

# IMPLICATION DE LA PROTEINE MV-LAP DANS LA PATHOGENICITE DU VIRUS MYXOMATEUX

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Frédérique, Anne BELLANGER**  
Née, le 31 janvier 1976 à BESANÇON (Doubs)

---

Directeur de thèse : M. le Docteur Jean-Luc GUERIN

---

JURY

PRESIDENT :  
**M. Henri DABERNAT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Jean-Luc GUERIN**  
**M. Stéphane BERTAGNOLI**

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

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

Directeur	: M.	<b>P. DESNOYERS</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>R. LAUTIE</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAUX</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>
	M.	<b>A. CAZIEUX</b>
	Mme	<b>V. BURGAT</b>
	M.	<b>D. GRIESS</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

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

**PROFESSEUR ASSOCIE**

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

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

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

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

**MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
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. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Fauzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
Mlle **HAY Magali**, *Zootecnie*  
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

**MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE**

- M. **GRANDJEAN Christophe**, *Gestion de la santé en élevage des ruminants*

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

- Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

***A notre président de thèse***

**Monsieur le Professeur Henri DABERNAT,**

Professeur des universités

Praticien Hospitalier

Bactériologie-Virologie

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

Hommage respectueux

***A notre jury de thèse,***

**Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Production animales-Virologie

Qui a bien voulu guider notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect et de toute notre gratitude.

**Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI**

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie-Maladies virales

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse

Sincères remerciements

## REMERCIEMENTS

**A toute l'équipe du laboratoire de virologie** pour sa gentillesse, sa joie de vivre et son encadrement dans ce travail,

**A Stéphane BERTAGNOLI** pour m'avoir soutenu tout au long de ma scolarité, dans les meilleurs moments comme dans les moments difficiles : un grand merci,

**A Jean-luc GUERIN** pour sa gentillesse et sa disponibilité, même s'il faut souvent courir pour l'attraper !

**A ma sœur Caroline** que j'admire et respecte profondément. Que la vie t'apporte toute la joie et le bonheur que tu mérites ! Les anglais ont bien de la chance...

**A ma mère** pour son courage et sa ténacité dans la vie. Qu'elle trouve dans ce travail ma reconnaissance pour ses sacrifices passés,

**A mon père** pour m'avoir permis de prendre un bon départ dans la vie en faisant ce que j'aime,

**A mes grands-parents maternels** pour leur soutien.

**A ma meilleure amie Béa** sans qui je ne serais sûrement pas là aujourd'hui,

**Aux gais lurons**, Cécile, Chouchou, Raph, Renato, Romain, Séverine et Ston. Que la vie ne vous change pas, on rigole bien comme ça !!!

**A Léa et à vos futurs bébés,**

**A mes ami(e)s d'école** en espérant vous garder le plus longtemps possible,

**Aux Docteurs DELOBEL et PENNANT** pour avoir eu la patience et la gentillesse de me former. Sincères remerciements.

**A Michaël,**

Pour le sourire que tu m'as redonné,  
Pour la force que tu me donnes,  
Pour ton amour,  
Pour ta joie de vivre...

...Je t'aime.

**IMPLICATION DE LA PROTEINE MV-LAP DANS LA PATHOGENICITE  
DU VIRUS MYXOMATEUX.**

	PAGE
TABLE DES ILLUSTRATIONS	4
INTRODUCTION	6
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>8</b>
<b><u>I] La myxomatose chez le lapin européen</u></b>	<b>9</b>
1. <i>Etude épidémiologique de la maladie</i>	9
1.1 Les différentes espèces touchées	9
1.2 Les sources possibles de virus	9
1.3 Extension de la maladie	9
1.4 Synthèse épidémiologique	11
2. <i>Virus myxomateux et pouvoir pathogène</i>	11
2.1 Virulence du virus myxomateux	11
2.2 Symptômes principaux	12
2.3 Lésions macroscopiques et histologiques rencontrées	15
3. <i>Prophylaxie face à une contamination éventuelle</i>	16
<b><u>II] Généralités sur les poxvirus</u></b>	<b>17</b>
1. <i>Cycle et structure</i>	17
1.1 Organisation et morphologie du virus	17
1.1.1 Composants chimiques	17
1.1.2 Structure générale	18
1.2 Organisation génomique	20
1.3 Le cycle viral	20

