma du cycle viral d'un *Influenzavirus*

D'après Kelly, 2003 [33]

1.5. Evolution des Virus Influenza

L'évolution des virus Influenza dépend directement des propriétés génomiques. En effet, le génome à ARN segmenté est à l'origine de deux types de réorganisation.

Tout d'abord, l'ARNpolymérase induit une répllication avec de forts taux d'erreurs. Cette dérive antigénique entraîne des modifications légères des virus.

En parallèle, si plusieurs virus Influenza infectent la même cellule, il est possible que des réassortiments s'effectuent entre les différents segments d'ARN (figure 16). Dans ce cas, un nouveau virus est formé et il peut ne pas exister d'immunité. En réalité, ce nouveau sous-type viral ne peut être reconnu par le système immunitaire puisqu'il est trop différent des autres *Influenzavirus* qui ont circulé précédemment. L'organisme n'est donc pas protégé.

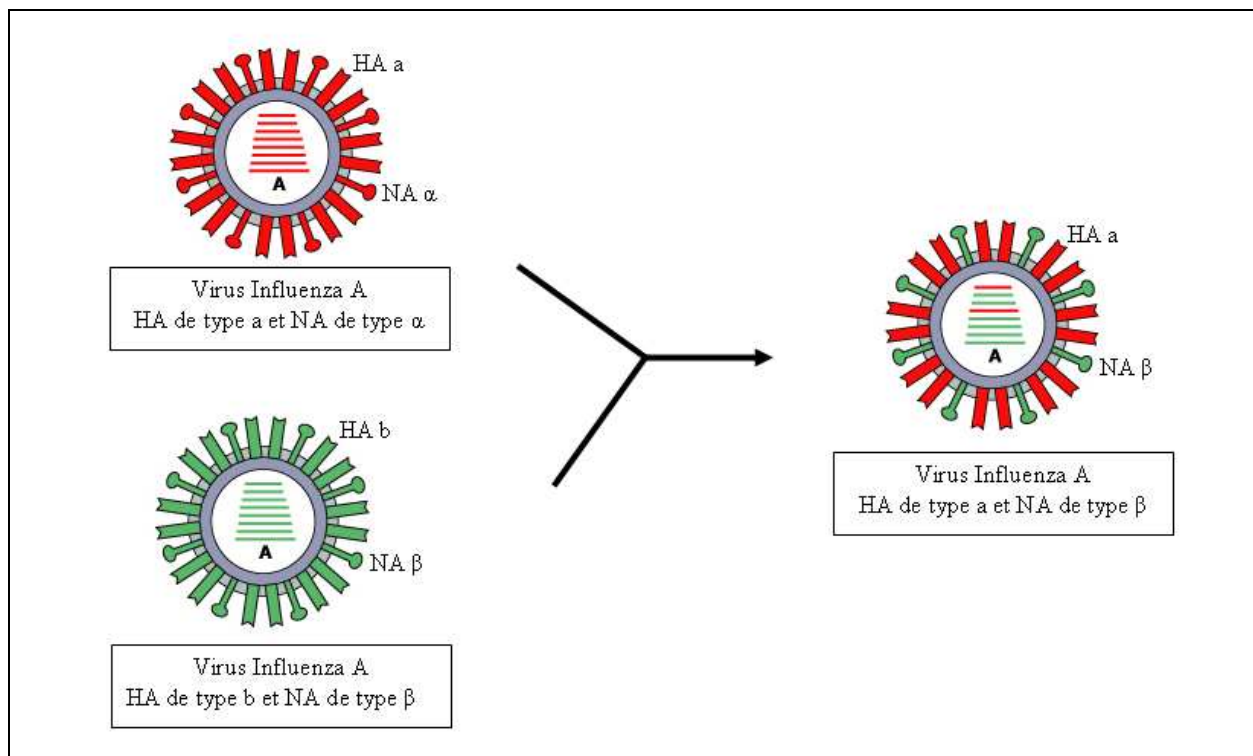


Figure 16 : Schéma de la cassure antigénique

Lors de co-infection d'une même cellule par deux virus Influenza très proches, un réarrangement des différents segments d'ARN peut s'effectuer. Les principales modifications concernent principalement les neuraminidases et les hémagglutinines. Il en résulte l'apparition d'un nouveau virus.

Dans cet exemple, le nouveau virus obtenu est HA de type a et NA de type β. Par le même procédé, un virus comportant les protéines HA de type b et NA de type α peut également apparaître.

2. VACCINATION CONTRE LES VIRUS INFLUENZA

2.1. Vaccins actuels

Les vaccins contre la grippe sont basés sur les protéines majeures du virion [35]. Les hémagglutinines et les neuraminidases sont des glycoprotéines à haut pouvoir immunogène et facilement accessibles car exprimées à la surface des virions. Au final, trois types de vaccins sont possibles :

- Vaccins à virus entier inactivé
- Vaccins à virions fragmentés composés de particules obtenues après traitement par des détergents
- Vaccins sous-unités composés d'hémagglutinines et de neuraminidases après élimination des autres composants du virus

Depuis 2003, il existe sur le marché américain un vaccin intra-nasal basé sur 3 souches virales atténuées : FluMist® [36]. Il est obtenu par culture cellulaire à 25°C. L'intérêt majeur de ce procédé est que le virus réplique au niveau du nasopharynx et induit une réponse immunitaire locale (production d'IgA) et systémique (production d'anticorps neutralisants).

Aujourd'hui, la plupart des vaccins sont produits à partir d'œufs embryonnés de poulet. Une fois les particules virales récupérées, elles sont inactivées avec du formaldéhyde. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'il peut exister une allergie aux protéines d'œuf. De même, les réserves d'œufs embryonnés ne sont pas assurées à long terme. Normalement, aucun adjuvant n'est intégré dans la fabrication. Pour le vaccin contre le virus H1N1, certains vaccins ont été produits sur cellules (singe et chien) et ont été adjuvés (vaccin Celtura® de Novartis [37]).

2.2. Absence d'immunité durable

Chaque année, les virus Influenza se modifient à cause de la dérive antigénique et de la pression de sélection. Les souches virales utilisées lors de la fabrication des vaccins doivent être réactualisées chaque année. La composition des vaccins est ajustée en fonction des souches les plus récentes d'Influenza A (H3N2 et H1N1) et B. Pour les vaccins de l'année 2008-2009, les souches virales retenues sont les souches A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Brisbane/10/2007 (H3N2) et B/Florida/4/2006 ou B/Brisbane/3/2007.

Dans ces circonstances, les vaccins inactivés conventionnels protègent environ 80% de la population vaccinée. Dans tous les cas, aucun vaccin actuel ne protège contre les nouveaux variants issus d'une cassure antigénique.

3. LA PROTEINE M2 : UNE PROTEINE COMMUNE A L'ENSEMBLE DES VIRUS INFLUENZA

3.1. Localisation et structure

La protéine M2 est codée par le segment 7 (figure 17). Cette portion d'ARN est composée de 1027 nucléotides et code pour 2 protéines : M1 (252 acides aminés) et M2 (97 acides aminés dérivés de M1 par des délétions).

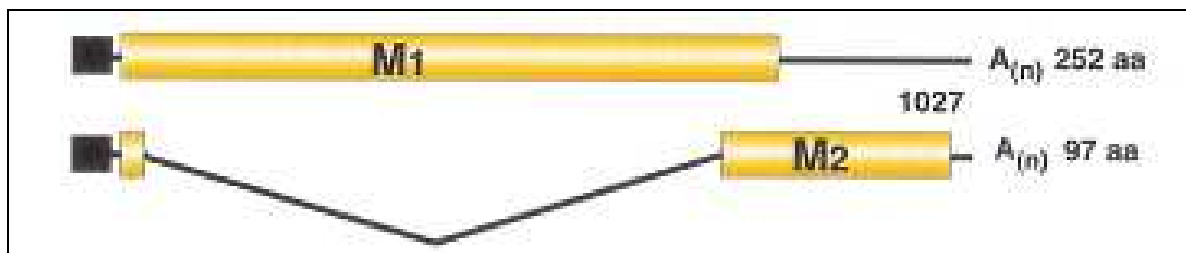


Figure 17 : Schéma des protéines du segment 7 d'un *Influenzavirus A*

De Virus Taxonomy, 2005 [10]

A partir d'un segment d'ARN de 1027 nucléotides, on obtient les protéines M1 (252 acides aminés) et M2 (97 acides aminés).

La protéine M2 est un homotétramère de type III relié par deux ponts disulfures (figure 18). On identifie 3 domaines : 54 acides aminés en portion intracellulaire, 19 en transmembranaire et la partie N-terminale constituée de 23 acides aminés en position extracellulaire [38]. Les 4 hélices forment un angle dans la bicouche lipidique formant un canal à ions.

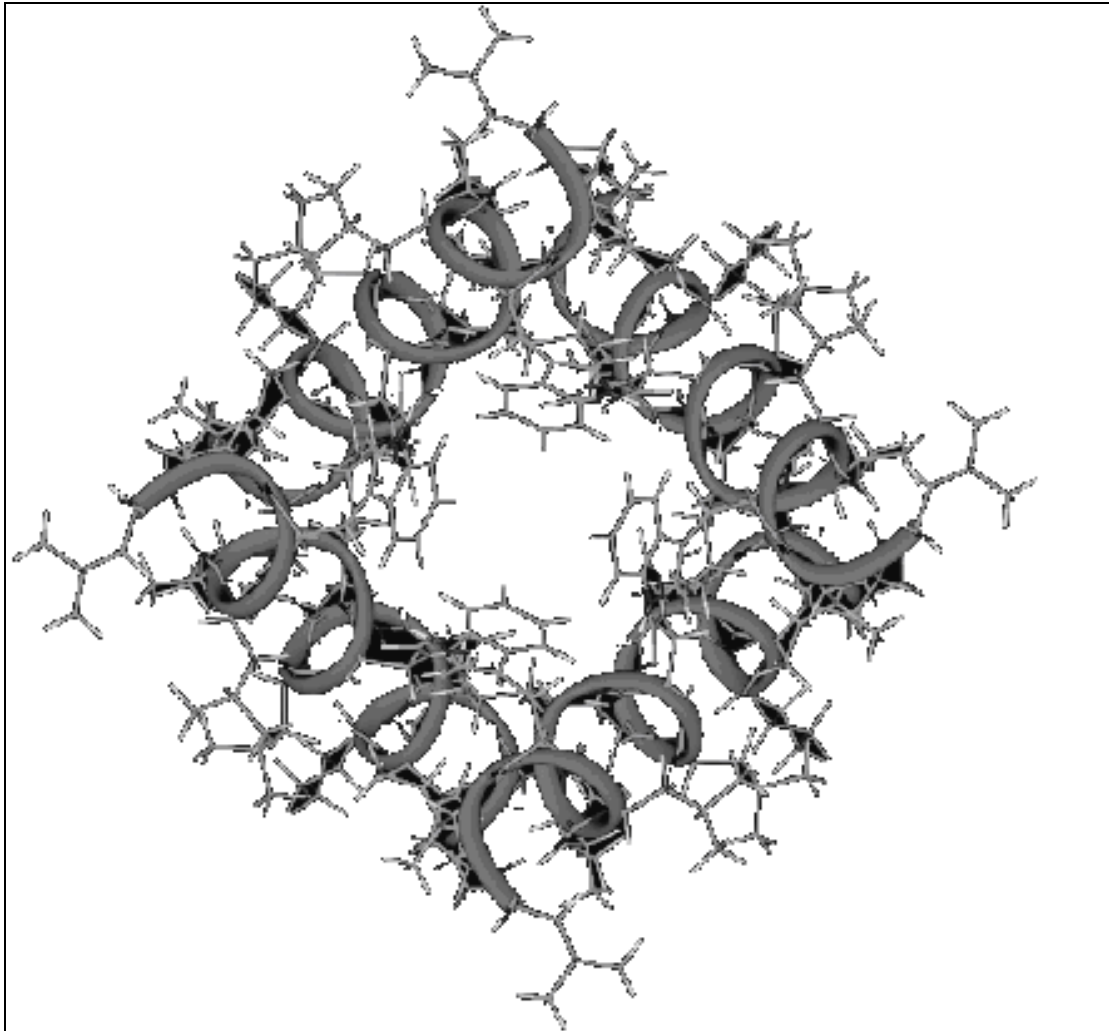


Figure 18 : Schéma de la protéine M2 d'un virus Influenza A

De Fiels Virology, 2007 [7]

Vue de dessus

Les parties les plus foncées représentent les 4 hélices α de la protéine M2.

