



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4475](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4475)

To cite this version :

ORTION, Kevin. *Vaccination par des virus myxomateux recombinants exprimant un épitope du virus influenza A aviaire : étude de la protection après épreuve chez la souris*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2011, 115 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

VACCINATION PAR DES VIRUS MYXOMATEUX RECOMBINANTS EXPRIMANT UN EPITOPE DU VIRUS INFLUENZA A AVIAIRE

Etude de la protection après épreuve chez la souris

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2011
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

ORTION-CORONIS Kevin, Germain, Etienne
Né, le 1 mars 1985 à NANTES (44)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Christelle CAMUS

JURY

PRESIDENT :
M. PASQUIER Christophe

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme Christelle CAMUS
Mme Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ÉCOLE 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. DORCHIES
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. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1°
CLASSE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
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*
Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mme TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

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

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
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*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYEMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre président de thèse

Monsieur PASQUIER Christophe

Professeur des Universités – Praticien hospitalier
Bactériologie, Virologie, Microbiologie industrielle

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

A notre jury de thèse

Madame CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle

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

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de notre thèse
Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance et de toute
notre gratitude pour son soutien et ses conseils

Mademoiselle BOULLIER Séverine

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

Qui nous a accordé sa confiance en nous proposant ce sujet de thèse, et son
aide pour ses corrections
Sincères remerciements

REMERCIEMENTS

A ma mère, pour sa présence dans les coups durs, les moins durs, et pour les multiples déménagements à travers la France, dans l'attente d'un permis (de conduire) insaisissable. Merci, Mum.

A mon frère, en mémoire de nos batailles quotidiennes...

A mes Tatates, Huguette, Chantal et Jocelyne, pour leur présence chaleureuse depuis le début, et toujours au top pour les infos sur les personnages du quartier !

A mon père, pour son soutien, même à distance.

A mes grands-parents, je vous dédie cette thèse !

Aux Coronis & assimilés, Madinina-Naoned forever!

A Marina, pour sa présence amicale quotidienne pendant 3 longues années à prendre le TER, à se plaindre de notre emploi du temps, des gens, de la météo, à faire des powerpoints incroyables sur des sujets qui l'étaient tout autant (saumon fumé, fromage à pâte molle en tête...), des régimes alimentaires et j'en passe : merki !

Aux Nantais : *Fanny* & ses besoins alimentaires sans limite, *Cécile* & ses goûts musico-littéraires plus que douteux, *Marine* & ses idées improbables, *Labouré Q.* & sa roussitude voire pire, *Maxime* & ses tentatives de percer à la télé... Sans commentaire... Vous m'adorez.

Aux Toulousains : *Marie* aux sérieux problèmes d'orthographe mais aux compétences pâtisseries sans reproche, *Mathilde* la NAC-iste, toujours prête à héberger à la dernière minute, et tolérante pour la plupart de mes penchants musicaux...

Aux Alforiens de souche, *Anna Fünfurst* et ses connaissances musicales perturbantes, *Caroline* et ses gerbilles neurologiquement déficientes, et aux T1 1^{er} ET 2nd semestres, ainsi que la team NAC powaaaa, et beaucoup d'autres : merci pour votre accueil !

Aux Toulousaino-Alforiennes, *Marie-Hélène* la corse bipolaire, dont les capacités d'assimilation de nourriture ne surpasseront jamais celles d'*Elodie*, la lotoise, merci pour tous ces bons moments...alforiens !

A mes co-internes de LA, nous survivrons, au moins grâce aux sushis...

A Jafar & Jasmine, par principe.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	11
INTRODUCTION	14
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1. Chapitre 1 : Etude des virus Influenza A	18
1.1. Généralités sur les virus grippaux	18
1.1.1. Classification	18
1.1.2. Structure et génome	18
1.1.3. Caractéristiques épidémiologiques générales des virus grippaux	22
1.1.4. Modifications antigéniques	25
1.1.5. Nomenclature.....	28
1.2. Aspects biologiques spécifiques au type A	29
1.2.1. Mécanismes de la Transmission virale	29
1.2.2. Symptomatologie	29
1.2.2.1. Maladie grippale suite à l'Infection naturelle à IAV	30
1.2.2.2. Infection expérimentale sur modèle : souris, furet, porc	32
1.2.2.3. Influenza aviaire hautement pathogène H5N1	32
1.2.3. Cycle viral des virus influenza de type A	33
2. Chapitre 2 : La protéine M2, structure et activité	36
2.1. Structure de la protéine M2	36
2.1.1. Présence dans le virion.....	36
2.1.2. Séquence aminoacide.....	36
2.1.3. Ectodomaine de M2 : le peptide M2e	37
2.1.4. Domaine transmembranaire de M2 : TM2	40
2.1.5. Domaine cytoplasmique de la protéine M2	42
2.2. Fonction de la protéine M2	42
2.2.1. Activité Canal ionique	42
2.2.2. Rôle de M2 dans le cycle viral.....	43
2.3. Sensibilité médicamenteuse	44
3. Chapitre 3 : Lutte contre le virus influenza A : immunité, antiviraux, vaccination	46
3.1. Les mécanismes de l'Immunité antigrippale	46
3.1.1. Réponse innée non spécifique	46
3.1.2. Réponse spécifique	48
3.1.2.1. Réponse acquise cellulaire	48
3.1.2.2. Réponse acquise humorale	50
3.1.2.3. Mécanismes immunitaires de la protection croisée	51
3.1.2.4. Conclusion de la réponse immunitaire spécifique antigrippale	52

3.2. Immunité induite par M2 : les mécanismes	52
3.2.1. Les effecteurs de la Réponse humorale anti-M2.....	53
3.2.2. Les effecteurs de la Réponse cellulaire anti-M2.....	55
3.2.3. Effet protecteur de l'immunité anti-M2e.....	56
3.2.4. La protéine M2 & le peptide M2e, cibles vaccinales.....	57
3.2.4.1. Vaccinations expérimentales avec la protéine de matrice.....	58
3.2.4.2. Le peptide M2e, antigène vaccinal expérimental.....	59
3.3. Antiviraux	65
3.4. Vaccination : Quels vaccins contre la grippe ?	65
3.4.1. Vaccins humains autorisés sur le marché.....	65
3.4.1.1. Vaccins à virus inactivé.....	66
3.4.1.2. Vaccins vivants atténués.....	67
3.4.2. Vaccins humains en développement.....	68
3.4.2.1. Virus vivants obtenus par génie génétique.....	68
3.4.2.2. Vaccins vivants exprimant des gènes NS1 altérés.....	68
3.4.2.3. Virus influenza à réplication défective.....	69
3.4.2.4. Vaccin ADN.....	69
3.4.2.5. Nouveaux adjuvants pour vaccins tués ou atténués.....	70
3.4.3. Vaccination antigrippale des espèces aviaires.....	70
4. Chapitre 4 : Le virus myxomateux : potentiel recombinant vaccinal	73
4.1. Caractères généraux du virus myxomateux	73
4.1.1. Classification.....	73
4.1.2. Aspects biologiques.....	73
4.1.3. Structure et génome.....	74
4.1.4. Cycle viral des poxvirus.....	75
4.1.4.1. Entrée du poxvirus.....	75
4.1.4.2. Expression du génome myxomateux.....	75
4.1.4.3. Assemblage et maturation.....	76
4.1.4.4. Particules infectieuses & dissémination.....	76
4.2. Utilisation vaccinale recombinante du virus myxomateux	78
4.2.1. Chez l'hôte naturel, le lapin.....	78
4.2.2. Virus myxomateux : vecteur vaccinal chez d'autres espèces ?.....	79
4.3. Virus myxomateux recombinant de notre étude	79
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	80
Objectif de l'étude	81
1. Chapitre 1 : Matériel et Méthodes	82
1.1. Animaux	82
1.2. Réactifs biologiques	83
1.2.1. Virus recombinants.....	83
1.2.2. Virus Influenza utilisé lors de l'épreuve.....	83
1.3. Protocole expérimental	83
1.3.1. Immunisation des souris.....	83
1.3.2. Epreuve virale au virus influenza de type A PR8.....	83
1.4. Suivi clinique & abattage des souris	84
1.4.1. Variables mesurées.....	84
1.4.2. Abattage.....	86
1.5. Calendrier des événements et manipulations	86
1.6. Analyse des résultats	86

2. Chapitre 2 : Résultats	87
2.1. Mortalité post-épreuve : le vaccin M071L-M2e ne protège pas contre l'épreuve létale, le vaccin M2e-M022L aggrave la mortalité des souris	87
2.2. Mesures du Poids des souris	88
2.2.1. Les vaccins M071L-M2e et M2e-M022L n'inhibent pas la perte de poids	88
2.2.2. Les vaccins M071L-M2e et M2e-M022L n'améliorent pas le poids des survivants	89
2.3. Mesures des Notes cliniques des souris	90
2.3.1. Les vaccins M071L-M2e et M2e-M022L n'inhibent pas les symptômes liées à l'infection	90
2.3.2. Le vaccin M2e-M022L n'a pas d'effet sur la guérison clinique contrairement au vaccin M071L-M2e.....	91
2.4. Autres observations sur la morbidité post-épreuve	91
Bilan des Résultats Expérimentaux	93
DISCUSSION	94
1. Effet délétère & utilisation de M2	94
2. Virus myxomateux : bon choix chez la souris ?	95
3. Absence de placebo : stress et vaccination	95
4. Protocole d'immunisation	96
CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE	100

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Schéma d'un virus influenza A et de son complexe RNP..	19
Figure n°2 : Diagramme représentant le réservoir naturel des IAV (oiseaux aquatiques) et leurs transferts interspécifiques	23
Figure n°3 : Epidémiologie des virus influenza A et B humains.....	24
Figure n°4 : Schématisation de la dérive antigénique.....	26
Figure n°5 : Réassortiment génétique entre deux virus influenza de type A.	27
Figure n°6 : Nomenclature des virus influenza : exemple du virus PR8.	29
Figure n°7 : Schéma représentant le cycle viral des virus influenza de type A dans une cellule cible	35
Figure n°8 : Schéma de la protéine M2.....	37
Figure n°9 : Relation génétique entre les protéines de matrice M1 et M2.....	38
Figure n°10 : Illustration schématique de l'activation du tunnel M2.....	41
Figure n°11 : Le peptide TM2, un canal à proton à porte tryptophane, sensible à la rimantadine.....	45
Figure n°12 : Mécanismes immuns <i>in vivo</i> de l'action des anticorps anti-M2e et anti-HA proposés par Schotsaert et al (2009).	54
Figure n°13 : Schémas des formes IMV et EEV d'un Poxvirus	74
Figure n°14 : Les différentes formes de particules infectieuses du virus myxomateux.....	77
Figure n°15 : Schéma de dissémination des poxvirus sur une monocouche cellulaire.....	78
Figure n°16 : Récapitulatif de la répartition des souris lors de l'expérimentation.....	82
Figure n°17 : Synthèse des notes de pelage, de jetage et d'éternuement en une note clinique unique.	85
Figure n°18 : Courbes de survie de Kaplan-Meier en fonction du statut vaccinal.	87
Figure n°19 : Courbes décrivant l'évolution du poids de chaque groupe, prenant en compte les individus morts, après épreuve.	88
Figure n°20 : Graphique représentant l'évolution du poids des survivants pour chaque groupe, après épreuve.....	89
Figure n°21 : Evolution des notes cliniques moyennes de chaque groupe, en prenant en compte les individus morts	90
Figure n°22 : Graphique décrivant l'évolution des notes cliniques moyennes des survivants après épreuve	91

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau n°1</i> : Genres et hôtes-cibles des virus de la famille des Orthomyxiviridae.....	18
<i>Tableau n°2</i> : Le génome viral des IAV, les protéines codées et leurs fonctions.	20
<i>Tableau n°3</i> : Séquences aminoacides du peptide M2e de divers virus Influenza de type A.	39
<i>Tableau n°4</i> : Changement des formulations des vaccins antigrippaux humains.	66
<i>Tableau n°5</i> : Récapitulatif des vaccins antigrippaux destinés aux espèces aviaires recommandés par l'OIE en 2007.....	71
<i>Tableau n°6</i> : Schématisation des grilles d'enregistrement journalier par cage et par jour d'observation.	84
<i>Tableau n°7</i> : Calendrier retraçant le protocole expérimental.....	86
<i>Tableau n°8</i> : Nombre de relevés pour chacun des symptômes observés au cours de l'expérience..	92

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANOVA : analyse de variance

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNv : acide ribonucléique viral

CCDA : cytotoxicité cellulaire dépendante en anticorps

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

coll. : collaborateurs

CPA : cellule présentatrice d'antigène

Da : Dalton (unité de mesure)

DMEM : dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium, milieu essentiel modification minimum de dubbelco

EEV : virus (myxomateux) extracellulaire enveloppé

H ou HA : hémagglutinine

HBc : protéine du core viral du virus de l'hépatite B

HPAI : *highly pathogenic avian influenza*, influenza aviaire hautement pathogène

IAV : virus influenza de type A

IEV : virus (myxomateux) intracellulaire enveloppé

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IMV : virus (myxomateux) intracellulaire mature

IV : virus (myxomateux) immature non-infectieux

KLH : protéine Keyhole Limpet Hemocyanin

kpb : kilopaire de bases

LB : lymphocyte B

LPAI : *low pathogenicity avian influenza*, influenza aviaire faiblement pathogène

LT : lymphocyte T

LTc : lymphocyte T cytotoxique

LTh : lymphocyte T helper ou auxiliaire

MDCK : Madin–Darby Canine Kidney

MHD: maladie hémorragique virale du lapin
mM: millimole
µm: micrometer
µM: micromole
N ou NA: neuraminidase
NK: cellule Natural Killer
nM: nanomole
nm: nanomètre
OIE: Office International des Epizooties
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
ORF : cadre ouvert de lecture (*opening reading frame*)
PAM : particule à antigènes multiples
pfu : plaque formant unité
PR8 : virus influenza de type A souche A/Puerto-Rico/8/1934 (H1N1)
PTV : particule de type viral
REG : réticulum endoplasmique granuleux
RMN : résonance magnétique nucléaire
RNP : ribonucléoprotéine
SC : sous-cutané(e)
S-Ig : immunoglobuline sécrétée ou sécrétoire
TLR : récepteur Toll-like
TNF : facteur de nécrose tumorale
VM : virus myxomateux
WHO : World Health Organization

INTRODUCTION

La maladie grippale (fièvre, jetage, toux, douleurs musculaires) est connue depuis plus de 2000 ans : elle a été décrite pour la première fois en 412 avant notre ère. En 1743, le nom « Influenza » lui est conféré, d'après l'expression italienne « *influenza di freddo* » : l'influence du froid. En 1933, l'agent pathogène de la grippe est découvert : il s'agit d'un virus. Les virus influenza de type A (IAV) sont des pathogènes respiratoires hautement infectieux des oiseaux et des mammifères (Webster et al, 92 ; Webby et Webster, 2001). La grippe a affecté la population humaine à différentes périodes de l'Histoire : la pandémie la plus connue est celle de la « Grippe Espagnole » qui affecta très largement la population mondiale, avec une mortalité estimée à plus de 50 millions de personnes entre 1917 et 1920 (Johnson et Mueller, 2002). D'autres pandémies ont eu lieu en 1957 (« Grippe Asiatique »), 1968 (« Grippe de Hong-Kong »), et plus récemment, en 2009-2010 (« Grippe Mexicaine »).

Des épidémies limitées d'un nouveau sous-type hautement pathogène d'IAV, H5N1, directement transmis des oiseaux à l'homme, ont eu lieu à Hong-Kong en 1997 et 2003, et d'autres pays asiatiques de 2003 à 2005 (Claas et al, 1998 ; Normile, 2005). Dans la même période, l'Organisation Internationale des Epizooties (OIE) a rapporté des épizooties au virus influenza hautement pathogène H5N1 chez des oiseaux sauvages et domestiques dans une cinquantaine de pays (World Health Organisation (WHO), 2006).

Les antigènes dominants des vaccins antigrippaux humains ou animaux sont l'hémagglutinine HA, antigène principal, et la neuraminidase NA, qui assurent une protection forte contre l'infection et la morbidité (Wright et Webster, 2001). Cependant, ces vaccins conventionnels ont quelques défauts, le plus important réside dans le choix de la souche virale incluse dans la formulation vaccinale, qui ne correspond pas toujours complètement aux souches virales sauvages circulantes, contrariant l'efficacité vaccinale (Fiers et al, 2009). Par exemple, un nouveau virus Influenza A porcine, apparu à la fin des années 90 aux Etats-Unis, a compliqué le développement d'un vaccin efficace pour le porc (Kitikoon et al, 2010). Ces vaccins inactivés confèrent, de plus, peu ou pas d'immunité croisée entre sous-types ou entre virus génétiquement différents (Tamura et al, 2005 ; David, 2002). L'efficacité vaccinale est donc directement corrélée au degré de similitude entre virus vaccinaux et virus sauvages circulants pour chaque sous-type (Tamura et al, 2005) : une mise à jour annuelle vaccinale, connue presque exclusivement chez l'Homme, est fortement recommandée (Wright et Webster, 2001 ; Kitikoon et al, 2010).

En effet, HA et la neuraminidase NA sont des protéines de membrane dont les structures antigéniques changent très facilement, sans que leurs sites actifs ne perdent leur fonctionnalité (Fiers et al, 2009). Ces modifications aminoacides, de l'ordre de 10^{-3} substitution par nucléotide par an, sont dues à la « dérive génétique », à l'origine, chaque année, de nouvelles souches épidémiques et épizootiques (Cox et Subbarao, 1999 ; Fiers et al, 2009). Ce phénomène est probablement dû à une forte pression de sélection résultant de l'immunité dans la population sensible humaine ou animale (Fiers et al, 2009).

Un autre intérêt majeur de la vaccination provient de l'émergence attendue d'une nouvelle pandémie grippale (Fiers et al, 2009). Une souche pandémique apparaît par l'introduction d'un gène HA totalement neuf, associé possiblement à d'autres gènes dans le pool génétique grippal, causée par « cassure » ou « réassortiment » génétique (Fiers et al, 2009). Les phénomènes de dérive et de réassortiment génétiques, associés à l'apparition de virus H5N1 hautement pathogènes au potentiel pandémique et panzootique, mettent en valeur l'intérêt d'une vaccination antigrippale large spectre.

Or, contrairement à HA et NA, la troisième protéine de membrane, M2, montre une forte similarité de sa séquence aminoacide parmi toutes les souches virales A humaines, aviaires, mammifères (Ito et al, 1991 ; Fiers et al, 2004 ; De Filette et al, 2006). La partie externe de la protéine M2, appelée M2e, est ainsi considérée comme un bon antigène, par ce caractère universel, dans le développement de vaccin large spectre (Fiers et al, 2004 ; De Filette et al, 2006). Par ailleurs, les réservoirs de toutes les souches d'IAV sont représentés initialement par les oiseaux aquatiques sauvages, principalement les Anatidés, comme le canard. Ces oiseaux assurent la transmission de tous les sous-types d'IAV, de faible à hautement pathogènes, aux espèces sensibles aviaires (dont les volailles domestiques) et mammifères (porc, cheval, homme...). Au gré des migrations, des contaminations des eaux souillées et des contacts rapprochés avec ce réservoir canard, le maintien de la pression infectieuse en IAV est assuré.

L'étude mise en place par l'équipe IHVV de l'UMR 1225 INRA-ENVT consiste ainsi à tester chez la souris un nouveau vaccin recombinant intragénique attachant la fraction extramembranaire de la protéine M2 aviaire, le peptide M2e, à l'une des protéines (M071L ou M022L) d'enveloppe d'un virus myxomateux de souche T1, afin, à terme, de développer une vaccination large spectre chez le canard, réservoirs à IAV. L'efficacité vaccinale est analysée en deux parties : la première correspond à notre étude sur la protection clinique induite par ces vaccins chez la souris, alors que la seconde, décrite dans la thèse rédigée par Mademoiselle

Marie Delamare, s'attachera à la mise en évidence de l'immunité cellulaire murine conférée par ces vaccins myxomateux recombinants (Delamare, 2010).

Dans une première partie, nous détaillerons ainsi les caractéristiques des virus grippaux de type A, puis nous décrirons structure et fonction de la protéine M2 de ces virus, en s'attachant particulièrement à son domaine extramembranaire M2e ; après l'analyse des différentes stratégies de défense (naturelle, vaccinale et médicamenteuse) de l'hôte contre l'infection grippale, nous nous attacherons aux caractéristiques du virus myxomateux et son potentiel vaccinal recombinant. Dans une seconde partie, nous décrirons et analyserons nos observations sur la protection clinique contre épreuve, après la vaccination de souris par des virus myxomateux recombinants exprimant M2e.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Chapitre 1 : Etude des virus Influenza A

La grippe est une maladie respiratoire aiguë causée par un virus Influenza qui s'attaque aux muqueuses du tractus respiratoires de l'hôte (Murphy et Webster, 1996).

1.1. Généralités sur les virus grippaux

1.1.1. Classification

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Elle comprend cinq genres (cf. tableau n°1) : *Influenzavirus A* (regroupant les virus de type A), *Influenzavirus B* (virus de type B), *Influenzavirus C* (virus de type C), *Isavirus*, *Thogotovirus* (Fauquet et al, 2005). D'importantes différences structurales, épidémiologiques et cliniques séparent ces trois types.

Genre	Hôtes principaux
<i>Influenzavirus A</i>	Oiseaux aquatiques, mammifères
<i>Influenzavirus B</i>	Homme
<i>Influenzavirus C</i>	Homme, porc
<i>Isavirus</i>	Saumon
<i>Thogotovirus</i>	Mammifères (transmission par les tiques)

Tableau n°1 : Genres et hôtes-cibles des virus de la famille des Orthomyxiviridae. (D'après Fauquet et al, 2005)

1.1.2. Structure et génome

Nous allons développer les particularités structurales du virus de type A, en essayant de décrire les différences avec les virus de type B et C lorsqu'il y en a : les virus influenza restent en effet structurellement très similaires, indépendamment du genre auxquels ils appartiennent (Büchen-Osmond, 2006).

La structure des IAV est décrite dans la figure n°1 ci-après.

Les virus de la grippe sont enveloppés. Mesurant entre 80 et 120 nanomètres, ils ont une forme généralement sphérique, parfois filamenteuse (comme le type C) (Büchen-Osmond, 2006). Ils possèdent un génome à ARN monocaténaire à polarité négative : l'ARN viral doit d'abord être transcrit, par une ARN-transcriptase, en ARN messager, nécessaire à la fabrication protéique virale (Cros et Palese, 2003).

Une des particularités des virus influenza est la segmentation de leur génome ARN : huit segments indépendants pour les type A et B, sept pour le type C (Bouvier et Palese, 2008). Ces segments d'ARN, contenant 1 à 2 gènes, codent pour huit à onze polypeptides (Bouvier et Palese, 2008). Chaque segment ARN est associé au complexe de transcription et de réplication du virus (protéines PB1, PB2 et PA pour le type A, P3 pour le type C) ainsi qu'à une nucléoprotéine majoritaire du core viral (NP). Cette association constitue la ribonucléoprotéine (RNP).

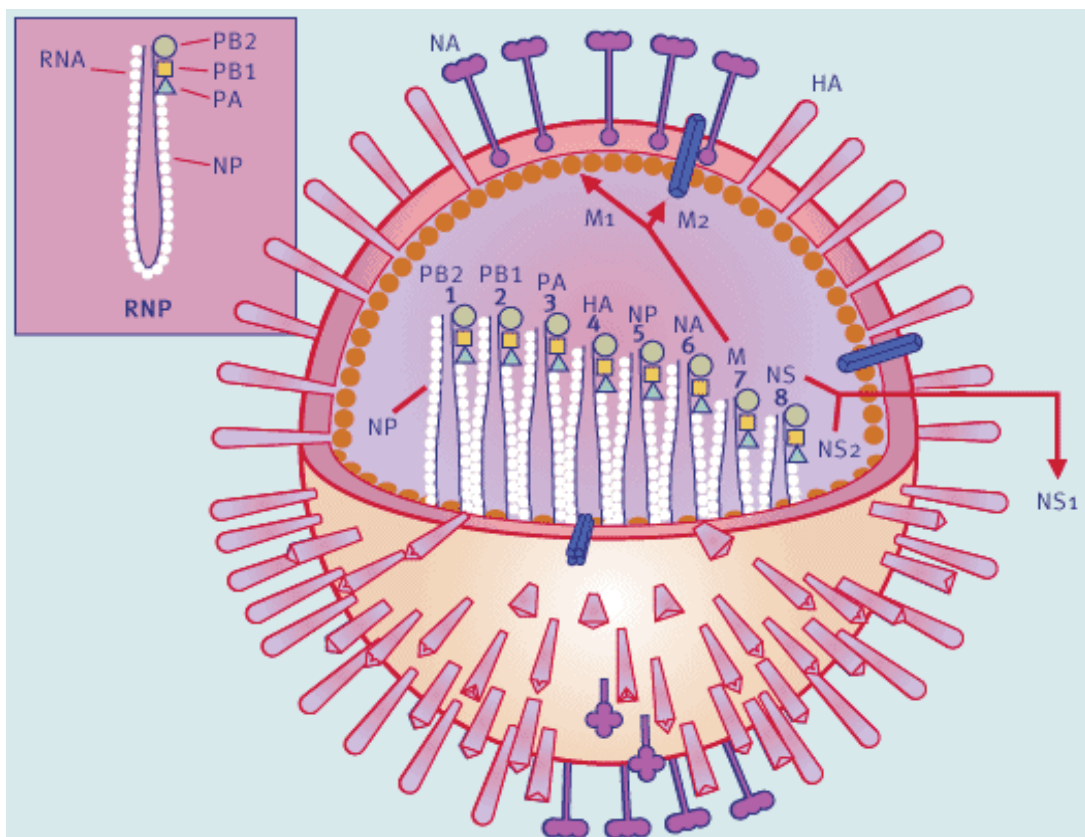


Figure n°1 : Schéma d'un virus influenza A et de son complexe RNP (D'après Heinen, 2003). PB1, PB2 et PA sont trois sous-unités du complexe « polymérase » viral. NP est la nucléoprotéine. M1 est la protéine de matrice. NEP ou NS2 est une protéine non structurale, issue de NS comme NS1. L'hémagglutinine HA et la neuraminidase NA sont des glycoprotéines de membrane. M2 est un canal à ions présent sur l'enveloppe virale. Les numéros 1 à 8 correspondent aux segments ARN du virus : ils codent chacun pour la protéine qui leur est associée sur le schéma.

Le génome des virus de type A, fragmenté en huit molécules d'ARN, contient onze gènes codant pour onze protéines (Chen et al, 2001 ; Ghedin et al, 2005), dont 7 protéines internes (NP, PB1, PB2, PB1-F2, PA, M1, M2, NS1, NEP) et 2 glycoprotéines externes (l'hémagglutinine, HA et la neuraminidase, NA), comme le décrit le tableau n°2. Les 8 segments d'ARN sont empaquetés individuellement dans les ribonucléoprotéines hélicoïdales virales, elles-mêmes empaquetés dans les virions matures (Whittaker et al, 1996).

Segment d'ARN des IAV	Protéine(s)	Fonction protéique
ARN1	PB2, polymérase	Synthèse des ARN (complexe polymérase)
ARN2	PB1, polymérase	Synthèse des ARN (complexe polymérase)
ARN3	PA, polymérase	Synthèse des ARN (complexe polymérase)
ARN4	HA, hémagglutinine	Liaison à la cellule cible
ARN5	NP, nucléoprotéine	Constitution des ribonucléoprotéines
ARN6	NA, neuraminidase	Libération du virus de la cellule
ARN7	M, protéine de matrice (M1 & M2)	M1 : exportation du génome & assemblage viral M2 : endocytose, maturation & assemblage viraux
ARN8	NS1 & NEP, protéines non structurales	Exportation du génome vers le noyau

Tableau n°2 : Le génome viral des IAV, les protéines codées et leurs fonctions.

Les RNP sont constituées d'un segment d'ARN et de la nucléoprotéine virale, NP (56000 Dalton) : NP forme, en une chaîne de plusieurs molécules, le cœur central de la RNP virale, autour duquel tourne le brin d'ARN (Murti et al, 1988). Une molécule NP est ainsi liée à 25 nucléotides (Jennings et al, 1983). Un virion entier contient environ 700 copies de NP (Compans et al, 1970). De plus, chaque RNP contient également un complexe polymérase

trimérique composé des protéines PB1, PB2 et PA, logé à l'extrémité de la RNP virale (Murti et al, 1988). La RNP complète mesure 30 à 110 nanomètres (nm) de long en fonction de la taille de l'ARN contenu (Compans et al, 1970), pour un diamètre de 10 à 20 nm, c'est-à-dire inférieur aux pores nucléaires cellulaires de 23 nm (Dworetzky et Feldherr, 1988).

La protéine M1 (28000 Dalton) est associée aux RNP : M1 est une grosse protéine dont 2800 copies sont contenues dans le virion, soit le composant structural interne le plus abondant du virus (Compans et al, 1970), qui formerait un pont entre les RNP et la membrane virale (Bucher et al, 1980). La structure formée par M1 et les RNP est de type nucléocapside, qui reste stable en l'absence de la membrane virale (Ruigrok, 1998). M1 a un rôle important dans l'exportation vers le noyau des protéines virales et du génome viral, et dans l'assemblage du virion en formation (Bui et al, 2000).

La protéine NEP (appelée aussi NS2), protéine non structurale, est également associée aux composants du cœur viral: elle pourrait être un médiateur de l'export nucléaire des RNP virales (Betakova, 2007). NS1 est une protéine non structurale issue du même gène que NEP ; elle n'est rencontrée que dans les cellules infectées par le virus (Murphy et Webster, 1996).

BP1-F2 est une protéine récemment découverte (Betakova, 2007 ; Ghedin et al, 2005).

Toutes les autres protéines structurales du virus sont intégrées à l'enveloppe virale, dérivée de la bicouche phospholipidique de la cellule hôte :

- L'enveloppe lipidique est constituée par une couche phospholipidique sous-tendue par la protéine virale M1, associée à des glycoprotéines. Pour les types A et B, 40% de ces glycoprotéines sont des HA, 60% des NA. Pour les virus de type C, 100% des glycoprotéines d'enveloppe correspondent à des hémagglutinine estérase (HE) assurant à la fois le rôle de fixation et de libération. Elles sont activées elles aussi par clivage en deux parties (HE1 et HE2).
- HA, comme NA, est une glycoprotéine avec un large ectodomaine. L'hémagglutinine HA est un homotrimère de 510 acides aminés ; chacun de ses monomères est constitué de deux parties HA1 et HA2 qui sont reliées entre elle par un pont disulfure (UCL, 2010). HA1 est une partie globulaire assurant la fonction de HA (UCL, 2010): une activité de fusion membranaire stimulée par clivage en milieu acide, qui favorise la pénétration par liaison des virus avec les

récepteurs à l'acide sialique. HA2 assure l'ancrage de HA dans l'enveloppe virale (UCL, 2010).

- La neuraminidase, NA, est un homotétramère de 420 acides aminés (AA) doté d'une activité sialidase, assurant la libération des virions nouvellement synthétisés (UCL, 2010). Lors de leur fabrication pendant le cycle viral, elles migrent à la surface cellulaire où elles s'assemblent en plaques en chassant les protéines cellulaire membranaire.
- M2, protéine exclusive des virus de type A, est un homotétramère formant un canal à ions, notamment à protons (Pinto et al, 1992 ; Sugrue et Hay, 1991) : 4 à 17 tétramères sont présents par virions, contrairement à HA et NA qui sont très abondantes à la surface virale (Zebedee et Lamb, 1988). Les protéines BM2 pour le type B et CM2 pour le type C sont les équivalents de cette protéine M2.

1.1.3. Caractéristiques épidémiologiques générales des virus grippaux

La division des virus influenza en 3 genres ou 3 types A, B ou C, repose sur les différences antigéniques entre les protéines internes NP et M (Murphy et Webster, 1996 ; Tamura et al, 2005). Bien que leurs gènes aient moins de 30 % en commun, les souches A et B partagent un ancêtre commun (Pelese et Garcia-Sastre, 2002).

- ***Type A***

Le genre Influenzavirus A est caractérisé par une seule espèce, virus influenza A. Les oiseaux sauvages aquatiques sont les hôtes et réservoirs naturels d'une large variété de virus influenza A, et seul ce type de virus grippal est rencontré chez les oiseaux (Alexander, 2000 ; Rohm et al, 1996). D'un point de vue phylogénétique, les gènes viraux de lignées spécifiques d'espèces aviaires aquatiques sont considérés comme la source de toutes les souches virales d'IAV trouvées chez les autres espèces animales (Webster et al, 1992). Ces virus aviaires peuvent être transmis à de nombreuses autres espèces (oiseaux aquatiques et terrestres, mammifères marins, mammifères terrestres dont l'Homme), comme l'illustre la figure n°2, et peuvent déclencher des crises dévastatrices dans les élevages de volaille ou favoriser l'apparition de pandémie humaine grippale. Parmi les trois types, les virus de type A sont en effet les plus virulents chez les humains, et causent la plupart des maladies grippales sévères.

Les IAV sont divisés en différents sérotypes basés sur la réponse en anticorps envers HA et NA. A ce jour, 16 types antigéniques de HA ou H, et 9 de NA ou N ont été identifiés (Fouchier et al, 2005 ; Murphy et Webster, 1996 ; Tamura et al, 2005). Parmi les 144 combinaisons HxNy possibles, seules 103 ont été identifiées à ce jour. Par exemple, un IAV de sous-type H1N1 est responsable de la pandémie de la Grippe Espagnole de 1918 ; un virus du même sérotype est responsable de la pandémie grippale de 2009.