<i>2. Les facteurs majeurs de pathogénicité du Virus myxomateux et leur rôle</i>	25
2.1 Action stimulante sur la cellule hôte	26
2.2 Action anti-inflammatoire	28
2.3 Fabrication de leurres	28
2.4 Limitation de l'apoptose cellulaire pour la survie	30
2.5 Réduction de l'expression de protéines membranaires	31
CONCLUSION : MV-LAP, un nouveau facteur de pathogénicité ?	32
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE</b>	<b>33</b>
INTRODUCTION	34
<b><u>I] Matériels et méthodes</u></b>	<b>36</b>
1. <i>Virus et cellules</i>	36
2. <i>Analyse de séquences, clonage et séquençage</i>	36
3. <i>Extraction d'ARN et RT-PCR</i>	36
4. <i>Construction d'un virus mutant MV-LAP et d'un virus révertant</i>	37
5. <i>Inoculation expérimentale des lapins</i>	39
6. <i>Examen histologique</i>	40
7. <i>Analyses des cellules infectées en cytométrie de flux</i>	41
<b><u>II] Résultats</u></b>	<b>41</b>
1. <i>Analyse de la séquence de MV-LAP</i>	41
1.1 Séquençage	41
1.2 Fonctions des protéines en doigt de zinc	42
1.3 Le motif C <sub>4</sub> HC <sub>3</sub> ou LAP/PHD	45
1.4 Cinétique d'expression du gène	47

<i>2. Construction d'un virus mutant <math>\Delta</math>LAP ; Symptômes et lésions observés lors de l'inoculation par les souches T1 et MV-<math>\Delta</math>LAP</i>	47
<i>3. Analyse histologique de tissus d'animaux infectés expérimentalement</i>	51
<i>4. La réplication virale in vivo</i>	54
<i>5. Implication du facteur MV-LAP dans la dérégulation des molécules de CMH 1</i>	54
<b><u>III] Discussion</u></b>	56
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	60

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

	PAGE
<b>Figure 1</b> : Cycle épidémiologique de la myxomatose (Arthur et Louzis, 1988)	10
<b>Figure 2</b> : Photos de lapins infectés par le virus myxomateux : symptômes classiques	13
<b>Figure 3</b> : Photo de lapin infecté par le virus myxomateux : forme « amyxomateuse »	13
<b>Figure 4</b> : Vue schématique d'un <i>Orthopoxvirus</i> (forme EEV)	21
<b>Figure 5</b> : Représentation du génome du virus de la vaccine	21
<b>Figure 6</b> : Cycle récapitulatif de la réplication des poxvirus (modèle de la vaccine) (Moss, 1996)	23
<b>Figure 7</b> : Les facteurs de pathogénicité codés par le virus myxomateux	27
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique du vecteur construit	38
<b>Figure 9</b> : Séquences nucléotidique et polypeptidique de MV-LAP	44
<b>Figure 10</b> : Homologie entre les motifs LAP identifiés chez les poxvirus et les herpesvirus (Guérin, 2001a).	44
<b>Figure 11</b> : Structures des différentes classes de motif en doigts de zinc	46
<b>Figure 12</b> : Expression de l'ARN messager du facteur MV-LAP en culture cellulaire.	48
<b>Figure 13</b> : Comparaison de coupes histologiques	53
<b>Figure 14</b> : Dérégulation de l'expression des molécules de surface de classe 1 du CMH	55
<b>Tableau 1</b> : Critères de définitions des grades de virulence de souches de virus myxomateux	12
<b>Tableau 2</b> : Signes cliniques et délais d'apparition (Adaptation de Best et Kerr, 2000).	14
<b>Tableau 3</b> : Influence de la souche virale sur différents critères cliniques	15
<b>Tableau 4</b> : Classification des <i>Chordopoxvirinae</i> (D'après Moss, 1991)	19
<b>Tableau 5</b> : Stratégie de réplication des poxvirus (Cann, 1993)	24
<b>Tableau 6</b> : Séquences des amorces utilisées	38
<b>Tableau 7</b> : Grille d'évaluation de l'apoptose dans les tissus	41