La partie centrale correspond au canal transmembranaire.

La protéine M2 est exprimée abondamment dans le cytoplasme mais peu dans le virion (entre 20 et 60%). De plus, on localise cette protéine principalement au pôle apical des cellules infectées [39].

Depuis l'isolement des virus Influenza en 1918, des séquençages de l'ensemble des virus ont été réalisés. La connaissance de l'ensemble du génome a permis de se rendre à l'évidence que la séquence de protéines M2 des *Influenzavirus A* est remarquablement conservée [40/41/42].

Pour être exact, il apparaît quelques changements dans les acides aminés (figure 19) mais il y a très peu de modifications dans la structure tridimensionnelle. De ce fait, on va pouvoir se baser sur la séquence extracellulaire comme antigène cible pour la réponse immunitaire.

Souche représentative	Sous-type	Hôte	Séquence des acides aminés
Consensus H1/H2/H3	---	---	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDP
A/New Caledonia/20/99	H1N1	Humain	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDP
A/Aichi/470/68	H3N1	Humain	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDP
A/Canada/720/05	H2N2	Humain	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDP
A/Berkeley/1/68	H2N2	Humain	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDP
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	Humain	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDP
A/Wisconsin/3523/88	H1N1	Humain	SLLTEVETPIRNEWGCKCNDSSDP
A/Hebei/19/65	H3N2	Humain	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDP

Figure 19 : Séquences des acides aminés de l'ectodomaine de la protéine M2 de souches représentatives de souches virales Influenza A

D'après Huleatt, 2007 [43]

Les résidus qui diffèrent de la séquence consensus sont soulignés et mis en gras.

La séquence consensus correspond à la séquence « universelle ». On retrouve cette séquence dans la majorité des génomes de virus Influenza A.

3.2. Rôle dans le cycle viral

Le rôle de cette protéine a été défini par Lamb en 1985 [39] et Wang en 1994 [44]. La protéine M2 est un élément essentiel lors de l'assemblage et le bourgeonnement des nouveaux virions. D'autres études [45] ont permis de montrer que la partie intracytoplasmique de M2 sert de transporteur au génome lors de la construction des nouveaux virions.

On estime également que son activité sélective de canal à protons est responsable de la baisse du pH dans l'endosome [34]. M2 est un canal sélectif aux ions H^+ . Cette acidification entraîne alors la destruction des interactions entre les protéines et les lipides du virus et donc la décapsidation du virus dans la cellule (figure 20). De même, l'entrée des protons dans le virus permet la dissociation du RPN.

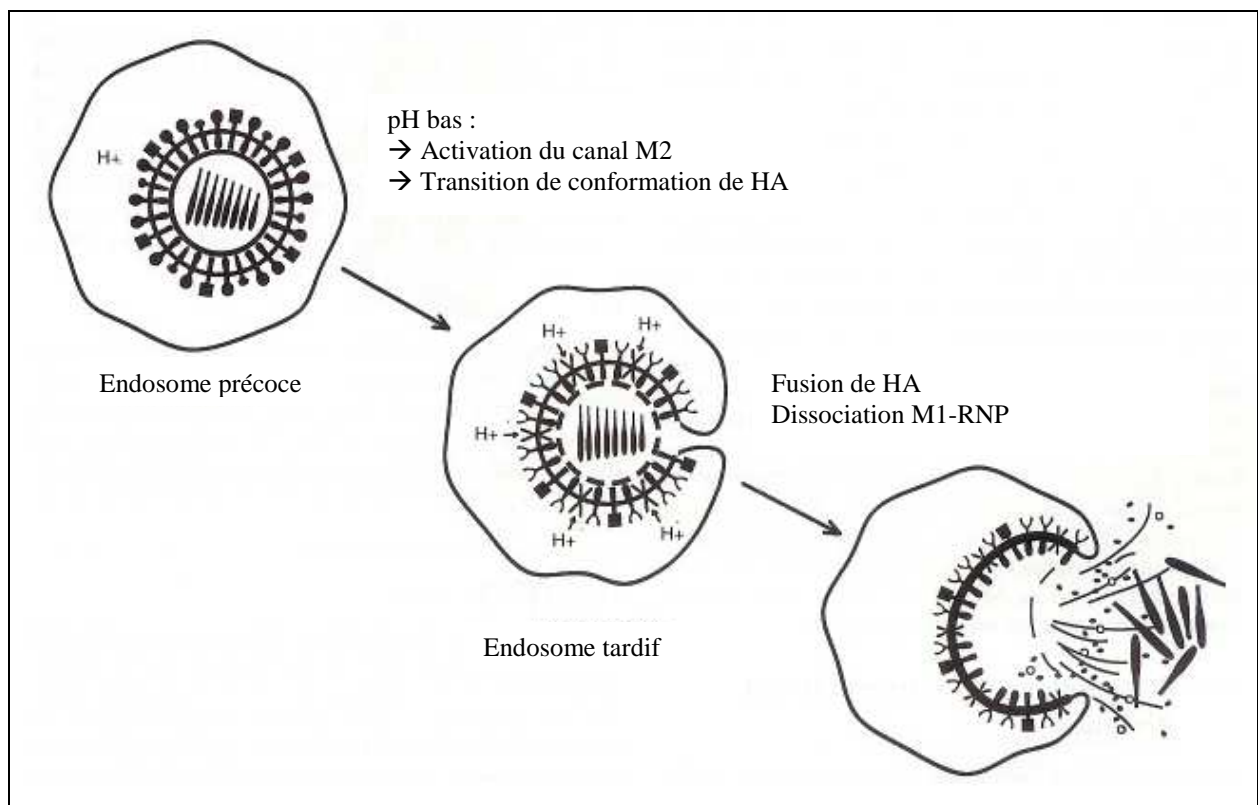


Figure 20 : Rôle de la protéine M2 lors de la fusion membranaire entre le virus Influenza et l'endosome

D'après Mahy, 1998 [46]

Le virus Influenza rentre dans la cellule par endocytose. Le pH faible de cet endosome active le canal à proton (protéine M2) et induit une transition de conformation de l'hémagglutinine. Au final, les membranes de l'endosome et du virion fusionnent et les particules virales sont libérées dans le cytoplasme cellulaire.

3.3. Immunogénicité de la protéine M2

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ectodomaine de la protéine M2 est relativement bien conservé en termes de séquence nucléotidique. La plupart des études actuelles se base donc sur ce peptide. La réponse immunitaire contre ce peptide semble principalement être une réponse à médiation humorale. Le peptide M2e seul semble donc très immunogène.

En 1988, l'équipe de Zebedee [47] a montré qu'un anticorps monoclonal contre M2e (nommé 14C2) entraînait la restriction de la réplication virale in vitro (diminution du nombre de plaque de lyse). Cette action des anticorps monoclonaux a été confirmée par Treanor en 1990 [48]. En effet, dans cette étude, la réplication virale fut divisée par 100 mais l'infectivité du virus n'a pas été affectée. En parallèle, il a été démontré que les anticorps 14C2 protègent des souris naïves lors d'épreuves virulentes. Il existe donc une protection passive (anticorps neutralisants).

En se basant sur la séquence consensus du peptide M2e (cf. figure 19), des résultats moins probants ont été décrit [43]. Dans leur cas, le peptide M2e synthétisé était alors peu immunogène car de taille faible (23 acides aminés). Dans le même temps, la présence d'anticorps IgG1 et de lymphocytes T helper a pu être mise en évidence après une immunisation par de la protéine M2e adjuvée [49]. En 1993, un vaccin recombinant associant la protéine de core du virus de l'hépatite B (HBc) et la protéine M2 [41] a été construit. Ce dernier s'est révélé très immunogène.

Les vaccins basés sur l'ectodomaine de la protéine M2 procurent une protection croisée contre les virus Influenza humains. Par exemple, des souris vaccinées à l'aide de vaccin ADN (contenant la séquence M2e du virus A/PR/8) ont survécu à une épreuve virulente avec le virus A/PR/8 ou avec le virus A/FM [50].

En conclusion, le peptide M2e semble être un bon candidat comme antigène cible pour la réponse immunitaire.

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

Introduction

Notre projet d'étude est basé sur un virus recombinant issu de la fusion entre l'ectodomaine de la protéine M2 d'un virus Influenza et la protéine d'enveloppe M022L d'un Poxvirus, le SG33. Le recombinant obtenu servira de vaccin vivant afin d'immuniser des individus contre le peptide M2e et de les protéger contre une épreuve virulente à l'aide d'un virus Influenza H1N1.

Pour réaliser notre objectif (créer un vaccin contre la grippe animale), nous avons mené deux expérimentations complémentaires.

La première a consisté en l'immunisation de souris à l'aide d'un peptide M2e-PR8. Le but était de vérifier les capacités immunogènes du peptide et de tester les aptitudes protectrices des immunoglobulines anti-M2e après épreuve virulente à l'aide d'un virus Influenza de type A, le virus PR8 (H1N1).

Pour la seconde expérimentation, nous sommes partis d'un virus recombinant myxomateux M2e-M022L construit au laboratoire INRA par l'unité UMR 1225 IHAP.

Avant d'éprouver sur l'animal, nous avons d'abord vérifié la construction virale. En effet, pendant la phase de purification, l'unique contrôle est le séquençage du gène modifié afin de constater la présence des segments nucléotidiques insérés. Cependant, rien lors de la construction ne permet d'évaluer l'expression de la protéine M2e-M022L. Il s'avérait nécessaire d'apprécier la présence effective du peptide M2e au sein de notre vaccin. Le Western Blot et l'Immunofluorescence ont ainsi permis de constater l'expression de l'ectodomaine de la protéine M2 par le virus recombinant.

Nous avons ensuite immunisé des souris et effectué une épreuve virulente. La première étape du suivi des souris a été le suivi clinique. Dans un deuxième temps, nous avons examiné les plasmas récupérés via une technique ELISA ou Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Notre objectif était d'estimer la réponse immunitaire humorale induite par le recombinant virus myxomateux M2e-M022L contre le vecteur SG33 et le peptide M2e. Deux étapes successives ont été réalisées. Tout d'abord, nous avons réalisé un test ELISA afin de repérer les anticorps anti-M2e, puis un second test capable de détecter la présence d'anticorps anti-SG33. Ce dernier permet de vérifier si le système immunitaire de nos souris a effectivement été en contact avec le recombinant.

Matériels et Méthodes

1. VIRUS

1.1. Souches virales utilisées

La souche de virus myxomateux est la souche SG33. Il s'agit de la souche vaccinale utilisée en prévention de la Myxomatose chez le lapin (Dervaximyxo SG33® et Dercunimix® du Laboratoire Merial [19]).

Concernant le virus Influenza, nous nous sommes servis du virus PR8 (souche A/Porto Rico/8/34 (H1N1)). La séquence de l'ectodomaine de la protéine M2 est également issue du PR8 (cf. figure 19).

1.2. Méthode d'insertion de la protéine étrangère et obtention des virus recombinants

Dans cette expérience, la souche vaccinale a été bâtie par fusion protéique entre l'ectodomaine de la protéine M2 (appelé M2e) du virus Influenza et la protéine membranaire M022L du SG33.

La méthode d'obtention passe par la création de plasmides de transfert (figure 21). Ils ont été obtenus après fusion amino-terminale entre M2e et M022L. Le nouveau virus a été ensuite généré selon des procédures standards de recombinaison : infection de cellules par un virus myxomateux puis transfection avec les plasmides.