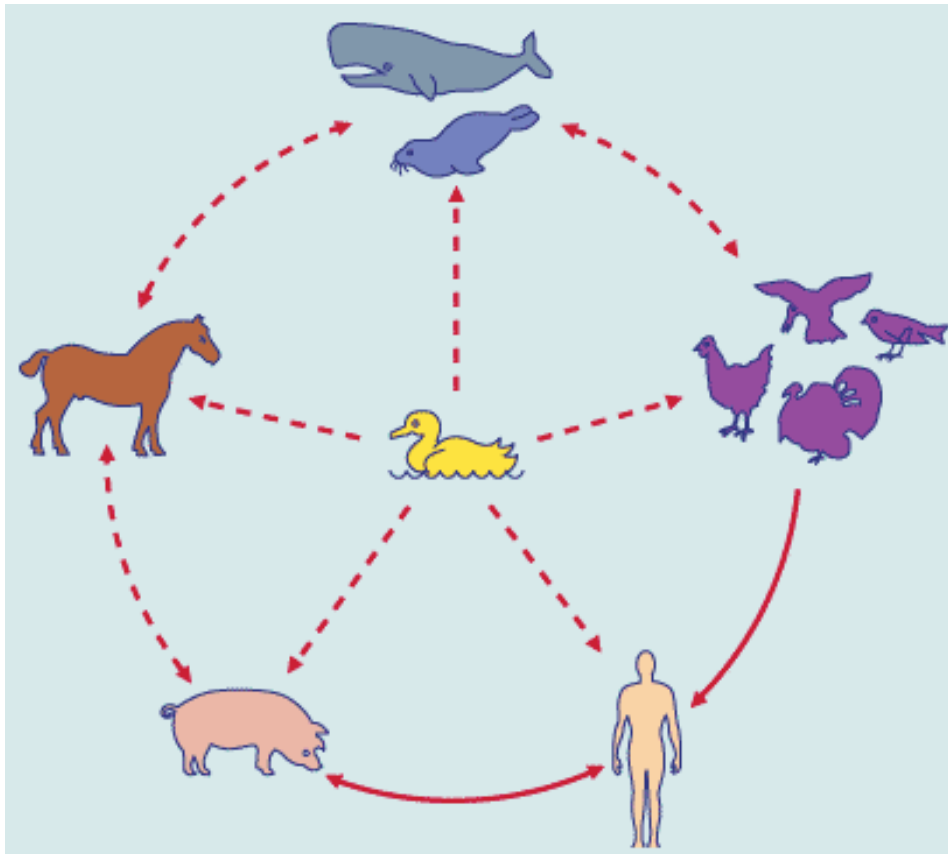


Figure n°2 : Diagramme représentant le réservoir naturel des IAV (oiseaux aquatiques) et leurs transferts interspécifiques. Les flèches pointillées à double-sens montrent les transmissions interspécifiques hypothétiques des virus. Les autres flèches pointillées mettent en évidence le caractère de réservoir des oiseaux aquatiques des virus de type A. Les flèches pleines montrent les relations interspécifiques connues entre l'homme et le porc, et des volailles vers l'homme. (D'après Heinen, 2003)

Trois différents sous-types d'hémagglutinine d'influenza A (H1, H2, H3) et deux sous-types de neuraminidase (N1 et N2) ont été identifiés chez les humains au cours du siècle passé (Pelese et Garcia-Sastre, 2002; Reid et al, 1999 ; Webster et al, 1992) : la population humaine est naïve vis-à-vis des autres sous-types (cf. figure n°3). Les virus de type A de sous-type H1N1 ont circulé de 1918 à 1957. Ils ont été remplacés par les virus de type H2N2 jusqu'en 1968, puis H3N2. H1N1 étant réapparu en 1977, deux virus A circulent

actuellement. Outre le saut antigénique, de légères modifications des protéines de surface lors de mutations ponctuelles permettent au virus grippal d'échapper au système immunitaire (humain) ; cependant, il faut de 3 à 5 ans à un virus d'un sous-type pour accumuler suffisamment de mutations susceptibles de causer une maladie sur une personne réinfectée (Pelese et Garcia-Sastre, 2002 ; Reid et al, 1999).

Les virus Influenza porcins, quant à eux, ont pour particularité de montrer des différences génétiques et antigéniques à travers le monde, notamment pour des souches de même sous-type (Kothalawala et al, 2006).

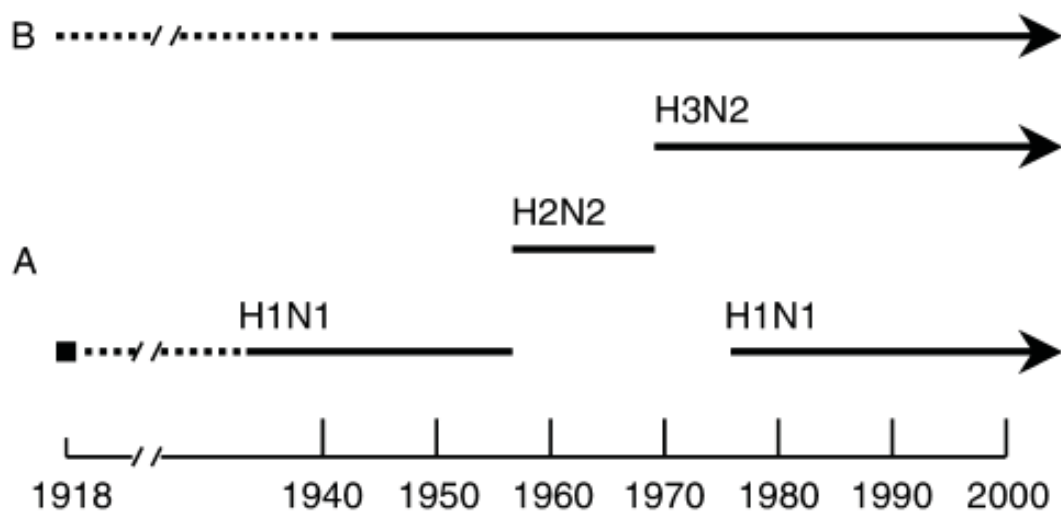


Figure n°3 : Epidémiologie des virus influenza A et B humains. (D'après Pelese et Garcia-Sastre, 2002). Les virus de type B circule concomitamment aux virus de type A.

Aux Etats-Unis, après de nombreuses années de stabilité génétique du virus influenza porcin H1N1 circulant classiquement dans les cheptels porcins, proche du premier virus influenza porcin isolé en 1930, l'émergence d'un virus H3N2 dans cette population a exacerbé la mortalité et la morbidité de la maladie grippale porcine : le génome de ce virus combinait des gènes humains, porcins et aviaires (Webby et al, 2000 ; Webby et al, 2004), dont l'origine serait liée à un réassortiment génétique. Ce phénomène est également observé dans la population humaine : lorsque les souches aviaires ou porcines (principalement des sous-types H5-H7) dépassent ainsi la barrière d'hôte et infectent l'homme, morbidité et mortalité sont maximales (Claas et al, 1998 ; Fouchier et al, 2004 ; Matrosovich et al, 2000). Ce fut le cas de la pandémie mondiale de 1968 liée au sous-type H3, qui a dépassé la barrière de son hôte naturel, le canard, pour toucher la population humaine dès 1967 (Matrosovich, 2000). Dès 1997, les virus influenza hautement pathogènes, transmis directement de la

volaille à l'homme, ont infecté des êtres humains à différentes occasions (Hong-Kong, Pays-Bas, Italie), aux graves conséquences sanitaires (Claas et al, 1998 ; Fouchier et al, 2004).

- **Type B**

L'espèce influenza B est la seule représentante du genre *Influenzavirus B* (UCL, 2010). Les virus de type B n'infectent presque exclusivement que les humains, chez lesquels ils sont beaucoup moins communs que les IAV (Hay et al, 2001). Les seuls animaux susceptibles à l'infection grippale B sont le furet, beaucoup moins sensible que l'homme, et le phoque (Jakeman et al, 1989 ; Osterhaus et al, 2000).

Le taux de mutation du type B étant 2 à 3 fois plus lent que celui du type A, il est génétiquement moins divers, avec un unique sérotype (Hay et al, 2001) : en résulte une immunité précoce et efficace dans les populations humaines. Ces caractéristiques éliminent le type B des candidats potentiels à une pandémie grippale.

- **Type C**

Le genre *Influenzavirus C*, représenté par l'unique espèce virale influenza C, infectent les hommes, les chiens, les volailles et les porcs, parfois à l'origine de maladies grippales sévères sporadiques et d'épidémies locales (Tautenberger et Morens, 2008). Etant moins commun que les autres types chez les humains, le type C cause habituellement des maladies modérées chez les enfants (Pelese et Garcia-Sastre, 2002).

1.1.4. Modifications antigéniques

Les modifications antigéniques ont lieu fréquemment : elles sont un mécanisme d'adaptation du virus à l'hôte, nécessaire à son maintien.

- **Dérive antigénique**

Le phénomène de dérive antigénique, d'apparition annuelle, commun à tous les types de virus grippaux, crée des virus avec des antigènes légèrement modifiés (Murphy et Webster, 1996; Tamura et al, 2005).

Pour les IAV, il correspond à des changements antigéniques mineurs dans les sites antigéniques de HA et/ou NA (cf. figure n°4), dus à l'accumulation de changements dans leurs séquences aminées, causés par des mutations du génome (Gamblin et al, 2004), de l'ordre de 10^{-3} substitution par nucléotide par an.

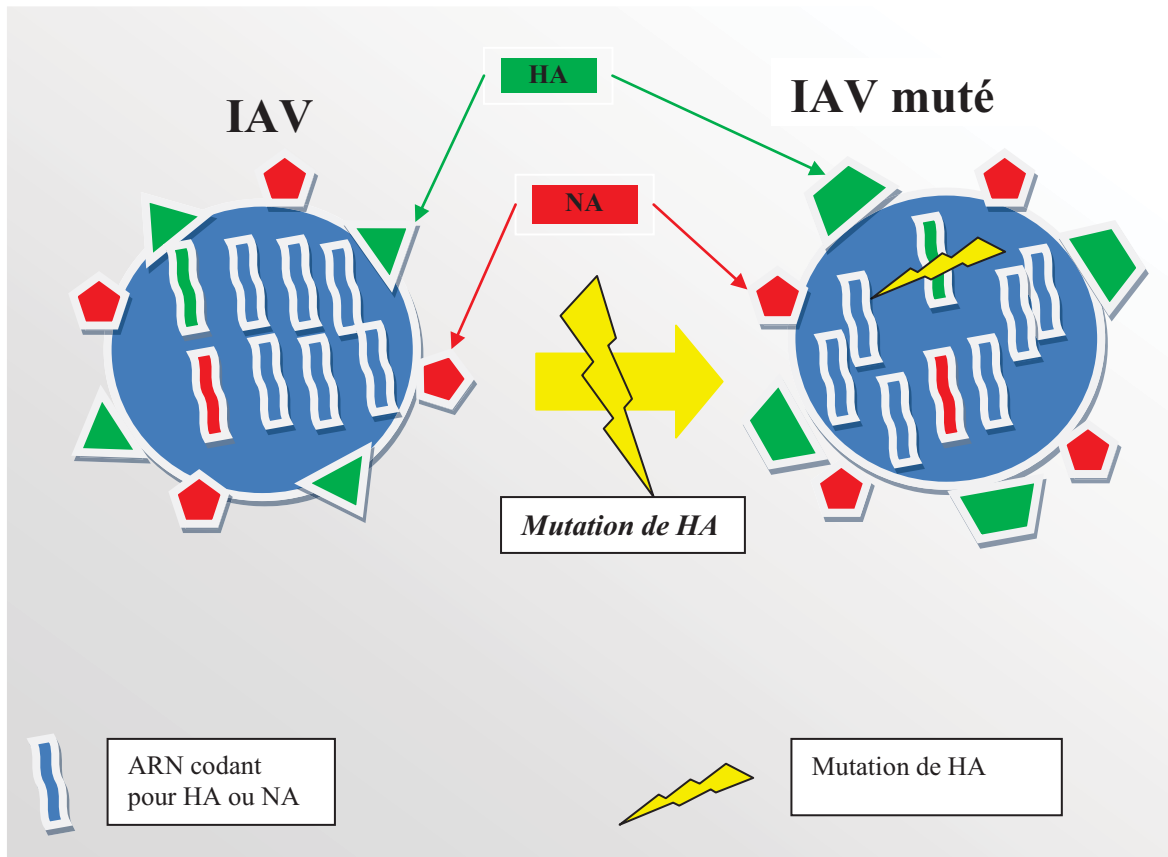


Figure n°4 : Schématisation de la dérive antigénique. Exemple lors de mutation de la séquence ARN de l'IAV codant pour l'hémagglutinine HA.

La dérive génétique permet au virus de répondre à la pression de sélection de l'hôte, en générant des variants antigéniques différents qui évitent les anticorps neutralisants. Ce phénomène de variation saisonnière est à l'origine de la mise à jour annuelle des vaccins antigrippaux humains recommandée par l'OMS (OMS, 2010). Il peut également être à l'origine de pandémie si les mutations virales mènent à une transmission efficace d'homme à homme.

L'émergence de tels variants est responsable des épidémies et crises locales de maladie grippale (Murphy et Webster, 1996 ; Tamura et al, 2005), mais seul le type A possède un potentiel pandémique.

- **Cassure antigénique**

La « cassure antigénique » est exclusive des IAV. Les virus de type B ne voyagent presque exclusivement que chez les humains (même s'il peut infecter les phoques et les furets), ils ne peuvent pas subir de réassortiment avec des souches animales et sont donc concernés uniquement par le phénomène de « dérive génétique », décrit précédemment (Pelese et Garcia-Sastre, 2002). La « cassure antigénique », également appelée

« réassortiment génétique », assure une modification majeure de la structure antigénique de HA et/ou NA, favorisant l'émergence d'un nouveau virus pour lequel la population hôte sensible n'a pas d'immunité: il donne son potentiel pandémique au type A (Murphy et Webster, 1996 ; Pelese et Garcia-Sastre, 2002 ; Tamura et al, 2005).

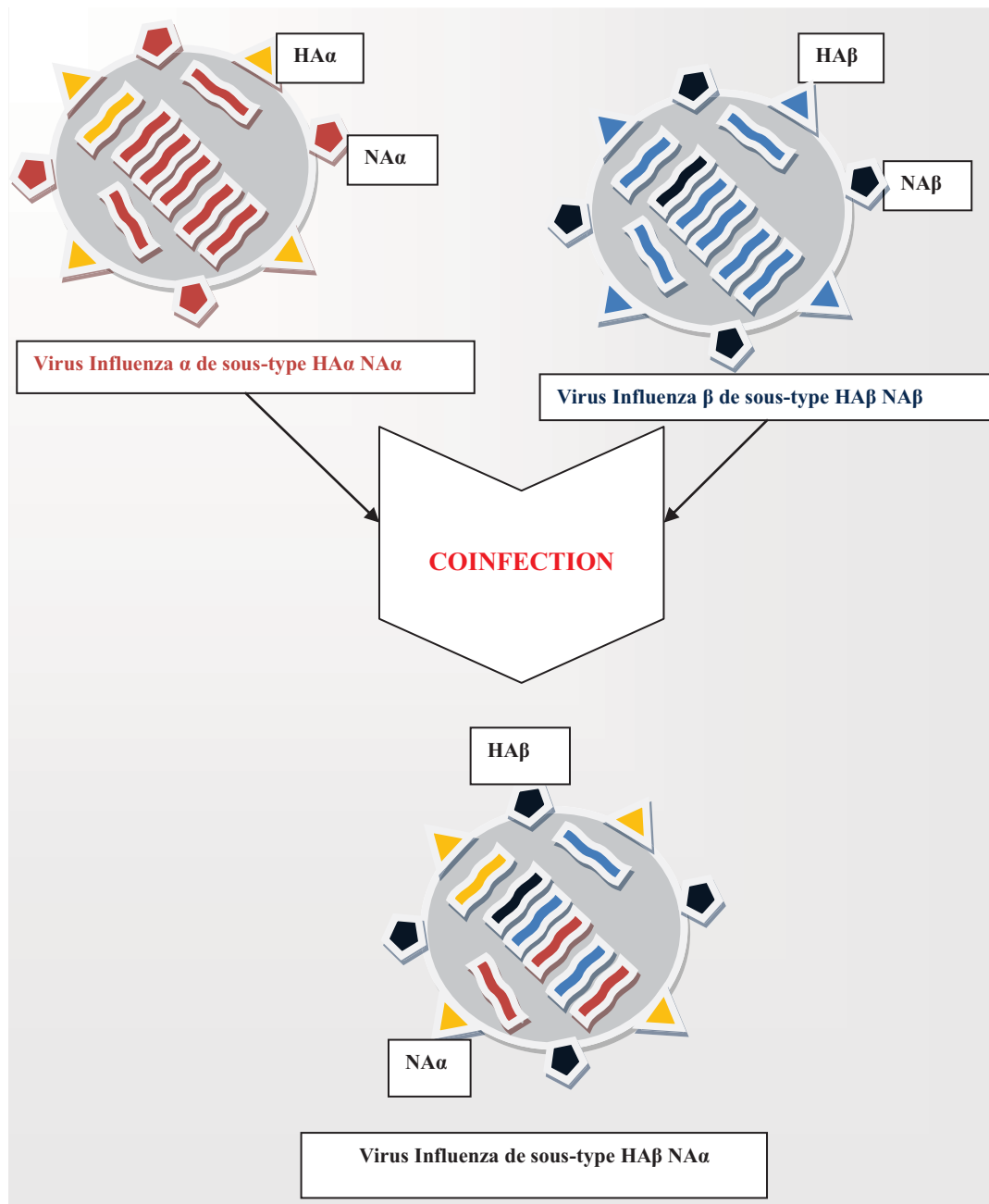


Figure n°5 : Réassortiment génétique entre deux virus influenza de type A. Ce phénomène opère lors de la coinfection de deux virus influenza dans une cellule permissive : un nouveau virus apparaît, dont les modifications touchent principalement l'hémagglutinine et la neuraminidase. Dans cet exemple, le virus obtenu est du sous-type HAβ NAα.

Ce changement, schématisé dans la figure n°5, peut être causé par réassortiment des 8 segments du génome, lorsque la cellule d'un hôte intermédiaire comme le porc est infectée

par deux virus de sérotypes différents de souches aviaire et humaine ou de souches porcine et humaine, comme l'illustre la figure 5 (Murphy et Webster, 1996 ; Tamura et al, 2005 ; Treanor et al, 2005). Il peut également être causée par l'introduction directe d'un virus influenza spécifique d'espèce vers une autre espèce, comme de l'oiseau à l'homme (Murphy et Webster, 1996 ; Tamura et al, 2005 ; Treanor et al, 2005).

Cette cassure antigénique met donc en jeu le rôle de l'hémagglutinine. Les virus humains se lient préférentiellement au récepteur à l'acide sialique avec des liens α -2,6-galactose des cellules épithéliales respiratoires, alors que les virus aviaires préfèrent ceux à l'acide sialique aux liens α -2,3-galactose des cellules épithéliales intestinales (Treanor et al, 2005). Or, l'épithélium trachéal porcine inclut des liens α -2,3 et α -2,6 : ses cellules peuvent servir d'hôte pour une coinfection et un mélange des génomes viraux. L'épithélium respiratoire humain contient des liens α -2,3 (situés plutôt dans les bronches) et α -2,6 (situés plutôt dans la trachée) : il permet l'infection directe des virus influenza aviaires (Treanor et al, 2005).

L'un ou l'autre de ces phénomènes sur les virus aviaires de type A H5N1, à l'origine de changements aminoacides, pourrait induire des altérations antigéniques de ces protéines de liaison, et conduire à une transmission plus efficace parmi les humains (Treanor et al, 2005).

1.1.5. Nomenclature.

Les virus influenza sont désignés selon la nomenclature officielle, proposée par le comité d'experts de l'OMS, qui reprend les informations suivantes (OMS, 2010 ; Treanor et al, 2005):

- * le type antigénique (A, B, ou C) de NP et M, et donc des ribonucléoprotéines
- * l'hôte d'origine : information indiquée pour toutes les souches isolées d'hôtes non-humaines, absente si les souches sont isolées de l'homme
- * la région ou le pays de l'isolement d'origine
- * un numéro de référence
- * l'année d'isolement
- * les sous-types H et N entre parenthèse pour les virus de type A (cf. supra)

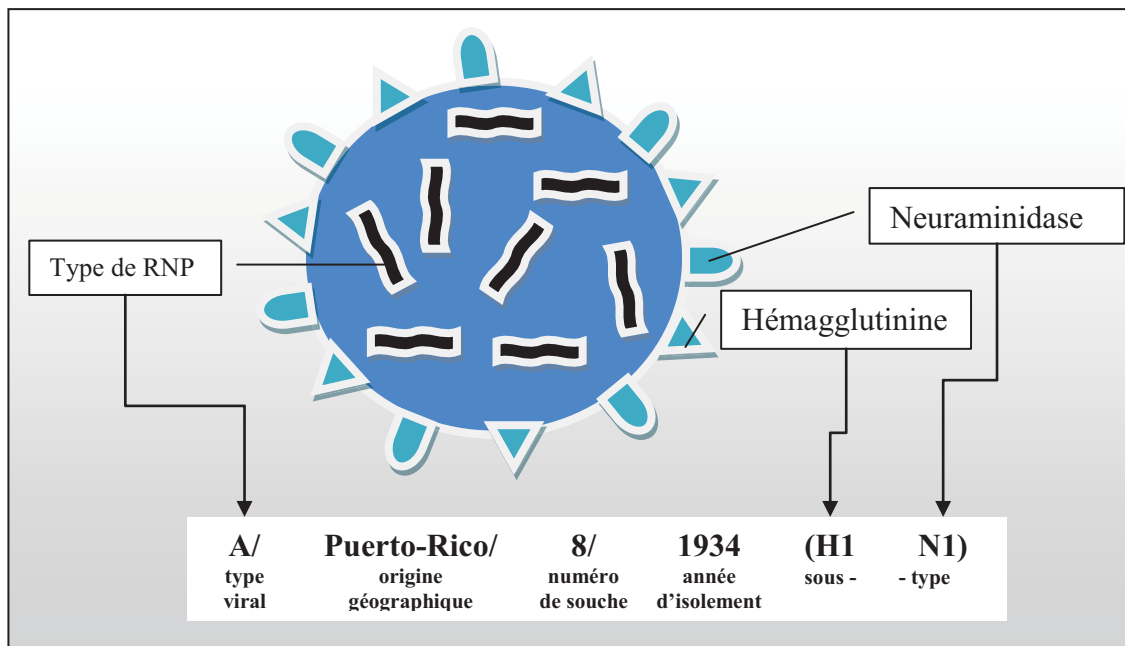


Figure n°6 : Nomenclature des virus influenza : exemple du virus PR8.

Par exemple (cf. figure n°6), le virus PR8 de notre étude a pour nomenclature officielle A/Puerto-Rico/8/34 : virus de type A, de souche humaine, isolée à Puerto-Rico en 1934.

1.2. Aspects biologiques spécifiques au type A

1.2.1. Mécanismes de la Transmission virale

A travers une transmission fécale-orale et par contamination de l'eau, les IAV aviaires circulent parmi les oiseaux aquatiques, comme le canard ou l'oie, réservoirs des IAV (Liu et al, 2005). Ces virus aviaires sont transmis aux autres espèces par les mêmes voies.

Les voies de transmission intraspécifiques ou interspécifiques s'opèrent généralement par trois routes principales : transmission directe par pulvérisation directe du jetage d'un individu infecté sur les muqueuses d'un individu sensible, transmission par les aérosols (particules transmises dans l'air environnant, inhalées par un individu sensible) expliquant potentiellement les transmissions intraspécifiques dans les élevages de porc ou de volaille, transmission indirecte *via* une surface contaminée (Weber et Stilianakis, 2008).

1.2.2. Symptomatologie

Le syndrome grippal se caractérise chez l'homme et les mammifères par une apathie, de la dysorexie, des céphalées, des douleurs musculaires et articulaires, de la fièvre et des symptômes respiratoires (toux plutôt sèche, jetage) (Tautenberger et Morens, 2008).

1.2.2.1. **Maladie grippale suite à l'Infection naturelle à IAV**

Nous allons décrire les symptômes rapportés lors d'infection naturelle à l'IAV chez quelques espèces sensibles.

- ***Chez l'homme***

La grippe bénigne saisonnière est une infection aiguë, autolimitée au tractus respiratoire, qui débute par l'apparition soudaine de fièvre, suivie par l'inflammation des voies respiratoires supérieures et de la trachée, avec coryza, toux, céphalée, prostration, malaise persistant 7 à 10 jours (Tautenberger et Morens, 2008). Le virus se réplique à la fois dans les voies respiratoires supérieures et inférieures. Dans les infections expérimentales chez les volontaires sains, la réplication de l'IAV atteint son paroxysme en 48 heures environ après inoculation au niveau du nasopharynx, puis décline en 6 jours. Occasionnellement chez les individus sains, mais plus souvent chez les très jeunes, les personnes âgées ou immunodéprimées, une grippe saisonnière aiguë se développe en bronchite hémorragique, pneumonie, caractérisées par une dyspnée, une hémoptysie, un œdème pulmonaire, une cyanose. La mort peut intervenir en 48 heures après l'occurrence des symptômes (Barnard et al, 2009). Lors de pneumonies grippales sévères chez les humains, des thromboses capillaires, des bronchites et bronchiolites nécrosantes, des œdèmes interstitiels, des infiltrats inflammatoires, des lésions alvéolaires sont observés dans le tissu pulmonaire (Tautenberger et Morens, 2008).

- ***Chez le furet***

Les souches les moins virulentes de virus influenza causent des symptômes grippaux modérés chez les furets, rarement mortels (Barnard et al, 2009). Seule une maladie grippale respiratoire bénigne a lieu chez les animaux infectés par ce type de virus, avec des reniflements occasionnels et un léger jetage séreux, souvent associés à de la fièvre et une perte de poids (Svitek et al, 2008).

- ***Chez le porc***

Le virus influenza porcine est à l'origine d'une maladie respiratoire à impact négatif sur l'industrie porcine (Kothalawala et al, 2006). Les signes de la maladie, parfois mortelle, chez ces animaux sont fièvre, léthargie, reniflement, toux, dyspnée, dysorexie, parfois avortement

(Kothalawala et al, 2006 ; van der Laan, 2008) ; l'impact économique de la perte de poids et de la faible croissance qui en découlent est rarement négligeable.

- ***Chez le chien***

Un virus influenza canin de type A H3N8, issu d'un virus équin de même sous-type a récemment été identifié aux Etats-Unis (Payungporn et al, 2008). Transmissible de chien à chien, peu d'entre eux expriment les symptômes cliniques typiques du syndrome grippal : toux, jetage, fièvre (Payungporn et al, 2008).

- ***Chez les oiseaux***

Les symptômes grippaux chez les oiseaux sont variables, et peuvent être non spécifiques (Elbers et al, 2005). Tous les sous-types d'IAV sont représentés, mais les oiseaux aquatiques de l'ordre des Anseriformes connaissent une distribution, une variété et un nombre plus larges d'IAV (Alexander, 2000). Les virus influenza infectant la volaille peuvent être différenciés en deux groupes en fonction de leur capacité à induire une maladie chez la poule (Alexander, 2000). Les virus les plus virulents, à l'origine des « pestes aviaires » sont les virus influenza hautement pathogènes (*highly pathogenic avian influenza* ou HPAI), chez lesquels la mortalité peut atteindre 100% en peu de temps: ces virus sont restreints à certaines souches de sous-type H5 ou H7. Tous les autres virus induisent principalement une maladie respiratoire plus modérée : ils font partie des virus à faible pathogénicité (*low pathogenic avian influenza* ou LPAI), éventuellement exacerbée par des infections concomitantes ou des conditions environnementales favorisantes (Alexander, 2000).

Les gripes faiblement pathogènes conduisent à une mauvaise qualité de plumage, une réduction de la ponte, une perte de poids combinées à une maladie respiratoire mineure : jetage, épiphora, toux, dyspnée (Capua et Mutinelli, 2001). Des souches plus virulentes peuvent causer des symptômes plus sévères, respiratoires et digestifs (comme de la diarrhée), parfois associés à une cyanose des muqueuses, à l'origine une mortalité significative chez les volailles : les formes hautement pathogènes peuvent produire des symptômes sévères d'apparition soudaine et induire jusqu'à 100% de mortalité en deux jours chez les poulets et les dindes (Swayne et Suarez, 2000). Les canards présentent généralement des symptômes discrets, plus modérés que les poules ou les oies.

1.2.2.2. **Infection expérimentale sur modèle : souris, furet, porc**

- ***Chez la souris infectée expérimentalement***

La souris n'est pas hôte naturel de l'IAV : chez les souris infectées expérimentalement par des virus de faible pathogénicité, une maladie d'intensité modérée apparaît, avec peu des signes et symptômes observés chez les humains (Barnard et al, 2009). Les souris peuvent être infectées expérimentalement par les virus saisonniers de type A et B, mais cela nécessite généralement des passages pulmonaires multiples pour adaptation à cette espèce. Le virus grippal pandémique de 1918 est létal pour la souris (Tautenberger et Morens, 2008). Le virus adapté peut infecter les cellules pulmonaires murines, probablement par modification d'acides aminés des HA favorisant la liaison aux molécules d' α -2,3-acide sialique. Contrairement à l'homme, la souris montre rarement des signes d'hyperthermie, de dyspnée, de cyanose ou d'hémoptysie, sauf lors d'infection au virus hautement pathogène H5N1. La perte de poids et le taux de survie restent deux bons marqueurs de la sévérité de la maladie (Sidwell et Smee, 2004) ; les manifestations de la maladie dépendent du potentiel infectieux, de la dose-épreuve de virus et de l'adaptation du virus à cet hôte pour les souches grippales saisonnières (Barnard et al, 2009).

- ***Chez des hôtes naturels infectés expérimentalement : le furet et le porc***

Le furet infecté naturellement par le virus Influenza développe beaucoup des signes typiques de l'infection grippale humaine : jetage, anorexie, épiphora séreux, symptômes otologiques et fièvre ; il est ainsi utilisé comme modèle pour les pneumonies humaines grippales (Sidwell et Smee, 2004 ; Svitek et al, 2008). Si les porcs meurent rarement de la grippe lors d'infection naturelle, un virus inoculé directement dans la trachée peut être à l'origine d'une pneumonie (van der Laan, 2008). Les porcs sont utilisés principalement dans le développement de vaccins contre le virus influenza porcin (van der Laan, 2008).

1.2.2.3. **Influenza aviaire hautement pathogène H5N1**

Le virus H5N1 infecte un large nombre de mammifères sans adaptation préalable nécessaire. Cette variante hautement pathogène du virus de la grippe aviaire provient du virus A/goose/Guandong/96 (Cardona et al, 2009).

Les galliformes montrent une défaillance multiple d'organes suivie d'une mort rapide sans prodrome (Cardona et al, 2009).

Le chat, l'oie, le rat, les pigeons, inoculés à forte dose, et les canards infectés par le H5N1 isolé depuis 2002 développent des signes neurologiques centraux mortels (Cardona et al, 2009).

Les humains infectés naturellement, et leurs représentants en laboratoire tels que le furet, la souris et le macaque, présentent une maladie grippale sévère plus longue avec des signes nombreux (léthargie sévère, fièvre, perte de poids, pneumonie...), qui se termine inévitablement par une défaillance mortelle des organes interne, même si l'infection semble principalement pulmonaire (Cardona et al, 2009). Les macaques infectés expérimentalement par H5N1 montrent pneumonie et syndrome respiratoire aigu sévère (Cardona et al, 2009), avec une susceptibilité variable qui pourrait refléter celle de la population humaine.

Les pigeons, les canards inoculés avec une variante H5N1 antérieure à 2002, les rats et les porcs sont plus résistants et développent peu, voire pas de signes cliniques (Cardona et al, 2009). Les porcs, peu sensibles à cette variante, présentent ainsi toux modérée, fièvre et anorexie passagères (Cardona et al, 2009). Par les contacts plus ou moins étroits entretenus avec les humains, le virus aviaire H5N1 peut également affecter l'espèce canine : conjonctivite, fièvre se développent en 2 jours puis régressent en 7 jours sans autre symptômes (Cleaveland et al, 2006). Certains auteurs désignent les chiens comme une sentinelle, plus qu'un modèle, de la maladie grippale humaine (Cleaveland et al, 2006).

1.2.3. Cycle viral des virus influenza de type A

Le cycle viral de l'IAV se divise en plusieurs étapes schématisées plus loin dans la figure n°7.

- ***Entrée virale et Endocytose***

L'IAV entre dans la cellule par HA qui se lie à l'acide sialique présent à la surface de la cellule-hôte. Après liaison, le virus est internalisé via endocytose médiée dans les endosomes cellulaires. M2, protéine de l'enveloppe virale, est activée par le pH acide environnant (pH entre 5 et 6). La forme à pH neutre de HA, métastable, subit alors un changement conformationnel induit par ce pH faible, médiant ainsi la fusion de la membrane virale avec la membrane endosomale (Bullough et al, 1994).

M2 activée, assure le passage des protons à travers la membrane virale vers le core viral ; les interactions protéiques entre M1 et les ribonucléoprotéines virales sont alors affaiblies (Helenius, 1992 ; Lamb et al, 1994; Sugrue et Hay, 1991): Les ribonucléoprotéines

virales sont délivrées au noyau cellulaire afin d'initier l'expression et la réplication du génome viral (Bui et al, 2000; Helenius, 1992 ; Martin et Helenius, 1991). L'export nucléaire du génome viral serait médiée par un complexe M1-NEP-RNP virale.

- ***Expression du génome***

Dans le noyau, l'ARN-polymérase ARN dépendante, issue des RNP, initie la transcription des ARN viraux en ARN viraux complémentaires à polarité positive (Cros et Palese, 2003). La transcription et la réplication du génome viral prend place dans le noyau cellulaire, où aura lieu l'assemblage des constituants du futur virion (Wraith et al, 1987). La traduction de M1, NP, NS1, PA, PB1 et PB2 prend place sur des ribosomes libres, tandis que celle de HA, NA et M2 a lieu sur des ribosomes membranaires (Wraith et al, 1987). L'assemblage des RNP a lieu dans le noyau (Jennings et al, 1983). Les RNP virales synthétisées sont exportées hors du noyau : l'exportation des RNP met en jeu principalement M1 et NEP (Bui et al, 2000 ; Martin et Helenius, 1991) ; le complexe RNP-M1 prévient le retour des RNP dans le noyau (Martin et Helenius, 1991).

Notons que le mécanisme initial de la dérive génétique, décrite précédemment, intervient avec les erreurs commises par l'ARN-polymérase ARN-dépendante, en l'absence d'enzymes de relecture/correction (Drake, 1993). D'autres protéines virales ont de multiples actions dans la cellule infectée : dégradation et inhibition de la traduction des ARNm cellulaires (Kash et al, 2006).

- ***Bourgeonnement et libération des virions***

Les protéines HA, NA et M2 sont synthétisées en association dans le réticulum endoplasmique granuleux, puis insérées dans la membrane virale. Lors de leur transfert vers le pôle apical des cellules infectées, les protéines s'assemblent en leur structure multimérique mature et sont modifiées par l'ajout de chaînes osidiques et de groupements d'acides gras dans les diverticules transgolgiennes. L'environnement ionique de ces voies d'exocytose est modifié par M2, qui fait diminuer le pH des vésicules transgolgiennes, inhibant ainsi l'inactivation acide de HA (Ciampor et al, 1992 ; Takeuchi et Lamb, 1994).

Les protéines de membrane, comme M2, sont incorporées dans des zones de la membrane plasmique où les protéines membranaires cellulaires sont largement exclues.