<b>Tableau 8 :</b> Analyse clinique de l'influence de MV- $\Delta$ LAP sur la pathogénicité du virus myxomateux	50
<b>Tableau 9 :</b> Observations histologiques des lésions pour les deux groupes de lapins	52

## INTRODUCTION

C'est en 1896, en Amérique du sud, que la myxomatose a été décrite pour la première fois, par le professeur Giuseppe Sanarelli (Joubert *et al.*, 1972).

Jusqu'alors confinée dans son berceau originel, elle fut officiellement introduite en Australie en 1950, pour parvenir à la réduction de la population du lapin de garenne européen, devenu ennemi public numéro un sur le territoire (Joubert *et al.*, 1972). En deux ans, les australiens réussirent à diviser la population par six (<http://rubens.anu.edu.au>).

Malgré la virulence de la souche introduite (souche Lausanne), de nombreux lapins survécurent, laissant entrevoir une possible adaptation du virus à son hôte, et inversement.

C'est le 14 juin 1952 que la maladie fut introduite dans l'hexagone par Louis Armand-Delille, soucieux d'éradiquer les lapins présents sur ses terres. Malheureusement, par un phénomène inconnu à l'époque, la maladie diffusa dans toute l'Europe en moins de 10 ans (Joubert *et al.*, 1972). Le commerce international permit la diffusion de la myxomatose en Algérie et au Maroc. La myxomatose devient une maladie de répartition mondiale, limitée seulement par la présence de l'hôte spécifique.

Cette maladie fut considérée comme une maladie légalement réputée contagieuse jusqu'en 1995. Elle continue de sévir sur tout le territoire et de décimer des populations entières de lapins. Différents moyens de lutte sont explorés : vaccins homologues, hétérologues etc... C'est en étudiant finement les différents facteurs de pathogénicité du virus que les connaissances sur ses modalités d'interaction avec l'hôte seront mieux connus.

Un nouveau gène viral fut identifié sur le génome du virus myxomateux : MV-LAP. Plusieurs hypothèses ont été proposées quand à son rôle dans le cycle infectieux. Par homologie, il a été supposé qu'il pourrait être un gène majeur de pathogénicité. Après une introduction bibliographique qui traitera de la myxomatose et du pouvoir

pathogène du virus myxomateux, nous présenterons dans le cadre de la partie expérimentale le rôle biologique joué par un nouveau facteur de pathogénicité codé par le virus myxomateux, le facteur MV-LAP, et son implication aux niveaux clinique et histologique. Nous ouvrirons la discussion sur les interactions avec des structures cellulaires.

***PREMIERE PARTIE :***  
***ETUDE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

La myxomatose est une maladie virale répandue, hautement contagieuse qui se caractérise, chez le lapin européen (genre *Oryctolagus*), par l'apparition de pseudo-tumeurs (ou myxomes) inflammatoires et exsudatives généralisées. Elle entraîne d'énormes pertes dans la population de lagomorphes, autant dans la nature que dans les élevages rationnels.

## **I] La myxomatose chez le lapin européen**

### *1. Etude épidémiologique de la maladie*

#### 1.1 Les différentes espèces touchées

Le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*) est le seul lagomorphe spontanément sensible à la myxomatose (Joubert *et al.*, 1972), qu'il soit sauvage ou domestique.

Le genre *Sylvilagus* (lapin américain) est quand à lui peu sensible, et le lièvre (*Lepus europaeus*) n'est qu'exceptionnellement infecté. Cette maladie reste donc une spécificité du lapin.

#### 1.2 Les sources possibles de virus

Elles sont multiples : les animaux malades, morts (les cadavres restent infectieux pendant plusieurs mois), les animaux porteurs, comme les *Sylvilagus*, qui peuvent jouer le rôle de réservoir, et pour finir les arthropodes qui hébergent le virus pendant leur diapause hivernale.