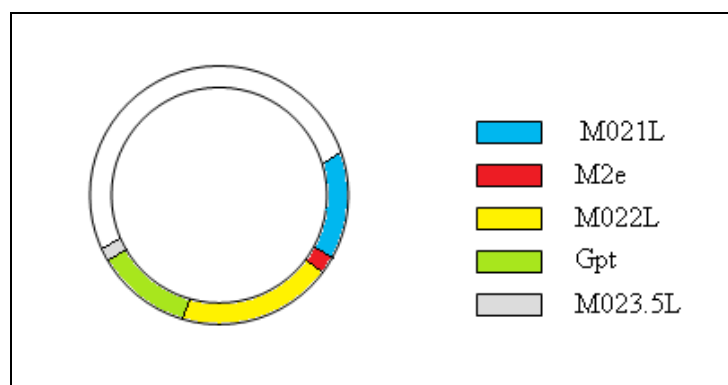


Figure 21 : Schéma du plasmide de transfert utilisé lors de la fabrication du virus recombinant VM M2e-M022L

Le plasmide de transfert contient des séquences appartenant au virus SG33. Ces dernières vont permettre la recombinaison homologue avec le virus SG33. Au final, les gènes codant pour le peptide M2e et la protéine gpt seront exprimés par le virus recombinant SG33 M2e-M022L.

Au final, nous obtenons une nouvelle protéine nommée M2e-M022L exprimée à la surface d'un SG33. La séquence de la protéine obtenue est la suivante : figure 22

```

MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDSSMVSLFSKPPPGAGCRIVETVPENLGITTQHMHTHECFDELITQA
KRYIHIAFCCNLRTTDDQGRIMKKLKEAAKSGVRVTILVDYQSGNKDEEELLESNVEYIKVKIGKRY
NPGVLLGSFWIVDGTRCYIGNASLTGGISISNIKTLGVYSTYAPLAADLERRFSTFKAFNGNKSILSILHT
ACCLTTSTQYNINNPIGGVFLSDSPDYMLGCSRTLADVVVLGKISKAKKSICLELLSLVPVIREDEKTV
YWPNIYNELICAAINRGVKVRLIGSWSNNDIYVMSSVKSLQAMCSNNDLIVKVFYDKNNTKLMIVD
DEFAHITPANFDGTHYL RHAFVSFNTVHPELVHMLNAIFTRDWENPRNTVVKN
  
```

Figure 22 : Représentation de la séquence de la protéine M2e-M022L

En noir : séquence de la protéine M022L
 En rouge : séquence du peptide M2e
 En bleu : séquence de la protéine M022L modifiée afin d'intégrer le peptide

La sélection du virus souhaité s'effectue par « pression de sélection ». Pendant la création du recombinant, on associe à l'insert un gène marqueur (ici le gène gpt ou xanthine guaninephosphoribosyl transférase) codant pour un intermédiaire lors de la biosynthèse d'énergie (formation de GTP). Le milieu de sélection MXHAT contenant de l'acide mycophénolique (MPA), de la Xanthine, de l'Hypoxanthine, de l'Aminoptérine et de la Thymidine va permettre l'évolution des cellules infectées par le virus recombinant possédant les gènes intégrés souhaités (figure 23). En effet, seules les cellules produisant du TTP, de l'ATP et du GTP se développeront.

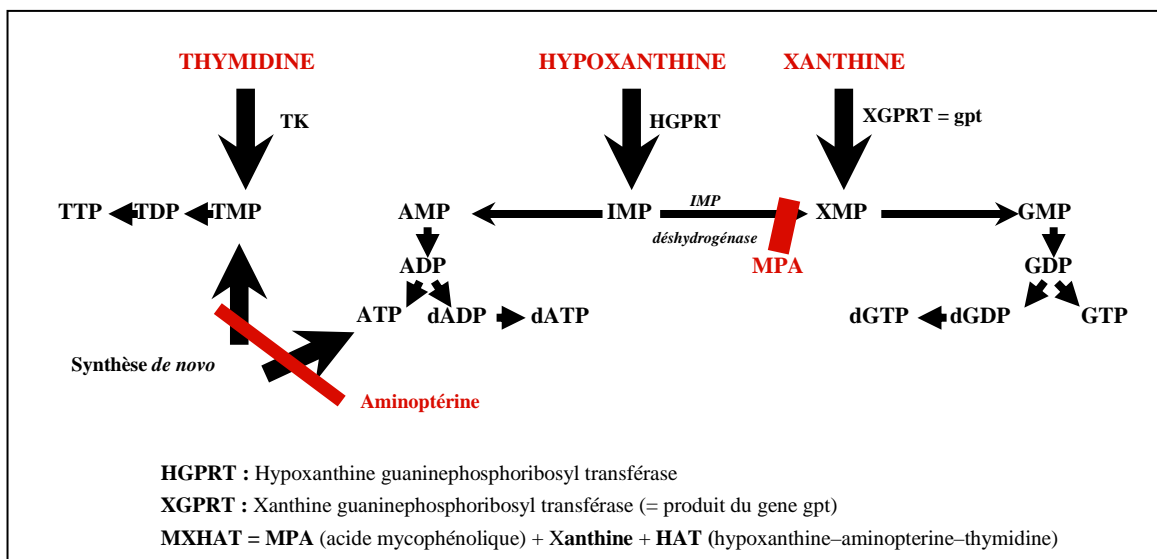


Figure 23 : Le système de sélection gpt

Les synthèses de novo de TMP et d'AMP sont bloquées par l'aminoptérine. La synthèse de GMP est bloquée par l'acide mycophénolique (MPA). La complémentation dans le milieu de sélection avec de la Thymidine permet de récupérer la synthèse de TMP. L'Hypoxanthine et la Xanthine permettent, grâce à l'activité de XGPRT (produit du gène gpt) de récupérer respectivement la synthèse d'AMP et de GMP.

2. SOURIS

L'ensemble des manipulations a été effectué sur des souris femelles Balb/cJ.

L'étape d'immunisation de l'expérience n°1 a été menée avec huit souris femelles Balb/cJ de 5 semaines. Les dix souris témoins sont des souris Balb/cJ de 7 mois (femelles reproductrices de réforme). Au final, les 17 souris ont formé 2 lots :

- Souris témoins : 2 cages de 5 souris
- Souris immunisées M2e-PR8 : 1 cage de 3 souris et 1 cage de 4 souris

Pour la seconde expérience, l'immunisation par le virus recombinant et l'épreuve virulente, des souris Balb/cJ de 5 semaines ont été réparties aléatoirement en lot de 5 de la manière suivante :

- Suivi clinique :
 - o 4 cages de souris témoins recevant des injections de VM SG33
 - o 4 cages de souris témoins recevant des injections de VM M2e-M022L
- Suivi sérologique :
 - o 2 cages de souris témoins recevant des injections de VM SG33
 - o 3 cages de souris témoins recevant des injections de VM M2e-M022L

3. PROTOCOLE D'INOCULATION

3.1. Expérience n°1

L'immunisation s'est effectuée avec un peptide M2e-PR8. La séquence choisie a été SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD. Le peptide a ensuite été couplé avec du MBS ou ester de m-MaleimidoBenzoyl-N-hydroxySuccinimidine. Les huit souris Balb/cJ ont reçu trois injections sous-cutanées, chacune séparées de 3 semaines : une avec un mélange de 10 µg de peptide M2e-PR8 + adjuvant complet de Freund et les deux autres avec un mélange de 10 µg de peptide M2e-PR8 + adjuvant incomplet de Freund. Des prises de sang ont été effectuées en parallèle des immunisations puis tous les quinze jours pendant 1 mois.

Une épreuve virulente a été réalisée 6 mois après la dernière immunisation avec le peptide M2e-PR8. Chaque souris (7 issues de l'étape d'immunisation et 10 témoins) a reçu une injection intra-nasale de 1000 pfu de virus Influenza PR8.

3.2. Expérience n°2

Lors de l'immunisation, chaque souris a reçu toutes les deux semaines une injection de 100 µL de virus (soit le SG33 soit le VM M2e-M022L) à la concentration de 10^7 pfu/100 µL en DMEM (milieu de Dubelco complet). La première injection a été réalisée en sous-cutanée et les deux suivantes en intra-péritonéale sans adjuvant. La durée totale de l'immunisation est de 6 semaines.

Les 8 lots de souris correspondant au « Suivi clinique » ont alors participé à l'épreuve virulente. Cette épreuve (injection intra-nasale de 1000 pfu de virus Influenza PR8) a débuté 2 semaines après la dernière immunisation et un suivi clinique rigoureux pendant 25 jours a été réalisé.

En parallèle, des prises de sang ont été faites sur les souris du lot « Suivi sérologique » pendant 75 jours avec un intervalle de 15 jours entre chaque prise de sang. Les tubes de sang, prélevés en sous-maxillaire ou en rétro-orbitaire, ont ensuite été centrifugés afin de récupérer le plasma.

4. SUIVI CLINIQUE DES ANIMAUX

Pour le suivi clinique, les critères ci-dessous ont été notés quotidiennement :

- Durée de survie
- Poids
- Aspect du pelage : tableau 3

Aspect du pelage	Normal	Poils peu ébouriffés	Poils ébouriffés	Poils très ébouriffés	Poils très ébouriffés et aspect mité
Notation	Ok	+	++	+++	++++

Tableau 3 : Système de notation de l'aspect du pelage

L'ensemble de ces paramètres a permis d'évaluer la réponse des souris lors de l'épreuve virulente. La durée de survie nous servira de paramètre de référence.

5. TECHNIQUES UTILISEES LORS DE CET ESSAI

5.1. Infection virales in vitro

Des cellules RK13 (Rabbit Kidney) ont été obtenues après cultures sur milieu de Dubelco complet (DMEM) dans une étuve à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂.

Pour le Western Blot (WB), 500 µL de virus (SG33 et M2e-M022L) ont été inoculés à des cellules RK13 en P6 (10⁶ pfu/mL). Les cellules sont incubées 2 heures puis lavées 2 fois en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) pour éliminer l'inoculum. Puis les cellules sont cultivées pendant 48 heures avec 1 mL de solution d'Opti-MEM + 2% SVF.

Pour l'Immunofluorescence (IF), nous avons ajouté 300 µL de virus (SG33 et M2e-M022L) à des titres de 1000 pfu/mL sur les RK13 cultivées en Labteck. Après 2 heures d'incubation, les cellules sont lavées puis cultivées pendant 36 heures. La fixation est réalisée avec du PFA 4% (Paraformaldéhyde 4%) pendant 1h30 à température ambiante.

5.2. Western Blot

Les gels de l'électrophorèse des protéines sont des gels dénaturants de 10 puits à 10% Bis-tri Gel w/Mops (NuPage®, Laboratoire Invitrogen®). On introduit alors les marqueurs de poids moléculaire et 25 µL d'échantillon par puits et on remplit la cuve à l'aide d'un tampon de cuve SDS Running Buffer 1x (composé de 50 mL de solution NuPage® SDS 20x + 950 mL d'eau distillé). Concernant la répartition, on verse 600 mL de tampon de cuve dans la chambre inférieure et le reste dans la chambre supérieure (dans laquelle on ajoute 500 µL d'antioxydant). La migration des protéines s'effectue à 4°C pendant 35 à 60 minutes entre 150 et 200 Volt.

La coloration au bleu de Coomassie et le transfert se réalisent dans la foulée. Des membranes de nitrocellulose sont prises en sandwich avec les gels. Le tout migre pendant 1h20 à 30V dans une cuve remplie d'un tampon de transfert en milieu réducteur. Ce tampon contient 50 mL de NuPage® transfert Buffer 20x + 1 mL de NuPage® anti-oxydant + 200 mL de Méthanol + 849 mL d'eau distillée.