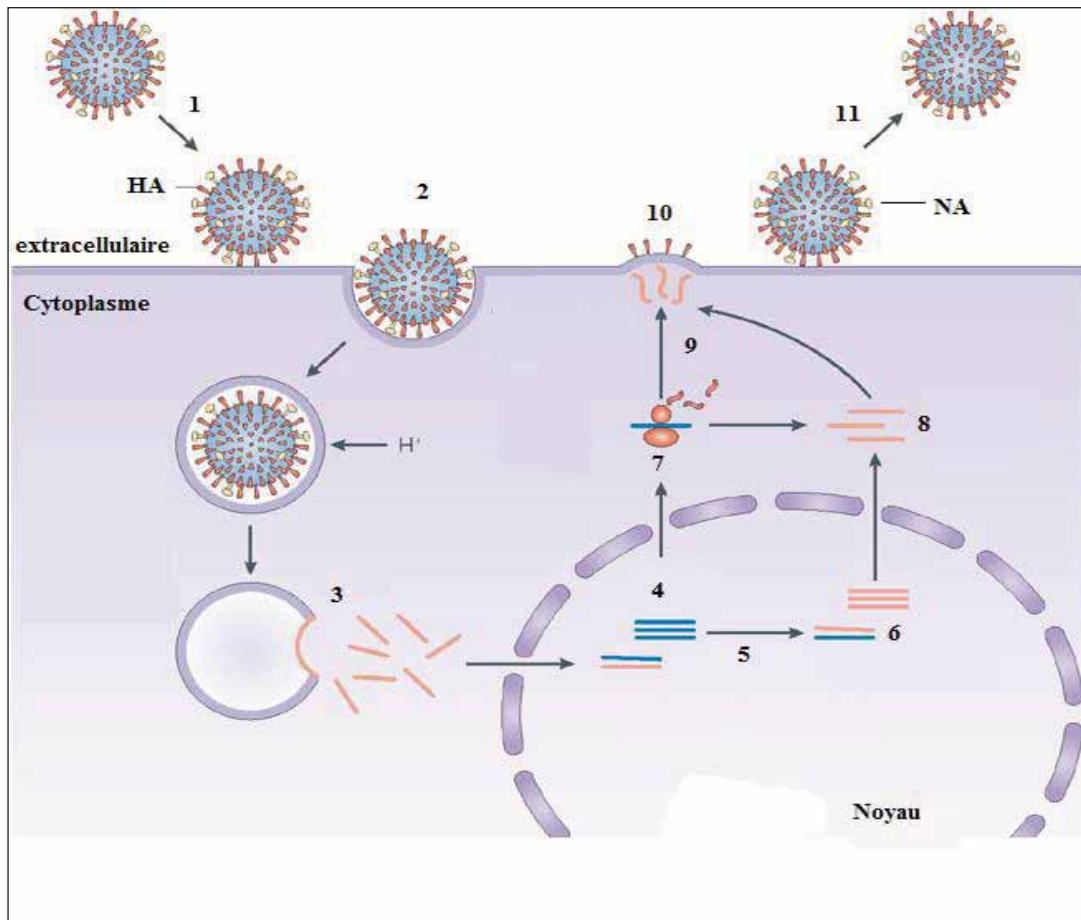


Figure n°7 : Schéma représentant le cycle viral des virus influenza de type A dans une cellule cible (D'après Von Itzstein, 2007). 1 : Liaison à la cellule cible à l'aide de l'hémagglutinine HA. 2 : endocytose. 3 : Fusion des membranes et libération des ARN viraux (orange) qui transitent vers le noyau. 4 : synthèse des ARN messagers (ARNm en bleu) à partir des ARN viraux. 5 : synthèse des ARN complémentaires à partir des ARN messagers formés. 6 : réplication des ARN constitutifs des virions. 7 : synthèse des protéines virales. 8 : formation des RNP à partir des ARN et des protéines nouvellement formés. 9 : assemblage viral. 10 : bourgeonnement. 11 : libération des virions par l'activité sialidasique de la neuraminidase NA.

L'IAV sélectionne les domaines riches en cholestérol-sphingomyéline pour le site d'assemblage des virions en bourgeonnement à la surface cellulaire (Leser et Lamb, 2005), permettant aux virions d'acquérir ces protéines via l'enveloppe formée lors du bourgeonnement.

M1, par son interaction avec HA, NA, M2 et la membrane lipidique, joue un rôle pivot dans le bourgeonnement de ces virions (Bucher et al, 1980 ; Lamb et al, 1985). NA est une enzyme clivant l'acide sialique terminale des glycoprotéines cellulaires de surface et favorisant le relargage des nouveaux virions de la cellule quelques heures après l'infection. Le clivage des acides sialiques du HA viral peut prévenir l'agrégation de virions (Wagner et al, 2002).

2. Chapitre 2 : La protéine M2, structure et activité

M2 est une protéine intégrante, intrinsèque de la membrane virale (Lamb et al, 1985). Cette protéine est la cible spécifique de l'amantadine et la rimantadine, inhibiteurs de la réplication virale des l'IAV (Hay et al, 1985 ; Hay, 1989; Pinto et al, 1992 ; Wang et al, 1993).

2.1. Structure de la protéine M2

2.1.1. Présence dans le virion

M2 est une protéine synthétisée à partir de l'ARNm épissé dérivé du gène M situé sur le septième segment ARN de l'IAV (Lamb et Choppin, 1981 ; Lamb et al, 1985), transportée via l'appareil de Golgi et les saccules transgolgiennes comme les autres protéines membranaires (Zebedee et al, 1985).

Alors qu'un nombre important de molécules M2 sont présentes à la surface des cellules infectées par IAV (Lamb et Choppin, 1981 ; Lamb et al, 1985 ; Zebedee et al, 1985), à raison d'environ deux molécules M2 pour une molécule trimérique de HA dans les cellules CV1 (Lamb et al, 1985), peu de ces molécules natives sont incorporées sur le virion en formation, (de l'ordre de 14 à 68 molécules M2 par virion), par rapport aux deux autres glycoprotéines membranaires, HA et NA (Zebedee et Lamb, 1988) : on compte environ 10 M2 pour 400 HA et 100 NA sur le virion.

2.1.2. Séquence aminoacide

La séquence protidique de M2, schématisée dans la figure n°8, est constituée de 97 acides aminés, divisé en 3 domaines structuraux : une partie aminotermine extracellulaire de 24 AA (appelée M2e), une portion transmembranaire de 19 AA (TM2), et une portion cytoplasmique de 54 AA (M2c) (Holsinger et Lamb, 1991 ; Lamb et al, 1985 ; Sugrue et Hay, 1991 ; Zebedee et al, 1985). La protéine M2 est phosphorylée principalement au résidu sérine en position 64 de la séquence aminoacide (Holsinger et al, 1994), acylée (Holsinger et Lamb, 1991 ; Sugrue et al, 1990b), non glycosylée, et contient de l'acide palmitique lié covalamment à un résidu de cystéine cytoplasmique (Sugrue et al, 1990b).

La protéine M2 native, non glycosylée, est un homotétramère composé de 2 homodimères liés par des ponts disulfures (Holsinger et Lamb, 1991 ; Sugrue et Hay, 1991).

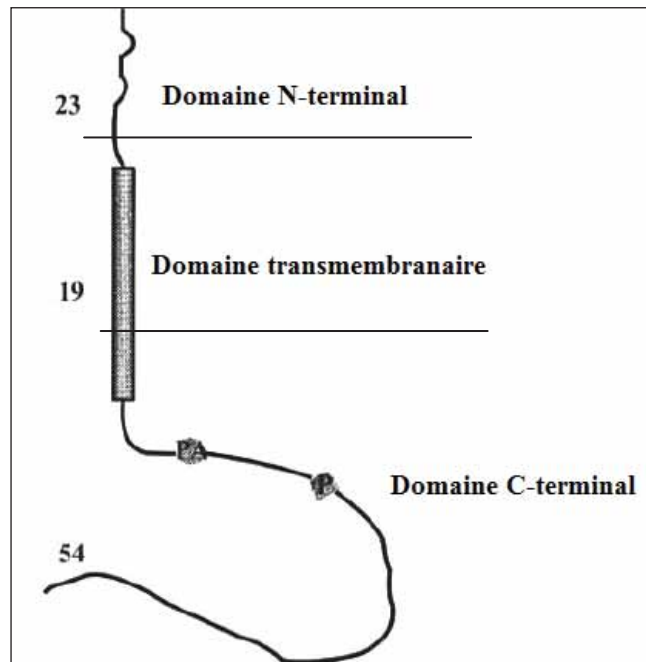


Figure n°8 : Schéma de la protéine M2. PA : Cystéine 50 palmytilée; P : Serine 64 phosphorylée. (D'après Betakova, 2007). Le domaine N-terminal de M2 est composé de 23 AA, le domaine transmembranaire de 19 AA et le domaine C-terminal de 54 AA.

2.1.3. Ectodomaine de M2 : le peptide M2e

M2e, peptide de 24 AA, est bien conservé parmi les souches transmissibles d'homme à homme depuis le premier isolat du virus influenza en 1933; il en est de même à l'intérieur des souches aviaires et porcines pour les peptides M2e aviaire et porcin, respectivement (Fiers et al, 2004). La conservation de M2e est remarquable pour un virus à ARN avec tant de souches et sous-types : c'est un contraste fort avec la variabilité de HA et NA. Les propositions expliquant ce maintien de la séquence M2e sont les suivantes :

- Le peptide M2e induit une réponse immunitaire faible, voire inexistante, suite à une infection grippale (Black et al, 1993 ; Feng et al, 2006 ; Liu et al, 2003) : il n'y aurait aucune pression de sélection significative conduisant à une modification d'origine immunitaire, contrairement à HA et NA, plus exposés. En effet, après l'infection ou la vaccination par des vaccins influenza à autorisation de mise sur le marché (AMM), les niveaux d'anticorps sériques spécifiques de M2e sont faibles chez l'homme, le porc et la souris.

- Une contrainte génétique limite la variabilité de M2e, tenant probablement dans les relations étroites entretenue par M2 avec la protéine M1 (cf. figure n°9) : cette dernière a longtemps été reconnue comme probablement la protéine la plus conservée de l'IAV (Ito et al, 1991), ses mutations étant très limitées et très sélectives car délétère pour le cycle viral. Les neuf premiers acides aminés N-terminaux de M2e sont identiques à ceux de la partie N-terminale de la protéine M1 et sont totalement conservés ; les 15 AA suivants de M2e sont codés par une séquence nucléotidique codant pour la partie C-terminale de M1 et sont sujets à une variation mineure. Le peptide M2e est donc sujet à peu de modifications, puisque celles-ci affecteraient aussi M1 (Fiers et al, 2009; Ito et al, 1991 ; Zebedee et Lamb, 1988).
- La stabilité génétique tiendrait également dans le rôle de M2e dans le cycle viral : M2e est nécessaire à l'incorporation des peptides M2e néoformés dans le virion, probablement par interaction avec la partie membranaire proximale de HA (Park et al, 1998 ; Saelens, 2008). Puisque la sous-unité HA2 de HA ancre la protéine HA dans la membrane, et que, comparée à HA1, HA2 est relativement conservée parmi les sous-types, cette interaction M2e/HA pourrait également contribuer à la conservation de la séquence M2e (Saelens, 2008).

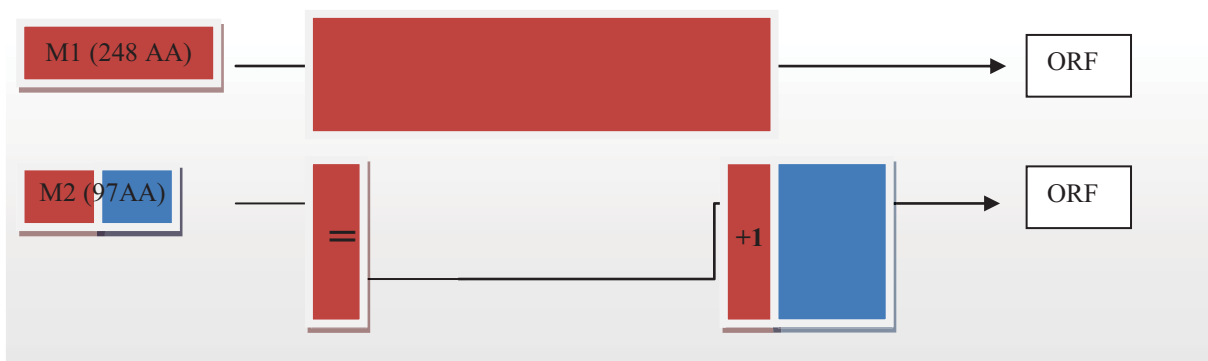


Figure n°9 : Relation génétique entre les protéines de matrice M1 et M2. La protéine M2 est traduite à partir d'un variant épissé de l'ARNm codant pour M1. Les neuf premiers résidus aminoacides de M1 et M2 sont identiques (représenté par « = » sur le schéma, le cadre ouvert de lecture, ou *open reading frame*, ORF, est identique). Les résidus aminoacides 10 à 24 de M2 sont traduits du cadre ouvert de lecture « +1 » relatif à M1 (D'après Saelens, 2008).

Il existe cependant des variations ponctuelles de cette séquence qui émergent sporadiquement dans M2e au niveau de la séquence codante de M2 chevauchant celle de la

partie carboxyterminale de la protéine de matrice M1 de l'IAV (Ito et al, 1991 ; Zebedee et Lamb, 1988). Il y a deux positions où une variation amino-acide a été observée : Glycine/Glutamate en position 16, Aspartate/Glycine en position 21 ; cette dernière variation n'influe pas sur l'efficacité vaccinale d'un vaccin M2e-HBc (Neyrinck et al, 1999). La souche épidémique H1N1 A/Fort Monmouth/1/47 a les résidus Isoleucine-Arginine en position 11-12 remplacés par les résidus Thréonine-Lysine, une modification observée également sur les séquences M2e porcines. Récemment, la séquence M2e d'un isolat de grippe espagnole H1N1 A/Brevig-Mission/1/18 a été publiée : la seule variation se trouve également en position 11, où un résidu thréonine est observé (Reid et al, 2002). L'émergence de variants M2e est très lente, le peptide n'étant pas concerné par les mécanismes d'échappement viral comme le sont HA et NA, plus sujettes à la pression de sélection (Zharikova et al, 2005).

Origine	Séquence aminoacide 2-24
Séquence universelle consensus humaine (H1-H2-H3)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
Séquence universelle porcine	SLLTEVETPIRNGWECKNDSSD
Séquence universelle aviaire (séquence consensus du M2e de notre étude)	SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD
<i>A/Puerto-Rico/8/34 (PR8)</i> (virus d'épreuve de notre étude)	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
A/aviaire/Pays-Bas/219/03 (séquence M2e des vaccins de notre étude)	SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD

Tableau n°3 : Séquences aminoacides du peptide M2e de divers virus Influenza de type A (d'après De Filette et al, 2006). La séquence aminoacide (code par lettre) du prototype M2e humain, porcine ou aviaire a été déduite de la séquence nucléotidique publique valable du gène 7. La séquence démarre à partir de la sérine en position 2 car la méthionine initiale est enlevée après la traduction. Les acides aminés qui changent relativement par rapport au consensus sont décrits en gras. Les AA soulignés dénotent les modifications dans les M2e porcine et aviaire par rapport au M2e consensus humain. Les différences entre les séquences M2e du virus PR8 et de celle des vaccins utilisés dans notre étude sont les AA en italique.

La séquence aminoacide de M2e est décrite dans la séquence consensus universelle pour toutes les souches transmissibles d'homme à homme (De Filette et al, 2006 ; Liu et al, 2003). Une compilation des séquences consensus M2e de toutes les souches humaines, aviaires, et porcines est décrite dans le tableau n°3 (De Filette et al, 2006).

L'analyse de 716 séquences M2e d'IAV valables de GenBank montre, comme le suggère le tableau n°3, qu'une région localisée des résidus aminoacides 10 à 20 du peptide M2e est restreinte à une spécificité d'hôte : **PIRNEWGCRCN** pour l'homme, **PTRNGWECKCS** pour les espèces aviaires, **PIRNGWECRCN** pour le porc (De Filette et al, 2006 ; Liu et al, 2005). Ces différences peuvent avoir un impact défavorable à la reconnaissance antigénique croisée entre souches humaines et aviaires (Liu et al, 2005). L'anticorps monoclonal dirigé contre la séquence 6-13 du peptide M2e humain EVETPIRN reconnaît faiblement la séquence aviaire EVETPTRN et échoue à reconnaître la séquence aviaire EVETLTRN (Liu et al, 2005). Cependant, la séquence humaine consensus de M2e diffère seulement de 5 acides aminés du M2e consensus aviaire ou porcine : certaines de ces 5 différences sont à l'extérieur d'une courte séquence de résidus aminoacides où sont situés plusieurs épitopes à cellules B, probablement chevauchants (Fiers et al, 2009). En résulte le fait que le sérum immun spécifique de M2e humain réagit avec la plupart des séquences M2e aviaires.

2.1.4. Domaine transmembranaire de M2 : TM2

Le peptide TM2 est hautement conservé sur toutes les souches IAV humaines, porcines, équine et aviaires (Betakova, 2007 ; Ito et al, 1991 ; Zebedee et Lamb, 1989) : quelques variations de sa séquence suffisent à influencer sur son activité. TM2 possède 3 résidus hydrophiles : Sérine en position 31 (Ser31), Histidine en 37 (His37), et Tryptophane en 41 (Trp41) (Pinto et al, 1997). La région codante pour la protéine M2 est conservée pour toutes les souches connues d'IAV aviaires, humaines, équine et porcines, où His37 et Trp41 sont absolument conservées (Ito et al, 1991). Ces deux résidus ont en effet un rôle très important.

- ***Structure de TM2***

Le peptide TM2 est la structure essentielle responsable de l'activité canal ionique de M2 : c'est un homotétramère formé de paquets d'hélices- α à pas droit, où chaque hélice est perpendiculaire à la membrane virale (Betakova, 2007 ; Kovacs et al, 2000). L'homotétramère TM2 est stabilisé par des interactions non covalentes dans son domaine transmembranaire, par des ponts disulfures dans son domaine N-terminal et par une base stable carboxyterminale (Castrucci et al, 1997 ; Holsinger et Lamb, 1991 ; Sugrue et Hay, 1991).

- **Modèle d'activation du canal (cf. figure n°10)**

L'étude de la structure de TM2 par résonance magnétique nucléaire (RMN) montre qu'à l'état fermé, 4 hélices transmembranaires étroitement liées forment un canal étroit de résidus histidine, fermé par une « porte » tryptophane liée par des interactions moléculaires avec l'acide aspartique (Schnell et Chou, 2008). Une hélice amphipathique carboxyterminale orientée presque parallèlement à l'hélice transmembranaire forme une base, orientée vers l'intérieur du canal (Schnell et Chou, 2008). La diminution du pH déstabilise l'hélice transmembranaire : la « porte » s'ouvre et facilite le passage de l'eau et la conduction des protons (Schnell et Chou, 2008) ; la base carboxyterminale, elle, reste intacte, ce qui limite la dissociation du tétramère.

L'Histidine 37 est indispensable à la sélectivité ionique et l'activation à faible pH (Wang et al, 1995). Pour l'état fermé de M2, la plupart des modèles orientent les 4 résidus His37 du tétramère de telle façon que leurs chaînes imidazoles sont dirigées vers la lumière, afin de fermer le pore. Les quatre histidines du pore forment l'unique groupe ionisable : au moins 2 histidines chargées sont nécessaires à la conduction des protons. L'état de protonation des quatre histidines est donc critique pour la conduction en proton et leur interaction avec la porte Trp41 (Schnell et Chou, 2008) : l'activité canal ionique s'observe à un pH acide inférieur à 6.8 ou 5.7 selon les auteurs (Wang et al, 1995 ; Schnell et Chou, 2008).

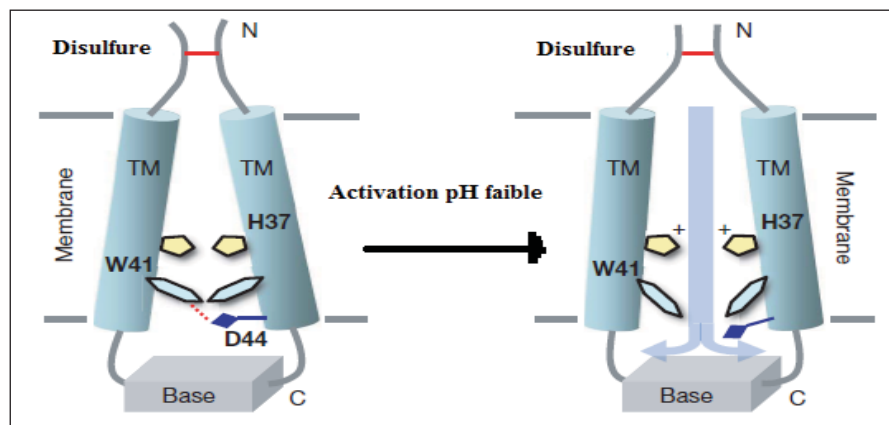


Figure n°10 : Illustration schématique de l'activation du tunnel M2 (Schnell et Chou, 2008). Pour de hautes valeurs de pH, les hélices transmembranaires (TM) sont paquetées étroitement, et la porte tryptophane (W) est fermée par des interactions intermoléculaires avec l'aspartate 44. A pH faible, la protonation des imidazoles des histidines 37 déstabilise les hélices transmembranaires, permettant l'hydratation du pore tunnel et ainsi, la conduction des protons. La base C-terminale du tétramère les ponts disulfures N-terminaux inhibent la déstructuration du tunnel. Sur le schéma, seuls 2 des 4 monomères formant TM2 sont illustrés.

Le résidu Tryptophane 41 est également important dans le maintien de l'activité canal ionique de M2 (Betakova, 2007). Il est localisé à un pas d'hélice de His37: Trp41 semble jouer un rôle de stabilisation du tétramère TM2 par des interactions hydrophobes avec la leucine et l'isoleucine d'une hélice adjacente (Betakova, 2007).

2.1.5. Domaine cytoplasmique de la protéine M2

Le domaine cytoplasmique de M2, M2c, est le plus long domaine des protéines transmembranaires de l'IAV : 54 AA pour M2, 12 pour HA, 6 pour NA. M2c joue un rôle important dans la réplication virale (Castrucci et Kawaoka, 1995). La queue cytoplasmique de M2 se lie à la protéine M1, critère important à l'assemblage du virion influenza et à la production de particules virales infectieuses (McCown et Pekosz, 2005 ; McCown et Pekosz, 2006).

2.2. Fonction de la protéine M2

Nous allons voir que l'activité de M2 contrôle sa fonction indispensable au cycle viral.

2.2.1. Activité Canal ionique

Lors de l'infection virale par l'IAV, la perméabilité membranaire de la cellule infectée est augmentée (Lopez-Vancel et al, 1984). Or, la même observation est faite lors de l'expression de M2 par des oocytes de *Xenopus laevis* (Holsinger et al, 1994 ; Pinto et al, 1992 ; Wang et al, 1993), d'*E.coli* (Guinea et Carrasco, 1994), de cellules de mammifères (Wang et al, 1994) ou de bicouches lipidiques (Tosteson et al, 1994), suggérant l'idée que M2 peut avoir une activité sur la perméabilité membranaire. L'analyse de mutants influenza résistants aux concentrations micromolaires d'amantadine a apporté la preuve directe que M2 peut fonctionner comme un tunnel ionique (Hay et al, 1985 ; Hay, 1989 ; Sugrue et Hay, 1991).

L'activité canal ionique de M2 est induite à pH faible (Pinto et al, 1992 ; Shimbo et al, 1996; Wang et al, 1995), et sensible à l'amantadine (Pinto et al, 1992 ; Shimbo et al, 1996 ; Tosteson et al, 1994 ; Wang et al, 1993)

M2 est capable de conduire des protons et d'autres cations comme le sodium chez les virus sauvages (Lamb et al, 1994 ; Pinto et al, 1992 ; Shimbo et al, 1996). Cette activité canal ionique est due à la partie transmembranaire de TM2 décrite précédemment.

2.2.2. Rôle de M2 dans le cycle viral

M2 joue également un rôle important dans la morphogénèse virale (Iwatsuki-Horimoto et al, 2006), l'assemblage et le bourgeonnement viral (McCown et Pekosz, 2005 ; McCown et Pekosz, 2006).

Quelle que soit la souche IAV, M2 intervient tôt dans le cycle viral, entre la pénétration et la fusion des membranes (Bukrinskaya et al, 1982). Pendant l'entrée virale, via l'endocytose médiée par HA, M2 est activée par le pH faible de l'endosome (Pinto et al, 1992 ; Shimbo et al, 1996 ; Wang et al, 1995) : le transport des ions H⁺ à travers la membrane virale assure l'acidification de l'intérieur viral. La dissociation de la protéine de matrice M1 des nucléoprotéines virales, et le transport de ces dernières vers le noyau sont ainsi facilités (Bukrinskaya et al, 1982 ; Helenius, 1992 ; Martin et Helenius, 1991 ; Sugrue et Hay, 1991).

Les sous-types IAV aviaires hautement pathogènes H5 ou H7 possèdent une HA à pH de fusion optimal plus haut que les autres sous-types. Pendant l'infection par ces virus, M2 assure la diminution du pH dans les saccules transgolgiennes lors du transport des protéines virales natives vers la membrane plasmique cellulaire (Ciampor et al, 1992 ; Grambas et Hay, 1992 ; Iwatsuki-Horimoto et al, 2006 ; Steinhauer et al, 1991). Cette dernière activité, stimulée par le pH acide des vésicules de transport (Pinto et al, 1992 ; Shimbo et al, 1996 ; Wang et al, 1995), assure la prévention du réarrangement conformationnel de HA nouvellement synthétisée pendant le transport vers la surface cellulaire, en équilibrant le pH des saccules du réseau transgolgien avec celui du cytoplasme (Ciampor et al, 1992 ; Grambas et Hay, 1992 ; Sugrue et al, 1990a ; Sugrue et Hay, 1991 ; Takeuchi et Lamb, 1994).

La portion cytoplasmique M2c joue un rôle dans la production de virions infectieux en facilitant l'assemblage efficace des segments génomiques dans les virions influenza (McCown et Pekosz, 2006) et en se liant à la protéine M1, limitant le retour des RNP nouvellement synthétisées dans le noyau (McCown et Pekosz, 2005 ; McCown et Pekosz, 2006). Plus précisément, ce sont les résidus 74 et 79 de M2c qui joueraient ce rôle dans la morphogénèse virale, et affecteraient ainsi le pouvoir infectieux du virus (Iwatsuki-Horimoto et al, 2006 ; McCown et Pekosz, 2005 ; McCown et Pekosz, 2006).

2.3. Sensibilité médicamenteuse

L'amantadine et la rimantadine ont montré leur efficacité dans la prophylaxie et le traitement des infections à IAV (Dolin et al, 1982 ; Oxford et Galbraith, 1980). Bien que l'autorisation de mise sur le marché ait été obtenue depuis 1966, l'utilisation de l'amantadine reste limitée ; la rimantadine, considérée comme plus efficace avec moins d'effets secondaires, est plus utilisée.

L'amantadine et la rimantadine interagissent avec M2, leur cible primaire (Hay et al, 1985 ; Pinto et al, 1992; Wang et al, 1993), bien que HA influence également la susceptibilité de la souche à la molécule (Hay et al, 1985).

Sur les cultures cellulaires, l'amantadine montre deux actions inhibitrices de la multiplication virale, dépendantes de la concentration :

_Pour des concentrations supérieures à 0,1mM, l'action est non spécifique par inhibition indirecte de l'activation acide de l'activité de fusion de HA, mise en jeu dans l'endocytose (Daniels et al, 1985). Cette action, qui résulte de l'élévation du pH dans l'endosome, n'est pas particulière de l'amantadine, mais est effectuée par d'autres amines (Hay et Zambon, 1984 ; Daniels et al 1985). Les virus influenza mutants résistants à ces concentrations ont une HA fusionnant à pH plus élevé (Daniels et al, 1985 ; Steinhauer et al, 1991). Cette action reflète le spectre clinique de l'activité antivirale, puisque l'inhibition touche la réplication de tous les virus influenza, dont les souches B, mais également celle de virus enveloppés à ARN comme les paramyxovirus, les togavirus, et les rétrovirus.

_Pour des concentrations thérapeutiques inférieures à 0.1-5 μ M, la molécule a une activité inhibitrice souche-spécifique, en inhibant deux étapes du cycle viral: l'acidification de l'intérieur viral (Burkrinskaya et al, 1982 ; Martin et Helenius, 1991) ou de l'assemblage viral en équilibrant le pH intravésiculaire transgolgien avec celui du cytoplasme (Steinhauer et al, 1991 ; Sugrue et al, 1990a). Les mutants résistants à ces concentrations thérapeutiques présentent un peptide TM2 modifié (Hay et al, 1985 ; Pinto et al, 1992). Par exemple, deux souches aviaires étroitement liées, les virus faiblement pathogènes Rostock (A/poulet/Allemagne/34 (H7N1)) et Weybridge (A/poulet/Allemagne/27 (H7N7)), présentent des sensibilités différentes à l'amantadine : M2 de la souche Rostock augmente plus fortement le pH intracellulaire que M2 de la souche Weybridge (Grambas et Hay, 1992 ; Hay et al, 1985).

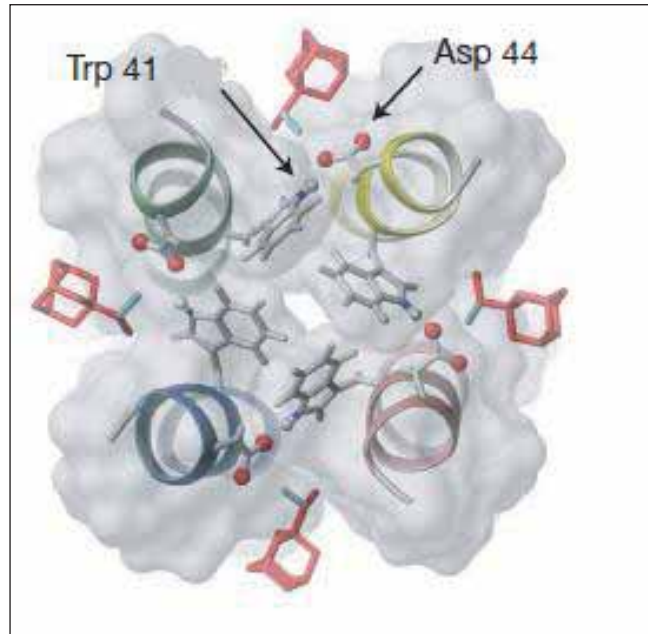


Figure n°11 : Le peptide TM2, un canal à proton à porte tryptophane (D'après Schnell et Chou, 2008), sensible à la rimantadine. Vue du dessus du côté C-terminal du canal TM2 de la protéine M2 montrant la porte Trp41 d'une hélice transmembranaire liée à l'Asp44 d'une hélice adjacente. Cette vue est celle de l'état fermé du tunnel, les molécules rouges à l'extérieur du tunnel étant des molécules de rimantadine.

La liaison de la rimantadine sur 4 sites près de la porte du canal, du côté lipidique du tunnel, stabilise la conformation fermée du canal (Schnell et Chou, 2008), inhibant l'activité canal ionique de M2 nécessaire au cycle viral (cf. figure n°11). Les mutations conduisant à la résistance aux médicaments, sont restreintes à 4 AA hydrophobes en position 21, 27, 30 et 34 (Hay et al, 1985).

3. Chapitre 3 : Lutte contre le virus influenza A : immunité, antiviraux, vaccination

Après l'émergence des symptômes grippaux 7 jours en moyenne après l'infection, une immunité acquise s'installe sans pouvoir prévenir les symptômes respiratoires (Murphy et Webster, 1996 ; Tamura et al, 2005). Une immunité efficace doit donc être induite préalablement, naturellement ou par le biais de la vaccination, afin de prévenir la maladie (Murphy et Webster, 1996 ; Tamura et al, 2005). En cas d'infection, ou en moyen prophylactique en l'absence de vaccination efficace, les antiviraux peuvent également être utilisés.

3.1. Les mécanismes de l'Immunité antigrippale

La réponse immunitaire se divise en 3 phases différentes, parfois interactives : une réponse innée immédiate et non inductible, une réponse inductible précoce non spécifique de l'antigène, une réponse inductible tardive spécifique de l'antigène à l'origine de la mémoire immunologique, dépendante des lymphocytes T.

Les macrophages et les cellules Natural killer (NK) sont la base des réponses innée et inductible précoce. L'induction de ces cellules se fait par les interférons (IFN), et sont à l'origine d'une réponse antivirale précoce.

La réponse tardive spécifique est importante pour le contrôle et la guérison des infections virales. Elle met en jeu les lymphocytes B (LB), T auxiliaires ou helpers (LTh) et T cytotoxiques (LTc). Ces cellules sont activées, puis subissent une multiplication clonale pour finalement se différencier en lymphocytes T CD4⁺ qui sécrètent diverses cytokines, en lymphocytes T CD8⁺ lysant les cellules infectées, et en LB sécrétant des anticorps spécifiques d'antigènes, ces derniers ayant une action indépendante à celle de leur cellule mère.

3.1.1. Réponse innée non spécifique

Les muqueuses respiratoires ne sont pas seulement le site d'infection du virus grippal : elles sont aussi le site primaire de défense contre l'infection virale. Les mécanismes de défense non spécifiques comprennent des effecteurs cellulaires et moléculaires, non spécifiques d'antigènes, sans longue période d'induction. Divers composants tels que le mucus, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les IFN α , β et d'autres cytokines, des composants du complément (C3 et C5) assurent la détection et la destruction précoce des particules virales infectieuses (Tamura et Kurata, 2004).

- ***Mucus***

Il ralentit mécaniquement la progression du virus vers les cellules ; il contient des facteurs inhibant la capacité du virus à infecter les cellules-hôtes (Yoshikawa et al, 2004)

- ***Cellules inflammatoires***

Les leucocytes polynucléaires sont les premières cellules pénétrant dans la lésion primaire lors de primo-infection, suivis, un jour plus tard environ, des macrophages. Les macrophages sont les médiateurs de la lyse des cellules infectées, probablement par phagocytose dépendante de l'apoptose (Mak et al, 1982 ; Fujimoto et al, 2000). Après le développement de la réponse immunitaire, les LT CD4⁺ spécifiques migrent vers la lésion, puis sécrètent des substances chémoattractives et activatrices, qui favorisent l'arrivée de nouvelles cellules inflammatoires.