#### 1.3 Extension de la maladie

Elle se fera grâce aux arthropodes vecteurs comme les moustiques (du genre *Anopheles* et *Aedes*), aux puces (du genre *Spilopsyllus cuniculi*) ou aux simulies (Fenner et Ratcliffe, 1965). Les puces joueraient un rôle assez important dans la transmission du virus dans les zones tempérées, en assurant la présence du virus au sein d'un terrier au cours de l'hiver, alors que les moustiques sont eux en diapause. Dans des environnements confinés, le virus peut également se transmettre via les aérosols. Tout ceci explique l'épidémiologie originale de la myxomatose « respiratoire » ou amyxomateuse dans les élevages intensifs.

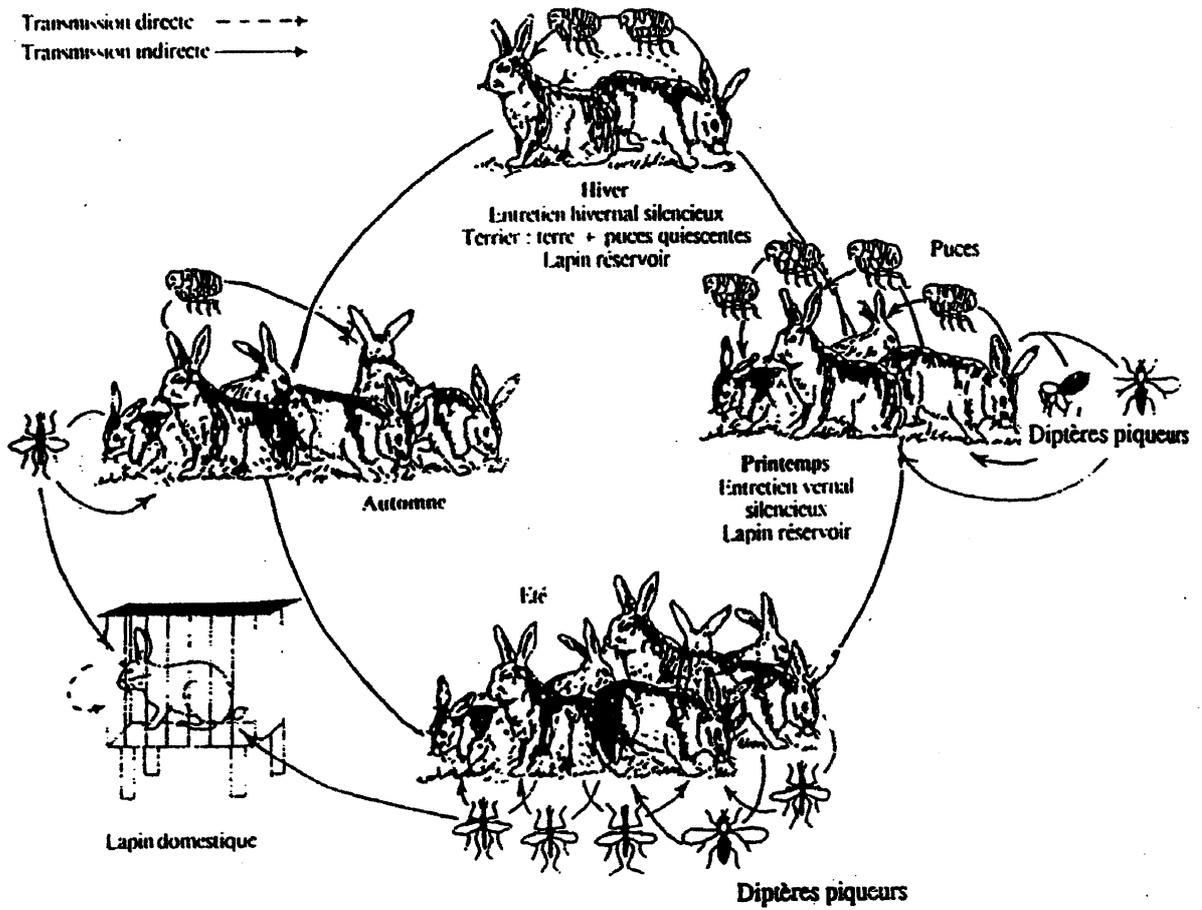


Figure 1 : Cycle épidémiologique de la myxomatose (Arthur et Louzis, 1988)