La seconde étape du Western Blot est un marquage immunologique. Après avoir plongé les membranes dans une solution de blocage, composée de 10 mL d'eau distillé + 2 mL de Blocker/Diluent A + 3 mL de Blocker/Diluent B (kit Western Breeze, Laboratoire Invitrogen®) pendant 30 minutes, les anticorps primaires sont incubés pendant 60 minutes à température ambiante. Les anticorps (Ac) utilisés sont des Ac de lapin anti-virus myxomateux à 1/500^{ème}, des Ac de lapin anti-M022L à 1/100^{ème} et des Ac de souris anti-M2e (autrement appelés 14C2) à 1/100^{ème}. Les Ac anti-virus myxomateux et anti-M022L ont été obtenus dans notre laboratoire. Les anticorps 14C2 proviennent du laboratoire Santa Cruz Biotechnologies® (référence SC32238). Les anticorps secondaires sont des anticorps anti-anticorps de lapin ou de souris (kit Western Breeze, Laboratoire Invitrogen®). Ils sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante après un lavage avec 150 mL d'eau distillée additionnée de 10 mL d'Antibody wash solution 16x.

La révélation utilise la technique du WesternBreeze chemiluminescent. Pour cela, nos membranes accolées avec des films plastiques sont plongées dans une solution de 2,375 mL de substrat chemiluminescent + 125 µL d'enhancer de luminescence pendant 5 minutes à l'obscurité. Les films obtenus peuvent ensuite être exposés et lu avec le système Chemidoc® du Laboratoire BioRad®.

5.3. Immunofluorescence

Le marquage immunologique utilise des anticorps anti-virus myxomateux (titre de 1/500^{ème}) et des anticorps anti-M2e (titre de 1/100^{ème}) dont la provenance est la même que précédemment. Après 60 minutes d'incubation à 37°C et trois lavages successifs avec une solution de PBS-Tween 0,05%, les anticorps secondaires sont ajoutés. Ce sont des anticorps anti-lapin-FITC à la dilution 1/200^{ème} (obtenus sur chèvre, Laboratoire Sigma-Aldrich®) et d'Ac anti-souris-RodRX à la même dilution (obtenus sur singe, Laboratoire Jackson ImmunoResearch®). Le marquage TOPRO s'effectue après 60 minutes d'incubation à 37°C et trois rinçages au PBS-Tween 0,05%. Le mélange de 2,5 µL de TOPRO + 2500 µL de PBS est réparti dans l'ensemble des cupules pendant 15 minutes à température ambiante.

Après rinçage au PBS et montage de la labteck avec le milieu Vectashield® (Vector Laboratories®), les lames sont lues au microscope confocal à fluorescence.

5.4. ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

Le protocole retenu pour l'ELISA permet de mettre en évidence soit les anticorps contre le peptide M2e soit les anticorps contre le vecteur SG33.

Pour les anticorps anti-M2e, les supports sont des microplaques ELISA Falcon® tapissées de peptide M2e dilué (0,5 µg et de 2,5 µg par cupule) dans du tampon Carbonate-Bicarbonate à pH 9,6. Après une nuit d'incubation dans une étuve à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂, l'antigène est éliminé des plaques par lavage en PBS-Tween puis les cupules sont saturées d'une solution de gélatine dans du PBS (15 mg/mL) à raison de 100 µL par cupule (incubation pendant 60 minutes à 37°C).

Les échantillons de sérums sont alors déposés à raison de 100µL par cupule et dilués en fonction du plan de plaque avec du PBS-Tween (départ des dilutions au 1/50^{ème}). Ensuite, après 1 heure d'incubation, on dépose du conjugué phosphatase alcaline couplé à un anticorps anti-souris. La révélation s'effectue grâce au substrat PnPP ou p-Nitrophenyl Phosphate (2 tablettes de mélangées avec 10 mL de tampon diéthanolamine à 1 mg/mL) avec une lecture à la longueur d'onde de 405 nm après 10 ou 20 minutes.

Concernant l'ELISA pour la recherche des anticorps contre le SG33, le protocole est quasiment le même. Le virus qui tapisse les cupules est le virus SG33 cultivé au laboratoire. Il est issu d'une solution au 1/2000^{ème} et déposé à raison de 2.5 µg par cupule. Ensuite, les manipulations sont effectuées comme décrit ci-dessus : incubation pendant une nuit dans une étuve à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂, lavages des plaques au PBS-Tween avant de saturer les cupules d'une solution de gélatine dans du PBS à 15 mg/mL à raison de 100 µL par cupule. Le dépôt des échantillons et la révélation s'effectue comme indiqué précédemment. Pour la révélation, les anticorps utilisés sont des Ac anti-souris au 1/300^{ème} et des Ac anti-lapin au 1/300^{ème} (pour les témoins positifs).

Pour lire une plaque ELISA, quelques pré-requis sont nécessaires. Le seuil de positivité se définit par trois fois la valeur du témoin négatif la plus élevée. Il permet alors le contrôle des témoins mais aussi la détermination du taux d'anticorps (correspondant à la dernière dilution avec une valeur positive). La présence d'une quantité connue d'anticorps contrôle permet de quantifier la teneur en anticorps des sérums contrôlés.

5.5. Statistiques

Afin de déterminer la présence de différences statistiques entre les différents groupes, des tests de Mann Whitney ont été mis en place afin de comparer les différentes moyennes.

Résultats

1. LE PEPTIDE M2E INDUIT UNE REPOSE PROTECTRICE CONTRE LE VIRUS PR8

Le premier objectif était de valider peptide M2e comme antigène à l'origine d'une réponse immunitaire protectrice. Pour cela, nous avons effectué une épreuve virulente à l'aide d'un virus Influenza H1N1 (PR8) sur des souris immunisées avec l'ectodomaine de la protéine M2 et effectué un suivi clinique et sérologique de ces souris.

1.1. Suivi clinique

Suite à l'infection, le taux de survie des souris immunisées avec le peptide est de 100% alors que 50% des souris témoins sont mortes au bout de 9 jours (figure 24). D'un point de vue statistique, il existe une différence significative entre les deux groupes ($p < 0.05$).

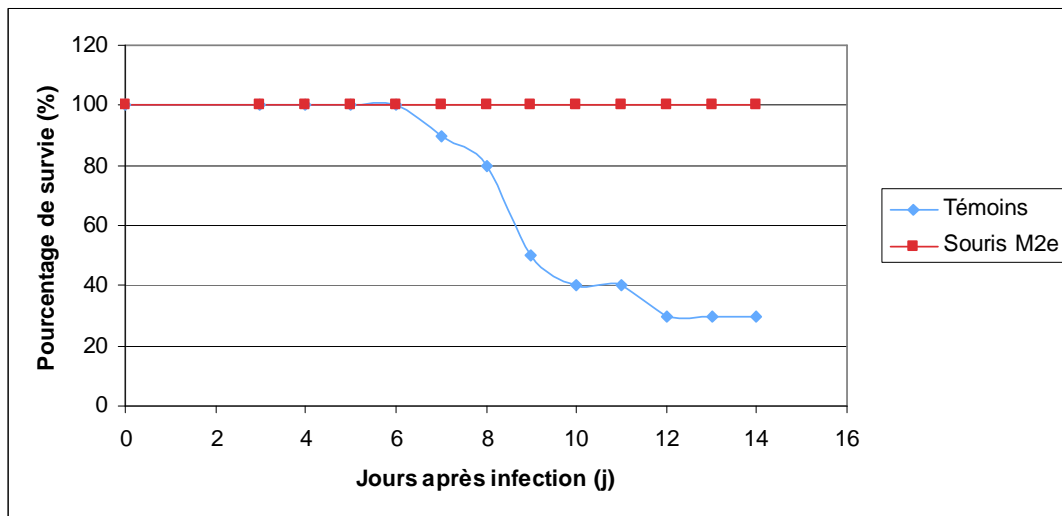


Figure 24 : Pourcentage de survie (expérience n°1)

14 jours après infection par le virus Influenza PR8, les 8 souris immunisées avec le peptide M2e sont encore vivantes tandis qu'il en reste seulement 3 dans le groupe des souris témoins.

Au niveau du poids, il est à noter que les souris du lot témoin ont un poids initial supérieur. Cependant, les pentes semblent indiquer que les souris immunisées avec le peptide M2e perdent moins de poids. A partir du 8^{ème} jour, ces mêmes souris reprennent du poids. A la fin de l'expérience, les souris immunisées ont un poids moyen de 22,7 g contre 18 g pour les souris du groupe témoin.

Cette tendance est confirmée lorsque l'on réalise le graphique montrant les pourcentages de variations des poids pendant l'expérience (figure 25). On peut également prouver qu'il existe une différence statistique significative entre le pourcentage de variation des poids des souris vaccinées avec le peptide M2e et des souris témoins ($p = 0.002$).

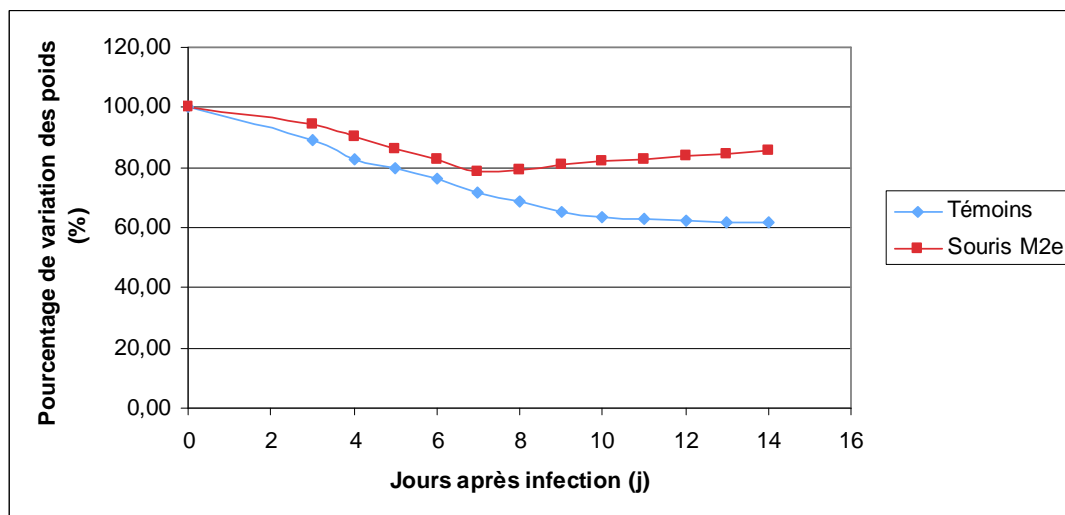


Figure 25 : Variations du pourcentage de perte de poids (expérience n°1)

Le graphique montre la perte de poids dans les 2 groupes de souris.

1.2. Suivi sérologique

Le suivi sérologique des souris immunisées avec le peptide M2e a été réalisé avec un test ELISA afin de déterminer la présence d'anticorps contre le peptide.

Les dilutions s'étalent du 1/50^{ème} au 1/400^{ème}. Les témoins positifs ont été réalisés avec une concentration initiale d'anticorps 14C2 (anti-M2e) de 200 µg/mL. Ils vont nous permettre de réaliser une courbe étalon (figure 26) et de calculer les différentes concentrations en anticorps anti-M2e d'après l'interprétation des densités optiques (tableau 4). D'après le seuil de positivité de la plaque, des valeurs positives ont pu être déterminées pour la dilution 1/400^{ème}.