- ***Interférons***

Les IFN sont des molécules capables de rendre les cellules résistantes aux infections virales (Müller et al, 1994). Avec ce rôle de protection contre les agents pathogènes, les antigènes et les tumeurs, les IFN régulent également les réponses inflammatoires et immunitaires. Ils induisent l'expression des glycoprotéines des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH), CMH-I et CMH-II, qui améliorent la présentation des antigènes viraux aux LT (Müller et al, 1994). Les niveaux en IFN- α , IFN- β nasaux et pulmonaires augmentent rapidement après l'infection et sont corrélés directement au degré de réplication virale chez le furet, la souris et l'homme (Husseini et al, 1982 ; Murphy et Webster, 1996).

Les macrophages produisent des interleukines (IL) IL-1, IL-6, et TNF- α (facteur de nécrose tumorale). Ces cytokines induisent une fièvre : l'amplitude de la réponse fébrile est fortement corrélée au degré d'excrétion virale (Husseini et al, 1982 ; Murphy et Webster, 1996). L'infection virale à H3N2 induit chez le furet une régulation forte et rapide en IFN- α , IFN- γ , et TNF- α , alors que des souches plus virulentes induisent des niveaux significativement plus petits en IFN- α pendant les deux premiers jours post-infection (Svitek et al, 2008). Pendant les quatre premiers jours après l'infection, seule IL-8 était détectée dans les échantillons de furets inoculés avec A/Aichi/2/68, tandis que l'expression en IL-6 était associée aux virus les plus virulents (Svitek et al, 2008).

- ***Cellules Natural Killer***

Les macrophages sécrètent des cytokines comme IL-1, IL-6, TNF- α , et IL-12 qui activent les cellules NK (Monteiro et al, 1998). Les cellules NK ont une activité de cytolysse non spécifique. Ces cellules sont des lymphocytes granuleux de grande taille, provoquant la lyse des cellules infectées par le virus, indépendamment de l'intervention d'anticorps spécifiques. Les cellules NK pulmonaires détectées 48 heures après l'infection produisent des IFN- γ , et limitent la diffusion virale par lyse cellulaire probablement médiée par la formation d'un pore dans les cellules infectées, phénomène médié par la perforine (Husseini et al, 1982).

- ***Complément***

L'activation du complément est une cascade d'événements aboutissant à la destruction de l'agent pathogène ou à son inactivation, par la fixation de protéines à la surface de l'agent infectieux. L'entrée de ce dernier dans la cellule cible est ainsi inhibée, ou alors l'opsonisation (amélioration de la présentation antigénique) et la phagocytose de cet agent sont favorisées. Le complément est donc médiateur de la protection : la mortalité augmente chez les souris déficientes en C5 infectées par une dose létale d'IAV (Kopf et al, 2002).

Cependant, si les virus évitent ces mécanismes précoces de défense, ils sont détectés et éliminés par les mécanismes immuns adaptés (cf. infra), qui peuvent être accrus par les constituants viraux eux-mêmes en se liant aux récepteurs Toll-like (TLR) présents sur les macrophages et les cellules dendritiques du tractus respiratoire (Akira et al, 2001).

3.1.2. Réponse spécifique

Comme tous les virus, l'IAV est un parasite intracellulaire obligatoire : les mécanismes immunitaires spécifiques de l'IAV dépendent de cette caractéristique.

3.1.2.1. Réponse acquise cellulaire

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est une défense tardive, dont les LT CD4⁺ et CD8⁺ sont les intervenants. Les LT reconnaissent spécifiquement les antigènes étrangers présentés par les cellules infectées dans le contexte du CMH. Leurs effets antiviraux sont liés aux lymphokines produites par les LT CD4⁺ et aux effets lytiques cellulaires directs des LT CD8⁺ : l'élimination des virions en formation est ainsi favorisée.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont essentielles dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative (Akira et al, 2001) : les antigènes viraux exogènes, qui comprennent les particules virales inactives, les virus intacts et les cellules infectées apoptotiques, sont pris en charge par les CPA à travers l'endocytose, et sont une source potentielle de peptides qui pourront se lier aux molécules du CMH-I ou CMH-II (Albert et al, 1998 ; Tulp et al, 1994). Les macrophages activés par le virus influenza peuvent agir comme CPA. Les CPA produisent l'IL-1 β , l'une des plus importantes cytokines liant systèmes immunitaires inné et acquis (Matsuo et al, 2000).

Le cycle viral assure la transcription du génome viral en protéines constitutives et fonctionnelles du futur virion en synthèse : des peptides sont générés de ces antigènes endogènes synthétisés dans les cellules infectées par leur dégradation cytoplasmique (Wraith et al, 1987 ; Yewdell et al, 1985). Ces peptides sont ensuite chargés sur des molécules du CMH-I, puis exprimés à la surface des cellules (Wraith et al, 1987 ; Yewdell et al, 1985). Ces complexes peptides/CMH-I présentés à la surface cellulaire sont reconnus par des lymphocytes T CMH-I CD8+, précurseurs des lymphocytes T cytotoxiques, qui détruisent les cellules infectées par l'exocytose de granules contenant granzymes et perforines (Topham et al, 1997 ; Wraith et al, 1987 ; Yewdell et al, 1985). Parmi ces antigènes endogènes, les protéines virales internes sont les cibles principales : NP est le plus fort de ces antigènes (Yewdell et al, 1985). Comme la structure de ces antigènes endogènes est conservée parmi un type viral, les lymphocytes T cytotoxiques présentent une réaction croisée pour ce même type viral (Wraith et al, 1987 ; Yewdell et al, 1985).

HA et NA sont des antigènes majeurs présents à la surface du virus, qui sont endocytés puis dégradés par les CPA: les peptides obtenus sont chargés sur des molécules du CMH-II, puis exprimées à la surface de ces CPA (Tulp et al, 1994 ; Wraith et al, 1987). Les complexes peptides/CMH-II sont reconnus par les lymphocytes T CMH-II CD4+, ou lymphocytes T auxiliaires, précurseurs des cellules de type Th1 ou Th2. Les CPA sécrètent des IL-12, qui contribuent au développement de LTh type Th1. Les cellules Th1 sécrètent IFN- γ et IL-2, et favorisent la production d'anticorps IgG2a par les cellules productrices d'anticorps chez la souris, alors que les cellules Th2 sécrètent IL-4 et IL-5, favorisant la production des anticorps IgA, IgG1 et IgE. Les cellules Th1 peuvent également amplifier la production de LTc CD8+ par la sécrétion d'IL-2 (Riberdly et al, 2000).

En l'absence d'anticorps chez les animaux pré-immunisés, les LTc sont produits rapidement par les LTc mémoires CD8+, et ces LTc sont impliqués dans la mort des cellules

hôtes en 3 jours après l'infection (Murphy et Clements, 1989). Les cellules Th1 sont les médiateurs d'une hypersensibilité de type retardée par la sécrétion d'IFN- γ , inhibant la réplication virale (Tamura et al, 1996).

Les cellules T helpers participent à la diminution de l'infection à la faveur d'une réponse anticorps (Mozdzanowska et al, 1997) et d'une réponse en lymphocytes T cytotoxiques (Riberdy et al, 2000). Les lymphocytes T cytotoxiques ont été proposés comme des médiateurs majeurs de l'immunité hétérosubtypiques et plusieurs études ont montré que ces cellules contribuaient à la protection chez la souris (Epstein et al, 2000 ; Ulmer et al, 1998). Ces cellules auraient le même rôle dans la protection hétérosubtypique chez le porc (Heinen et al, 2001). Après infection virale, les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent particulièrement des épitopes conservés de la protéine NP (Doherty et Christensen, 2000).

3.1.2.2. Réponse acquise humorale

- ***Dépendance antigénique***

En reconnaissant ces antigènes, les LTh, stimulés, favorisent la production des anticorps spécifiques de HA et NA par les lymphocytes B (Tulp et al, 1994). Les anticorps anti-HA neutralisent le potentiel infectieux du virus, alors que les anticorps anti-NA inhibent le relargage des virions de la surface des cellules infectées (Johansson et al, 1989). Les anticorps anti-HA et anti-NA spécifiques de souche ou spécifiques de sous-type sont des protecteurs majeurs contre l'infection virale (Tulp et al, 1994).

La protéine M2 étant conservée parmi les virus de type A, les anticorps anti-M2 assurent une protection croisée contre les différents sous-types, bien que leur niveau de production est faible (Black et al, 1993). Les anticorps contre NP et M1, deux protéines conservées, peuvent être induits, bien qu'ils échouent à contribuer à la protection (Murphy et Clements, 1989).

- ***Immunoglobulines mises jeu dans la lutte contre l'IAV***

Les immunoglobulines (Ig) A sécrétoires (S-IgA), les IgG et les LTc CD8⁺ sont mis en jeu dans la clairance du virus après primo-infection chez des souris immunitairement naïves (Tamura et al, 1998 ; Wiley et al, 2001). La présence de ces anticorps chez des animaux déjà immunisés procure une protection contre épreuve virale (Yoshikawa et al, 2004).

Les S-IgA sont portées vers le mucus par transport transépithélial utilisé pour les IgA dimériques (Ito et al, 2003). Les IgG, qui sont largement distribuées au niveau des épithéliums alvéolaires pour prévenir des pneumonies grippales, transsudent du sérum vers le mucus par diffusion (Ito et al, 2003 ; Palladino et al, 1995). En l'absence d'anticorps chez les animaux non immunisés, la production de S-IgA et IgG est accélérée et amplifiée par les cellules mémoires B après réinfection, et ces anticorps jouent alors un rôle dans l'élimination viral dans les 3 jours post-infection (Ito et al, 2003 ; Palladino et al, 1995). Dans les cellules épithéliales d'animaux infectés, les IgA dimériques sont transitées à travers les cellules et mises en jeu dans la prévention de l'assemblage viral, en se liant aux jeunes glycoprotéines formées (Ito et al, 2003) : initialement, le complexe IgA/récepteur polymérique à immunoglobuline est délivré aux endosomes précoces situés à la base de la cellule, puis délivré plus tard aux endosomes de recyclage à l'apex cellulaire, par lesquels, les glycoprotéines virales synthétisées par le réticulum endoplasmique granuleux (REG), sont transportées vers la surface apicale cellulaire. Les endosomes de recyclage apicaux sont donc une localisation potentielle des IgA pour intercepter les protéines virales (Ito et al, 2003).

3.1.2.3. Mécanismes immunitaires de la protection croisée

Les souris guéries du virus influenza A montrent qu'elles possèdent une protection croisée contre épreuve soit avec différents virus d'un même sous-type (immunité subtypique spécifique) soit avec différents sous-types de virus (immunité hétérosubtypique) (Tamura et al, 2005).

La présence d'anticorps préexistants S-IgA et IgG induits par l'infection est mise en jeu dans l'élimination des virus d'épreuve en formant des complexes immuns peu après une nouvelle infection. Par leur nature polymérique, les anticorps S-IgA, plus abondants que les IgG dans les muqueuses, montrent une forte réaction croisée avec les virus d'épreuve, alors que les IgG le sont plus faiblement, par leur nature monomérique. La spécificité des anticorps est principalement dirigée contre HA et NA (Tamura et al, 2005).

Les lymphocytes T mémoires CD8⁺ induits par l'infection sont mis en jeu dans l'élimination du virus d'épreuve en favorisant la mort des cellules hôtes infectées par différents sous-types viraux dès 3 jours après une nouvelle infection. La spécificité de ces cellules est dirigée contre les protéines virales internes (Tamura et al, 2005).

Les réponses accélérées en IgA et IgG, produits par les cellules mémoires B après épreuve, sont aussi mises en jeu dans les protections croisées environ 4 jours après réinfection (Tamura et al, 2005).

Dans les cellules épithéliales des souris infectées, les IgA dimériques qui circulent à travers l'épithélium peuvent contribuer à la prévention de l'assemblage viral en se liant aux protéines virales nouvellement synthétisées (Tamura et al, 2005).

L'infection naturelle est connue pour être bien supérieure aux vaccins inactivés parentéraux dans l'induction d'une protection croisée (Tamura et al, 2005).

3.1.2.4. Conclusion de la réponse immunitaire spécifique antigrippale

Les anticorps anti-HA sont principalement responsables de la prévention de l'infection virale, alors que les anticorps anti-NA et les LTC spécifiques des protéines du core viral réduisent la diffusion du virus et favorise la récupération clinique (Johansson et al, 1989 ; Tulp et al, 1994 ; Wraith et al, 1987 ; Yewdell et al, 1985).

3.2. Immunité induite par M2 : les mécanismes

Le mécanisme immunitaire induit par M2 est mal connu : il a été principalement étudié par des vaccinations expérimentales en laboratoire.

Probablement à cause de sa petite taille et de sa situation à proximité de nombreuses glycoprotéines et glycolipides de grande taille, M2 est difficilement visible du système immunitaire (Black et al, 1993). Une étude montre pourtant le caractère hautement immunogène du peptide M2e libre (mais en présence de l'adjuvant incomplet de Freund ou d'aluminium) chez la souris (Wu et al, 2007). Les titres en anticorps anti-M2e sont faibles voire nuls sur les sérums humains, leur induction étant irrégulière et transitoire lors d'une infection (Black et al, 1993 ; Liu et al, 2003), et très faible par les vaccins courants (Zhang et al, 2006).

3.2.1. Les effecteurs de la Réponse humorale anti-M2

De faibles titres d'anticorps anti-M2 ont été détectés sur sérum d'hommes et furets infectés naturellement par H3N2 (Black et al, 1993).

Un anticorps monoclonal IgG1 appelé « 14C2 » peut réprimer la réplication virale sur culture cellulaire, sans prévenir l'infection par le virus ; son épitope est localisé sur la partie N-terminale de M2 (Hughey et al, 1995 ; Zebedee et Lamb, 1988). Tous les anticorps anti-M2e ne montrent pas cette activité (Hughey et al, 1995), et toutes les souches virales n'y sont pas sensibles (Zebedee et Lamb, 1988). *In vivo* (cf. figure n°12), les anticorps 14C2 passifs diminuent la croissance virale et accélèrent la clairance virale pulmonaire après épreuve sublétales chez la souris (Treanor et al, 1990), y compris contre le virus PR8 (Mozdzanowska et al, 1999) qui n'est pourtant pas sensible à la diminution médiée par anticorps *in vitro* (Mozdzanowska et al, 1999 ; Zebedee et Lamb, 1988). L'inhibition médiée par anticorps anti-M2 apparaît donc à travers des mécanismes distincts *in vitro* et *in vivo* (Mozdzanowska et al, 2003). D'autres anticorps anti-M2 sont spécifiques de la partie C-terminale de M2 (Slepishkin et al, 1995 ; Zebedee et Lamb, 1988).

Différents protocoles d'immunisation ont permis de mettre en évidence 7 anticorps monoclonaux M2e isolés de 3 souris Balb/c : leurs épitopes sont tous situés sur les 13 mêmes AA du peptide M2e, dans l'intervalle 4-16 de la séquence aminoacide (Zhang et al, 2006). Ils proviennent de 4 différents précurseurs de cellules LB (Zhang et al, 2006) : l'usage du gène V serait donc très restreint. Les chaînes lourdes de ces anticorps proviennent des mêmes gènes Vh, D, Jh ; les chaînes légères ne mettraient en jeu que deux gènes différents V-kappa (Zhang et al, 2006). Cette restriction génétique pourrait expliquer la faible réponse en anticorps anti-M2e après infection (Zhang et al, 2006).

Les anticorps anti-M2e dont les épitopes sont localisés sur les parties N-terminales (2-12) et moyenne (8-18) du peptide M2e montrent que l'épitope EVETPIRN (6-13) de M2e pourrait être responsable de l'induction d'une immunité protectrice contre PR8 chez la souris (Liu et al, 2004a). Ce peptide induit de hauts titres en anticorps monoclonaux anti-M2e « 8C6 » chez la souris et apporte une protection active ou passive significative supérieure à 40% contre PR8, statuant le caractère immunogène et protecteur de l'épitope EVETPIRN de M2e (Zou et al, 2005 ; Liu et al, 2003 ; Liu et al, 2004a).

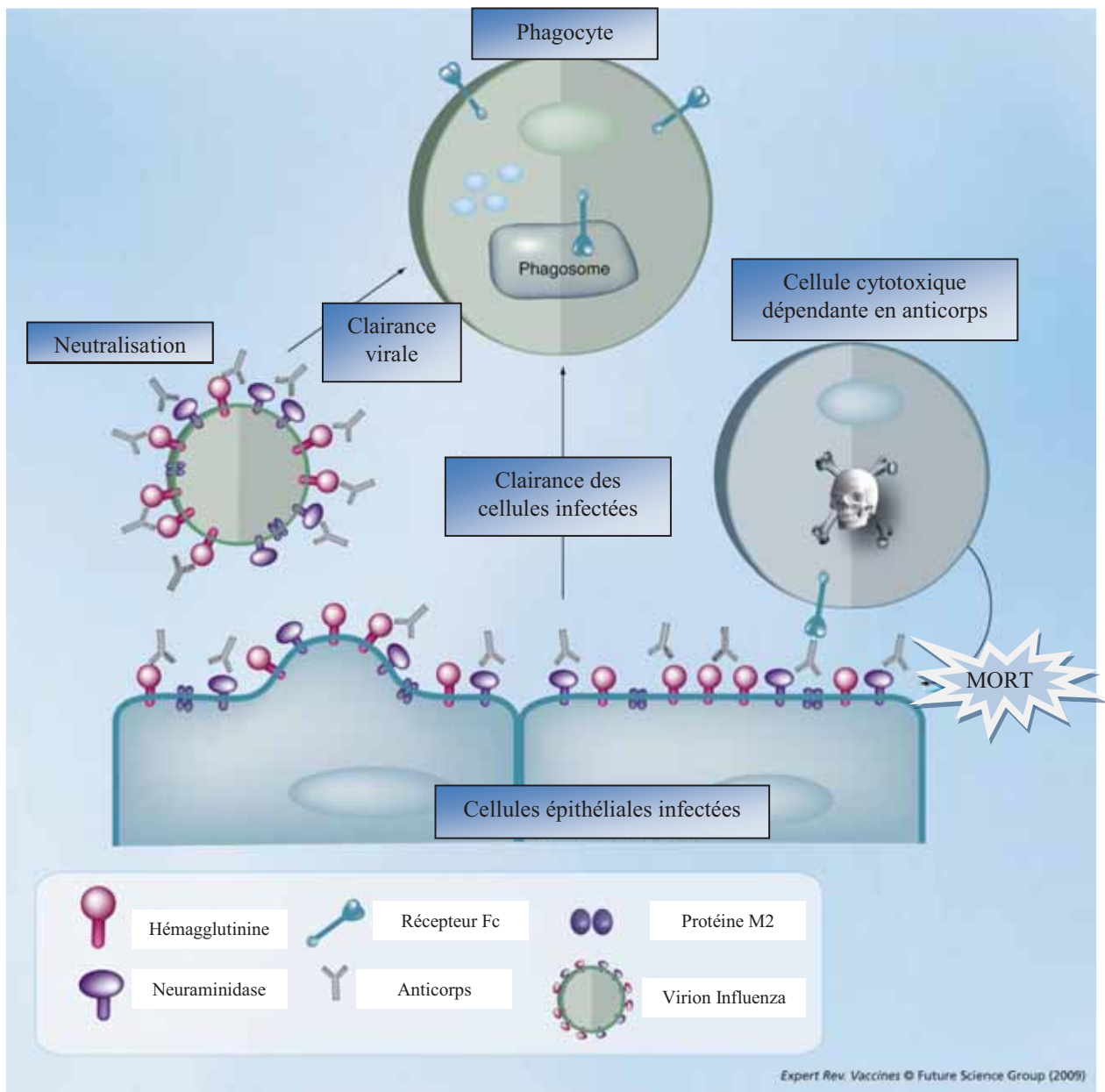


Figure n°12: Mécanismes immuns *in vivo* de l'action des anticorps anti-M2e et anti-HA proposés par Schotsaert et al (2009). Les cellules épithéliales infectées par le virus expriment HA, NA, et M2 à la surface membranaire. Les anticorps anti-M2e peuvent se lier à la protéine M2 présente sur ces cellules, et le complexe immun résultant peut être reconnu par les récepteurs Fc portés par les cellules effectrices de l'immunité, telles que les cellules natural killer. Ce processus mène à la mort des cellules infectées par cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (à droite sur le schéma). De manière alternative, les cellules infectées opsonisées anti-M2e peuvent être phagocytées par une voie dépendante en récepteur Fc. Le mode d'action des anticorps anti-HA se fait par neutralisation directe des virions (à gauche). De plus, les anticorps anti-HA peuvent promouvoir la prise en charge des virions par la phagocytose après liaison avec HA à la surface des cellules infectées.

Chez le porc, la réponse en anticorps anti-M2e, faible après une primo-infection à H3N2, est accrue par une infection secondaire par H1N1 (Heinen et al, 2001) : ces anticorps

ont donc un rôle dans l'immunité hétérosubtypique liée à la protéine M2 (Heinen et al, 2001). La réponse en anticorps anti-M2 n'est pas bien caractérisée chez le porc (Kitikoon et al, 2008). Si le titre en anticorps anti-M2e est directement corrélé à la dose de virus utilisé expérimentalement sur des porcs, il dépend également du sous-type viral utilisé (Kitikoon et al, 2008). Sur ces porcs, les anticorps anti-M2e sont en quantité plus faible que les anticorps anti-HA ou anti-M1 (Kitikoon et al, 2008). Les porcs avec des anticorps d'origine maternelle, non infectés, possèdent, de façon inconstante, des anticorps anti-M2e (Kitikoon et al, 2008).

3.2.2. Les effecteurs de la Réponse cellulaire anti-M2

- ***Effecteurs cellulaires***

La réponse cellulaire T à M2 a été décrite par Slepushkin et coll. (1995). L'immunisation à ADN exprimant la protéine M2 complète peut induire, avec l'aide des anticorps, une réponse cellulaire T spécifique de M2 sans être induite par des peptides porteurs (Tompkins et al, 2007 ; Jegerlehner et al, 2004). Les LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de M2 pourraient avoir un rôle majeur dans l'immunité protectrice contre un virus PR8 (Tompkins et al, 2007). L'immunité cellulaire spécifique de M2e est décrite comme être dépendante des cellules NK (Jegerlehner et al, 2004). Sur des souris vaccinées primaires par un ADN exprimant la protéine M2 consensus suivie d'un vaccin à adénovirus recombinant exprimant cette même protéine, puis secondairement inhibées en cellules T CD4⁺ ou CD8⁺, la protection contre épreuve PR8 est totale, alors qu'elle est très faible lors de déplétion partielle commune en cellules CD4⁺ et CD8⁺ : les cellules T sont donc importantes dans ces conditions (Tompkins et al, 2007). De plus, des épitopes M2e sont identifiés sur les cellules T helpers sécrétant IFN- γ et IL-4 (Wu et al, 2007).

- ***Cytotoxicité dépendante en anticorps***

Si les anticorps anti-M2e ne sont pas neutralisants, ils se lient au peptide M2e exprimée à la surface des cellules hôtes infectées (cf. figure n°12) : d'une part, ils inhibent ainsi la réplication virale en interférant avec l'excrétion des virions (Zebedee et Lamb, 1989), et, d'autre part, ils assurent la médiation de la cytotoxicité dépendante d'anticorps exprimée par le complément et les cellules de l'immunité innée sur les cellules épithéliales pulmonaires (Mozdzanowska et al, 1999). Les anticorps fixés avant ou pendant l'excrétion virale peuvent limiter l'infection des cellules par les virions et favoriser la phagocytose des cellules via les récepteurs Fc (Heinen et al, 2002). L'immunité protectrice induite contre M2e, principalement cellulaire, peut être transférée passivement : elle serait ainsi médiée par des

anticorps anti-M2e polyclonaux (Fan et al, 2004 ; Neiryck et al, 1999). En effet, la protection liée à la cytotoxicité de cellules dépendantes d'anticorps (CCDA) ne requiert pas de contact cellule à cellule : les anticorps anti-M2e lient leur domaine Fab à M2e, alors que leur queue Fc interagit avec les cellules immunitaires (Fiers et al, 2009) ; les anticorps réduisent ainsi la distance entre la cellule-cible et la cellule effectrice de l'immunité.

3.2.3. Effet protecteur de l'immunité anti-M2e

Les effets protecteurs liés à l'immunité anti-M2e décrite précédemment ont été mis en évidence à travers différents protocoles vaccinaux.

Dans certains rapports, les anticorps spécifiques de M2e sont présentés comme ayant un rôle important dans la protection antigrippale. Les particules M2-HBc protègent les souris contre épreuve en induisant des anticorps anti-M2e, et l'administration passive de ces anticorps pourraient donner une protection suffisante (Neiryck et al, 1999). L'étude de Jegerlehner et al indique que la protection induite par M2e-HBc est médiée par une cytotoxicité cellulaire dépendante en anticorps, médiée par les cellules Natural killer (Jegerlehner et al, 2004). Fan et al rapportent que l'administration passive de sérums de singes anti-M2e pouvait protéger des souris contre épreuve (Fan et al, 2004). Une étude montre également que des anticorps de lapins, induits par des peptides conjugués M2e, pouvaient également inhiber la réplication virale *in vitro* (Liu et al, 2003). Les anticorps anti-M2 sont également capables d'inhiber la réplication virale sur cellules MDCK (Liu et al, 2003), et que les anticorps anti-M2e diminuent le titre viral dans les poumons de souris (Frace et al, 1999). Le transfert passif d'anticorps anti-M2e (où M2e est lié à la protéine de core du virus de l'hépatite B) confère 90 à 100% de protection contre épreuve chez la souris (Neiryck et al, 1999). Les IgG anti-M2 protègent la souris contre épreuve mortelle (Wu et al, 2007).

A l'opposé, la vaccination par un ADN plasmide contenant les gènes M protégeaient les souris en activant les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ au lieu d'anticorps protecteurs (Okuda et al, 2001). La vaccination avec la protéine M2 exprimée par un baculovirus recombinant peut aussi conférer une protection malgré l'absence d'anticorps protecteurs (Slepishkin et al, 1995). L'immunité protectrice provoquée par ces différents vaccins anti-M2e pouvait être influencée par les porteurs protéiques, les adjuvants ou les voies d'administration (De Filette et al, 2005).

Des études sur des souches de souris knock-out indiquent que le mécanisme majeur de protection induite par M2 est la cytotoxicité de cellules dépendantes d'anticorps (Fiers et al, 2009). La protection contre M2e est médiée exclusivement par les anticorps (Jegerlehner et al, 2004). Cependant, ces anticorps ne se lient pas efficacement au virus libre, et ne sont pas neutralisants (Jegerlehner et al, 2004). Ils se lient à la protéine M2 exprimée à la surface des cellules infectées (Jegerlehner et al, 2004). La présence des cellules NK est importante pour la protection, alors que celle du complément ne l'est pas : la protection serait donc médiée via une cytotoxicité dépendante en anticorps médiée par cellule (Jegerlehner et al, 2004). Les anticorps anti-M2e n'étant pas neutralisants, ils ne peuvent prévenir l'infection, mais réduisent la maladie à des doses faibles d'épreuve virale alors qu'ils échouent à des doses plus hautes (Jegerlehner et al, 2004).

Les anticorps sériques anti-M2e ont un rôle important dans l'inhibition de la réplication virale dans la trachée et les poumons de souris, alors que les cellules spécifiques M2e et les anticorps locaux assurent plutôt la protection des voies respiratoires supérieures (Mozdzanowska et al, 2007).

3.2.4. La protéine M2 & le peptide M2e, cibles vaccinales

La protéine paraît être une bonne cible vaccinale car la séquence M2e humaine a subi peu de variation depuis 1918 sur les souches isolées, et peu de variations entre les différentes souches aviaires, porcines et humaines sont observées sur le peptide M2e (Liu et al, 2005 ; Zharikova et al, 2005). De plus, les anticorps M2e passifs (Mozdzanowska et al, 1999 ; Neiryneck et al, 1999 ; Treanor et al, 1990) et induits activement (Fan et al, 2004 ; Frace et al, 1999 ; Jegerlehner et al, 2004 ; Mozdzanowska et al, 2003 ; Neiryneck et al, 1999) permettent de diminuer la morbidité sur les animaux modèles, souris et furet. Un vaccin à base de M2e pourrait donc accroître la résistance immunitaire contre un large spectre de virus influenza A. Les études des vaccins basés sur M2 avec épreuve ont pour la plupart lieu sur des modèles animaux non hôtes naturels de l'IAV (Kitikoon et al, 2010), comme la souris. Des études dans lesquelles des souris et des furets ont été vaccinés avec un virus recombinant de la vaccine exprimant M2 n'ont montré aucune preuve de protection (Epstein et al, 1993 ; Jakeman et al, 1989), même si l'induction d'une réponse anti-M2 n'a pas été vérifiée.

3.2.4.1. Vaccinations expérimentales avec la protéine de matrice

Neyrinck et coll. ont généré un vaccin antigrippal en fusionnant la protéine M2 d'un virus Influenza A à la protéine du core du virus de l'hépatite B (HBc) (Neyrinck et al, 1999). L'administration intra-péritonéale ou intranasale chez la souris de ce vaccin assure une protection significative de haut niveau après épreuve virale (Neyrinck et al, 1999) en diminuant la croissance virale et la mortalité.

L'efficacité vaccinale d'un baculovirus recombinant exprimant la protéine intacte M2 du virus Influenza A/Ann Arbor/6/60 a été étudiée sur des souris après épreuve (Slepushkin et al, 1995). Si la vaccination est efficace contre épreuve létale avec le même virus influenza A, celle-ci s'avère inefficace contre un virus de type B, suggérant que la protection induite par cette construction est bien liée à la protéine M2 (Slepushkin et al, 1995). Cette vaccination permet d'inhiber l'excrétion virale et d'accroître la clairance pulmonaire en virus (Slepushkin et al, 95). La protection est également hétérosubtypique (Slepushkin et al, 1995).

Deux études ont montré l'efficacité protectrice conférée par des plasmides exprimant les gènes des protéines de matrice du virus influenza A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1) (Okuda et al, 2001 ; Watabe et al, 2001). Administrées par voie topique (Watabe et al, 2001), intramusculaire ou intranasale (Okuda et al, 2001), ces constructions vaccinales permettent d'établir une immunité humorale et cellulaire, à l'origine d'une résistance des souris à l'épreuve virale (homologue et hétérologue) de 70 à 80% des individus vaccinés (Okuda et al, 2001 ; Watabe et al, 2001).

Frace et coll. utilisent une protéine M2 recombinante (provenant du virus A/Aichi/2/68 H3N2) dépourvue de certains résidus de son domaine transmembranaire pour augmenter l'hydrophilie de la protéine (Frace et al, 1999). La fusion de M2 recombinant à la protéine glutathion-S-transférase, utilisée comme vaccin chez la souris, induit un haut taux d'anticorps anti-M2 et une clairance virale accrue, contre virus homologue (A/Hong-Kong/1/68 H3N2) et hétérologue (A/Ann Arbor/6/60 H2N2 et A/Taiwan/1/86 H1N1) (Frace et al, 1999). Des résultats similaires sont obtenus en utilisant la protéine M2 recombinante seule (Frace et al, 1999).

Kitikoon et coll. proposent un vaccin, chez le porc, basé sur la protéine M2 exprimée par un baculovirus recombinant, associé ou non à un virus influenza porcine A/swine/IA/15/1930 (H1N1) inactivé, contre épreuve homologue et hétérologue (virus influenza A/Swine/MN/00194/2003 (H1N2)) sur des porcs (Kitikoon et al, 2010). La

combinaison M2-H1N1 permet de diminuer la fièvre lors de l'épreuve hétérologue, mais n'inhibe pas l'excrétion virale (Kitikoon et al, 2010). La vaccination M2 seule permet de diminuer les signes respiratoires et les lésions pulmonaires par rapport au groupe témoin (Kitikoon et al, 2010).

Dans ces études (vaccin avec M2 conjugués à des peptides porteurs : Fan et al, 2004 ; baculovirus exprimant M2 : Slepukhin et al, 1995 ; protéines de fusion : Frace et al, 1999 & Neiryneck et al, 1999 ; peptide à antigène multiple : Mozdzanowska et al, 2003 ; construction ADN avec gène M exprimant M2 : Okuda et al, 2001 & Watabe et al, 2001), les souris étaient protégées contre épreuve avec des virus homologues ou hétérologues où même les virus hétérosubtypiques avaient une séquence M2e identique ou différent au plus d'1 acide aminé par rapport à la séquence M2e des vaccins (Tompkins et al, 2007). Or, bien que la plupart des virus influenza humains H1, H2 ou H3 partagent la séquence consensus M2e (Neiryneck et al, 1999 ; Zharikova et al, 2005), certains non (Tompkins et al, 2007).

3.2.4.2. **Le peptide M2e, antigène vaccinal expérimental**

La protéine M2 est faiblement immunogène, et seuls les anticorps anti-M2e peuvent être considérés comme protecteurs chez les modèles animaux, via une cytotoxicité dépendante d'anticorps (Ernst et al, 2006 ; Fan et al, 2004 ; Jegerlehner et al, 2004 ; Mozdzanowska et al, 1999 ; Neiryneck et al, 1999 ; Tompkins et al, 2007 ; Treanor et al, 1990 ; Zharikova et al, 2005). Or, les titres sériques humains en anticorps anti-M2e sont faibles, voire nuls, suggérant que les vaccins en circulation ou les infections naturelles n'induisent pas de réponse suffisante en anticorps anti-M2e chez l'homme (Black et al, 1993 ; Feng et al, 2006 ; Liu et al, 2003). Des vaccins expérimentaux basés sur le peptide M2e ont été développés afin d'étudier l'immunogénicité et la protection sur des modèles animaux (Ernst et al, 2006 ; Fan et al, 2004; Frace et al, 1999 ; Jegerlehner et al, 2004 ; Liu et al, 2004b ; Mozdzanowska et al, 2003 ; Neiryneck et al, 1999 ; Slepukhin et al, 1995; Tompkins et al, 2007).

- **Constructions vaccinales M2e et particules de type viral**

Le problème est de convertir le peptide M2e, faiblement immunogène, en un peptide qui l'est beaucoup plus. La fusion, obtenue chimiquement ou génétiquement, de M2e à un porteur approprié permet d'obtenir une particule de type virale (PTV). Les expérimentations sur souris et furets ont montré que l'immunité induite par immunisation avec un vaccin M2e-porteur protège contre une infection létale (Fan et al, 2004).