Il faut aussi noter que la transmission peut être faite par voie séminale, avec une persistance du virus dans la semence jusqu'à 15 jours après la guérison (Kerr et Best, 1998).

#### 1.4 Synthèse épidémiologique

L'évolution de la maladie dans le temps est singulière (figure 1), dépendante de la présence du vecteur indispensable (du genre Culicidé). On constate une fluctuation en fonction, non seulement de la souche de virus mais aussi de l'environnement et des conditions de vie du lapin.

En élevage traditionnel, on constate une épizootie estivale dans les garennes et une enzootie dans les clapiers. Le virus persiste au fond des terriers pendant l'hiver. En élevage intensif, les épizooties sont indépendantes de la saison. En effet, elles se manifestent au cours d'un cycle : début de maternité, puis 1 à 2 mois plus tard à l'engraissement.

## 2. *Virus myxomateux et pouvoir pathogène*

### 2.1 Virulence du virus myxomateux

Une souche très virulente, isolée initialement au Brésil, fut introduite en 1950 en Australie (Best et Kerr, 2000). Cette souche fut baptisée SLS (Standard Laboratory Strain). A l'origine, cette souche était létale à plus de 99% mais rapidement une souche moins virulente fit son apparition, associée à un temps de survie plus élevé tout en restant à un taux de mortalité de 90% (Best et Kerr, 2000).

De cette constatation suivit une étude sur le terrain qui permit d'isoler différentes souches de virus et de les classer :

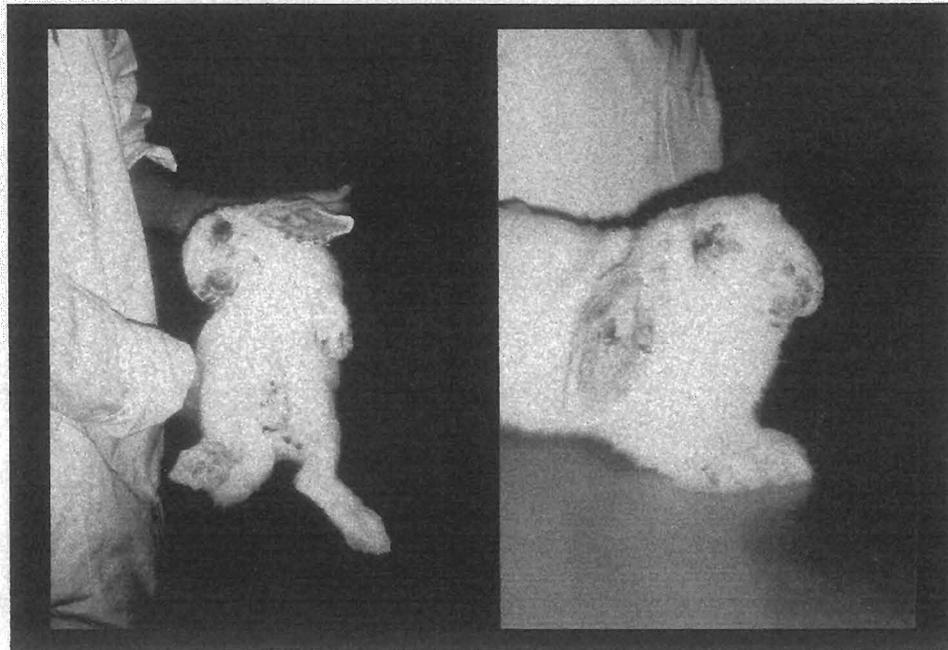
Grade de virulence	Temps de survie moyen	Taux de létalité (%)
I	< 13 jours	>99
II	14-16 jours	95-99
III	17-28 jours	70-95
IIIA	17-22 jours	90-95
IIIB	23-28 jours	70-90
IV	29-50 jours	50-70
V	Non applicable	<50

**Tableau 1 :** Critères de définitions des grades de virulence de souches de virus myxomateux (Adaptation de Fenner et Marshall, 1957).