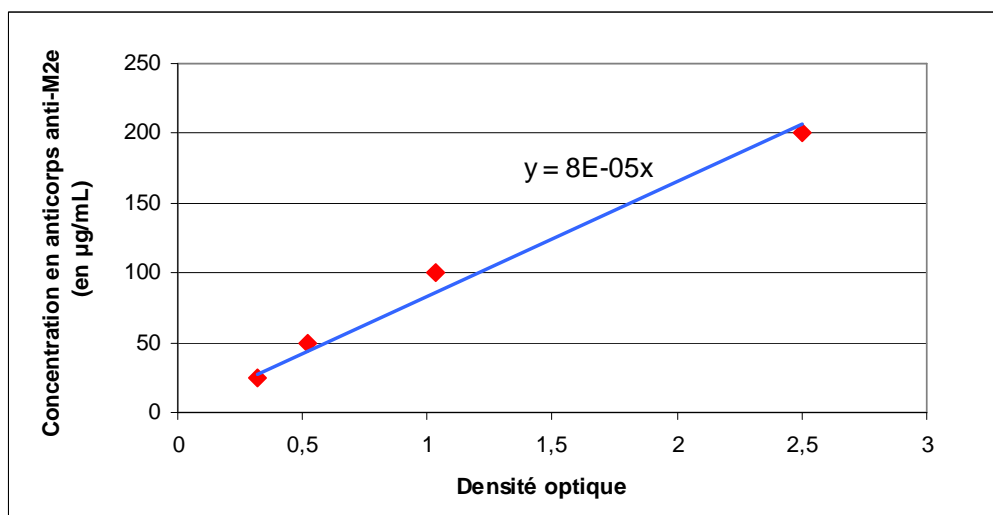


Figure 26 : Courbe étalon du test ELISA permettant de déterminer la présence d'anticorps anti-M2e

Grace aux différentes dilutions du témoin positif, nous pouvons établir une droite étalon de la concentration en anticorps en fonction de la densité optique.

Cette dernière de fonction $y = 8 \cdot 10^{-5}x$ nous permet de calculer les concentrations en anticorps anti-M2e de nos sérums.

	Densité optique	Concentration en anticorps anti-M2e
Anticorps 14C2	2.5	200 µg/mL
Souris 1 (1/400)	1.792	573.4 µg/mL
Souris 2 (1/400)	2.072	663.0 µg/mL
Souris 3 (1/400)	2.064	660.5 µg/mL
Souris 4 (1/400)	2.586	827.5 µg/mL
Souris 5 (1/400)	2.494	798.1 µg/mL
Moyenne des souris immunisées avec le peptide M2e (1/400)	2.202	704.5 µg/mL

Tableau 4 : Résultats de la plaque ELISA de la réponse immunitaire contre le peptide M2e à la dose de 2,5 µg par puits

Sur la plaque, les sérums de 5 souris seulement ont pu être utilisés, les 2 dernières souris n'ayant pu être prélevées.

Nous pouvons constater que toutes les souris immunisées avec le peptide M2e possèdent des anticorps contre ce dernier. Les taux obtenus sont trop élevés par rapport à nos dilutions. L'immunisation grâce au peptide induit donc une concentration moyenne en immunoglobulines supérieure à 700 µg/mL chez nos souris. Ce titre induit une protection de 100% contre une infection par 100 pfu de virus PR8.

2. LE VIRUS RECOMBINANT EXPRIME LE PEPTIDE M2E

La seconde étape de notre étude était de créer un vaccin poxvirus SG33 recombinant exprimant l'ectodomaine de la protéine M2 d'un virus Influenza H1N1 (PR8). Avant de réaliser des essais *in vivo*, nous avons d'abord vérifié la validité de notre construction et l'expression de la protéine de fusion par le virus *in vitro* sur des cellules permissives au virus, les cellules RK13, via un test d'Immunofluorescence et d'un Western Blot.

2.1. Western Blot

Le Western Blot, grâce à la détermination du poids moléculaire des protéines virales et la spécificité du marquage, nous a permis de valider l'expression du peptide M2e en fusion avec la protéine M022L (figure 27).

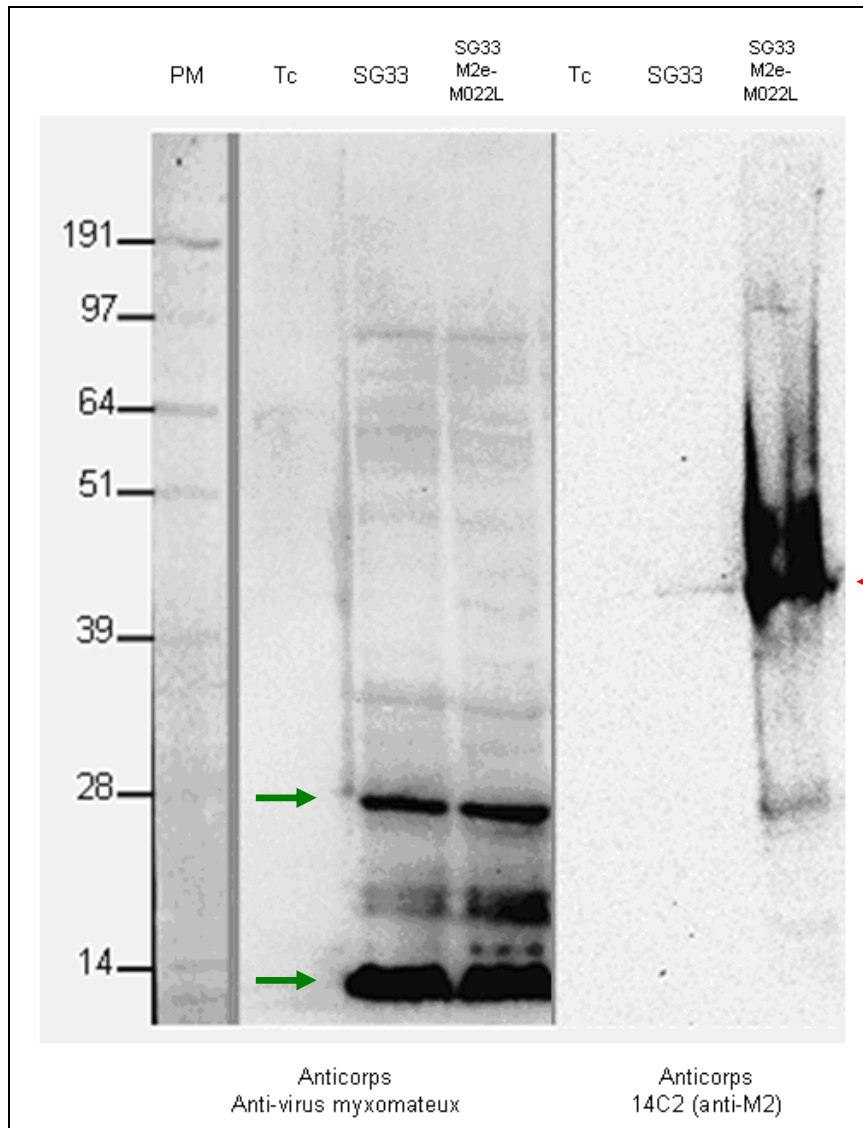


Figure 27 : Résultats du Western Blot

PM : colonne de migration des marqueurs de poids moléculaire

Tc : Témoin cellulaire (aucun virus n'a été déposé)

SG33 : virus SG33

SG33 M2e-M022L : virus recombinant SG33 M2e-M022L

Flèches vertes : visualisation de 2 bandes caractéristiques de la présence du virus SG33

Flèches rouges : visualisation de la bande caractéristique du peptide M2e

Les anticorps anti-virus myxomateux nous dévoilent la présence de virus SG33 dans l'échantillon de référence et dans l'échantillon du virus recombinant.

Les anticorps 14C2 (anticorps contre le peptide M2e) nous indiquent la présence de ce peptide dans le virus recombinant M2e-M022L. Cette bande n'est pas présente ni chez le témoin cellulaire ni chez le virus SG33 de départ.

L'association des bandes caractéristiques des anticorps 14C2 et des anticorps anti-virus myxomateux nous prouvent que le virus recombinant M2e-M022L est composé de SG33 et du peptide M2e.

Sur la partie gauche de la figure 27, nous pouvons remarquer la présence de deux bandes de même poids moléculaire à environ 28 et 14 Da (flèches vertes). Elles correspondent au marquage avec l'anticorps polyclonal anti-virus myxomateux, signalant la présence de protéines virales du virus SG33 et du recombinant SG33 M2e-M022L.

Sur la partie droite, une bande intense révélée par l'anticorps monoclonal 14C2 est visualisable (flèche rouge). Il est à noter la présence d'une bande fine dans la colonne de migration du SG33. Cette bande est un artéfact dû aux débordements des dépôts pendant la préparation.

La taille de la protéine obtenue (environ 41 kDa) est compatible avec le poids moléculaire de la protéine M022L (soit 41518 Da en théorie). On peut avec certitude conclure que le peptide M2e est bien associé à la protéine M022L dans le recombinant virus myxomateux M2e-M022L.

2.2. Immunofluorescence

Nous avons ensuite vérifié si le peptide M2e était exprimé par le virus recombinant sur des cellules infectées (figure 28). Après marquage et visualisation au microscope confocal, les noyaux des cellules apparaissent en bleu, le virus myxomateux en vert (SG33 et recombinant VM M2e-M022L) et le peptide M2e en rouge. Lorsque les plages se chevauchent, la coloration est modifiée (lorsque les plages rouges et vertes se réunissent, il y a apparition d'une teinte jaune).

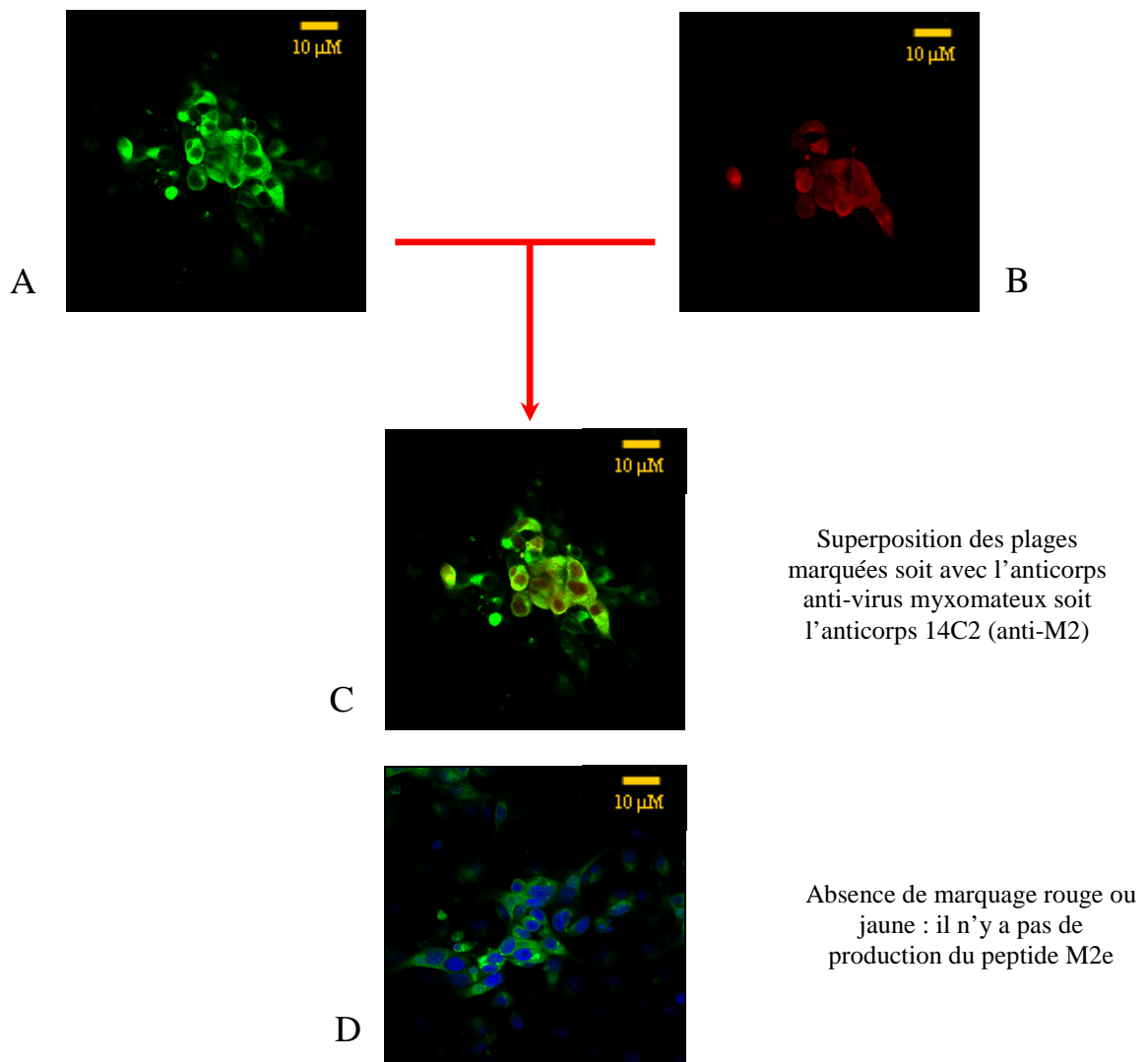


Figure 28 : Résultats de l'Immunofluorescence

- A : Recombinant M2e-M022L marqué avec l'anticorps anti-virus myxomateux couplé FITC
 B : Recombinant M2e-M022L marqué avec l'anticorps 14C2 (anti-M2e) couplé RodRX
 C : Recombinant M2e-M022L marqué avec les anticorps anti-virus myxomateux couplé FITC et anti-M2e couplé RodRX
 D : Virus SG33 marqué avec les anticorps anti-virus myxomateux couplé FITC, anti-M2e couple RodRX et le marquage TOPRO

Comme nous pouvons le constater, il y a superposition des colorations verte et rouge (les aires de répartition sont identiques). Cela indique que l'ectodomaine de la protéine M2 est produit par le recombinant et exprimé dans une conformation lui permettant d'être reconnu par les anticorps monoclonaux 14C2.