Le premier vaccin à M2e met en jeu une particule HBc sur laquelle chaque sous-unité est fusionnée en sa partie N-terminale avec un peptide M2e (Neyrinck et al, 1999). Ce vaccin induit une forte réponse immunitaire, représentée par les anticorps polyclonaux anti-M2e (Neyrinck et al, 1999). La vaccination HBc-M2e intra-péritonéale suivie par une épreuve hautement létale à l'IAV X-47 adapté à la souris confère un taux de survie de 100% (Neyrinck et al, 1999). La morbidité est également considérablement réduite : réduction de la perte de poids, de la hausse de température et du titre viral pulmonaire (Neyrinck et al, 1999). Puisque la protection pouvait être transférée par sérum (Neyrinck et al, 1999), il a été conclu que cette protection était due à une réponse immunitaire humorale. Cette protection est de longue durée (Neyrinck et al, 1999). Si la vaccination était faite par voie intranasale, une réponse muco-sale complétant la protection contre l'épreuve virale, était induite (Neyrinck et al, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres laboratoires utilisant d'autres porteurs (Frace et al, 1999 ; Jegerlehner et al, 2004 ; Mozdzanowska et al, 2003 ; Mozdzanowska et al, 2007). L'immunisation par le peptide M2e couplé à HBc procure une protection modeste contre épreuve à faible dose virale (Jegerlehner et al, 2004) : la protection est attribuée à des anticorps anti-M2 couplés aux cellules NK (Jegerlehner et al, 2004).

L'utilisation de M2e-HBc, où M2e est fusionné au N-terminus des sous-unités HBc ou inséré dans la boucle immunodominante de HBc, a également été évaluée en tant que vaccin par Fiers et coll. (2004). Ces vaccins confèrent pleine protection (protection équivalente avec des constructions en N-terminus ou en boucle immunodominante) quand ils sont administrés avec adjuvant : plusieurs adjuvants ont été testés par voie intra-péritonéale, alors que l'adjuvant mutant de l'entérotoxine non toxique LT(R192G) a été évalué par administration intranasale (Fiers et al, 2004). La combinaison appropriée de ces constructions vaccinales et adjuvants permet d'obtenir des titres sériques en IgG2a anti-M2e à l'origine d'une complète protection (Fiers et al, 2004). Sans adjuvant, la protection varie de 70 à 100% (Fiers et al, 2004). L'utilisation de multiples séquences M2e sur une particule HBc améliore la protection (De Filette et al, 2005) : avec ces vaccins, non seulement un plus haut titre en anticorps anti-M2e est observé, mais également une protection plus efficace. Ces constructions vaccinales induisent même un titre d'anticorps anti-M2e supérieur au titre d'anticorps dirigés contre HBc, pourtant considéré comme beaucoup plus immunogène que M2e (De Filette et al, 2005). L'utilisation d'un vaccin à base HBc avec troncation partielle en sa partie C-terminale, augmente la protection par rapport aux constructions HBc précédentes (De Filette et al, 2005). Le vaccin M2e-porteur type viral protège contre différentes souches (adaptées à la souris) comme H1N1, H3N2 ou même des souches aviaires (De Filette et al, 2005). La réponse

immunitaire est alors polyclonale (De Filette et al, 2005). La vaccination intranasale M2e avec cette construction, associée à l'adjuvant mucosal CTA1-DD induit une forte immunogénicité et une protection complète (De Filette et al, 2006).

Heinen et coll. ont testé l'efficacité des vaccins de type HBc-M2e avec ou sans adjuvant sur épreuve à virus influenza porcine H1N1 sur des porcs (Heinen et al, 2002). Aucune protection significative n'est observée par rapport au groupe témoin (Heinen et al, 2002). Au contraire, les signes cliniques sont plus sévères chez les groupes vaccinés (Heinen et al, 2002), bien que des anticorps anti-M2e soient observés. L'excrétion virale est identique entre porcs vaccinés et porcs témoins non vaccinés (Heinen et al, 2002). L'échec de la vaccination serait lié à la différence des séquences M2e entre vaccin et virus de l'épreuve (Heinen et al, 2002). Heinen et coll. ont également étudié l'efficacité d'un vaccin à ADN exprimant deux protéines conservées de l'IAV, le peptide M2e et la protéine NP après épreuve sur des porcs, M2e du vaccin différant du M2e viral de 6 AA (Heinen et al, 2002). Si des anticorps M2e sont aussi induits par ce vaccin, une réponse lymphoproliférative spécifique supplémentaire est observée (Heinen et al, 2002). Comparé aux groupes témoin et vaccinés par HBc-M2e (cf. supra), le groupe vacciné par ADN présente les signes cliniques les plus sévères avec un taux de mortalité de 50% en 2 jours post-épreuve (Heinen et al, 2002), mise à part la fièvre qui est très peu exprimée dans ce groupe. L'excrétion virale est identique à celle du groupe témoin (Heinen et al, 2002). Ces résultats suggèrent donc que, chez le porc, la présence d'anticorps anti-M2e (et d'anticorps anti-NP), associée à une réponse cellulaire spécifique, et en l'absence d'anticorps anti-HA et anti-NA, aggrave l'expression de la maladie chez le porc (Heinen et al, 2002). Le vaccin HBc-M2e serait donc plus efficace que le vaccin à ADN avec adjuvant pour présenter M2e au système immunitaire, induisant une concentration en anticorps anti-M2e plus importante chez le porc (Heinen et al, 2002). En revanche, après épreuve avec un virus influenza porcine H1N1, l'augmentation de la concentration en ces anticorps est plus grande chez les animaux vaccinés par ADN que chez les animaux vaccinés par le complexe HBc-M2e, phénomène lié à la présence plus grande en lymphocytes T cytotoxiques helpers (Heinen et al, 2002). Cette réponse cellulaire T ne serait stimulée que par la protéine porteuse et non par le peptide M2e (Heinen et al, 2002).

- **Constructions protéiques associées à M2e**

L'utilisation de peptide synthétique à antigène multiple (PAM), où des peptides Th-déterminants sont associés par des liaisons covalentes à des peptides M2e (séquence M2e PR8 où cystéine changée en sérine), montre que deux vaccinations consécutives intranasales avec

adjuvant (toxine cholérique et oligodéoxynucléotide immunostimulant) assurent une résistance significative à la réplication virale PR8 dans tous les sites du tractus respiratoire chez la souris, mais plus faible que celle induite dans les poumons par deux infections consécutives hétérosubtypiques par des virus sauvages sur d'autres souris, chez lesquelles les mécanismes immunitaires seraient différents (Mozdzanowska et al, 2003). Les anticorps induits par ce genre de constructions sont majoritairement spécifiques du peptide M2e utilisé (Mozdzanowska et al, 2007). Une partie de ces anticorps réagissent de façon croisée avec la séquence présumée consensus M2e exprimée par des cellules M2-transfectées (Mozdzanowska et al, 2007). L'immunisation parentérale avec ce type de construction montre que le titre en anticorps anti-M2e augmente avec le niveau de protection observé chez la souris contre l'épreuve PR8, dont la séquence M2e ne diffère que d'un acide aminé du M2e vaccinal (Mozdzanowska et al, 2007). Cependant, la vaccination intranasale procure une protection plus forte, associée à une proportion plus haute en anticorps IgG2a que la vaccination parentérale : le titre en anticorps anti-M2e augmente proportionnellement avec la force de protection (Mozdzanowska et al, 2007). Les auteurs suggèrent ainsi l'existence d'une immunité associée aux voies respiratoires chez les souris vaccinées par la voie intranasale (Mozdzanowska et al, 2007). En revanche, l'immunisation intranasale sans adjuvant n'induit aucune réponse chez la souris, mais l'administration commune du vaccin avec un IAV infectieux accroît légèrement la protection et la réponse en anticorps anti-M2e, en comparaison à la vaccination M2e-MAP seule (Mozdzanowska et al, 2007). Ces constructions peuvent engendrer de hauts titres en anticorps anti-M2e, à l'origine d'une protection significative contre l'épreuve létale chez la souris (Mozdzanowska et al, 2003).

Des vaccins combinant M2e à KLH ou au complexe protéique de la membrane externe de *Neisseria meningitidis* sont hautement immunogènes chez la souris, le furet et le singe rhésus (Fan et al, 2004). Ils assurent une protection contre l'épreuve létale à H1N1(PR8) ou H3N1 (A/Hong-Kong/68 réassorti PR8, même fragment M2e que PR8) chez la souris, et permettent de diminuer l'excrétion virale dans les voies respiratoires inférieures chez la souris et le furet (Fan et al, 2004). La protection contre l'épreuve létale chez la souris peut aussi être obtenue par transfert passif de sérums de singe contenant un haut titre en anticorps anti-M2 (Fan et al, 2004). Les antisérums M2e obtenus offrent une protection croisée contre de nombreuses souches d'IAV humains (dont PR8), mais ne montrent aucune réaction avec les peptides M2e des virus aviaires de sous-types H5 et H7 qui ont 3 à 4 différences d'acides aminés (Fan et al, 2004).

Une autre étude montre, au contraire, que la vaccination de souris par KLH conjuguée à différentes séquences M2e, dont la séquence consensus humaine, assure la production, chez la souris, et ce, quelle que soit la séquence M2e utilisée, d'anticorps qui réagissent de façon croisée à différentes séquences M2e, dont celles de virus H5N1 hautement pathogènes (A/Hong-Kong/156/97 et A/Thaïlande/SP-83/04) qui diffèrent au plus de 4 acides aminés des séquences M2e vaccinales (Tompkins et al, 2007). Ces souris vaccinées sont ensuite mises à l'épreuve vaccinale contre deux virus H1N1 : la perte de poids des souris vaccinées est significativement moindre que celle du groupe témoin (Tompkins et al, 2007). Si 100% des souris vaccinées avec la séquence consensus survivent à l'épreuve, la protection induite par la vaccination avec M2e de virus H5N1 s'avère incomplète (Tompkins et al, 2007).

Des protéines de fusion glutathion-S-transférase portant un nombre variable d'épitopes M2e SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (1, 2, 4, 8 ou 16 copies) sont utilisées pour immuniser souris et lapins (Liu et al, 2004b). La réponse humorale anti-M2e est accrue avec la densité en épitope (Liu et al, 2004b). La protection après épreuve PR8 sur souris montre que plus la densité en épitope M2e est grande, plus le taux de survie est important et la perte de poids faible (Liu et al, 2004b) : 100% de survie après épreuve pour 16 copies, 50% pour 4, 0 pour 1 copie (Liu et al, 2004b).

Un vaccin utilisant une protéine recombinante comprenant la flagelline du ligand du récepteur TLR5 fusionnée à 4 copies de M2e (séquence consensus humaine avec modification des résidus cystéine en sérine : SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSDPSR), exprimée par *E.coli*, assure une activité TLR5 nécessaire à la formation d'une réponse immunitaire adaptative en stimulant et favorisant l'activité des cellules présentatrices d'antigènes et une induction d'anticorps 14C2 spécifiques de M2e chez la souris (Akira et al, 2001 ; Huleatt et al, 2008). La protection contre épreuve au virus PR8, dont la séquence M2e diffère de 3 résidus par rapport au M2e vaccinal, et la diminution des signes cliniques, sont ainsi induites par ce vaccin, chez la souris (Huleatt et al, 2008).

- **Vaccination par ADN et séquence M2e**

La vaccination primaire de souris par ADN exprimant M2 avec la séquence M2e consensus, boostée par une vaccination par un adénovirus recombinant exprimant la même protéine M2 : ce protocole assure la production en quantité significative comparée à celle de souris non boostées, d'anticorps IgG spécifiques de M2e-PR8 (Tompkins et al, 2007). De plus, ces anticorps montrent une réaction croisée avec des séquences M2e différentes de 3

acides aminés, dont celle d'un virus H5N1 hautement pathogène (Tompkins et al, 2007). Aucune réaction n'est observée en revanche avec la séquence M2e d'un autre virus H5N1 (A/Hong-Kong/156/97) (Tompkins et al, 2007). Ce même protocole doublant les vaccinations assure une protection totale contre deux épreuves virales H1N1 (dont PR8) chez la souris, prouvant son efficacité contre des virus avec des séquences M2e similaires ou bien différentes de celle du vaccin (Tompkins et al, 2007). La vaccination de souris avec un vaccin à ADN exprimant la protéine M2 (avec la séquence consensus M2e humaine MSLLETEVETPIRNEWGCRCNDSSD) protège les souris contre épreuve PR8 (Tompkins et al, 2007) dont la séquence M2e varie (MSLLETEVETPIRNEWGCRCNGSSD) d'un seul acide aminé. Un vaccin à ADN exprimant la protéine M du virus PR8 assure également la protection des souris contre la même épreuve virale (Tompkins et al, 2007).

- **Constructions liposomales vaccinales avec peptide M2e**

Ernst et coll. ont évalué la protection après épreuve sur souris après immunisation par un vaccin liposomal exprimant des segments M2e de souche H1N1, H5N1 et H9N2 (Ernst et al, 2006). Les vaccinations, après épreuves homologues, confèrent 100% de survie pour H1N1, 80% pour H9N2, et la réduction de la charge virale pulmonaire est significative chez les souris immunisées contre le sous-type H5N1 (Ernst et al, 2006). L'immunisation avec l'épitope M2e de PR8 confère un titre élevé en anticorps IgG : l'antisérum de ces souris confère une protection passive totale contre épreuve homologue (Ernst et al, 2006).

- **Vaccination par le peptide M2e, sans porteur vaccinal**

La plupart de ces protocoles vaccinaux utilisent des porteurs pour stimuler l'immunogénicité de M2e. Or, Wu et coll. montrent que l'utilisation du peptide universel M2e N-KSLLETEVETPIRNEWGCRCNDSSD sans porteur, mais en présence d'adjuvants (incomplet de Freund ou aluminium) assure une protection contre épreuve létale à PR8 chez la souris, médiée par des IgG spécifiques de M2e et une réponse cellulaire T efficace (Wu et al, 2007), avec, notamment, une perte de poids moins grande et une disparition des symptômes plus rapide que le groupe de contrôle (Wu et al, 2007).

3.3. Antiviraux

Quatre molécules agissent contre le virus influenza A : l'amantadine et la rimantadine, chimiquement liés, sont des inhibiteurs de la protéine M2 (Hay et al, 1985) ; le zanamivir et l'oseltamivir sont des inhibiteurs de NA (Palese et Compans, 1976) et préviennent le relargage de virions. En Europe, seuls l'amantadine et la rimantadine ont une AMM.

Ces quatre médicaments sont des adjuvants de la thérapeutique antigrippale (Treanor et al, 2000), et seul le zanamivir n'est pas utilisé en prophylaxie antigrippale. Malgré leur efficacité générale, ces molécules sont peu utilisées à cause de leurs effets secondaires, de l'observance difficile des patients humains, et de l'émergence possible de résistance médicamenteuse (Palese et Garcia-Sastre, 2002). Leur utilisation serait pourtant intéressante en cas de pandémie grippale, avant le développement d'un vaccin efficace (Palese et Garcia-Sastre, 2002).

L'amantadine et la rimantadine (Hay et al, 1985), empêchent aux cations, dont les protons, de passer la membrane virale (Pinto et al, 1992), par blocage de l'activité canal ionique du peptide TM2, rendant vain le rôle crucial de M2 dans l'initiation et la finition du cycle de l'IAV.

3.4. Vaccination : Quels vaccins contre la grippe ?

La meilleure option pour lutter « artificiellement » contre les virus grippaux reste la vaccination.

3.4.1 Vaccins humains autorisés sur le marché

Pour la saison hivernale 2010-2011, l'OMS recommande la composition suivante pour les vaccins antigrippaux humains autorisés sur le marché (vaccins inactivés, et vaccins vivants atténués) : une souche H1N1 2009 pandémique A/California/7/2009 (H1N1), la souche A/Perth/16/2009 (H3N2) et la souche B/Brisbane/60/2008. Si les recommandations formulées par l'OMS sont les mêmes pour tous les pays (comme la France et ou les Etats-Unis), les AMM peuvent être différentes (OMS, 2010).

Saison Hivernale	Souche H3N2	Souche H1N1	Souche de type B
2001-2002	A/Moscow/10/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Sichuan/379/1999
2002-2003	A/Moscow/10/1999	A/New Caledonia/20/1999	B/Hong-Kong/330/2001
2008-2009	A/Brisbane/10/2007	A/Solomon Islands/3/2006	B/Florida/4/2006
2009-2010	A/Brisbane/10/2007	A/Brisbane/59/2007	B/Brisbane/60/2008
2010-2011	A/Perth/16/2009	A/California/7/2009	B/Brisbane/60/2008

Tableau n°4 : Changement des formulations des vaccins antigrippaux humains. A : la désignation de souche dénote le type viral (A ou B)/la localisation de l'isolat/le numéro de l'isolat/l'année de l'isolation. (D'après Pelese et Garcia-Sastre, 2002 ; OMS, 2010).

Chaque année, l'OMS met à jour ses recommandations vaccinales antigrippales (cf. tableau n°4).

3.4.1.1 Vaccins à virus inactivé

Pour être efficace, les vaccins humains actuels sont tripartites : ils doivent contenir un virus H1N1, un virus H3N2 et un composant viral de type B (Pelese et Garcia-Sastre, 2002). Au moins un composant doit être modifié régulièrement à cause de la dérive génétique : les recommandations saisonnières identifient une souche spécifique circulante, mais des souches antigéniquement équivalentes ou des souches réassorties à haut rendement peuvent être utilisées (Pelese et Garcia-Sastre, 2002).

Pour préparer ces virus, les souches virales sont développées sur des œufs de poule embryonnés, puis purifiées et inactivées chimiquement, et fragmentées. L'efficacité de ces vaccins dépendra aussi bien de la correspondance antigénique avec les souches circulantes que de l'âge du sujet et de son statut immunitaire. Des études montrent que ces vaccins préviennent environ 70 à 80% des maladies grippales chez les personnes saines de moins de 65 ans, chiffre qui diminue à 30-40% chez les personnes plus âgées (Patriarca et al, 1985). Si ces vaccins prévenaient jusqu'à 80% de morts, même chez les personnes plus âgées en 1985 (Patriarca et al, 1985), certains auteurs affirment que les vaccins inactivés à AMM récente offriraient une protection efficace inférieure à 50% chez les personnes de plus de 60 ans (Simonsen et al, 2007), chez qui le risque de maladies grippales sévères est plus élevée, en plus de représenter 90% des morts causées par la grippe aux Etats-Unis (Smith et al, 2006). Les recommandations actuelles de l'OMS proposent la vaccination systématique annuelle de

toutes les personnes de plus de 50 ans, des personnes appartenant aux groupes à risque et de ceux côtoyant ces groupes. Ces vaccins ont une AMM pour les êtres humains de plus de 6 mois (Smith et al, 2006).

3.4.1.2 Vaccins vivants atténués

Maassab et Bryant multiplient les passages de virus grippaux sur des cellules rénales de poule et sur des œufs embryonnés pour les adapter à la multiplication à 25°C (Maassab et Bryant, 1999). Ces virus deviennent ainsi sensibles à la température et sont bien adaptés à une utilisation en tant que vaccins vivants, car leur pathogénicité est fortement atténuée, chez les animaux comme chez les hommes (Maassab et Bryant, 1999). De plus, la réévaluation annuelle de ces vaccins est facile en créant des virus réassortis « 6 :2 » où 2 gènes codent pour HA et NA identifiées sur le terrain, alors que les 6 gènes restant sont issus de la souche adaptée au froid. (Pelese et Garcia-Sastre, 2002).

Ces vaccins vivants, sensibles à la température, peuvent être administrés par voie intranasale, un avantage par rapport à la voie intramusculaire, plus coûteuse, plus difficile et douloureuse. Ils induisent une immunité locale neutralisante et une réponse immunitaire cellulaire, à l'origine d'une protection plus longue et plus large que des préparations vaccinales chimiquement inactivées. Finalement, une meilleure protection est observée chez les enfants de 6 mois à 9 ans, et les infections bactériennes secondaires causées d'otite moyenne sont fortement réduites (Smith et al, 2006). Ces vaccins, vivants, sensibles à la température, ont une AMM pour les personnes âgées de 5 à 49 ans (Smith et al, 2006). Ils assurent une forte réponse en anticorps dirigés contre HA et NA (Smith et al, 2006).

Par exemple, le vaccin antigrippal en spray intranasal FluMist™, développé par le laboratoire MedImmune a été introduit aux Etats-Unis en 2003 ; ce vaccin n'a pas d'AMM en Europe (Laboratoire MedImmune, 2010). Pour la saison 2010-2011, il est composé de virus influenza réassortis vivants atténués de chacune des trois souches décrites précédemment recommandées par l'OMS.

3.4.2. Vaccins humains en développement

Nous présenterons dans ce paragraphe quelques exemples de vaccins antigrippaux en développement chez l'homme.

3.4.2.1. Virus vivants obtenus par génie génétique

L'avancement des techniques de génie génétique pour induire des modifications spécifiques de site dans les génomes de virus à ARN négatif a rendu possible de nouvelles approches vaccinales (Enami et al, 1990 ; Garcia-Sastre et al, 1998) : il est possible à présent de créer de nouvelles souches avec des propriétés uniques conduisant à leur atténuation. Par exemple, échanger la région promotrice du gène NA d'un virus de type A avec celle d'un virus de type B atténue la virulence de la souche chez la souris (Muster et al, 1991).

3.4.2.2. Vaccins vivants exprimant des gènes NS1 altérés

Des cellules transfectées avec des plasmides permettent d'obtenir des candidats à la vaccination antigrippale en créant des délétions stables dans le génome viral grippal (Fodor et al, 1999 ; Neumann et al, 1999). La protéine NS1 du virus Influenza a une activité IFN-antagoniste (Garcia-Sastre et al, 1998).

A la suite d'une infection par un virus, l'hôte met généralement en place une réponse antivirale à l'aide d'IFN. Or, beaucoup de virus expriment une protéine anti-interféron ou une activité IFN-antagoniste. Dans le cas des virus grippaux, une modification de la protéine NS1 peut altérer cette caractéristique virulente. Chez les humains, un virus délété du gène NS1 peut être trop atténué pour convenir à la vaccination. Cependant, les virus exprimant les 99 ou 126 aminoacides de la portion N-terminale de la protéine NS1 possèdent une activité IFN-antagoniste intermédiaire chez la souris (Pelese et Garcia-Sastre, 2002).

De tels vaccins obtenus par génie génétique peuvent avoir des caractéristiques phénotypiques optimales pour stimuler une réponse immunitaire robuste chez les humains, tout en étant atténués de façon à ne pas inhiber la réponse IFN de l'hôte (Pelese et Garcia-Sastre, 2002). Or, il est avancé que les êtres humains ont des gènes IFN redondants de telle sorte que la réponse IFN est sauve de tout échec. En conséquence, les humains, même avec un système immunitaire compromis, peuvent répondre efficacement à un virus à activité anti-IFN réduite, sans tomber malades. Le fait que la réponse IFN devrait être plus forte chez des personnes infectées par ces mutants NS1 que chez celles infectées par des virus sauvages peut mener à une réponse immunitaire humorale amplifiée. Cette affirmation se base sur le fait que

les IFN de type I peuvent potentiellement stimuler la réponse primaire en anticorps contre les protéines et peuvent agir comme adjuvants chez la souris (LeBon et al, 2001). Si cet effet immunostimulateur est aussi observé chez des humains inoculés avec des mutants NS1, de plus faibles quantités de virus pourront être utilisées pour la vaccination (Pelese et Garcia-Sastre, 2002).

3.4.2.3. **Virus influenza à réplication défective**

Une autre approche de vaccins vivants est la construction de particules virales qui ne peuvent effectuer qu'un seul cycle viral.

Par exemple, l'infection de cellules avec une préparation de particules virales sans gène codant pour la protéine NEP assure l'expression de protéines virales mais ne permet pas de créer des particules infectieuses (Watanabe et al, 2002). Ces préparations induisent une réponse protectrice en anticorps et stimulent une forte réponse immunitaire à médiation cellulaire sans permettre la réplication du virus (Watanabe et al, 2002).

L'élimination de gène codant pour M2 génère une souche à réplication défective : si la croissance virale se fait efficacement sur cultures tissulaires, elle est fortement limitée chez la souris (Watanabe et al, 2001). Une souche ainsi délétée représente un candidat parmi les vaccins vivants (Watanabe et al, 2001).

3.4.2.4. **Vaccin ADN**

La vaccination ADN met en jeu l'administration (injectable ou topique) de plasmide ADN codant pour une ou plusieurs des protéines grippales (Pelese et Garcia-Sastre, 2002). Les études se limitent à des modèles animaux, comme les primates non humains, les souris, les poules et les furets (Kodihalli et al, 2000 ; Ljungberg et al, 2000 ; Okuda et al, 2001 ; Watabe et al, 2001). Si ces vaccins assurent une protection après épreuve, leur utilisation chez les humains serait plus appropriée chez les personnes immunodéprimées (comme les personnes atteintes du syndrome de l'immunodéficience acquise), chez lesquelles l'utilisation de souches atténuées pourrait être difficile pour des raisons de sécurité (Letvin, 2002).

Des vaccinations tests avec des constructions à ADN exprimant la protéine NP de l'IAV ou NP associé à M induisent des anticorps et protègent contre épreuves hétérosubtypiques (Epstein et al, 2000 ; Ulmer et al, 1993). La vaccination à ADN exprimant NP et M permet d'atteindre une protection – limitée – contre une souche H5N1 de isolée de

l'épidémie humaine de 1997 à Hong-Kong, et ce malgré une épreuve infectieuse virulente et rapide (Epstein et al, 2002).

3.4.2.5. Nouveaux adjuvants pour vaccins tués ou atténués

Des préparations de type liposome contenant du cholestérol et des particules virales appelées « ISCOMS » (pour « *immune-stimulating complexes* ») sont hautement efficaces pour amplifier l'immunogénicité de vaccins basés sur des virus tués ou atténués, lors d'administration sous-cutanée ou intranasale (Sambhara et al, 2001).

La toxine labile à la chaleur d'*Escherichia coli*, complexée à des vésicules de lécithine, peut être utilisée comme adjuvant d'un vaccin trivalent à virus influenza inactivé (Glueck et al, 2001). Cette préparation peut être administrée par voie intranasale, et induit une protection immunitaire à médiation cellulaire (Glueck et al, 2001). Ce vaccin, qui avait reçu une AMM en Suisse, a du être rappelé pour de sévères effets secondaires (paralysie faciale).

3.4.3. Vaccination antigrippale des espèces aviaires

Contrairement à la vaccination humaine privilégiant la protection individuelle, la stratégie de la vaccination des oiseaux domestiques est l'induction d'une immunité protectrice d'une population cible (OIE, 2007). Un bon programme de vaccination augmenterait l'immunité protectrice du troupeau de volailles et la résistance à l'infection. Une exposition à un IAV peut ne pas mener à l'infection chez les oiseaux vaccinés. Si l'infection venait à émerger, la présentation clinique chez les animaux vaccinés devrait être moins sévère et la production virale réduite en termes de quantité et de durée. La vaccination des volailles peut également prévenir l'introduction d'IAV, ou bien, en réduisant leur diffusion, minimiser l'impact négatif sur la production de volailles et diminuer les potentielles pertes économiques (OIE, 2007). De plus, le risque d'exposition humaine aux IAV à potentiel zoonotique peut ainsi être réduit par cette vaccination de masse (OIE, 2007).

Plusieurs types de vaccins destinés aux espèces aviaires de production sont validées par l'OIE : ils doivent contenir le type d'hémagglutinine du virus circulant effectivement dans le pays ou susceptible d'y être introduit (OIE, 2007). Ces recommandations sont regroupées dans le tableau n°5 ci-après.

Type de Vaccin	Base de la construction vaccinale	Antigène
Inactivé monovalent	IAV inactivé Ou sous-unités de l'IAV	H5 OU H7
Inactivé bivalent	IAV inactivé Ou Sous-unités de l'IAV	H5 & H7
Inactivé combiné	IAV inactivé + Autres agents pathogènes	H5 OU H7 + Autres antigènes
Vivant recombinant	Vecteur viral recombinant de la variole aviaire	H5

Tableau n° 5: Récapitulatif des vaccins antigrippaux destinés aux espèces aviaires recommandés par l'OIE en 2007.

Les vaccins inactivés monovalents contiennent des virus ou particules virales provenant soit d'une souche aviaire H5, soit H7 (OIE, 2007). Les vaccins inactivés bivalents combinent souches H5 et H7 (OIE, 2007). Ces deux types de vaccins peuvent contenir des sous-types homologues ou hétérologues de neuraminidase, en fonction de la neuraminidase du virus circulant et de la neuraminidase présente dans le vaccin (OIE, 2007). Les vaccins inactivés combinés associent à ces antigènes grippaux d'autres antigènes destinés à l'immunisation des volailles contre d'autres maladies. Par exemple, le vaccin Nobilis® Trt Inac, produit par le laboratoire Intervet, est un vaccin inactivé destiné à la vaccination des poulets contre le sous-type H5 des IAV aviaires (Laboratoire Intervet, 2010).

Les vaccins recombinants vivants sont des virus de la variole aviaire exprimant l'hémagglutinine H5 (OIE, 2007). Ils ne sont efficaces que chez les poulets, et seulement sur les poussins âgés de quelques jours (OIE, 2007). En effet, la potentielle immunisation des

animaux plus âgés contre un virus sauvage de la variole aviaire pourrait limiter l'efficacité du vaccin recombinant (OIE, 2007). Le vaccin TROVAC™-AIV H5, par exemple, est un vaccin influenza aviaire qui contient un virus de la variole aviaire recombinant vivant exprimant l'hémagglutinine H5 isolé d'un sous-type d'IAV aviaire, a une AMM restreinte à certains pays du continent américain : Mexique, Salvador, Guatemala et Etats-Unis (Laboratoire Merial, 2010 ; Bublot et al, 2006). Son efficacité vaccinale s'élargirait à certains isolats de 2003 et 2004 du sous-type H5N1 hautement pathogène (Bublot et al, 2006).

4. Chapitre 4 : Le virus myxomateux : potentiel recombinant vaccinal

4.1. Caractères généraux du virus myxomateux

4.1.1. Classification

Le virus myxomateux (VM) appartient à l'ordre des *Poxviridae*, sous-famille des *Chordopoxviridae*, genre *Leporipoxvirus* (Fenner, 1996).

Le virus de la myxomatose montre des réactions sérologiques croisées avec les autres membres du genre *Leporipoxvirus*, comme le virus du fibrome de Shope ou le virus du fibrome du lièvre, qui peuvent être à l'origine de protection croisée (Fenner, 1996).

4.1.2. Aspects biologiques

Le VM est l'agent de la myxomatose, maladie mortelle pour le lapin européen, *Oryctogalus cuniculus* (Fenner et Ratcliffe, 1965). Deux souches sont initialement décrites : les souches brésilienne et californienne (Fenner et Ratcliffe, 1965). Le virus est habituellement transmis mécaniquement par des vecteurs arthropodes.

Il est responsable, chez les Léporidés (lapin et lièvre), hôtes naturels, de tumeurs bénignes localisées appelées myxomes, et d'une maladie générale sévère chez les lapins européens.

Les espèces non cunicoles, comme l'homme ou la souris, sont réfractaires au virus myxomateux: une infection silencieuse, une incubation prolongée pourraient expliquer l'absence de signes cliniques (Pimentel, 1968). Les cellules autres que les cellules de lapin seraient capables d'activer un état antiviral dépendant de la réponse en IFN- β , réfractaire au virus myxomateux (McFadden, 2005). Les hommes en contact avec des lapins malades ne développent pas d'anticorps spécifiques du virus (Pimentel, 1968). Différentes études montrent pourtant que le tropisme *in vitro* du VM peut s'élargir à des cellules humaines, murines, ovines ou félines, notamment lorsque la réponse en IFN est inhibée (Johnston et al, 2005 ; Lalani et al, 1999 ; McCabe et al, 2002 ; Pignolet et al, 2008 ; Wang et al, 2004).

4.1.3. Structure et génome

Le virus de la myxomatose (cf. figure n°13) est un gros virus en forme de brique d'environ 300x250x200 nm³. Deux formes infectieuses sont décrites (cf. figure n°13): les virus intracellulaires matures ou IMV, et les virus extracellulaires enveloppés ou EEV (Smith et Law, 2004). Ces derniers sont produits en plus petite quantité que les IMV (Moss, 2001). Les EEV possèdent une membrane supplémentaire aux IMV (Moss, 2001 ; Smith et Law, 2004).

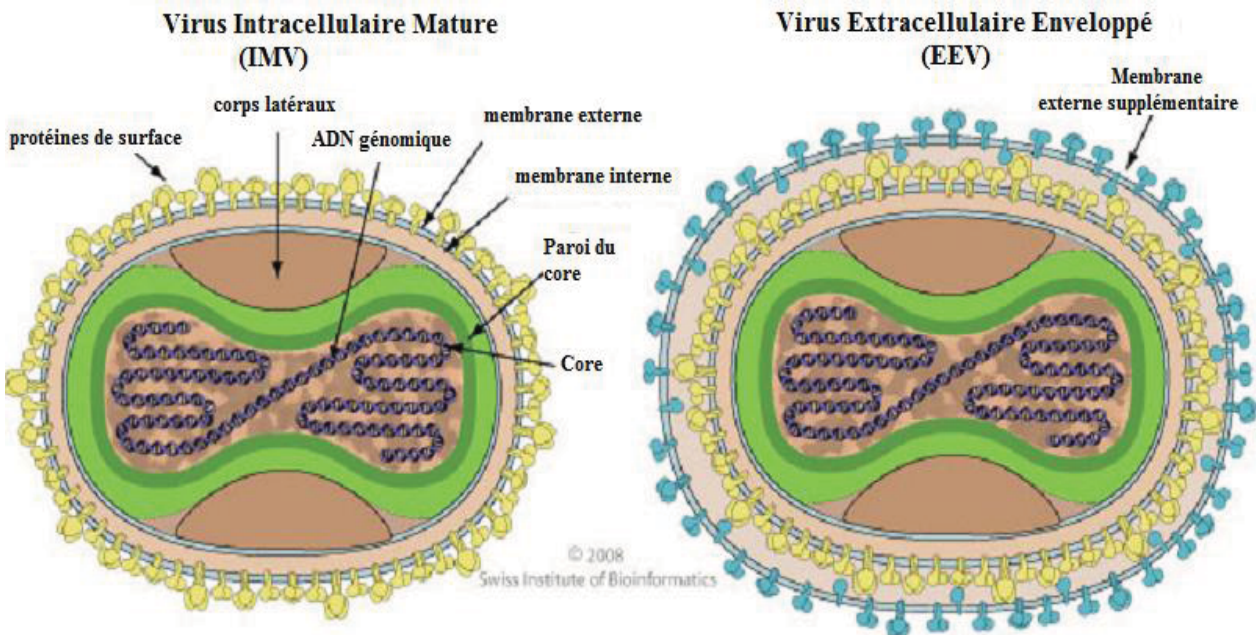


Figure n°13 : Schémas des formes IMV et EEV d'un Poxvirus (D'après Swiss Institute of Bioinformatics, 2010)

Le génome de la souche de référence Lausanne est un ADN linéaire double brin de 162 kilopaires de bases (kpb), avec une proportion de 40% de bases guanine et cytosine. Les régions terminales inversées comptent 11,5 kpb (Cameron et al, 1999). Sans intron, le génome est composé de très peu de séquences non codantes, des séquences promotrices courtes et des ORF (open reading frame ou cadre ouvert de lecture) de petite taille (Cameron et al, 1999). La synthèse de 159 protéines potentielles est assurée par 171 ORF colinéaires, 12 d'entre eux étant présents en duplicata dans les régions terminales inversées (Cameron et al, 1999). La portion centrale du génome se constitue de 120 kpb, encadrée par 15 kpb à gauche et 25 à droite (Cameron et al, 1999) : elle code pour des protéines essentielles à la réplication complète du virus ; 90 des gènes de cette portion sont conservés chez plus de 25 poxvirus de Chordés. Il existe des régions inter-géniques. Ainsi, les gènes structuraux et de vérification/correction sont situés dans la portion centrale ; les gènes codant pour des motifs

immunomodulateurs ou de restriction d'hôte sont rencontrés plutôt dans les parties terminales (Cameron et al, 1999).