La souche de grade 5 (Ur pour Uriarria Strain) fut obtenue par atténuation de la première. A ce jour, on retrouve sur le terrain une majorité de souche de grade 3 (Fenner *et al.*, 1956). Cette atténuation permet de mettre en évidence une adaptation du virus myxomateux au changement d'environnement ainsi qu'une sélection naturelle des lapins les plus résistants. On constate qu'après les sept premières années d'épizootie, le taux de survie d'un lapin atteint du virus myxomateux de grade 3 est passé de 10 à 74% (Marshall et Fenner, 1958).

## 2.2 Symptômes principaux

Sur les animaux infectés, on retrouve au point d'inoculation, une lésion de diamètre variable, rouge, indurée et surélevée. Cette lésion se nomme myxome primaire (Joubert, 1972). Par la suite on observe un épaississement des paupières, l'apparition de boursouffures sur celles-ci ainsi que sur le nez et les oreilles. Les myxomes secondaires s'étendent par la suite à tout le corps. Une blépharoconjonctivite s'installe, accompagnée d'un jetage mucopurulent. L'animal est en détresse respiratoire et présente une inflammation de la sphère ano-génitale. La figure 2 montre les différents signes cliniques classiques de la myxomatose.



**Figure 2 :** Forme classique de la myxomatose (lapin à J+10 post-inoculation par la souche virale MV-T1) . On retrouve les myxomes primaires au point d'inoculation (oreilles), une déformation de la face, une blépharoconjonctivite et de nombreux myxomes secondaires sur tout le corps. Inflammation et œdème de la région anogénitale.



**Figure 3 :** Forme amyxomateuse. On trouve une localisation essentiellement faciale et respiratoire.

L'animal se trouve affaibli et incapable de se nourrir. C'est ainsi que le virus fait le lit de surinfections bactériennes de type Gram négatif (*Pasteurella multocida* et *Bordetella bronchiseptica*) au niveau de l'arbre respiratoire. C'est cette surinfection qui entraîne la mort de l'animal bien plus que les lésions initiales causées par le virus lui même.

Pour les formes dites respiratoires (ou amygomateuse), on constate une absence du tropisme cutané avec des myxomes très discrets (Brun, 1981). On retrouve essentiellement une conjonctivite mucopurulente et une atteinte des organes génitaux, ce qui va entraîner une stérilité à long terme . Les symptômes respiratoires restent prépondérant (figure 3).

Les délais d'apparitions ainsi que l'intensité des symptômes sont fonctions de la souche de virus et de la réceptivité de l'animal (Best et Kerr, 2000). Deux lots de lapins, lapin sauvage v.s lapin de laboratoire, ont été soumis à deux souches de virus, grade 1 v.s grade 5 (Best et Kerr, 2000). On peut constater qu'en général, les délais d'apparitions des symptômes sont plus longs pour les lapins sauvages, ce qui suggère une certaine résistance à l'infection par le virus myxomateux. De plus, la souche de virus joue un rôle important en augmentant les délais d'apparition en même temps que sa virulence diminue.

Le tableau suivant résume les observations de l'équipe Australienne ayant effectué cette manipulation (Best et Kerr, 2000).