3. VALIDATION IN VIVO DE NOTRE VECTEUR VIRAL

Le dernier objectif de cet essai était de valider le vecteur vaccinal in vivo. Un suivi clinique après épreuve virulente et un suivi sérologique après immunisation de souris avec le virus recombinant M2e-M022L ont donc été mis en place.

Le virus recombinant permet l'expression du peptide M2e in vitro sur des cellules permissives. Nous avons ensuite vérifié in vivo son pouvoir immunogène. Pour cela, des souris ont été immunisées comme indiqué dans la partie matériel et méthode puis infectées par le virus Influenza PR8.

Un suivi clinique journalier a été réalisé. Ce suivi clinique correspond principalement au suivi de la mortalité et du poids des souris. L'aspect du pelage a également été noté quotidiennement. Aucune différence n'a cependant pu être mise en évidence entre les deux lots : l'aspect du pelage s'est dégradé de la même façon. Les résultats ne sont donc pas montrés.

3.1. Mortalité

La mortalité fut forte dans les deux lots. En comparaison, le lot de souris vaccinées a un taux de survie inférieur à l'autre lot (45% de survie contre 65%). Dans la figure 29, on note un pic de mortalité entre le 11^{ème} et 12^{ème} jour. Cependant, on ne peut pas différencier statistiquement les deux groupes.

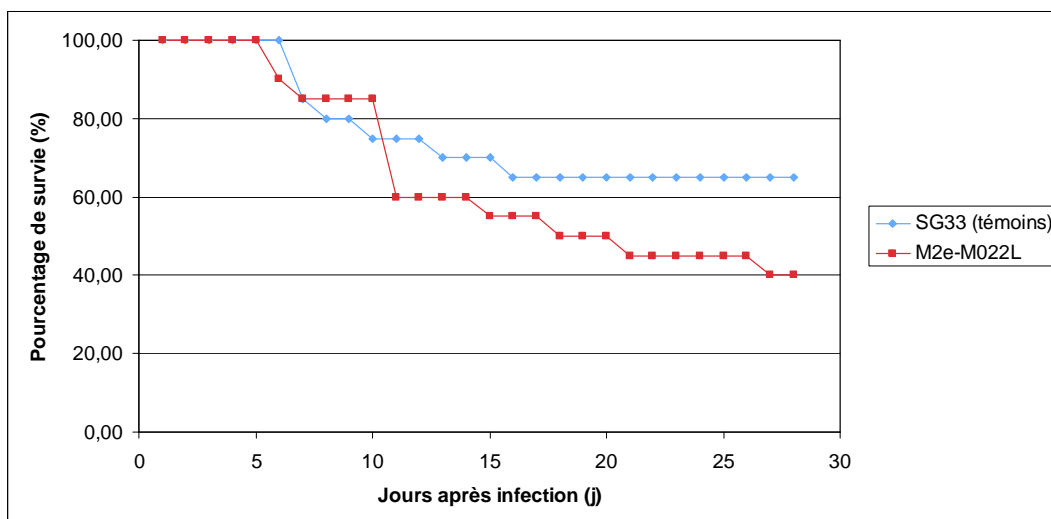


Figure 29 : Pourcentage de survie (expérience n°2)

A partir du 5^{ème} jour, des décès sont survenus dans les 2 lots de souris. Les souris immunisées avec le recombinant (tracé rouge) ont une un taux de mortalité plus élevé (> 50%) que les souris témoins (tracé bleu).

3.2. Perte de poids

Après infection par le PR8, aucune différence n'a été notée pour la perte de poids dans nos deux lots de souris. Comme nous pouvons le constater en figure 30, les courbes sont quasiment identiques.

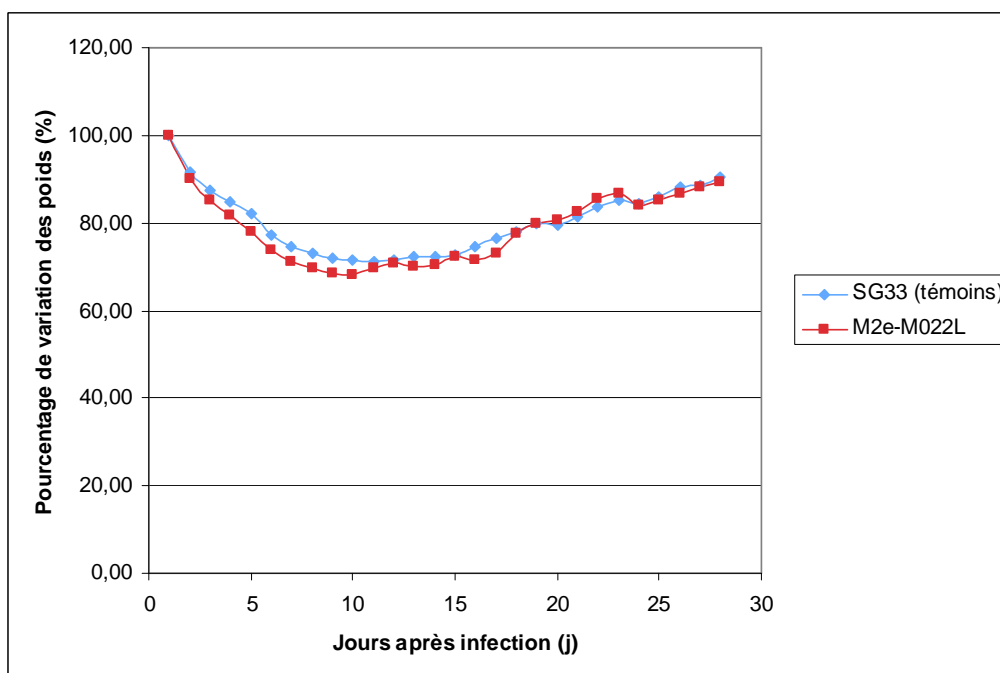


Figure 30 : Variations du pourcentage de perte de poids (expérience n°2)

Les deux courbes ont la même évolution au cours du temps avec une perte de poids maximale autour des 11^{ème} et 12^{ème} jours.

La perte de poids maximale est atteinte au 11^{ème} jour. Les souris vaccinées avec le recombinant VM M2e-M022L accusent une perte de poids de 31.77% par rapport au poids initial ; les souris témoins une perte de 28.34%.

Comme nous pouvions le prévoir sur le graphique, aucune différence statistique ne peut être mise en évidence ($p = 0.14$).

En conclusion, le virus recombinant M2e-M022L n'induit pas de réponse protectrice contre une infection par le virus Influenza PR8.

4. LE VIRUS RECOMBINANT N'INDUIT PAS DE REPOSE HUMORALE SPECIFIQUE DU PEPTIDE M2E

Pour comprendre pourquoi notre vecteur vaccinal n'induit pas de réponse protectrice, nous avons vérifié *in vivo* la présence d'anticorps anti-M2e dans le sérum des souris immunisées avec le virus recombinant M2e-M022L.

4.1. Réaction immunitaire face au peptide M2e

Les souris témoins, vaccinées avec le SG33 seul, n'ont pas d'anticorps contre le peptide M2e (données non montrées).

Dans le cas de notre recombinant VM M2e-M022L, les données, obtenues avec 2,5 µg de peptide M2e après 20 minutes de lecture, montrent les résultats les plus probants.

Les résultats chiffrés découlent de l'interprétation des densités optiques (figure 31).

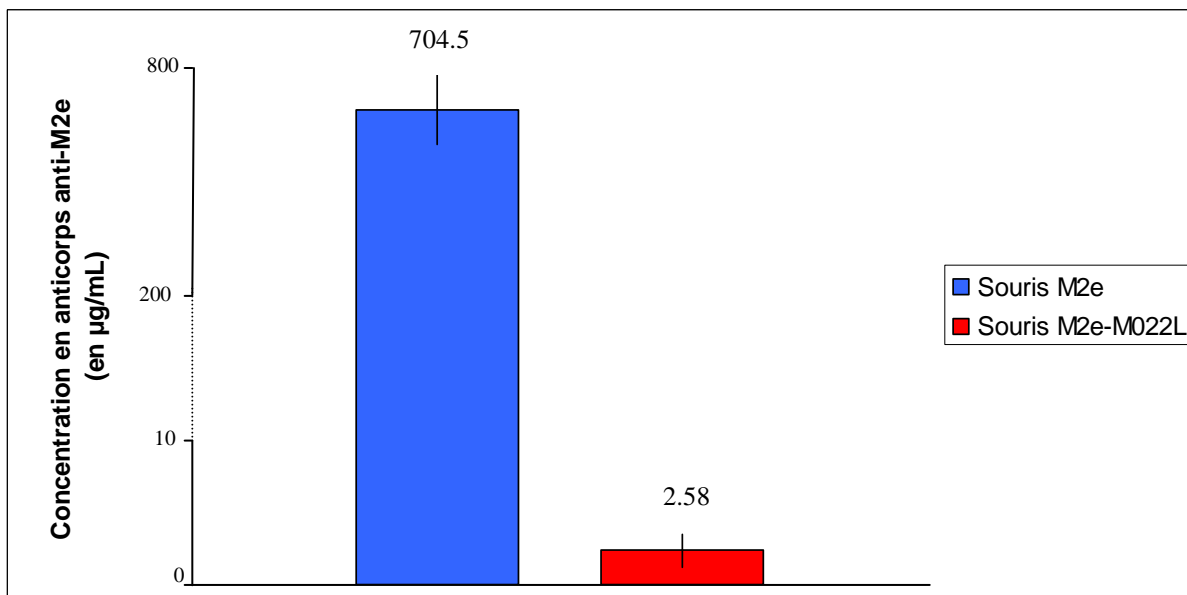


Figure 31 : Concentrations en anticorps anti-M2e après vaccination à l'aide d'un recombinaut M2e-M022L

Echelle non respectée afin de mieux visualiser les histogrammes

En bleu : 5 souris immunisées avec le peptide M2e

En rouge : 15 souris immunisées avec le recombinaut M2e-M022L

Les valeurs indiquées au dessus des histogrammes correspondent à la valeur moyenne de la concentration en anticorps anti-M2e en µg/mL après immunisation.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas eu de production significative d'anticorps contre le peptide M2e par le système immunitaire des souris vaccinées avec notre recombinaut.