4.1.4. Cycle viral des poxvirus

Le cycle viral du virus myxomateux est commun à tous les Poxvirus (Smith et Law, 2004). La réplication virale a lieu dans le cytoplasme dans des viroplasmes, situés en périphérie du noyau (Moss, 2001).

Le virus se réplique intensivement au site d'inoculation, puis infecte les lymphocytes résidents (Fenner et Ratcliffe, 1965). Le transport par les lymphocytes le conduit aux nœuds lymphatiques qui drainent la région, puis il dissémine dans l'ensemble de l'organisme (Kerr et Best, 1998). Il n'y a pas de forme virale libre dans le sérum (Kerr et Best, 1998). Le virus myxomateux étant un virus immunodépresseur, les lymphocytes infectés deviennent non fonctionnels chez le lapin.

4.1.4.1. Entrée du poxvirus

Les IMV, majoritaires et les EEV sont les deux formes infectieuses des poxvirus (Smith et Law, 2004). L'entrée de l'IMV dans la cellule se ferait par fusion avec la membrane plasmique (Smith et Law, 2004 ; Vanderplasschen et al, 1998). L'entrée des EEV, compliquée par la présence d'une membrane supplémentaire, se ferait par deux mécanismes distincts : acidification des virions dans les vésicules intracellulaires ou perte de la membrane à la surface de la cellule (Vanderplasschen et al, 1998). L'entrée du virus dans la cellule met en jeu des récepteurs cellulaires spécifiques.

Une fois dans le cytoplasme, le virus est transporté de la périphérie vers le centre de la cellule par les microtubules (Carter et al, 2003) : les ARN messagers libérés du core viral peuvent aussi être transportés vers les sites de traduction.

4.1.4.2. Expression du génome myxomateux

L'expression des gènes viraux est contrôlée de près par différents promoteurs (dont les séquences sont extrêmement conservées parmi les *Chordopoxvirus* : les trois classes de gènes (précoce, intermédiaire, tardive) sont exprimées dans une cascade temporelle où la transcription de chaque classe de gène dépend de celle de la classe précédente (Moss et al, 1991).

- ***Expression précoce***

La classe des gènes précoces représente approximativement la moitié du génome viral : elle est transcrite par l'ARN- polymérase ADN-dépendante, associée à des facteurs de transcription empaquetés dans le core viral. Les ARNm précoces, dont la synthèse est initiée immédiatement après l'entrée du virus, sont coiffés et polyadénylés par d'autres enzymes poxvirales (Moss et al, 1991). Les gènes précoces codent pour des protéines à diverses fonctions incluant les immunomodulateurs et les protéines nécessaires à la réplication de l'ADN viral, comme l'ADN- polymérase.

- ***Réplication de l'ADN et transcription intermédiaire***

Une fois que commence la réplication de l'ADN, dépendante de 3 principales enzymes, quelques heures après l'infection, l'expression des gènes intermédiaires est lancée. Plusieurs protéines requises pour l'expression de gènes tardifs sont ainsi fabriquées, comme les facteurs de transcription impliqués dans la transcription tardive (Moss et al, 1991).

- ***Expression des gènes tardifs***

La classe des gènes tardifs code pour beaucoup des protéines nécessaires à la constitution des nouvelles particules virales, et également pour des enzymes empaquetées dans les nouveaux virions qui initieront la prochaine étape de l'infection. La réplication de l'ADN est nécessaire à l'expression tardive, car l'ADN du virus initial ne peut pas servir de matrice à la transcription (Moss et al, 1991). La cellule infectée ne synthétise pratiquement plus aucune protéine relative à ses besoins et sa fonction.

4.1.4.3. **Assemblage et maturation**

L'assemblage des virions a lieu dans les viroplasmes, qui donnent naissance à des virions immatures non-infectieux (IV). La condensation du corps viral et le clivage protéolytique de certaines protéines de capsid confère le pouvoir infectieux à ces IMV nouvellement formés (Moss, 2001).

4.1.4.4. **Particules infectieuses & dissémination**

Les IMV, majoritaires et les EEV sont les deux formes infectieuses du virus myxomateux (Smith et Law, 2004). Les IMV produits lors du cycle viral sont soit relâchés lors de la lyse cellulaire, soit transportés par les microtubules vers un site proche du centre d'organisation des microtubules, où ils sont enveloppés par des membranes intracellulaires

dérivées des saccules transgolgiennes ou des endosomes précoces, pour former les IEV ou virus intracellulaires enveloppés. Les IMV peuvent également bourgeonner de la membrane plasmique bien que ce mécanisme soit peu connu. Les particules IEV sont ensuite transportées par les microtubules vers la surface cellulaire. Après fusion de la membrane externe des IEV avec la membrane plasmique, une particule virale enveloppée associée à la cellule (CEV) est formée : elle est exposée à l'extérieur de la cellule par exocytose. Les CEV induisent ensuite la polymérisation d'une queue d'actine favorisant l'expulsion du virion hors de la cellule par propulsion, ou bien sont relâchés en EEV. Ces mécanismes de libération des particules infectieuses sont décrits dans la figure n° 14 (d'après Smith et al, 2002 ; Smith et Law, 2004).

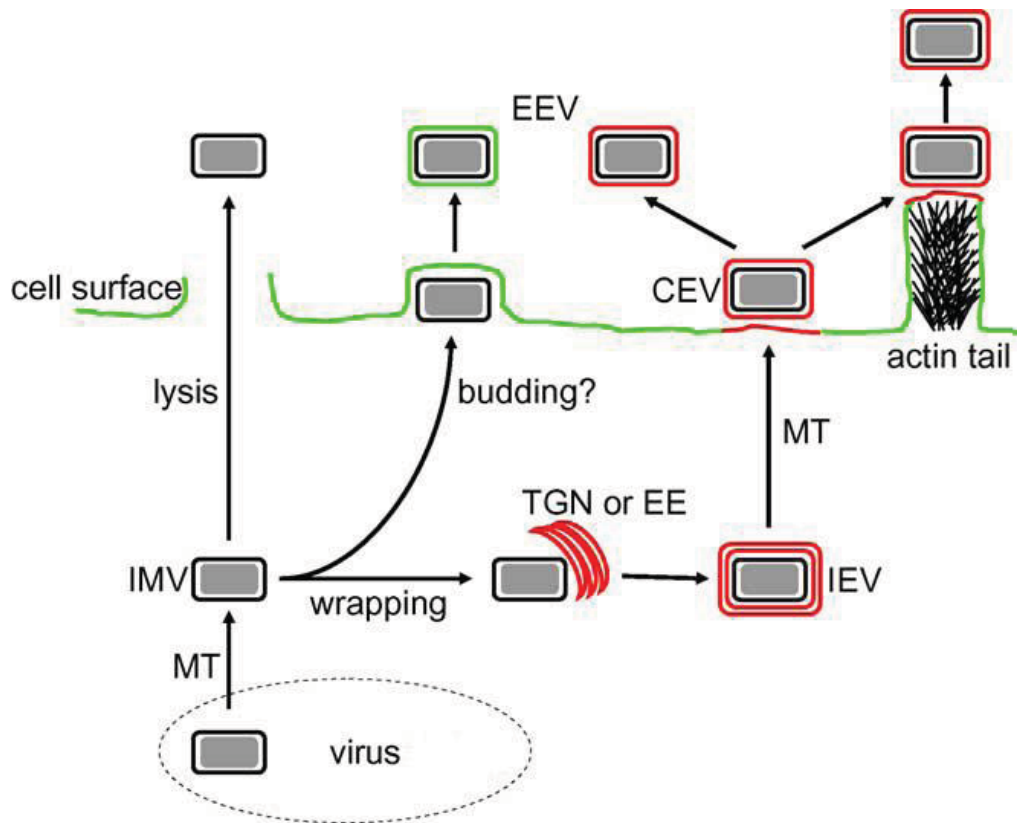


Figure n° 14: Les différentes formes de particules infectieuses du virus myxomateux. (D'après Smith et Law, 2004 ; Smith et al, 2002). IMV : virus intracellulaire mature, EEV : virus extracellulaire enveloppé, IEV : virus intracellulaire enveloppé, CEV : virus enveloppé associé à la cellule, actin tail : queue d'actine, cell surface : surface de la cellule hôte, MT : microtubule, TGN : appareil transgolgien, EE : endosomes précoces, wrapping : enveloppement intracellulaire, budding : bourgeonnement. Les différentes couleurs mettent en avant le fait que les membranes ne sont peut-être pas composées des mêmes lipides et protéines.

Les modes de dissémination d'un poxvirus sont donc divers (cf. figure n°15): une cellule infectée au sein d'une monocouche par un poxvirus peut ainsi disséminer le virus par libération d'IMV lors de la lyse cellulaire, par propulsion des CEV par une queue d'actine vers les cellules adjacentes, par libération d'EEV vers les cellules voisines ou à distance.

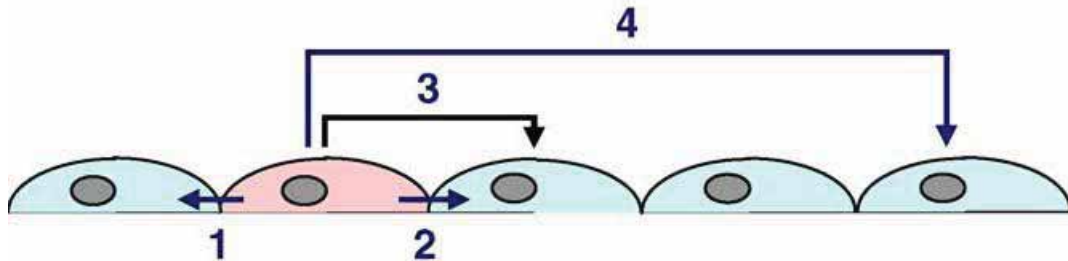


Figure n°15 : Schéma de dissémination des poxvirus sur une monocouche cellulaire. 1 : libération d'IMV par lyse cellulaire ; 2 : propulsion de CEV par queue d'actine ; 3 : libération d'EEV à proximité ; 4 : libération d'EEV à distance. (Smith et Law, 2004).

4.2. Utilisation vaccinale recombinante du virus myxomateux

Les poxvirus recombinants ont démontré leur efficacité vaccinale en stimulant une réponse immunitaire protectrice chez l'hôte contre divers pathogènes (Moss, 2001). Au sein de ces virus, le VM a déjà montré son potentiel vaccinal recombinant chez quelques espèces.

4.2.1. Chez l'hôte naturel, le lapin

Le virus myxomateux a d'abord été envisagé comme vecteur chez le lapin, bien qu'il produise de nombreuses protéines immunomodulatrices (Nash et al, 1999). L'avantage d'un tel vecteur dans l'espèce cunicole est qu'il offre alors une double protection, contre l'insert et contre le vecteur lui-même. La vaccination d'individus avec un virus myxomateux SG33 exprimant la protéine de capsid VP60 du virus de la maladie hémorragique du lapin (MHD) induit la production d'anticorps anti-VP60 et anti-myxomateux (Bertagnoli et al, 1996). La synthèse d'anticorps exprimée contre l'hémagglutinine de l'influenza exprimée par un virus myxomateux recombinant est similaire à celle lorsque le vecteur est un recombinant de la vaccine (Kerr et Jackson, 1995).

Dans la vaccination de population de lapins, l'utilisation d'une souche de terrain peu virulente, la souche 6918 isolée en Espagne, favorise la transmission horizontale du virus recombinant entre individus, afin de les protéger contre la MHD, grâce à la protéine de capsid VP60 du virus de la MHD exprimée par le recombinant (Barcena et al, 2000).

Par son tropisme d'hôte restreint, le virus myxomateux paraît être un excellent vecteur recombinant chez le lapin. Qu'en est-il des autres espèces ?

4.2.2. Virus myxomateux : vecteur vaccinal chez d'autres espèces ?

Le potentiel de vecteur vaccinal du VM chez les espèces non-Léporidés a été démontré initialement par la vaccination efficace de chat contre la calicivirose féline en utilisant un VM recombinant possédant le gène de capsid du virus félin : il favorise la production d'anticorps sériques neutralisants du virus ciblé (McCabe et al, 2002).

L'utilisation d'un VM recombinant sur le mouton montre le potentiel immunogène du VM et de son transgène dans cette espèce, mettant en avant le potentiel de vecteur vaccinal du VM chez les petits ruminants (Pignolet et al, 2008).

4.3. Virus myxomateux recombinant de notre étude

Deux vaccins recombinants intragéniques, utilisant la souche sauvage myxomateuse T1 comme vecteur, sont testés dans notre étude. Contrairement à la technique intergénique, aucun gène n'est supprimé dans la technique intragénique utilisée dans la construction de nos vaccins. Le gène M2e influenza A aviaire est ainsi intégré aux gènes des protéines d'enveloppe M022L ou M071L, ce qui permet de contrôler le lieu d'expression de M2e. De ce fait, la protéine M2e est accolée à la partie N-terminale des protéines M022L ou M071L, au sein de la membrane du poxvirus, site privilégié pour stimuler le système immunitaire. Les caractéristiques immunogènes de M071L et M022L sont utilisées afin de présenter plus favorablement M2e au système immunitaire par le biais de ces protéines porteuses :

- M071L est une protéine de 324 acides aminés codée par un gène tardif. Sa masse moléculaire est d'environ 36,8 kDa. Elle appartient à la famille des *heparane sulfate binding proteins* (protéines liant l'héparane sulfate). Protéine d'enveloppe, elle est intégrée à la membrane de l'IMV dont elle constitue la composante antigénique immunodominante.
- M022L est la protéine majeure des EEV, composée de 371 AA pour une masse moléculaire de 41,5 kDa. Elle appartient à la famille des phospholipases.

Partie 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence une éventuelle protection clinique conférée par le peptide M2e d'un virus influenza A aviaire, contre épreuve avec virus influenza A hétérologue humain, chez la souris.

Le peptide M2e possède en effet une séquence aminoacide fortement conservée parmi les différentes souches grippales : son pouvoir protecteur vaccinal large spectre a été démontré dans différentes études. Cependant, ce peptide reste intrinsèquement peu immunogène lors d'infection naturelle, car faiblement accessible aux effecteurs du système immunitaire par sa situation au sein de l'enveloppe du virus influenza, masqué par les glycoprotéines HA et NA. Nous proposons donc de fusionner le peptide M2e à l'une des protéines d'enveloppe, M071L ou M022L, d'un virus myxomateux recombinant, afin de rendre M2e plus accessible aux effecteurs de l'immunité, donc plus immunogène, et de potentialiser ainsi son caractère protecteur large spectre.

La finalité de l'étude est d'étendre ces constructions vaccinales aux canards, réservoirs sauvages des IAV. En utilisant le caractère universel de M2e dans cette espèce, la diffusion intraspécifique, voire interspécifique, de différents IAV pourrait être endiguée.

1. Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

Nous proposons de suivre la réponse macroscopique après épreuve de souris inoculées avec des vaccins myxomateux recombinants : M071L-M2e et M2e-M022L, où M2e est la partie extracellulaire de la nucléoprotéine M2 du virus influenza A aviaire. Les animaux témoins n'ont reçu aucune injection.

1.1. Animaux

Trente souris de souche Balb/cJ, femelles, âgées de 5 semaines, nous ont été fournies par l'Élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France).

Les animaux sont répartis au hasard dans 6 cages différentes, à raison de 5 souris par cage, la distribution étant la suivante (cf. figure n°16):

- 2 cages de souris témoins.
- 2 cages de souris qui recevront 3 injections de 100µl (10^6 plaques formant unité ou pfu) de virus myxomateux M2e-M022L (J-21, J-14 et J-7 avant épreuve) par voie sous-cutanée (SC) ; nous appelons ces souris « M22 ».
- 2 cages recevront 3 injections de 100µl (10^6 pfu) de virus myxomateux M071L-M2e (J-21, J-14 et J-7) par voie SC ; ces souris seront appelées souris « M71 ».

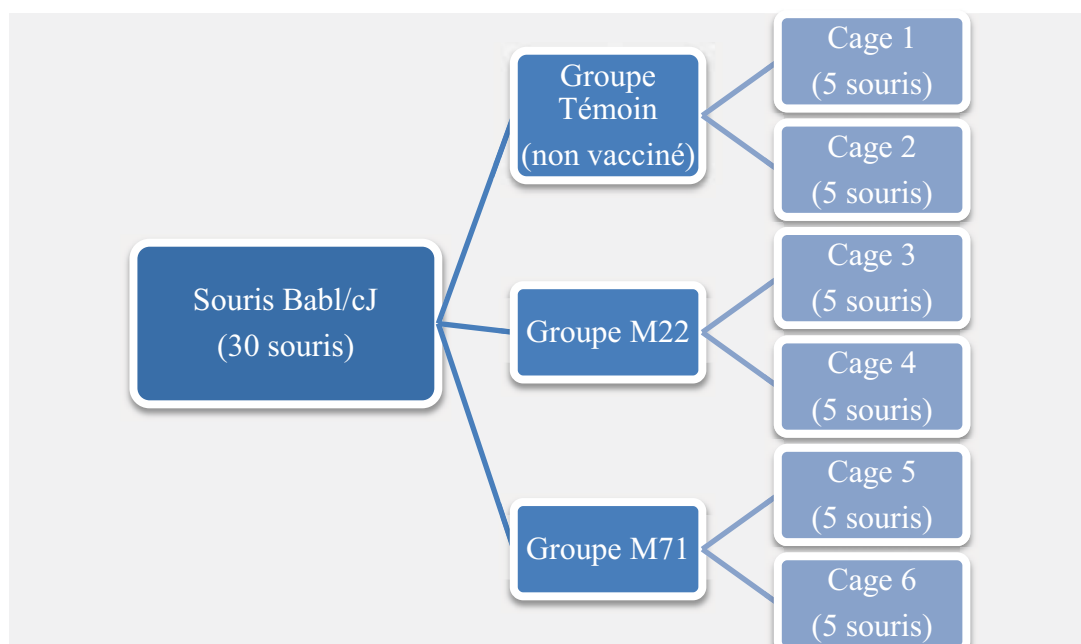


Figure n°16 : Récapitulatif de la répartition des souris lors de l'expérimentation.

Les souris bénéficient d'une semaine d'adaptation avant le début de l'expérimentation. Soumises à un cycle d'éclairage de 12 heures de lumière par jour, elles reçoivent une alimentation standard pour rongeurs et de l'eau distribuée dans des biberons.

1.2. Réactifs biologiques

1.2.1. Virus recombinants

Deux vaccins myxomateux recombinants intragéniques, décrits dans la partie I, sont testés dans cette étude. La souche myxomateuse T1 vectorielle est utilisée. La séquence M2e aviaire intégrée au virus myxomateux est SLLTEVETPTRNGWECKCNDSSD.

Nous obtenons ainsi les deux vaccins suivants :

- 1- Virus myxomateux recombinant M2e-M022L semi-purifié (titre : 7.10^7 pfu/ml ; 2ml), où M2e est accolé à la partie N-terminale de M022L.
- 2- Virus myxomateux recombinant M071L-M2e semi-purifié (titre : $6,75.10^8$ pfu/ml ; 2,4ml), où M2e est intégré de la même manière à M077L.

1.2.2. Virus Influenza utilisé lors de l'épreuve

Pour l'épreuve vaccinale, le virus PR8 est inoculé aux souris : le virus A/Puerto-Rico/8/34 (H1N1), naturellement résistant à l'amantadine (Castrucci et Kawaoka, 1995). Issue d'une souche humaine, ce virus PR8 dérive d'une souche adaptée à la souris. Sa séquence M2e est la suivante : SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD.

1.3. Protocole expérimental

1.3.1. Immunisation des souris

Les virus myxomateux recombinants sont dilués à la concentration de 10^7 pfu/ml : (en DMEM, sans sérum ni antibiotique) ; les souris des lots vaccinés (cages 3 à 6) recevront chacune 3 injections de 100µl (soit 10^6 pfu) de cette dilution du virus recombinant associé en voie sous-cutanée, à J-28, J-21, J-14 avant épreuve. Les souris témoins ne reçoivent aucune injection.

1.3.2. Epreuve virale au virus influenza de type A PR8

Une semaine après la dernière injection vaccinale - soit à J0 - toutes les souris sont anesthésiées par injection intramusculaire de 100µl d'un mélange [1 :1] kétamine (50mg/ml)-xylazine (20mg/ml) dilué extemporanément au 5^{ème} en PBS, soit 1 mg de kétamine et 0.4 mg de xylazine par souris.

Le virus utilisé pour l'épreuve est un virus Influenza A PR8 (lot RV2), faiblement pathogène pour l'homme, pathogène pour la souris. Il est dilué dans du PBS à la concentration $6,7 \cdot 10^4$ pfu/ml. Les souris anesthésiées reçoivent chacune 2000 pfu (soit 30 μ l de solution) du virus Influenza par injection intranasale. Elles sont également pesées et marquées au feutre de couleur afin d'assurer le suivi individuel au cours de l'expérience.

1.4. Suivi clinique & abattage des souris

Un suivi journalier est assuré pour chacune des souris après inoculation du virus grippal. Pesée, aspect du pelage, symptômes et temps de survie sont relevés, pour chacun des animaux, par le même observateur, sur un document standard d'enregistrement (schématisé par le tableau n°6). Les souris sont considérées comme mortes le jour de cette observation, et sont pesées également pour obtenir le « poids-mort ».

Cage n°	Pelage	Eternuement	Jetage	Poids	Remarques
Individu 1					
Individu 2					
Individu 3					
Individu 4					
Individu 5					

Tableau n° 6: Schématisation des grilles d'enregistrement journalier par cage et par jour d'observation. Une colonne « Remarques » permet de relever des symptômes originaux ou des observations ponctuelles faites par le manipulateur pour chaque individu.

1.4.1. Variables mesurées

- *Poids des souris*

Le poids, associé au taux de survie, est une mesure objective permettant d'évaluer la morbidité liée à l'infection par le virus Influenza (Sidwell et Smees, 2004). Chacune des souris est pesée à chaque journée d'observation avec la même balance. Lorsqu'une souris est retrouvée morte, nous la pesons, et cette mesure constituera le dernier poids mesuré, ou « poids-mort », qui sera utilisé pour les jours suivants dans les analyses statistiques : cela a pour effet de sous-estimer le poids moyen du groupe par rapport au poids des survivants, le poids-mort étant souvent plus faible que celui des survivants du même groupe.

- **Note clinique des souris**

Une note clinique subjective sur 8, basée sur les observations relevées quotidiennement, et donnée *a posteriori*, est attribuée à chacune des souris (cf. figure n°17):

_ **Aspect du pelage** noté de 0 à 4 (0 pour un pelage lisse et propre, 4 étant la note la plus sévère, pour un poil piqué, très ébouriffé, raréfié et sale).

_ **Jetage** noté de 0 à 2 (0 en cas d'absence de jetage, 1 en cas de présence de jetage séreux modéré, 2 en cas de présence de jetage plus conséquent avec prurit nasal plus marqué).

_ **Éternuement** noté de 0 à 2 (0 en cas d'absence, 1 en cas d'éternuement modéré, 2 en cas d'éternuement sévère).

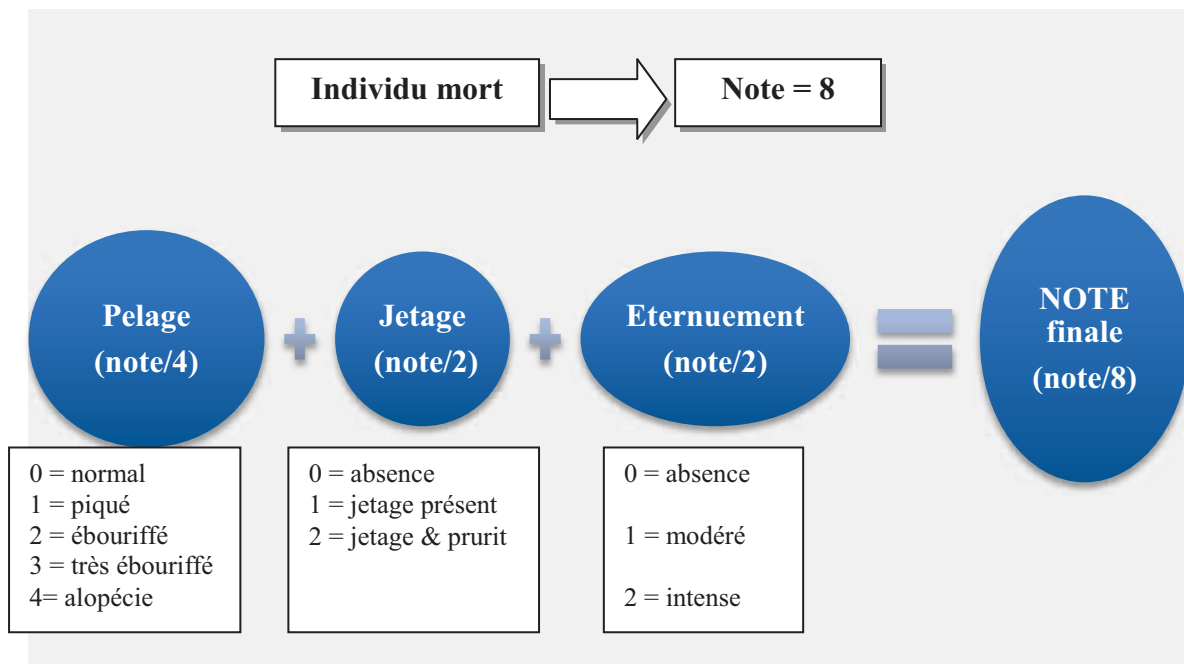


Figure n°17 : Synthèse des notes de pelage, de jetage et d'éternuement en une note clinique unique. Un individu retrouvé mort lors des observations obtient une note clinique maximale de 8.

Les observations relatives à la note clinique sont faites par un système de notation par croix dont dispose l'observateur en fonction de la sévérité des symptômes (aspect du pelage, jetage, éternuement) rencontrés au moment-même de l'expérimentation. Pour chaque nouvelle journée de relevés de données, l'observateur n'a pas accès aux notes accordées les jours précédents. La somme de ces 3 notes donne une note clinique finale sur 8 pour chaque individu vivant le jour de ces observations (cf. figure n°17). Un individu mort est pris en compte dans l'analyse : il reçoit la note maximale 8, ce qui surestime la note moyenne du groupe par rapport à la note des survivants (cf. figure n°17).

1.4.2. Abattage

Les souris survivant 30 jours après inoculation sont sacrifiées par dislocation des vertèbres cervicales. A la fin de l'expérience, les cages sont entièrement vidées (litière et aliment, éliminés dans une poubelle dédiée) puis décontaminées. Cadavres et déchets engendrés par l'expérience sont éliminés.

1.5. Calendrier des événements et manipulations

Le protocole expérimental est décrit chronologiquement dans le tableau n°7 ci-dessous.

Intervention	Date
Réception des souris	J-27 (17/04/08)
Inoculation de VM	J-21 (23/04/08)
Inoculation de VM	J-14 (30/04/08)
Inoculation de VM	J-7 (7/05/08)
Anesthésie	J 0 (14/05/08)
Inoculation de virus RV2	J 0 (14/05/08)
Pesée, marquage	J 0 (14/05/08)
Suivi clinique	J 0 à J 30 (du 14 au 15/06/08)

Tableau n°7 : Calendrier retraçant le protocole expérimental. VM=virusmyxomateux ; RV2=virus Influenza PR8 lot RV2 utilisé lors de l'épreuve.

1.6. Analyse des résultats

Un traitement statistique des résultats est nécessaire afin de déterminer les valeurs moyennes et les écart-types. Les courbes de survie de Kaplan-Meier et les tests du logrank associés sont réalisés à l'aide respectivement des logiciels Excel 2007® et MedCalc® (version 2009). Les logiciels Excel 2007® et XLSTAT 2009® permettent d'analyser l'influence de la vaccination sur le poids et la note clinique par la réalisation d'analyses de variance à mesures répétées (anova). Une probabilité (« *p-value* » ou « *p* ») inférieure à 0.05 est considérée comme significative.

2. Chapitre 2 : Résultats

2.1. Mortalité post-épreuve : le vaccin M071L-M2e ne protège pas contre l'épreuve létale, le vaccin M2e-M022L aggrave la mortalité des souris

Les courbes de survie de Kaplan-Meier sont illustrées dans la figure n°18 ci-dessous.

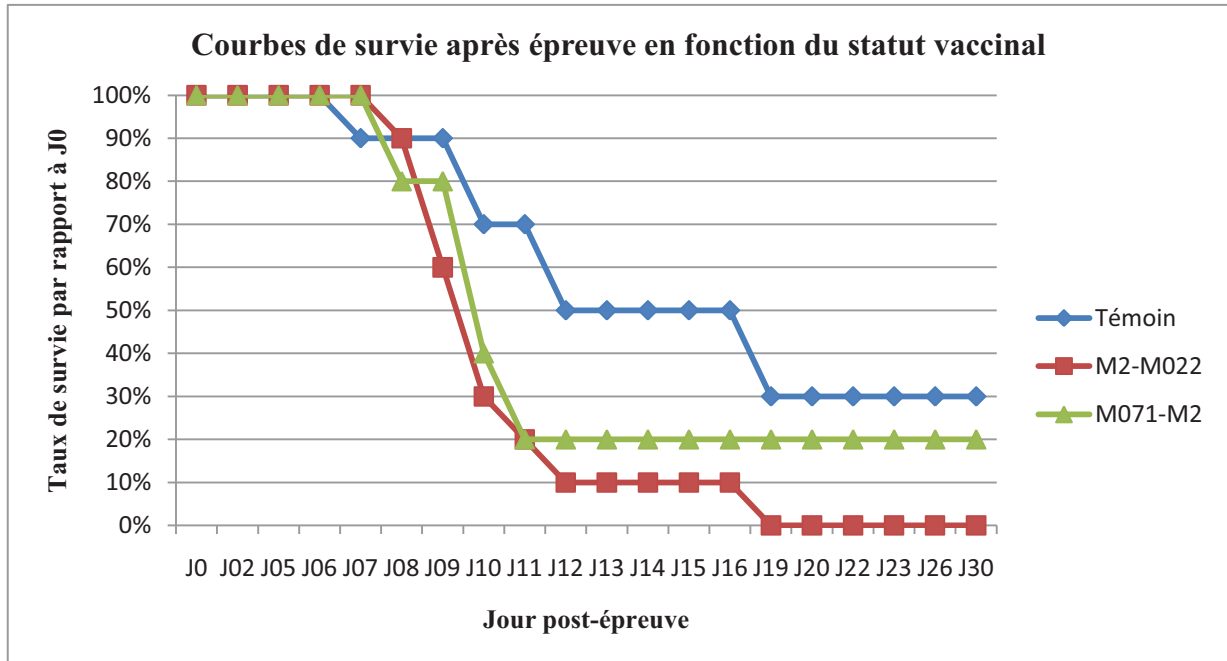


Figure n°18: Courbes de survie de Kaplan-Meier en fonction du statut vaccinal.

Le groupe témoin présente le taux de survie le plus grand à la fin de l'expérimentation, avec des morts plus retardées par rapport aux groupes vaccinés. Ces deux groupes présentent des courbes similaires jusqu'à J11, où le taux de survie de M22 devient le plus faible, jusqu'à devenir nul à J19. A la fin de l'expérience, alors que les souris témoins sont encore trois, le groupe témoin est composé de deux survivants. Il est intéressant de noter que le taux de survie du groupe M71 est invariable dans les 20 derniers jours de l'expérience. Seules les différences observées entre le groupe témoin et le groupe vacciné M22 sont significatives ($\text{Chi}^2=5,6010$; $\text{df}=1$; $p=0.018$) : la vaccination par M2e-M022L a un effet délétère sur l'espérance de vie. La comparaison entre le groupe témoin et le groupe M71 montre que les différences de survie ne sont pas significatives ($\text{Chi}^2=1.2597$; $\text{df}=1$; $p=0.2617$).

2.2. Mesures du Poids des souris

2.2.1. Les vaccins M071L-M2e et M2e-M022L n'inhibent pas la perte de poids

La figure n°19 ci-dessous présente l'évolution des poids des souris témoins (n'ayant reçu aucune injection), M22 (vaccinées avec le virus recombinant M2e-M022L) et M71 (vaccinées avec le virus recombinant M071L-M2e). Tous les individus morts sont pris en compte jusqu'à la fin de l'expérience, en prenant leur dernier poids mesuré (c'est-à-dire le « poids mort »).