4.2. Réaction immunitaire face au SG33

Le virus myxomateux est un virus très spécifique et il est possible que son cycle de réplication soit bloqué trop tôt dans les cellules murines ce qui empêcherait l'induction d'une réponse immunitaire spécifique. Pour répondre à cette question, nous avons cherché la présence d'anticorps spécifique du virus SG33 dans le sérum des souris immunisées par un test ELISA.

Les souris témoins (vaccinées avec le SG33 seul) ont en moyenne des seuils positifs à la dilution 1/800 (valeurs comprises entre 0.110 et 0.098). Les souris vaccinées à l'aide du recombinaut ont des taux plus variables d'anticorps : 2 souris avec un titre de 800, 2 autres avec un titre de 200 et la dernière avec un titre de 400.

De ce test, nous pouvons tirer deux principales conclusions (figure 32).

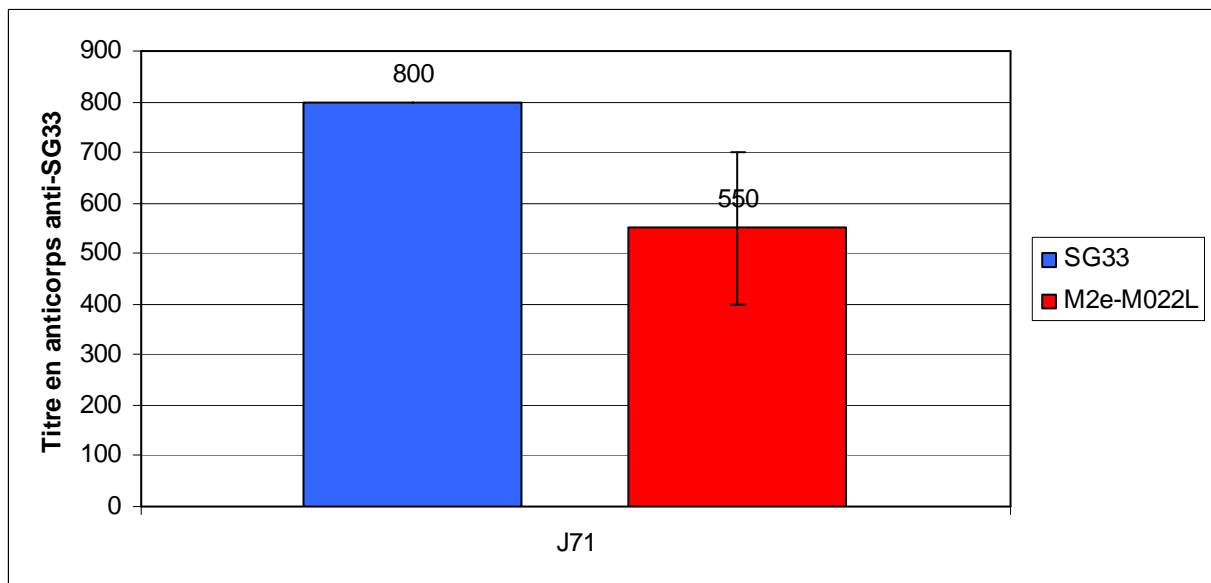


Figure 32 : Titre en anticorps anti-SG33 après vaccination à l'aide du recombinant M2e-M022L

En bleu : souris vaccinées avec le virus SG33

En rouge : souris vaccinées avec le recombinant VM M2e-M022L

A J0, l'ensemble des souris est naïve face au vecteur ou au recombinant.

71 jours après la vaccination, les souris vaccinées uniquement avec le SG33 ont un titre d'anticorps face au vecteur plus important que les souris vaccinées avec le recombinant M2e-M022L (différence non significative)

Ces résultats indiquent que le vecteur viral est suffisamment exprimé in vivo pour être immunogène. En effet, aussi bien les souris vaccinées avec le SG33 que celles vaccinées avec le recombinant VM M2e-M022L ont réagi contre le vecteur même si la réponse contre le recombinant semble moins forte.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous avons cherché à exploiter le virus myxomateux SG33 comme vaccin recombinant en se fondant sur la capacité des Poxvirus à intégrer des génomes étrangers. L'insertion d'une protéine d'intérêt en fusion avec une protéine de membrane du virion apparaît comme une solution adéquate afin d'améliorer la réponse immunitaire de l'hôte. Ce procédé a été utilisé avec succès dans un certain nombre d'études [1/26/27]. Grâce à la souche vaccinale contre la Myxomatose, on pouvait donc espérer coupler sécurité d'emploi, innocuité et efficacité du vaccin recombinant. C'est dans cette optique que nous avons utilisé la souche SG33 comme support d'un vecteur recombinant exprimant l'ectodomaine de la protéine M2. A cela s'ajoute l'intérêt des protéines de membrane des Poxvirus : ces dernières sont directement au contact du milieu extérieur et abondamment présentes à la surface des cellules infectées.

Face aux risques d'une nouvelle pandémie de grippe, les recherches s'orientent vers la création d'un vaccin « universel ». De nombreuses techniques ont été employées afin de produire le peptide M2e [41/51]. Dans ces articles, on testait uniquement le peptide (seul ou couplé à une protéine porteuse) et la réaction immunitaire qu'il induisait. L'ensemble des études montre un peptide immunogène induisant à une réaction immunitaire forte (avec notamment la quasi-absence de mortalité lors d'une épreuve infectieuse). Nos résultats confirment que le peptide M2e-PR8 couplé avec du MBS réagit de la même manière.

Nos recherches se basent sur un procédé différent : la fusion protéique entre un antigène d'intérêt et une protéine de la membrane du virion. Ces nouveaux vaccins cumulent de nombreux avantages dont notamment un coût réduit, une sécurité d'emploi (utilisation pour la vaccination de femelles gravides par exemple) et une activation adéquate du système immunitaire. Nos observations n'ont cependant pas permis de conclure sur l'éventuelle protection induite par le peptide M2e via une telle recombinaison.

Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons avancer quelques hypothèses.

Tout d'abord, bien que reconnu par l'anticorps 14C2 in vitro sur des cellules de lapin (espèce cible du virus myxomateux), on peut penser que notre antigène, ainsi intégré dans la protéine de membrane, n'est pas suffisamment exprimé par le recombinant in vivo chez la souris (hôte non permissif). L'architecture tridimensionnelle de la protéine M2e-M022L n'est peut être pas favorable à la présentation de l'antigène aux cellules du système immunitaire. Il est en effet difficile de prévoir la conformation de la nouvelle protéine fusionnée.

La construction du recombinant par fusion avec la phospholipase M022L a également pu influencer sur la fonction de la protéine fusionnée. In vitro, nous avons pu mettre en évidence une diminution de la vitesse de croissance du virus recombinant par rapport au SG33 (résultats non montrés). Cela peut aboutir à une réduction de l'immunogénicité de notre vaccin par baisse de l'infectivité des cellules. Dans le laboratoire, pendant la préparation de l'expérience, un vaccin recombinant virus myxomateux sauvage associant le peptide M2e d'origine aviaire a été construit. Le test d'infectivité sur des cellules RK13 (cellules rénales de lapin) a été concluant (Camus, communication personnelle). Il est, bien sûr, difficile d'extrapoler (virus, peptide et hôte différents) mais on peut imaginer que notre virus conserve suffisamment d'activité pour infecter les cellules de souris. Cet aspect reste encore à explorer.

Pour cela, il serait également judicieux d'étudier plus attentivement l'effet de notre vaccin sur des lignées cellulaires de souris. Tous les tests in vitro ont été effectués sur des cellules RK13. On ne connaît donc pas les capacités de notre vaccin à effectuer son cycle viral chez la souris, un hôte non-sensible. En effet, notre souhait était de créer un vaccin non répliatif (c'est-à-dire que le cycle viral s'arrête dans les premières étapes). On peut ainsi imaginer que notre recombinant n'a pas pu exprimer la protéine de fusion M2e-M022L du fait de cet arrêt du cycle viral. Pourtant, il a été démontré que même les protéines tardives (comme la protéine M022L) sont exprimées lors de réplication chez des hôtes non-sensibles dont la souris (Bertagnoli, communication personnelle). Il pourrait être intéressant de regarder in vitro l'expression du peptide M2e sur des cellules murines infectées par notre virus recombinant.

Considérant l'ensemble des résultats, il apparaît nécessaire d'améliorer notre vecteur vaccinal.

En effet, d'autres protéines du virion sont susceptibles de servir de protéine porteuse. La protéine M071L présente sur l'IMV du SG33 peut être choisie afin d'améliorer la présentation de l'antigène M2e au système immunitaire. En parallèle de notre travail, un recombinant virus myxomateux M071L-M2e a été construit. A l'heure actuelle, des essais de vaccination sont menés au laboratoire.

A plus long terme, il est évident qu'il faudra affiner le vaccin. L'utilisation d'adjuvants (de type huile dans l'eau, aluminium ou Carbopol) apparaît comme une solution adaptée afin d'améliorer la réponse immunitaire lors de vaccination avec notre recombinant. Plusieurs articles indiquent que l'aluminium favorise le développement d'une réponse de type Th2 [43/49], qui n'est pas celle espérée dans notre situation. Il semble donc plus intéressant d'utiliser des copolymères synthétiques comme le Carbopol pour améliorer la réponse immunitaire [52]. Cet adjuvant est préconisé pour augmenter la réponse immunitaire lors

d'immunisation avec des vaccins vivants. En comparaison avec les adjuvants minéraux, des titres en anticorps plus élevés et durables ont, en effet, pu être observés lors de vaccination contre la grippe équine avec un vaccin recombinant canaripox adjuvé au Carbopol [51].

De même, il faudra envisager de tester d'autres voies d'immunisation (sous-cutané, intramusculaire, ...) et de modifier la dose de vaccin injectée (10^8 pfu/injection vaccinale) afin d'améliorer la réponse immunitaire de l'hôte.

CONCLUSION

Cette étude avait un double objectif : créer un vaccin « universel » contre les virus Influenza de type A d'origine aviaire et valider la méthode de l'insertion génomique par fusion protéique chez un Poxvirus. Le caractère universel du virus est lié au fait que le peptide M2e est très conservé chez tous les Influenza de type A. Il peut donc servir d'antigène pour la réponse immunitaire vaccinale.

Les différentes analyses ont montré que créer un virus recombinant exprimant l'ectodomaine de la protéine M2 était tout à fait réalisable. Le peptide M2e est exprimé par notre recombinant VM M2e-M022L. Par contre, tout cela ne présage en rien de l'immunogénicité du peptide ainsi inséré au sein d'une protéine d'enveloppe.

Dans notre étude, notre candidat vaccin n'a pas permis de protéger les souris lors d'une épreuve virulente par le virus Influenza PR8. Cependant, cet essai a permis de montrer que, dans les conditions d'immunisation utilisées, un très faible taux d'anticorps contre l'ectodomaine de la protéine M2 a été détecté. Dans ce contexte, il faut maintenant améliorer le vecteur vaccinal (dose, voies d'inoculation, adjuvants, ...) afin de stimuler une réponse immunitaire forte et durable.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mr BOYER Guillaume, Mathieu

a été admis(e) sur concours en : 2004

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 11 juin 2009

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

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, Séverine BOULLIER, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

Mr BOYER Guillaume, Mathieu

intitulée :

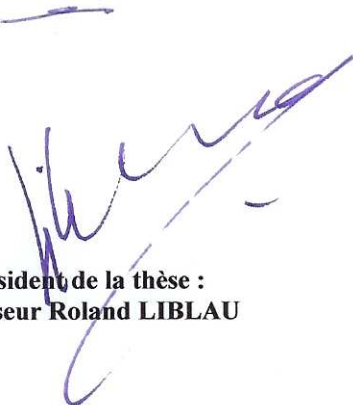
« Vaccination contre la souche Influenza PR8 à l'aide d'un vaccin recombinant SG33-M2e ».