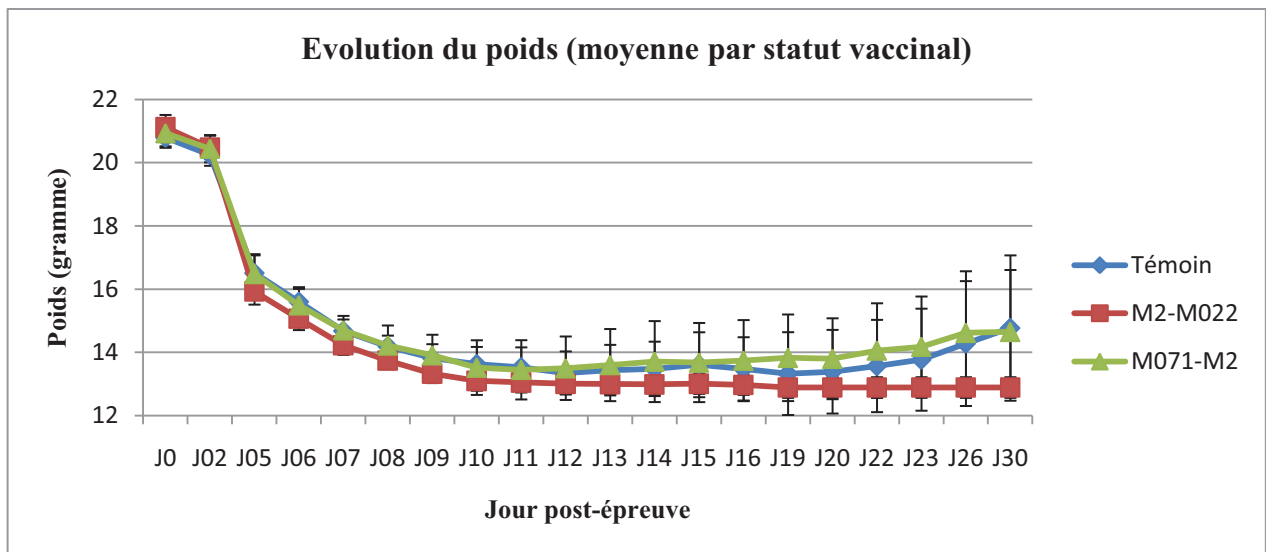


Figure n°19: Courbes décrivant l'évolution du poids de chaque groupe, prenant en compte les individus morts, après épreuve.

Nous observons une perte de poids généralisée à tous les groupes dès le 2^{ème} jour après inoculation du virus Influenza. Les 3 courbes suivent la même tendance jusque vers J19 où les groupes Témoin et M71 reprennent du poids, contrairement au groupe M22 – groupe alors constitué d'individus morts - dont le poids stagne. Les différences de poids observées par rapport au groupe témoin ne sont pas significatives ($p=0,595$). D'après l'anova, le vaccin M2e-M022L a un effet négatif (non significatif) sur le poids (-2 grammes), contrairement au vaccin M071L-M2e dont l'effet sur cette variable est nul (non significatif).

2.2.2. Les vaccins M071L-M2e et M2e-M022L n'améliorent pas le poids des survivants

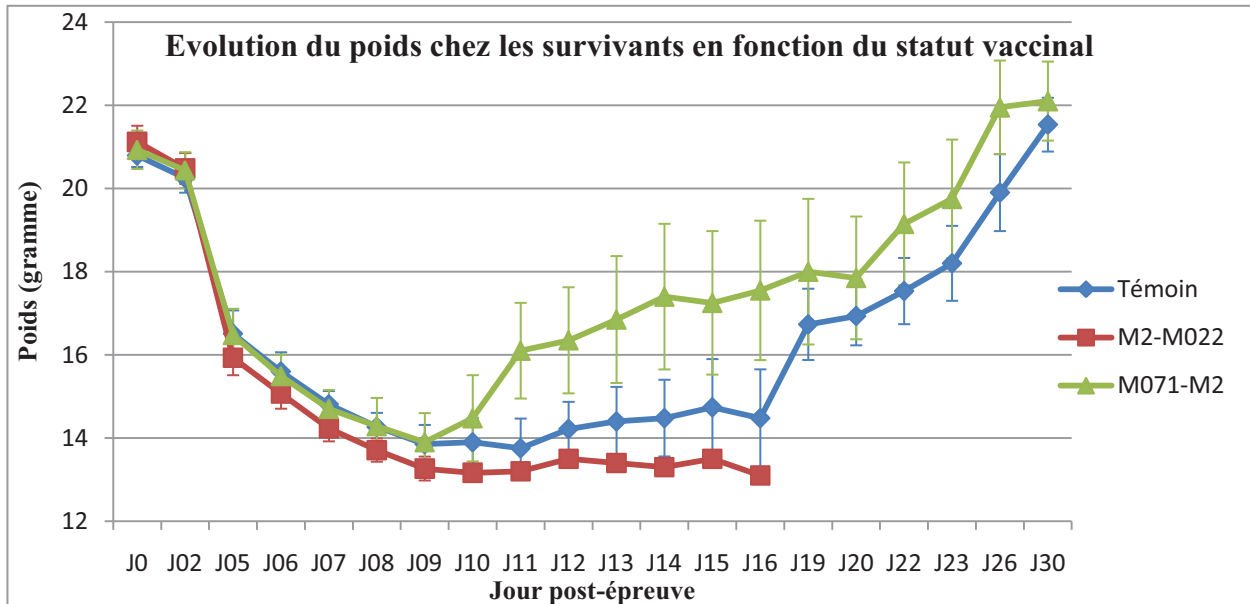


Figure n°20 : Graphique représentant l'évolution du poids des survivants pour chaque groupe, après épreuve.

Les courbes ci-dessus (figure n°20) décrivent l'évolution des moyennes des poids observés chez les survivants dans chaque groupe. Nous observons que le poids moyen du groupe vacciné M22 reste le plus faible jusqu'au jour J16. Si les mêmes tendances que précédemment sont observées pour les groupes témoin et M22 jusqu'à J19, le poids moyen du groupe M071, au contraire, augmente à partir de J10 avec des valeurs supérieures à celles des 2 autres groupes, pour atteindre la moyenne maximale à la fin de l'expérience, avec un poids moyen comparable à celui du groupe témoin.

L'anova montre que ces différences ne sont pas significatives : en effet, il n'y a pas d'effet vaccin significatif ($p=0.310$), bien que cette analyse montre que le vaccin M2e-M022L a un effet négatif sur le poids (-2.897 grammes) par rapport au groupe témoin, alors que le vaccin M071L-M2e a un effet bénéfique sur le poids (+0.722 grammes).

2.3. Mesures des Notes cliniques des souris

2.3.1. Les vaccins M071L-M2e et M2e-M022L n'inhibent pas les symptômes liés à l'infection

Les courbes représentent ci-dessous (figure n°21) l'évolution des notes cliniques accordées à chacun des trois groupes au cours de l'étude.

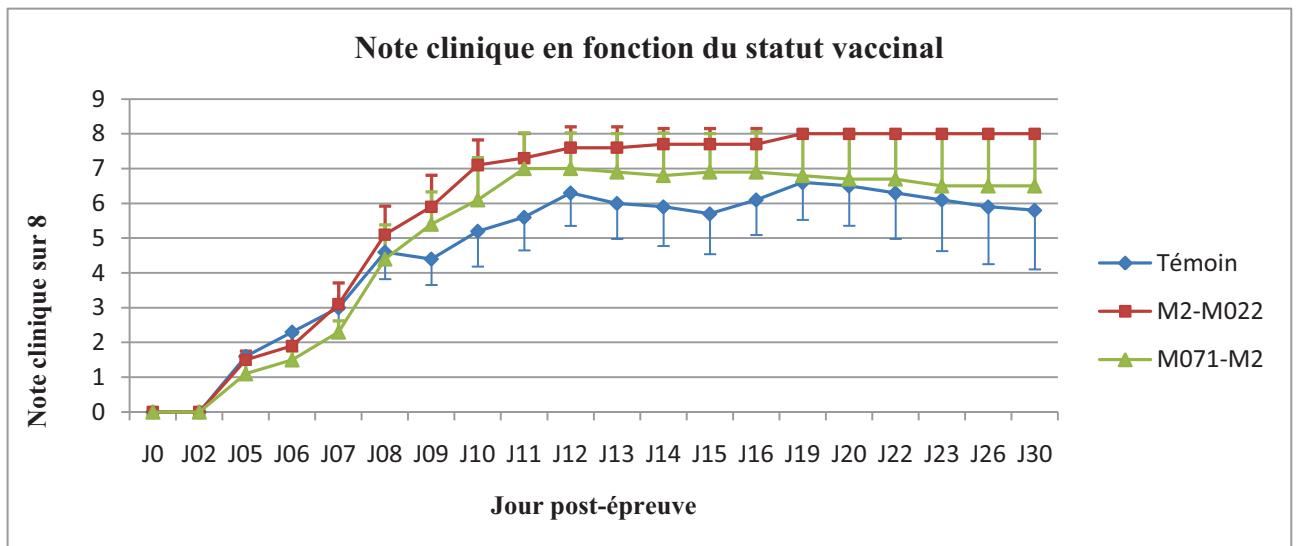


Figure n°21 : Evolution des notes cliniques moyennes de chaque groupe, en prenant en compte les individus morts (note 8 sur 8 pour ces derniers).

Les premiers symptômes – jetage, éternuement, poil piqué – apparaissent après le deuxième jour qui suit l'inoculation du virus Influenza. Si les notes cliniques moyennes de chaque groupe paraissent dans les mêmes valeurs pendant les 9 premiers jours d'observation, avec des symptômes moins prononcés pour le groupe vacciné par M071L-M2e pendant cette période, ces observations s'estompent nettement à partir du dixième jour d'observation (J09). En effet, à partir de cette date et jusqu'à la fin de l'expérience, le groupe témoin est celui qui a la note clinique moyenne la plus faible, alors que le groupe M2e-M022L a la note clinique moyenne la plus prononcée.

L'anova montre que, si les deux vaccins ont un effet négatif sur la note clinique par rapport au groupe témoin (effet deux fois plus important pour le vaccin M2e-M022L), cet effet de la vaccination n'est pas significatif ($p=0,168$).

2.3.2. Le vaccin M2e-M022L n'a pas d'effet sur la guérison clinique contrairement au vaccin M071L-M2e

Les variations des notes cliniques des survivants de chaque groupe sont décrites dans la figure n°22 ci-dessous.

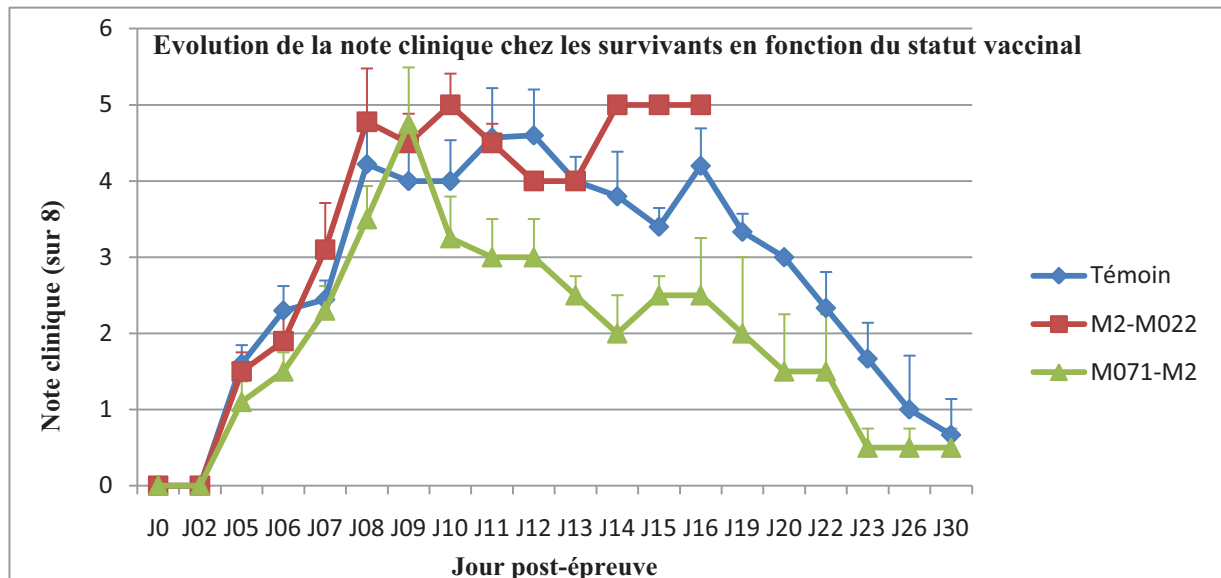


Figure n°22 : Graphique décrivant l'évolution des notes cliniques moyennes des survivants, après épreuve.

Les notes cliniques moyennes de chacun des groupes sont dans les mêmes valeurs pendant les 9 premiers jours de l'expérience. A partir de J09, le groupe M71 présente une note moyenne toujours inférieure aux deux groupes et ce, jusqu'à la fin de l'expérience. Le groupe témoin s'éloigne du groupe M22 à partir de J14 pour se rapprocher progressivement des valeurs cliniques du groupe M71 qui présente, en moyenne, le moins de symptômes (jetage, éternuement, poil piqué).

L'anova montre que le temps écoulé ($p < 0.0001$) et la vaccination ($p = 0.01$) ont chacun un effet significatif sur le poids au cours de l'expérience, le temps ayant l'effet le plus important.

2.4. Autres observations sur la morbidité post-épreuve

Lors du suivi journalier, d'autres symptômes, hormis ceux mis en valeur dans la note clinique, ont été observés (cf. tableau n°8): abattement (tête baissée, peu de réactions de défense lors des manipulations), dyspnée, paralysie/parésie apparente, syndrome vestibulaire agonique (un seul relevé dans le groupe M22), alopecie dorsale (deux relevés sur le même individu du groupe témoin). Tous ces symptômes ont été observés chez des individus montrant poil piqué, jetage et/ou éternuement.

Symptômes ou Mort	Témoin	M22	M71
<i>PEJ+abattement seul</i>	15	12	8
<i>PEJ+dyspnée</i>	4	4	1
<i>PEJ+paralysie/parésie</i>	4	0	1
<i>PEJ+alopécie dorsale</i>	2	0	0
<i>PEJ+syndrome vestibulaire agonique</i>	0	1	1
<i>Mort</i>	76	124	106

Tableau n° 8: Nombre de relevés pour chacun des symptômes observés au cours de l'expérience. PEJ=pelage piqué+/-éternuement+/-jetage, relatif à la note clinique sur 8.

Si le nombre de ces symptômes paraît plus important dans le groupe témoin, c'est avant tout dû au fait qu'il y a eu plus de survivants dans ce groupe. En revanche, le groupe M22 présente un nombre de symptômes supérieurs à celui du groupe M71 alors qu'il est le groupe où le relevé de l'événement « mort » est le plus important. Deux individus ont présenté un syndrome vestibulaire (parmi les groupes M22 et M71) : ce type de symptômes n'est pas rare lors d'infection naturelle chez l'homme (surdité, vertige, syndrome vestibulaire, syndrome de Guillain-Barré, encéphalite, myélite) ou expérimentale chez les animaux (encéphalite, syndrome vestibulaire) ; il est probablement lié dans notre étude au virus PR8 et non au vaccin (Toovey, 2008 ; Aronsson et al, 2003 ; Park et al, 2002).

L'infection se localisant principalement aux muqueuses respiratoires nasales, certaines souches H1N1 du virus influenza A responsables de la grippe saisonnière peuvent gagner les neurones de l'olfaction jusqu'aux bulbes olfactifs par transport antérograde (Aronsson et al, 2003) chez la souris infectée expérimentalement. Les symptômes neurologiques pourraient s'expliquer par l'absence de lymphocytes T et B dans le cerveau (Aronsson et al, 2003).

Bilan des Résultats Expérimentaux

Le vaccin M2e-M022L a un effet négatif significatif sur l'espérance de vie par rapport au témoin, alors que M071L-M2e ne modifie pas significativement l'espérance de vie.

M2e-M022L et M071L-M2e n'ont pas d'effet significatif sur le poids mesuré, variable plus objective que la note clinique PEJ, par rapport au groupe témoin.

Si nous ne prenons en compte que les individus survivants, le vaccin M071L-M2e a un effet significatif bénéfique sur l'aspect du poil, le jetage et l'éternuement. Cependant, nous surestimons ainsi l'effet bénéfique du vaccin M071L-M2e, puisque les individus morts ont la note clinique maximale. Le vaccin M2e- M022L n'a pas d'effet significatif sur la note clinique.

Par ces observations, nous pouvons conclure que les vaccins M2e-M022L et M071L-M2e n'ont pas d'effet protecteur contre l'infection au virus PR8.

DISCUSSION

Les vaccins myxomateux recombinants évalués dans la présente étude n'induisent pas la protection attendue lorsque les souris vaccinées sont soumises à une épreuve hétérologue par un virus Influenza A (PR8 lot RV2). Si les symptômes ne sont pas diminués, l'un des groupes vaccinés présente au contraire un effet délétère significatif sur l'espérance de vie, où aucun individu ne survit au-delà de 20 jours après épreuve, contrairement au groupe témoin et à l'autre groupe vacciné (lui-même constitué à la fin de l'expérience d'un unique survivant, face à 2 souris du groupe « contrôle »). Les vaccins myxomateux recombinants exprimant M2e aviaire ne confèrent aucune protection après épreuve chez la souris, tant en terme de survie que de symptômes cliniques. L'objectif de cette étude était de valider la protection vaccinale sur le modèle souris afin d'étendre ce protocole vaccinale au canard, cible vaccinale. Quels sont les raisons de cet échec ?

1. Effet délétère & utilisation de M2

A notre connaissance, une étude a décrit, de la même manière que nos résultats peuvent le suggérer, que la vaccination contre M2e peut exacerber la morbidité et la mortalité induite par une infection par un virus Influenza : Heinen et coll. montrent en effet que la présence d'anticorps anti-M2e et anti-NP, associée à une réponse immunitaire médiée par cellules induite par NP et M2e, en l'absence d'anticorps anti-HA et anti-NA, n'assure pas de protection contre épreuve à virus influenza porcine chez le porc, et aggrave les symptômes de la maladie (Heinen et al, 2002). Une aggravation des symptômes est également observée chez les porcs vaccinés avec un virus influenza porcine H1N1 inactivé contre épreuve à virus influenza porcine H1N2 (Vincent et al, 2007).

Ilyinski et coll. suggèrent que la cytotoxicité induite par la protéine M2 pourrait contribuer négativement à l'efficacité de vaccins recombinants et/ou atténués et pourrait expliquer « l'immunogénicité insuffisante de M2 » décrite par certains auteurs: l'utilisation d'un plasmide exprimant la totalité du peptide M2 associé à un vaccin ADN basé sur NP réduit en effet le taux de survie des souris vaccinés après épreuve, alors que la vaccination ADN basée sur une construction multigénique NP-M1-M2-NS1 (où le peptide M2 complet est cette fois lié à ces autres peptides) n'est pas cytotoxique *in vitro* et procure même un effet protecteur bénéfique supérieur à la même construction sans M2 (NP-M1-NS1); la cytotoxicité serait due au domaine transmembranaire de M2, alors que M2e serait un moyen de diminuer cette cytotoxicité (Ilyinski et al, 2007 ; Ilyinski et al, 2008). Les vaccins

recombinants utilisés dans notre étude n'expriment cependant que le domaine externe de M2 : nos résultats seraient donc liés à une mauvaise immunogénicité vaccinale plutôt qu'à une toxicité de M2e.

Comme le suggèrent ainsi ces études (Heinen et al, 2002 ; Ilyinski et al, 2007 ; Ilyinski et al, 2008), s'il ne faut pas éliminer M2e de la vaccination, l'utilisation de M2 comme cible vaccinale doit être faite avec grande précaution, en tentant de déterminer quels sont les mécanismes qui peuvent expliquer ces observations chez la souris comme chez le porc : type de vaccin, réponse humorale/cellulaire, animal cible ?

2. Virus myxomateux : bon choix chez la souris ?

Les virus myxomateux ont un tropisme d'hôte restreint aux Léporidés : la vaccination de la présente étude avait pour but de faciliter la présentation du peptide M2e au système immunitaire des souris en « accolant » ce peptide à une des protéines de membrane du VM, M022L ou M071L. Le VM de la souche T1 n'est pas répliquatif chez la souris (Okeke et al, 2006): la dose M2e présentée au système immunitaire est donc probablement proche de celle injectée aux souris. Cette dose était-elle suffisante pour assurer une immunité efficace et donc une protection contre épreuve ?

Si le VM n'est pas répliquatif, il l'a probablement été à l'échelle cellulaire, ou bien le cycle a pu être initié avant d'être avorté. Or, les poxvirus expriment précocement un grand nombre de protéines immunomodulatrices classées en 3 groupes : les protéines virofuratives (dont la stratégie est de masquer les signaux visibles de l'infection afin de réduire l'efficacité des réponses immunitaires cellulaires), les virotransducteurs (qui agissent dans le milieu intracellulaire afin d'inhiber les voies antivirales innées, et qui sont responsables de la spécificité d'hôte), et les viromimétiques (qui sont des protéines codées par le virus mimant les cytokines de l'hôte et leurs récepteurs, bloquant ainsi les signaux de communication extracellulaire, créant un microenvironnement protégé dans les tissus exposés) (Johnston et McFadden, 2004 ; Nash et al, 1999). La souche VM T1 de notre étude n'étant pas atténuée, ces protéines ont pu ainsi jouer un rôle en inhibant l'immunité des souris, et limitant ainsi la protection clinique vaccinale conférée aux souris.

3. Absence de placebo : stress et vaccination

Dans notre protocole d'immunisation, les souris vaccinées reçoivent toutes les semaines, pendant trois semaines, trois injections du vaccin qui leur est destiné. Ensuite,

souris vaccinées et souris témoins sont soumises à une anesthésie nécessaire à l'inoculation du virus Influenza. Les souris témoins n'ont pas été manipulées avant le protocole d'infection par le virus PR8 : elles n'ont pas reçu d'injection placebo. Le stress chronique est connu pour exposer l'organisme aux glucocorticoïdes endogènes aux effets immunosuppresseurs, potentiellement délétères pour l'immunité cutanée médiée par les cellules (Dhabhar et McEwen, 1999). En revanche, un stress aigu aurait un effet positif sur cette immunité par l'action physiologique de l'adrénaline et de la corticostérone (Dhabhar et McEwen, 1999) : un tel stress quelques heures avant une vaccination sous-cutanée pourrait augmenter la mémoire immunologique à long terme, favorisant l'action du système immunitaire lors de la réexposition à l'antigène et ainsi améliorant la protection vaccinale (Dhabhar et Kavitha, 2005). Toutes les souris de notre étude ont été soumises au même stress chronique post-épreuve : la différence (non significative) des taux de survie entre souris témoins et vaccinées pourraient-elles s'expliquer par la présence d'un stress (lié à la manipulation) lors des injections vaccinales, que les souris témoins n'auraient pas perçues ? Les injections sous-cutanées ont été répétées 3 fois à une semaine d'intervalle, pendant des manipulations de quelques heures : il serait plus probable d'associer ce stress à un stress aigu répétable, qui aurait pu alors renforcer l'immunité cutanée des souris vaccinées. Nous pouvons donc avancer que l'absence de protection vaccinale est probablement indépendante du stress pré-épreuve, ou bien que l'épreuve virale a été réalisée précocement aux effets bénéfiques qu'aurait pu fournir ce stress en potentialisant la vaccination.

4. Protocole d'immunisation

Les souris sont, dans notre étude, vaccinées par voie sous-cutanée, alors qu'elles sont soumises à l'épreuve par inoculation intranasale. Or, la vaccination intranasale est particulièrement indiquée pour les pathogènes respiratoires tel que l'IAV, qui débute l'infection au niveau des muqueuses des voies respiratoires supérieures (Mozdzanowska et al, 2003 ; Mozdzanowska et al, 2007). L'administration intranasale de vaccins a plusieurs avantages, notamment pour les campagnes de vaccination de masse, où la contamination croisée de pathogènes peut avoir lieu lors d'injection parentérale et/ou de réutilisation accidentelle d'aiguille (Fiers et al, 2009) ; l'utilisation de tels « aérosols vaccinaux » est de plus pratique pour la vaccination de groupes d'animaux. La vaccination M2e intranasale avec adjuvant paraît être particulièrement intéressant en prodiguant une immunité mucosale forte, supérieure à une même vaccination par voie sous-cutanée (Mozdzanowska et al, 2003 ; Mozdzanowska et al, 2007).

Notre étude utilise une séquence M2e vaccinale aviaire « hétérologue » à celle du virus d'épreuve PR8. Or, aucune étude n'a démontré de protection contre des épreuves à virus M2e différent véritablement de l'antigène immunisant, à l'exception de Tompkins et coll. (2007). Ces différentes études ont évalué le potentiel vaccinal de M2e : elles rapportent différents résultats qui peuvent refléter la méthode de délivrance de M2e et la présentation de cet antigène au système immunitaire ; si M2e natif est peu immunogène, cette immunogénicité peut être augmentée par l'utilisation de forme multimérique, ou par la combinaison d'adjuvants complexes et/ou de voie d'administration (De Filette et al, 2005 ; Fan et al, 2004 ; Fiers et al, 2004 ; Liu et al, 2004b ; Mozdzanowska et al, 2003 ; Neiryck et al, 1999 ; Okuda et al, 2001 ; Watabe et al, 2001). Les études utilisant des peptides synthétiques associés à M2 montrent que l'immunogénicité induite nécessite l'utilisation d'adjuvants complexes ou de porteurs tels que la protéine du core viral de l'hépatite B (De Filette et al, 2005 ; Neiryck et al, 1999 ;) ou le complexe protéique de membrane de *Neisseria meningitidis* (Fan et al, 2004). La fusion de la protéine du core viral du virus de l'hépatite B à la protéine M2e confère 90 à 100% de protection chez la souris contre épreuve létale (Neiryck et al, 1999). L'immunité protectrice conférée par M2e est pourtant large spectre selon certains auteurs (Fan et al, 2004 ; Mozdzanowska et al, 2003 ; Neiryck et al, 1999 ; Slepushkin et al, 1995). Les différences dans les séquences aminoacides des M2e du vaccin recombinant et la souche utilisée pour l'épreuve pourraient par exemple expliquer le manque de protection observé dans une étude de la protection induite par une vaccination avec M2e chez le porc (Heinen et al, 2002). Six résidus AA différaient alors entre la séquence M2e humaine utilisée dans le vaccin et la séquence M2e du virus influenza porcin utilisé pour l'épreuve. Cependant, deux jours après l'épreuve avec une souche hétérologue, les porcs vaccinés souffraient moins de la fièvre que les porcs témoins (Heinen et al, 2002).

Les résultats décrits dans la thèse de Mademoiselle Delamare Marie (2010) nous montrent que les vaccins utilisés n'ont induit chez la souris qu'une immunité contre le vecteur myxomateux, et non contre le peptide M2e, expliquant l'absence de protection vaccinale contre épreuve grippale (Delamare, 2010)..

CONCLUSION

Les virus influenza de type A ont une importance majeure en terme de santé publique et animale, leurs caractéristiques leur ouvrant un large spectre d'hôte avec parfois des transmissions interspécifiques. L'homme, les élevages aviaires et porcins font partie des acteurs les plus importants.

Dans cette étude, nous avons utilisé des vaccins myxomateux recombinants intragéniques, issus de la souche myxomateuse T1, exprimant le peptide M2e aviaire associée à l'une des protéines de surface du VM, M071L ou M022L : en étudiant la protection conférée par ces vaccins dans le modèle murin, l'objectif final était de développer ces vaccins au canard. Ces vaccins ne montrent aucun effet protecteur clinique chez la souris contre le virus PR8, mis à part une récupération clinique plus rapide des survivants vaccinés par le vaccin M071L-M2e. De plus, les résultats de l'étude décrite dans la thèse de Mlle Marie Delamare (2010) indiquent que ces vaccins n'induisent pas d'immunité cellulaire spécifique dirigée contre le peptide M2e (Delamare, 2010).

L'utilisation d'une souche SG33 du VM, souche vaccinale comportant entre autres une délétion du gène immunomodulateur MV-LAP (Guérin et al, 2002), combinée au peptide M2e du virus PR8, a été testée chez la souris (résultats exposés dans la thèse de Monsieur Boyer Guillaume en 2010) : aucune protection clinique n'est observée (Boyer, 2010). Les résultats de l'activation cellulaire sont en cours d'analyse.

La comparaison avec d'autres protocoles vaccinaux de la littérature montre cependant que l'ajout d'adjuvant, l'utilisation de constructions vaccinales différentes (tels que les peptides multiples...) ou une voie d'administration différente (notamment mucosale) peuvent favoriser la protection immunitaire conférée par le peptide M2e.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mr Kevin, Germain, Etienne ORTION-CORONIS
a été admis(e) sur concours en : 2005
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 17 Juillet 2009 ALFORT
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

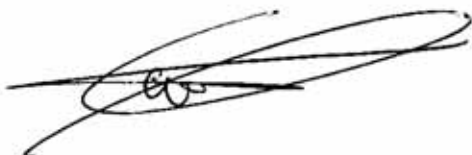
AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Mr Kevin, Germain, Etienne ORTION-CORONIS
intitulée :

« Vaccination par des virus myxomateux recombinants exprimant un épitope du virus Influenza A aviaire : *Etude de la protection après épreuve chez la souris.* »

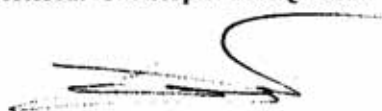
Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Christelle CAMUS



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



Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu le 13 DEC. 2010
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER



BIBLIOGRAPHIE

- *AKIRA, S., TAKEDA, K., KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.*, 2001, **2**, 675-680.
- *ALBERT, M.L., SAUTER, B., BHARDJAW, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 1998, **392**, 86-89.
- *ALEXANDER D.J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 2000, **74**, 3-13.
- *ARONSSON, F., ROBERTSON, B., LJUNGGREN, H.G., *et al.* Invasion and persistence of the neuroadapted influenza virus A/WSN/33 in the mouse olfactory system. *Viral Immunol.*, 2003, **16**, 415-513.
- *BARCENA, J., MORALES, M., VASQUEZ, B., *et al.* Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *J. Virol.*, 2000, **74**, 1114-1123.
- *BARNARD, D.L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, 2009, **82**, A110-A122.
- *BERTAGNOLI, S., GELFI, J., Le GALL, G., *et al.* Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.*, 1996, **70**, 5061-5066.
- *BETAKOVA, T. M2 Protein – A Proton Channel of Influenza A Virus. *Current Pharmaceutical Design*, 2007, **13**, 31, 3231-3235.
- *BLACK R.A., ROTA P.A., GORODKOVA N., *et al.* Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.*, 1993, **74**, 1, 143-146
- *BOUVIER, N.M., PALESE, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 2008, **26S**, D49-D53.
- *BOYER, G. Vaccination contre la souche influenza PR8 à l'aide d'un vaccin recombinant SG33-M2e. *Thèse d'exercice vétérinaire*, Microbiologie, Toulouse 3, 2010. 72 p.
- *BUBLLOT, M., PRITCHARD, N., SWAYNE, D.E., *et al.* Development and Use of Fowlpox Vected Vaccines for Avian Influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, **1081**, 193-201.
- *BUCHER, D.J., KHARITONENKOV, I.G., ZAKOMIRDIN, J.A., *et al.* Incorporation of influenza virus M-protein into liposomes. *J. Virol.*, 1980, **36**, 586-590.
- *BÜCHEN-OSMOND, C. (Page consultée le 11 juillet 2010). Site de l'ICTVdb, The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses, version 4, [en ligne]. Adresse URL : <http://www.ictvdb.org/>
- *BUI, M., WILLS, E.G., HELENIUS, A., *et al.* Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virol.*, 2000, **74**, 1781-1786.

- *BUKRINSKAYA, A.G., VORKUNOVA, N.D., KORNILAYEVA, G.V., *et al.* Influenza virus uncoating in infected cells and effect of rimantadine. *J.Gen.Virol.*, 1982, **60**, 49-59.
- *BULLOUGH, P. A., HUGHSON, F. M., SKEHEL, J. J., *et al.* The structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature (London)*, 1994, **371**, 37-43.
- *CAMERON C., HOTA-MITCHELL S., CHEN L., *et al.* The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus. *Virology*, 1999, **264**, 2, 298-318.
- *CAPUA I., MUTINELLI F. Low pathogenicity (LPAI) and highly pathogenic (HPAI) avian influenza in turkeys and chicken. *In*: CAPUA, I., MUTINELLI, F. (eds.), *A Colour Atlas and Text on Avian Influenza*, Papi Editore, Bologna, 2001, 13-20.
- *CARDONA, C.J., ZHENG, X., SANDROCK, C.E., *et al.* Avian influenza in birds and mammals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, **32**, 4, 255-273.
- *CARTER, G.C., RODGER, G., MURPHY, B.J., *et al.* Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J.Gen.Virol.*, 2003, **84**, 2443-2458.
- *CASTRUCCI, M.R., HUGHES, M., CALZOLETTI, L., *et al.* The cysteine residues of the M2 protein are not required for influenza A virus replication. *Virology*, 1997, **238**, 128-134.
- *CASTRUCCI, M.R., KAWAOKA, Y. Reverse genetics system for generation of an influenza A virus mutant containing a deletion of the carboxylterminal residue of M2 protein. *J. Virol.*, 1995, **69**, 2725-2728.
- *CHEN, W., CALVO, P.A., MALIDE, D. *et al.* A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.*, 2001, **7**, 12, 1306-1312.
- *CIAMPOR, F., BAYLEY, P.M., NERMUT, M.V., *et al.* Evidence that the amantadine-induced, M2-mediated conservation of influenza A virus hemagglutinin to the low pH conformation occurs in an acidic trans Golgi compartment. *Virology*, 1992, **188**, 14-24.
- *CLAAS, E.C., OSTERHAUS, A.D., van BEEK, R., *et al.* Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 1998, **351**, 9101, 472-477.
- *CLEAVELAND, S., MESLIN, F.X., BREIMAN, R. Dogs can play useful role as a sentinel hosts for disease. *Nature*, 2006, **440**, p 605.
- *COMPANS, R.W., KLENK, H.D., CALIGUIRI, L.A., *et al.* Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology*, 1970, **42**, 880-889.
- *COX, N.J., SUBBARAO, K. Influenza. *Lancet*, 1999, **354**, 1277-1282.
- *CROS, J., PALESE, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: Influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.*, 2003, **95**, 1-2, 3-12.
- *DANIELS, R. S., DOWNIE, J. C., HAY, A. J., *et al.* Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell*, 1985, **40**, 431-439.

- *DAVID, A.S. Genetics of influenza viruses. *Annu. Rev. Genet.*, 2002, **36**, 305–332.
- *De FILETTE, M., FIERS, W., MARTENS, W. *et al.* Improved design and intranasal delivery of an M2-based human influenza A vaccine. *Vaccine*, 2006, **24**, 6597-6601.
- *De FILETTE M., MIN JOU, W., BIRKETT, A. *et al.* Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*, 2005, **337**, 149-161.
- *DELAMARE, M. Caractérisation de la réponse immunitaire cellulaire induite par les vaccins recombinants T1-M2e-M022L et T1-M071L-M2e dans un modèle souris. *Thèse d'exercice vétérinaire*, Microbiologie, Toulouse 3, 2010, 112 p.
- *DHABHAR, F.S., KAVITHA, V. Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, **289**, R738–R744.
- *DHABHAR, F.S., McEWEN, B.S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 1059–1064.
- *DOHERTY, P. C., CHRISTENSEN, J. P. Accessing complexity: the dynamics of virus specific T cell responses. *A. Rev. Immunol.*, 2000, **18**, 561-592.
- *DOLIN, R., REICHMANN, R.C., MADORE, H.P., *et al.* A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *New Engl. J. Med.*, 1982, **307**, 580-584.
- *DRAKE, J. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, **90**, 9, 4171–4175.
- *DWORETZKY, S.I., FELDHERR, C.M. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.*, 1988, **106**, 575-584.
- *ELBERS, A., KOCH, G., BOUMA, A. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. *Avian Pathol*, 2005, **34**, 3, 181–7.
- *ENAMI, M., LUYTJES, W., KRYSTAL, M., *et al.* Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, **87**, 3802-3805.
- *EPSTEIN, S.L., STACK, A., MISPLON, J.A., *et al.* Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8(+) cytotoxic T lymphocytes: either CD4(+) or CD8(+) T cells can promote survival and recovery after challenge. *Int. Immunol.*, 2000, **12**, 91–101.
- *EPSTEIN, S.L., TUMPEY, T.M., MISPLON, J.A., *et al.* DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, **8**, 796–801.