**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Séverine BOULLIER**

Vu :

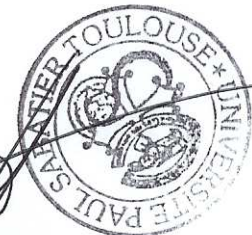
**Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Roland LIBLAU**

**Vu le :
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**

10 JUIL 2009



REFERENCES

1. **Ulrich, R., Lundkvist, A., Meisel, H., Koletzki, D., Sjolander, K. B., Gelderblom, H. R., Borisova, G., Schnitzler, P., Darai, G. & Kruger, D. H. (1998).** Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine* **16** (2-3), 272-280.
2. **Homberg, J.C. (1999).** Immunologie fondamentale. *Editions Estem*. 214p.
3. **Delves, P.J., Martin, S., Burton, D.R. & Roit, I. (2008).** Fondements de l'immunologie, 1^{ère} Edition. *Editions De Boeck*. 496 p.
4. **Campbell, N.A. (2001).** Biologie, 3^{ème} Edition, Adaptation et révision scientifique de Richard Mathieu. *Editions De Boeck Université*. 1190 p.
5. **Pasquier, C., Bertagnoli, C., Messud-Petit, F. & Izopet, J. (2005).** Virologie humaine et animale. *Editions Dunod*. 281 p.
6. **Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabiral, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. & Summers, M.D. (1995).** Virus Taxonomy, Classification and nomenclature of viruses, Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Editions Springer-Verlag*. 586 p.
7. **Knipe, D. M. & Howley, P. M. (2007).** Fields Virology, Fifth Edition. *Editions Lippincott-Williams and Wilkins*. 3177 p.
8. **Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.E. (2000).** Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press*. 1121 p.
9. **Swiss Institute of Bioinformatics** (page consultée le 17 mars 2009). Site de l'institut Swiss Institute of Bioinformatics. Adresse URL : <http://www.isb-sib.ch>
10. **Fauquet, C. M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger & Ball, L.A. (2005).** Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press*. 1162 p.
11. **Smith, G. L., Vanderplassen, A. & Law, M. (2002).** The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* **83**, 2915-2931.
12. **Messud-Petit, F. & Bertagnoli, S. (2000).** Le virus myxomateux : de l'agent pathogène au vecteur vaccinal. *Virologie* **4** (6), 453-462.

13. Collin, N., Guérin, J.L., Drexler, I., Blanié, S., Gelfi, J., Boullier, S., Foucras, G., Sutter, G. & Messud-Petit, F. (2005). The poxviral scrapin MV-LAP requires a myxoma viral infection context to efficiently downregulate MHC-I molecules. *Virology* **343**, 171-178.
14. **The Poxvirus Bioinformatics Ressource Center** (page consultée le 02 avril 2009). Site de l'institut Poxvirus Bioinformatics Ressource Center. Adresse URL : <http://www.poxvirus.org>
15. Duteyrat, J. L., Gelfi, J. & Bertagnoli, S. (2006). Ultrastructural study of myxoma virus morphogenesis. *Arch Virol* **151**, 2161-2180.
16. Drillien, R., Spohner, D., Autran, B. & Garin, D. (2003). Les poxvirus : une famille de vecteurs. *Virologie* **7** (4), 243-253.
17. Vanderplasschen, A., Hollinshead, M. & Smith, G.L. (1998). Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J Gen Virol* **79**, 877-887.
18. **Encyclopédie Universalis** (page consultée le 18 juin 2009). Site internet de l'Encyclopédie Universalis. Adresse URL : <http://www.universalis.fr>
19. **Laboratoire Mérieux** (pages consultées le 18 juin 2009). Site du laboratoire Mérieux :
 - a. <http://www.raboral.com>
 - b. http://fr.merial.com/data_safety_sheet/dervaximyxo_sg_33.asp
 - c. http://fr.merial.com/data_safety_sheet/dercunimix.asp
20. Smith, E.S., Mandokhot, A., Evans, E.E., Mueller, L., Borrello, M.A., Sahasrabudhe, D.M. & Zauderer, M. (2001). Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells : application to identifying tumor antigens. *Nature Med* **7** (8), 967-972.
21. Bertagnoli, S., Gelfi, J., Le Gall, G., Boilletot, E., Vautherot, J.F., Rasschaert, D., Laurent, S., Petit, F., Boucraut-Baralon, C. & Milon, A. (1996). Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J Virol* **70** (8), 5061-5066.
22. Mackett, M., Smith, G. L. & Moss, B. (1982). Vaccinia virus : a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7415-7419.
23. Hruby, D.E. (1990). Vaccinia virus vectors : news strategies for producing recombinant vaccines. *Clin Microbiol Rev* **3** (2), 153-170.
24. Blancou, J., Kieny, M.P., Lathe, R., Lecocq, J.P., Pastoret, P.P., Soulebot, J.P., Desmettre, P. (1986). Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* **322**, 373-375.
25. Barchichat, S. & Katz, E. (2002). Immunization of rabbits with a modified vaccinia Ankara recombinant virus bearing the HIV envelope antigen on its outer membrane. *Virus Res* **90**, 243-251.

26. **Kwak, H., Mustafa, W., Speirs, K., Abdool, A.J., Paterson, Y & Isaacs, S.N. (2004).** Improved protection conferred by vaccination with a recombinant vaccinia virus that incorporates a foreign antigen into the extracellular enveloped virion. *Virology* **322**, 337-348.
27. **Pignolet, B. (2007).** Interactions virus myxomateux-cellules hôtes : application à la vaccination chez les ruminants. *Th D. : discipline Microbiologie*, Toulouse. 207pp.
28. **Russell, R.J. & Robbins, S.J. (1989).** Cloning and molecular characterization of the myxoma virus genome. *Virology* **170** (1), 147-159.
29. **Guérin, J.L. (2001).** Analyse moléculaire de la souche atténuée vaccinale SG33 du virus myxomateux, à la recherche des gènes perdus. *Th : Med. Vet.*, Toulouse. 115pp
30. **Petit, F., Bertagnoli, S. & Boucraut-Baralon, C. (1997).** Interactions entre les Poxvirus et leurs hôtes. *Revue Méd Vét* **148** (1), 3-18.
31. **Whittaker, G.R. (2001).** Intracellular trafficking of influenza virus clinical implications for molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Cambridge University Press
32. **Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2005).** Influenza : lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews Microbiology* **3** (8), 591-600.
33. **Portela, A. & Digard, P. (2002).** The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**, 723-734.
34. **Kelly, M.L, Cook, J.A., Brown-Augsburger, P., Heinz, B.A., Smith, M.C. & Pinto, L.C. (2003).** Demonstrating the intrinsic ion channel activity of virally encoded proteins. *FEBS Letter* **552**, 61-67.
35. **Organisation mondiale de la santé ou World Health Organisation** (page consultée le 18 juin 2009). Site de l'Organisation Mondiale de la Santé. Adresse URL : <http://www.who.int>
36. **Laboratoire MedImmune** (page consultée le 18 juin 2009). Site du laboratoire MedImmune. Adresse URL : <http://www.flumist.com>
37. **Laboratoire Novartis** (page consultée le 18 juin 2009). Site du laboratoire Novartis. Adresse URL : <http://www.novartisvaccines.com>
38. **Park, E.K., Castrucci, M.R., Portner, A., Kawaoka, Y. (1998).** The M2 ectodomain is important for Its incorporation into influenza A virions. *Journal of Virology* **72** (3), 2449-2455.
39. **Lamb, R.A., Zebedee, S.L. & Richardson, C.D. (1985).** Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* **40** (3), 627-633.
40. **Zebedee, S.L. & Lamb, R.A. (1989).** Nucleotide sequences of influenza A virus RNA segment 7 : a comparison of five isolates. *Nucleic Acids Res* **17** (7), p 2870.

41. **Neiryneck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W.M. & Fiers, W. (1999).** A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* **5** (10), 1157–1163.
42. **Ito, T., Gorman, O.T., Kawaoka, Y., Bean, W.J. & Webster, R.G. (1991).** Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* **65** (10), 5491-5498.
43. **Huleatt, J.W., Nakaar, V., Desai, P., Huang, Y., Hewitt, D., Jacobs, A., Tang, J., McDonald, W., Song, L., Evans, R.K., Umlauf, S., Tussey, L. & Powell, T.J. (2008).** Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine* **26**, 201-214.
44. **Wang, C., Lamb, R.A. & Pinto, L.H. (1994).** Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel activity in mammalian cells. *Virology* **205**, 133-140.
45. **McCown, M.F. & Pekosz, A. (2005).** The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *Journal of Virology* **79** (6), 3595-3605.
46. **Mahy, B.W.J., Collier, L. & Sussman, A. (1998).** Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections ninth Edition : Volume I Virology. *Edition Arnold*.
47. **Zebedee, S.L. & Lamb, R.A. (1988).** Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of Virology* **62** (8), 2762-2772.
48. **Treanor, J.J., Tierney, E.L., Zebedee, S.L., Lamb, R.A. & Murphy, B.R. (1990).** Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *Journal of Virology* **64** (3), 1375-1377.
49. **Wu, F., Huang, J.H., Yuan, X.Y., Huang, W.S. & Chen, Y.H. (2007).** Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine* **25**, 8868-8873.
50. **Tompkins, S.M., Zhao, Z.S., Lo, C.Y., Misplon, J.A., Liu, T., Ye, Z., Hogan, R.J., Wu, Z., Benton, K.A., Tumpey, T.M., Epstein, S.L. (2007).** Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerging Infectious Diseases* **13** (3), 426-435.
51. **Black, R.A., Rota, P.A., Gorodkova, N., Klenk, H.D. & Kendal, A.P. (1993).** Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. *J Gen Virol* **74**, 143-146.
52. **Mumford, J.A., Wilson, H., Hannant, D., Jessett, D.M. (1994).** Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant. *Epidemiol Infect* **112** (2), 421-437.

NOM : BOYER

Prénom : GUILAUME

TITRE :

Vaccination contre la souche Influenza PR8 à l'aide d'un vaccin recombinant SG33-M2e

RESUME :

Cette étude présente un essai d'immunisation à l'aide d'un vaccin recombinant poxviral. Le processus de fabrication du vaccin est basé sur la fusion protéique entre l'antigène considéré et une protéine d'enveloppe du poxvirus. L'objectif est double : valider ce mode de construction et créer un vaccin protégeant contre les virus Influenza de type A. Nous avons utilisé comme antigène l'ectodomaine de la protéine M2, nommé M2e. Le Poxvirus de départ est la souche vaccinale utilisée pour protéger contre la Myxomatose, la souche SG33 du virus myxomateux.

Afin d'éprouver notre vaccin, nous avons immunisé des souris Balb/cJ et effectué un suivi sérologique et un suivi clinique après épreuve virulente. L'analyse des résultats indique que notre recombinant exprime le peptide M2e. Cependant, l'efficacité de notre vaccin a été insuffisante. Le protocole utilisé n'a pas permis d'induire une réponse sérologique significative ni de protéger les souris suite à l'infection.

MOTS-CLES :

Vaccination ; Influenza ; Réponse immunitaire ; SG33 ; virus myxomateux

ENGLISH TITLE :

Vaccination against Influenza PR8 strain with a recombinant vaccine SG33-M2e

ABSTRACT :

This study presents a test of immunization using a poxviral recombinated vaccine. The engineering of the vaccine is based on protein fusion between the considered antigen and a protein of the poxvirus envelope. The objective is double: to validate this method of construction and to create a vaccine protecting against the Influenza virus type A. We used as antigen the ectodomain of the M2 protein, called M2e. The chosen Poxvirus is the vaccine stock used to protect against the Myxomatosis, the SG33 strain of myxoma virus.

To assay our vaccine, we immunized Balb/cJ mice and performed a serological follow-up and clinical follow-up after virulent test. The analysis of the results indicates that our recombinant expresses M2e peptide. However, the effectiveness of our vaccine was insufficient. The used protocol did not allow to lead to a significant serological answer nor to protect mice further to the infection.

KEYWORDS :

Vaccine ; Influenza ; immune response ; SG33 ; myxoma virus