- *EPSTEIN, S.L., MISPLON, J.A., LAWSON, C.M., *et al.* Beta 2-microglobulin-deficient mice can be protected against influenza A infection by vaccination with vaccinia-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuraminidase. *J. Immunol.*, 1993, **150**, 12, 5484–5493.
- *ERNST, W.A., KIM, H.J., TUMPEY, T.M., *et al.* Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine*, 2006, **24**, 24, 5158–5168.
- *FAN, J., LIANG, X., HORTON, M.S., *et al.* Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*, 2004, **22**, 2993–3003.
- *FAUQUET, C. M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., *et al.* Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Oxford, UK: *Elsevier Academic Press*, 2005. 1162 p.
- *FENG, J., ZHANG, M., MOZDZANOWSKA, K., *et al.* Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Viol. J.*, 2006, **3**, 102.
- *FENNER, F. Poxviruses. *Field Virology*, Third Edition, 1996, **84**, 2673-2699.
- *FENNER, F., RATCLIFFE, F.N. Myxomatosis. Cambridge, UK: *Cambridge Univ. press*, 1965. 1-9.
- *FIERS, W., De FILETTE, M., BIRKETT, A. *et al.* A « universal » human influenza A vaccine. *Virus Research*, 2004, **103**, 173-176.
- *FIERS W., DE FILETTE M., EL BAKKOURI K., *et al.* M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*, 2009, **27**, 45, 6280-6283.
- *FODOR, E., DEVENISH, L., ENGELHARDT, O.G., *et al.* Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J.Virol.*, 1999, **73**, 9679-9682.
- *FOUCHIER, R.A., MUNSTER, V, WALLENSTEN, A. *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.*, 2005, **79**, 2814-2822.
- *FOUCHIER, R.A., SCHNEEBERGER, F.W., ROZENDAAL, J.M., *et al.* Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, **101**, 1356-1361.
- *FRACE, A.M., KLIMOV, A.I., ROWE, T., *et al.* Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus. *Vaccine*, 1999, **7**, 2237-2244.
- *FUJIMOTO, I., PAN, J., TAKIZAWA, T., *et al.* Virus clearance through apoptosis-dependent phagocytosis of influenza A virus-infected cells by macrophage. *J.Virol.*, 2000, **74**, 3399-3403.
- *GAMBLIN, S.J., HAIRE, L.F., RUSSELL R.J., *et al.* The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*. 2004, **303**, 1838-1842.

- *GARCIA-SASTRE, A., DURBIN, R.K., ZHENG, H., *et al.* The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J. Virol.*, 1998, **72**, 11, 8550-8558.
- *GHEDIN, E., SENGAMALAY, N., SHUMWAY, M., *et al.* Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature*, 2005, **437**, 7062, 1162-1166.
- *GLUECK, R. Review of intranasal influenza vaccine. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2001, **51**, 203-211.
- *GRAMBAS, S., HAY, A.J. Maturation of influenza A virus hemagglutinin: estimates of the pH encountered during transport and its regulation by the M2 protein. *Virology*, 1992, **190**, 11-18.
- *GUERIN, J. L., GELFI, J., BOULLIER, S., *et al.* Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *J. Virol.*, 2002, **76**, 2912–2923.
- *GUINEA, R., CARRASCO, L. Influenza virus M2 protein modifies membrane permeability in *E. coli* cells. *FEBS Lett.*, 1994, **343**, 242-246.
- *HAY A., GREGORY V., DOUGLAS A., *et al.* The evolution of human influenza viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2001, **356**, 1416, 1861-1870.
- *HAY, A.J. (1989). The mechanism of action of amantadine and rimantadine against influenza viruses. *In*: NOTKINS, A.L., OLDSTONE, M.B.A. (eds). *Concepts in Viral Pathogenesis III*. New York: *Springer-Verlag*, 1989, 561-567.
- *HAY, A.J., WOLSENTHOLME, A.J., SKEHEL, J.J., *et al.* The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.*, 1985, **4**, 3021-3024.
- *HAY, A.J., ZAMBON, M.C. Multiple actions of amantadine against influenza viruses. *In*: Y.BECKER (ed.). *Antiviral drugs and interferon: the molecular basis of their activity*. Boston, Massachusetts, USA: *Martinus Nijhoff Publishing*, 1984, 301-315.
- *HEINEN, P.P. Swine Influenza: A Zoonosis. *Veterinary Sciences Tomorrow* [en ligne]; 15 septembre 2003; 1–11. <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html>, page consultée le 11 juillet 2010.
- *HEINEN, P.P, de BOER-LUITZE, E.A., BIANCHI, A.T.J. Respiratory and systemic humoral and cellular immune response of pigs to heterosubtypic influenza A virus infection. *J. Gen. Virol.*, 2001, **82**, 2697–2707.
- *HEINEN, P.P., RIJSEWIJK, F.A., de BOER-LUIJTZE, E.A. *et al.* Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J. Gen. Virol.*, 2002, **83**, Pt8, 1851-1859.
- *HELENIUS, A. Unpacking the incoming influenza virus. *Cell*, 1992, **69**, 577-578.

- *HOLSINGER, L. J., LAMB, R. A. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology*, 1991, **183**, 32-43.
- *HOLSINGER, L.J., NICHANI, D., PINTO, L.H., et al. Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J. Virol.*, 1994, **68**, 1551-1563.
- *HUGHEY, P.G., ROBERTS, P.C., HOLSINGER, L.J., et al. Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. *Virology*, 1995, **212**, 411-421.
- *HULEATT, J., NAKAARA, V., DESAIA, P., et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 2008, **26**, 2, 201-214.
- *HUSSEINI, R.H., SWEET, C., COLLIE, M.H. et al. The relation of interferon and non specific inhibitors to virus levels in nasal washes of ferrets infected with influenza viruses of differing virulence. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1982, **62**, 87-93.
- *ILYINSKI, P.O., GABAI, V.L., SUNYAEV, S.R. et al. Toxicity of influenza A virus matrix protein 2 for mammalian cells is associated with its intrinsic proton-channeling activity. *Cell Cycle* [en ligne], **6**(16): 2043-2047. 15 août 2007. [12 novembre 2009]. Disponible de Landes Bioscience, 2007. <http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/4564>.
- *ILYINSKI, P.O., GANBARYAN, A.S., MERIIN, A.B. et al. Inhibition of Influenza M2-induced cell death alleviates its negative contribution to vaccination efficiency. *PLoS ONE* [en ligne], **3**(1): e1417. 16 janvier 2008. [12 novembre 2009]. Disponible sur PLoS ONE, 2008. doi:10.1371/journal.pone.0001417.
- *ITO, T., GORMAN, O. T., KAWAOKA, Y., et al. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *Journal of Virology*, 1991, **65**, 5491-5498.
- *ITO, R., YOSHIKAWA, T., OZAKI, Y., et al. Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. *Vaccine*, 2003, **21**, 2362-2371.
- *IWATSUKI-HORIMOTO, K., HORIMOTO, T., NODA, T., et al. The cytoplasmic tail of influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J. Virol.*, 2006, **80**, 5233-5240.
- *JAKEMAN, K.J., SMITH, H., SWEET, C. Mechanism of immunity to Influenza: Maternal and passive neonatal protection following immunization of adult ferrets with a live vaccinia-influenza virus haemagglutinin recombinant but not with recombinants containing other influenza virus proteins. *J. Gen. Virol.* 1989, **70**, 1523-1531.
- *JEGERLEHNER, A., SCHMITZ, N., STORNI, T., et al. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.*, 2004, **172**, 5598-5605.
- *JENNINGS, P.A., FINCH, J.T., WINTER, G., et al. Does the higher order structure of the influenza virus ribonucleoprotein guide sequence rearrangements in influenza viral RNA? *Cell*, 1983, **34**, 619-627.

- *JOHANSSON, B.E., BUCHER, D.J., KILBOURNE, E.D. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. *J. Virol.*, 1989, **63**, 3, 1239-1246.
- *JOHNSON, N.P.A.S., MUELLER, J. Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 “Spanish” Influenza Pandemic. *Bulletin of the History of Medicine*, 2002, **76**, 1, 105-115.
- *JOHNSTON, J. B., NAZARIAN, S. H., NATALE, R., *et al.* Myxoma virus infection of primary human fibroblasts varies with cellular age and is regulated by host interferon responses. *Virology*, 2005, **332**, 235–248.
- *JOHNSTON, J.B., McFADDEN, G. Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. *Cellular Microbiology*, 2004, **6**, 8, 695-705.
- *KASH, J., GOODMAN, A., KORTH, M., *et al.* Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Res*, 2006, **119**, 1, 111–120.
- *KERR, P.J., BEST, S.M. Myxoma virus in rabbits. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1998, **17**, 256-268.
- *KERR, P.J., JACKSON, R.J. Myxoma virus as a vaccine vector for rabbits: antibody levels to influenza virus haemagglutinin presented by a recombinant myxoma virus. *Vaccine*, 1995, **13**, 17, 1722-1726
- *KITIKOON, P., STRAIT, E.L., THACKER, E.L. The antibody responses to swine influenza virus (SIV) recombinant matrix (rM1), matrix 2 (M2) and hemagglutinin (HA) proteins in pigs with different SIV exposure. *Veterinary Microbiology*, 2008, **126**, 51-62.
- *KITIKOON, P., VINCENT, A.L., JANKE, B.H. Swine influenza matrix 2 (M2) protein contributes to protection against infection with different H1 swine influenza virus (SIV) isolates. *Vaccine*, 2010, **28**, 523-531.
- *KODIHALLI, S., KOBASA, D., WEBSTER, R. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine*, 2000, **18**, 2592-2599.
- *KOPF, M., ABEL, B., GALLIMORE, A., *et al.* Complement component C3 promotes T-cell priming and lung migration to control acute influenza virus infection. *Nat.Med.*, 2002, **8**, 373-378.
- *KOTHALAWALA, H., TOUSSAINT, M.J., GRUYS, E. An overview of swine influenza. *Vet.Q.*, 2006, **28**, 2, 46–53.
- *KOVACS, F.A., DENNY, J.K., SONG, Z., *et al.* Helix tilt of the M2 transmembrane peptide from influenza A virus : an intrinsic property. *J.Mol.Biol.*, 2000, **295**, 117-125.
- *Laboratoire MedImmune (page consultée le 2 décembre 2010). Site du laboratoire MedImmune. Adresse URL : <http://www.flumist.com>

*Laboratoire Intervet (page consultée le 2 décembre 2010). Site du laboratoire Intervet. Adresse URL : <http://www.intervet.fr/>

*LALANI, A.S., MASTERS, J., ZENG, W., *et al.* Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science*, 1999, **286**, 1968-1971.

*LAMB, R.A., CHOPPIN, P.W. Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology*, 1981, **112**, 729-737.

*LAMB, R.A., HOLSINGER, L.J., PINTO, L.H. The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza life cycle. *In*: WIMMER, E, (ed). Receptor-Mediated Virus Entry into Cells. Cold Spring Harbor, NY, USA: *Cold Spring Harbor Press*, 1994, 303-321.

*LAMB, R.A., ZEBEDEE, S.L., RICHARDSON, C.D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*, 1985, **40**, 627-633.

*LeBON, A., SCHIAVONI, G., D'AGOSTINO, G., *et al.* Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*, 2001, **14**, 461-470.

*LESER, G.P., LAMB, R.A. Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA, M2 proteins. *Virology*, 2005, **342**, 215-227.

*LETVIN, N.L. Strategies for an HIV vaccine. *J.Clin.Invest.*, 2002, **110**, 15-20.

*LIU, W., LI, H., CHEN, Y.H. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, **35**, 141-146.

*LIU, W., PENG, Z., LIU, Z., *et al.* High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine*, 2004b, **23**, 366-371.

*LIU, W., ZOU, P., DING, J. *et al.* Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes and Infection*, 2005, **7**, 171-177.

*LIU, W.L., ZOU, P., CHEN, Y.H., *et al.* Monoclonal antibodies recognizing EVETPIRN epitope of influenza A virus M2 protein could protect mice from lethal influenza A virus challenge. *Immunol. Lett.*, 2004a, **93**, 131-136.

*LJUNGBERG, K., WAHREN, B., ALMQVIST, J. *et al.* Effective construction of DNA vaccines against variable influenza genes by homologous recombination. *Virology*, 2000, **268**, 244-250.

*LOPEZ-VANCELL, R, BEATY, G, STEFANI, E, *et al.* Changes in paracellular and cellular ionic permeabilities of monolayers of MDCK cells infected with viruses that bud from apical (influenza) or from basolateral (vesicular stomatitis) regions of the plasma membrane. *J.Membr.Biol.*, 1984, **81**, 171-180.

- *MAASSAB, H.F., BRYANT, M.L. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.*, 1999, **9**, 4, 237-244.
- *MAK, N.K., LEUNG, K.N., ADA, G.L. The generation of “cytotoxic” macrophages in mice during infection with influenza A or Sendai virus. *Scand. J. Immunol.*, 1982, **15**, 553-561.
- *MARTIN, K., HELENIUS, A. 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*, 1991, **67**, 117-130.
- *MATROSOVICH, M., TUZIKOV, A., BOVIN, N. *et al.* Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.*, 2000, **74**, 8502-8512.
- *MATSUO, K., YOSHIKAWA, T., ASANUMA, H. *et al.* Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine*, 2000, **18**, 2713-2722.
- *McCABE, V.J., TARPEY, I., SPIBEY, N. Vaccination of cats with an attenuated recombinant myxoma virus expressing feline calicivirus capsid protein. *Vaccine*, 2002, **20**, 19-20, 2454-2462.
- *McCOWN, M.F., PEKOSZ, A. Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. *J. Virol.*, 2006, **80**, 8178-8189.
- *McCOWN, M.F., PEKOSZ, A. The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J. Virol.*, 2005, **79**, 3595-3605.
- *McFADDEN, G. Poxvirus tropism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 201-213.
- *MONTEIRO, J.M., HARVEY, C., TRINCHIERI, G. Role of interleukin-12 in primary influenza virus infection. *J. Immunol.*, 1998, **72**, 4825-4831.
- *MOSS, B. *Poxviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., (eds). *Virology*, 4th edition. Philadelphia, USA: *Lippincott Williams & Wilkins*, 2001, 2849-2883.
- *MOSS, B., AHN, B.Y., AMEGADZIE, B., *et al.* Cytoplasmic transcription system encoded by vaccinia virus. Minireview. *J. Biol. Chemistry*, 1991, **266**, 1355-1358.
- *MOZDZANOWSKA, K., FENG, J.Q., EID, M., *et al.* Induction of influenza type A virus specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2. *Vaccine*, 2003, **21**, 19-20, 2616-2626.
- *MOZDZANOWSKA, K., FURCHNER, M., WASHKO, G., *et al.* A pulmonary influenza virus infection in SCID mice can be cured by treatment with hemagglutinin specific antibodies that display very low virus-neutralizing activity in vitro. *J. Virol.*, 1997, **71**, 4347-4355.

- *MOZDZNOWSKA, K., MAIESE, K., FURCHNER, M., *et al.* Treatment of influenza virus-infected SCID mice with non neutralizing antibodies specific for the transmembrane proteins matrix 2 and neuraminidase reduces the pulmonary virus titer but fails to clear the infection. *Virology*, 1999, **254**, 138-146.
- *MOZDANOWSKA, K., ZHARIKOVA, D., CUDIC, M., *et al.* Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Viro. J.*, 2007, **4**, p 118.
- *MÜLLER, U., STEINHOFF, U., REIS, L. F., *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 1994, **264**, 1918–1921.
- *MURPHY, B.R., CLEMENTS, M.L. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1989, **146**, 107-116.
- *MURPHY, B.R., WEBSTER, R.G. Orthomyxoviruses. *In*: FIELDS, B.N., KNIPPE, D.M., HOWLEY, P.M., (eds). *Fields Virology*. Philadelphia, USA: *Lippincott-Raven*, 1996, 1353-1445.
- *MURTI, K.G., WEBSTER, R.G., JONES, I.M. Localization of RNP polymerases on influenza viral ribonucléoprotéine by immunogold labeling. *Virology*, 1988, **164**, 562-566.
- *MUSTER, T., SUBBARAO, E.K., ENAMI, M., *et al.* An influenza A virus containing influenza B virus 5' and 3' non-coding regions on the neuraminidase gene is attenuated in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, **88**, 5177-5181.
- *NASH, P., BARRETT, J., CAO, J.X., *et al.* Immunomodulatory by viruses: the myxoma virus story. *Immunol Rev.*, 1999, **168**, 103-120.
- *NEIRYNCK, S., DEROO, T., SAELENS, X., *et al.* A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature medicine*, 1999, **5**, 10, 1157-1163.
- *NEUMANN, G., WATANABE, T., ITO, H. *et al.* Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 9345-9350.
- *NORMILE, D. Avian Influenza: Potentially more lethal variant hits migratory birds in China. *Science*, 2005, **309**, 5732, p 231.
- *Organisme International des Epizooties (OIE). Avian Influenza Vaccination. *In* : OIE, FAO, IZSVe, European Union. Vaccination: a tool for the control of vaccine avian Influenza, Verona, Italy, 20-22 Mars 2007. 12 p.
- *OKEKE, M.I., NILSSEN, O., TRAAVIK, T. Modified vaccinia virus Ankara multiplies in rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines. *J. Gen. Virol.*, 2006, **87**, 1, 21-27.
- *OKUDA, K., IHATA, A., WATABE, S., *et al.* Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine*, 2001, **12**, 27, 3681-3691.

- *Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou World Health Organisation (WHO) (page consultée le 2 décembre 2010). Site de l'Organisation Mondiale de la Santé. Adresse URL: <http://www.who.int>
- *OSTERHAUS, A., RIMMELZWAAN, G., MARTINA, B., *et al.* Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, **288**, 5468, 1051–1053.
- *OXFORD, J. S., GALBRAITH, A. Antiviral activity of amantadine: a review of laboratory and clinical data. *Pharmacol. rev.*, 1980, **11**, 181-262.
- *PALESE, P., COMPANS, R.W. Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J.Gen.Virol.*, 1976, **33**, 159-163.
- *PELESE, P., GARCIA-SASTRE, A. Influenza vaccines; present and future. *J.Clin.Investig.*, 2002, **110**, 9-13.
- *PALLADINO, G., MOZDZANOWSKA, K., WASHKO, G. *et al.* Virus-Neutralizing Antibodies of Immunoglobulin G (IgG) but Not of IgM or IgA Isotypes Can Cure Influenza Virus Pneumonia in SCID Mice. *Journal of Virology*, 1995, **69**, 4, 2075-2081.
- *PARK, E.K., CASTRUCCI, M.R., PORTNER, A., *et al.* The M2 ectodomain is important for its incorporation into influenza A virions. *Journal of Virology*, 1998, **72**, 3, 2449-2455.
- *PARK, C.H., ISHINAKA, M., TAKADA, A., *et al.* The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. *Arch. Virol.*, 2002, **147**, 1425-1436.
- *PATRIARCA, P.A., WEBER, J.A., PARKER, R.A., *et al.* Efficacy of influenza vaccine in nursing homes. Reduction in illness and complications during an influenza A (H3N2) epidemic. *JAMA*, 1985, **53**, 1136– 1139.
- *PAYUNGPORN, S., CRAWFORD, P.C., KOUO, T.S., *et al.* Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis* [périodique en ligne], 2008 [11 juillet 2010]. Disponible sur <http://www.cdc.gov/EID/content/14/6/902.htm>.
- *PIGNOLET, B., BOULLIER, S., GELFI J., *et al.* Safety and immunogenicity of myxoma virus as a new viral vector for small ruminants. *J. Gen. Virol.*, 2008, **89**, 6, 1371-137.
- *PIMENTEL, D. Population regulation and genetic feedback. *Science*, 1968, **159**, 1432-1437.
- *PINTO, L.H., DIECKMANN, G.R., GANDHI, C.S. *et al.* A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 11301-11306.
- *PINTO, L. H., HOLSINGER, L. J., LAMB, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 1992, **69**: 517-528.
- *REID, A., FANNING, T., HULTIN, J., *et al.* Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 1651-1656.

- *REID, A.H., FANNING, T.G., JANCZEWSKI, T.A., *et al.* Characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus matrix gene segment. *J.Virol.*, 2002, **76**, 10717-10723.
- *RIBERDLY, J.M., CHRISTENSEN, J.P., BRANUM, K. *et al.* Diminished primary and secondary influenza virus-specific CD8⁺ T-cell responses in CDA- depleted Ig^{-/-}-mice. *J.Virol.*, 2000, **74**, 9762-9765.
- *ROHM, C., ZHOU, N., SUSS, J., *et al.* Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology*, 1996, **217**, 508–516.
- *RUIGROK, R.W., Structure of influenza A, B, and C viruses. *In*: NICHOLSON, K.G., WEBSTER, R.G., HAY, A.J., (Eds). Textbook of Influenza. Oxford, UK: *Blackwell Science Ltd.*, 1998, 29-42.
- *SAELEN, X. The influenza matrix protein 2 as a vaccine target. *Future Virol.*, 2008, **3**, 2, 167-178.
- *SAMBHARA, S., KURICHH, A., MIRANDA, R., *et al.* Heterosubtypic immunity against human influenza A viruses, including recently emerged avian H5 and H9 viruses, induced by FLU-ISCOM vaccine in mice requires both cytotoxic T-lymphocyte and macrophage function. *Cell. Immunol.*, 2001, **211**, 143-153.
- *SCHNELL, J.R., CHOU, J.J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, 2008, **451**, 31, 591-596.
- *SCHOTSAERT, M., DE FILETTE, M., FIERS, W., *et al.* Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev Vaccines*, 2009, **8**, 4, 499-508.
- *SHIMBO, K., BRASSARD, D.L., LAMB, R.A. PINTO, L.H. Ion selectivity and activation of the M2 ion channel of influenza virus. *Biophys.J.*, 1996, **70**, 1335-1346.
- *SIDWELL, R.W., SMEE, D.F. Experimental disease models of influenza virus infections: recent developments. *Drug Discov. Today Dis. Models*, 2004, **1**, 57-63.
- *SIMONSEN, L., VIBOUD, C., GRENFELL, B.T. *et al.* The genesis and spread of reassortment human Influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Mol. Biol. Evol.*, 2007, **24**, 8, 1811-1820.
- *SLEPUSHKIN, V. A., KATZ, J. M., BLACK, R. A., *et al.* Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine*, 1995, **13**, 15, 1399-1402.
- *SMITH, G.L., LAW, M. The exit of Vaccinia virus from infected cells. *Virus Res.*, 2004, **106**, 189-197.
- *SMITH, N.M., SHAY, D.K. Influenza vaccination for elderly people and their care workers [letter]. *Lancet*, 2006, **368**, 1752-1753.
- *SMITH, G. L., VANDERPLASSCHEN, A., LAW, M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J.Gen. Virol.*, 2002, **83**, 2915-2931.

- *STEINHAUER, D. A., WHARTON, S.A., SKEHEL, J. J., *et al.* Amantadine selection of a mutant influenza virus containing an acid-stable hemagglutinin: evidence for virus-specific regulation of the pH of glycoprotein transport vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 1991, **88**, 11525-11529.
- *SUGRUE, R.J., BAHADUR, G., ZAMBON, M.C., *et al.* Specific structural alteration of the influenza hemagglutinin by amantadine. *EMBO Journal*, 1990a, **9**, 3469-3476.
- *SUGRUE, R.J., BELSHE, R.B., HAY, A.J. Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein. *Virology*, 1990b, **179**, 51-56.
- *SUGRUE, R. J., HAY, A. J. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*, 1991, **180**, 617-624.
- *SVITEK, N., RUDD, P.A., OBOJES, K., *et al.* Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology*, 2008, **376**, 53-59.
- *SWAYNE, D., SUAREZ, D. Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.*, 2000, **19**, 2, 463-482.
- *TAKEUCHI, K., LAMB, R.A. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. *J. Virol.*, 1994, **68**, 911-919.
- *TAMURA, S.I., IWASAKI, T., THOMPSON, A.H. *et al.* Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *Journal of General Virology*, 1998, **79**, 291-299.
- *TAMURA, S., KURATA, T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2004, **57**, 236-247.
- *TAMURA, S., MIYATA, K., MATSUO, K., *et al.* Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *J. Immunol.*, 1996, **156**, 10, 3892-3900.
- *TAMURA, S., TANIMOTO, T., KURATA, T. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn.J. Infect. Dis.*, 2005, **58**, 195-207
- *TAUTENBERGER, J.K., MORENS, D.M. The pathology of influenza virus infections. *Ann. Rev. Pathol.: Mech. Dis.*, 2008, **3**, 499-522.
- *TOMPKINS, S.M., ZHAO, Z.S., LO, C.Y., *et al.* Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, **13**, 3, 426-435.
- *TOOVEY, S. Influenza-associated central nervous system dysfunction: a literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2008, **6**, 3, 114-124.
- *TOPHAM, D.J., TRIPP, R.A., DOHERTY, P.C. CD8+ T-cells clear influenza virus by perforine or Fas-dependent processes. *J.Immunol.*, 1997, **159**, 5197-5200.

- *TOSTESON, M.T., PINTO, L.H., HOLSINGER, L.J., *et al.* Reconstitution of the influenza virus M2 channel in lipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, 1994, **142**, 117-126.
- *TREANOR, J., HAYDEN, F.G., VROOMAN, P.S., *et al.* Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2000, **283**, 1016-1024.
- *TREANOR, J.J. Part III infectious diseases and their etiologic agents, influenza virus. In: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R., (eds). Principles and practice of infectious disease, 6th ed. Philadelphia, USA: *Elsevier*, 2005, 2060-2065.
- *TREANOR, J.J., TIERNEY, E.L., ZEBEBEE, S.L., *et al.* Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J. Virol.*, 1990, **64**, 3, 1375–1377.
- *TULP, A., VERWOERD, D., DOBBERSTEIN, B., *et al.* Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature*, 1994, **369**, 6476, 120-126.
- *UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN (UCL). (Page consultée le 12 juillet 2010). Initiation à la virologie, [en ligne]. Adresse URL : http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/index.htm
- *ULMER, J.B., DONNELLY, J.J., PARKET, S.E., *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 1993, **259**, 1745-1749.
- *ULMER, J.B., FU, T.M., DECK, R.R., *et al.* Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *J. Virol.*, 1998, **72**, 7, 5648-5653.
- *Van der LAAN, J.W., HERBERTS, C., LAMBKIN-WILLIAMS, R., *et al.* 2008. Animal models in influenza vaccine testing. *Exp. Rev. Vaccines*, 2008, **7**, 783-793.
- *VANDERPLASSCHEN, A., HOLLINSHEAD, M., SMITH, G.L., *et al.* Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *Journal of General Virology*, 1998, **79**, 4, 877-887.
- *VINCENT, A.L., MA, W., LAGER, K.M., *et al.* 2007. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine*, 2007, **25**, 7999-8009.
- * Swiss Institute of Bioinformatics. (Page consultée le 25 novembre 2010), ViralZone, [en ligne]. Adresse URL : www.expasy.org/viralzone
- *VON ITZSTEIN, M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007, **6**, 967-974.
- *WAGNER, R., MATROSOVICH, M., KLENK, H.D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.*, 2002, **12**, 159-166.

- *WANG, C., LAMB, R. A., PINTO, L. H. Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. *Biophys. J.*, 1995, **69**, 1363-1371.
- *WANG, C., LAMB, R. A., PINTO, L. H. Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel in mammalian cells. *Virology*. 1994, **205**, 133-140.
- *WANG, C., TAKEUCHI, K., PINTO, L.H. *et al.* Ion channel activity of Influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J. Virol.*, 1993, **67**, 9, 5585-5594.
- *WANG, F., MA, Y., BARRETT, J. W., *et al.* Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat. Immunol.*, 2004, **5**, 1266–1274.
- *WATABE, S., XIN, K.Q., IHATA, A. *et al.* Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine*, 2001, **19**, 31, 4434-4444.
- *WATANABE, T., WATANABE, S., ITO, H., *et al.* Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity. *J. Virol.*, 2001, **75**, 5656-5662.
- *WATANABE, T., WATANABE, S., NEUMANN, G., *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. *J. Virol.*, 2002, **76**, 767-773.
- *WEBBY, R.J., ROSSOW, K., ERICKSON, G., *et al.* Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Res.*, 2004, **103**, 67–73.
- *WEBBY, R.J., SWENSON, S.L., KRAUSS, S.L., *et al.* Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J. Virol.*, 2000, **74**, 8243–8251.
- *WEBBY, R.J., WEBSTER, R.G. Emergence of influenza A viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol.*, 2001, **356**, 1817-1828.
- *WEBER, T, STILIANAKIS, N. Inactivation of Influenza A Viruses in the Environment and Modes of Transmission: A Critical Review. *Journal Of Infection*, 2008, **57**, 5, 361-373.
- *WEBSTER, R.G., BEAN, W.J., GORMAN, O.T., *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.*, 1992, **56**, 152-179.
- *WHITTAKER, G., BUI, M., HELENIUS, A. The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell. Biol.*, 1996, **6**, 67-71.
- *World Health Organization (WHO), Geneva. Epidemiology of WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection. *Weekly epidemiological record*, 2006, **81**, 249-260.
- *WRAITH, D.C., VESSEY, A.E., ASKONAS, B.A. Purified influenza virus nucleoprotein protects mice from lethal infection. *J. Gen. Virol.*, 1987, **68**, Pt 2, 433-440.
- *WRIGHT, P.F., WEBSTER, R.G. 2001. Orthomyxoviruses. In: KNIFE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, D.E. *et al* (eds). *Field's Virology* (4th edition). Philadelphia, USA: *Lippincott-Raven Publishers*, 2001, 1533-1579.

- *WU, F., HUANG, J.H., YUAN, X.Y., et al. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine*, 2007, **25**, 8868-8873.
- *YEWDELL, J.W., BENNINK, J.R., SMITH, G.L., et al. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, **82**, 6, 1785-1789.
- *YOSHIKAWA, T., MATSUO, Ke., MATSUO, Ka., et al. Total viral genome copies and virus-Ig complexes after infection with influenza virus in the nasal secretions of immunized mice. *J.Gen.Virol.*, 2004, **85**, 2339-2346.
- *ZEBEBEE, S.L., LAMB, R.A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J.Virol.*, 1988, **62**, 8, 2762-2772
- *ZEBEDEE, S.L., LAMB, R.A. Growth restriction of influenza A virus by M2 protein antibody is genetically linked to the M1 protein. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 1061-1065.
- *ZEBEDEE, S.L., RICHARDSON, C.D., LAMB, R.A. Characterization of the influenza virus M2 integral membrane protein and expression at the infected cell surface from cloned cDNA. *Journal of Virology*, 1985, **56**, 502-511.
- *ZHANG, M., ZHARIKOVA, D., MOZDZANOWSKA K., et al. Fine specificity and sequence of antibodies directed against the ectodomain of matrix protein 2 of influenza A virus. *Molecular Immunology*, 2006, **43**, 2195–2206.
- *ZHARIKOVA, D., MOZDZANOWSKA, K., FENG, J., et al. Influenza type A virus escape mutants emerge in vivo in the presence of antibodies to the ectodomain of matrix protein 2. *J.Virol.*, 2005, **79**, 11, 6644-6654.
- *ZOU, P., LIU, W., CHEN, Y.H. The epitope recognized by a monoclonal antibody in influenza A virus M2 protein is immunogenic and confers immune protection. *Int. Immunopharmacol.*, 2005, **5**, 4, 631-635.

Toulouse, 2010

NOM : ORTION-CORONIS

Prénom : KEVIN

TITRE :

Vaccination par des virus myxomateux recombinants exprimant un épitope du virus Influenza aviaire : Etude de la protection après épreuve chez la souris

RESUME :

La récente émergence de virus influenza hautement pathogènes dépassant les barrières d'espèces, et la nécessité de mise à jour régulière des vaccins antigrippaux, chez l'homme comme chez les animaux, confirment l'intérêt d'une stratégie vaccinale large spectre. M2 est une protéine membranaire indispensable au cycle viral influenza A. Son ectodomaine, le peptide M2e, possède une séquence aminoacide hautement conservée, au potentiel vaccinal protecteur confirmé. L'équipe IHVV de l'UMR 1225 INRA-ENVT a construit deux virus myxomateux recombinants exprimant M2e fusionné à l'une des protéines d'enveloppe du virus (M022L ou M071L), afin de développer une vaccination aviaire antigrippale large spectre. Un suivi clinique est réalisé sur des souris vaccinées par l'un ou l'autre de ces recombinants, puis éprouvées avec un virus influenza A : aucune protection clinique n'a été observée. Différents arguments, avancés pour expliquer ces résultats, permettront de modifier les conditions expérimentales des prochains essais.

MOTS-CLES :

Vaccination ; Influenza aviaire ; épreuve ; souris ; M2e ; virus myxomateux

ENGLISH TITLE :

Vaccination by recombinant myxoma viruses expressing an avian influenza virus epitope: Challenge assay in mice

ABSTRACT :

Recent emergence of highly pathogenic avian influenza viruses, which overpass species barrier, and need for regular overview of animal and human vaccines, confirm the interest in wide vaccine-induced strategy. M2 is a type A influenza virus membrane protein, essential to viral cycle. Its ectodomain, M2e peptide, is highly conserved among avian, swine, and human strains. Different studies have confirmed its vaccine protection potential. The IHVV of UMR 1225 INRA-ENVT team engineered two recombinant myxoma viruses, which express M2e peptide fused to one of myxoma envelop proteins (M022L or M071L), in order to develop a wide vaccine-induced protection against influenza in birds. Clinical signs were followed in mice vaccinated with one of both recombinant viruses and challenged with a type A influenza virus. No clinical protection was induced by these vaccines. Different arguments are developed to explain these results in order to modify protocol of next clinical assays.

KEYWORDS :

Vaccine ; avian Influenza ; viral challenge; mouse; M2e; myxoma virus