	<b>Délai d'apparition des symptômes en jours</b>			
	Lapins de laboratoire		Lapin sauvages	
<b>Signes cliniques</b>	<i>Souche SLS</i>	<i>Souche Ur</i>	<i>Souche SLS</i>	<i>Souche Ur</i>
Site d'inoculation	2 <sup>e</sup>	3 <sup>e</sup>	2 <sup>e</sup>	4 <sup>e</sup>
Conjonctivite	4-6	6	5	7-10
Oedeme génital	6	6	5-7	10
Myxomes secondaires	6	9	7	10
Détresse respiratoire	7	10	9-12	–
Régression des lésions	–	17	12-15	15

**Tableau 2 :** Signes cliniques et délais d'apparition (Adaptation de Best et Kerr, 2000).

En ce qui concerne l'intensité des symptômes, on voit une nette différence entre les deux lots de lapins. On peut résumer les résultats de l'étude comme suit :

Signes cliniques	Lapins de laboratoires		Lapins sauvages	
	<i>Souche SLS</i>	<i>Souche Ur</i>	<i>Souche SLS</i>	<i>Souche Ur</i>
Intensité du myxome primaire	++	++	++	–
Développement des myxomes secondaires	Rapide	Lent	Moyen	Très lent
Intensité des signes cliniques	+++	++	++ (sévérité modéré)	–
Mort	10 à 14 jours		> 28 jours	

**Tableau 3** : Influence de la souche virale sur différents critères cliniques (Adaptation de Best et Kerr, 2000)

Pour résumer, on peut conclure que la souche de virus la plus virulente provoque des troubles importants dans les populations de lapins, mais que le lapin sauvage est plus résistant. Ceci lui permet de très bien supporter l'infection par la souche de grade 5.

Cette comparaison directe est bien sûr rendue possible grâce au fait que le programme génétique du virus myxomateux reste constant. L'utilisation de deux souches différentes permet de mettre en évidence la résistance que le lapin sauvage a développé.

### 2.3 Lésions macroscopiques et histologiques rencontrées

Le virus s'étend du site d'inoculation jusqu'aux nœuds lymphatiques qui drainent cette région. Au niveau du myxome primaire, on retrouve le plus haut titre viral ( $10^9$  pfu/g) au 6<sup>ème</sup> jour suivant l'infection pour tous types de lapins (Best et Kerr, 2000). La réplication du virus dans la peau est un élément crucial pour expliquer la transmission du virus à d'autres individus. De ce fait, les lésions secondaires (dont les titres viraux atteignent  $10^7$  pfu/g) sont une source importante

de virus pour la dissémination. Le nœud lymphatique qui draine le myxome primaire montre un titre viral assez élevé à partir du 4<sup>ème</sup> jour suivant l'infection en moyenne, et ce, pour toutes les souches de virus utilisées. La dissémination virale est prouvée par la présence du virus dans le nœud lymphatique poplité controlatéral au site d'inoculation, en moyenne six jours post-infection. Il a été démontré que le nœud lymphatique drainant le site primaire est un organe critique pour l'amplification et la dissémination du virus myxomateux (Best et Kerr, 2000).

S'en suit une dissémination jusqu'à la rate où on retrouve un titre viral élevé entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jours. Les poumons présentent un titre viral trop faible pour être détecté avant le 6<sup>ème</sup> jour. Les testicules sont aussi le lieu d'une présence virale (Best et Kerr, 2000).

Histologiquement, le myxome est décrit comme une prolifération de cellules mésenchymateuses non différenciées : les cellules myxoïdes. Elles ont l'apparence de fibroblastes étoilés et présentent de nombreuses déformations nucléaires. Le virus se multiplie activement dans l'intima des vaisseaux. De ce fait, il existe des lésions prolifératives de l'endothélium des différents capillaires du corps de l'animal. On peut aboutir ainsi à l'obturation du capillaire provoquant la nécrose du territoire vascularisé. Les cellules infectées présentent fréquemment des corps d'inclusions intracytoplasmiques basophiles qui sont nommés « corps de Splendore » (Joubert, 1972). Les différents plans cutanés subissent une métaplasie squameuse évoluant vers la kératinisation et la destruction de l'architecture ciliaire. Le mécanisme de recrutement des cellules inflammatoires sur le site de l'infection est inconnu mais la nature même des cellules est partiellement dévoilée : neutrophiles, hystiocytes et sécrétion abondante de mucine.

### *3. Prophylaxie face à une contamination éventuelle*

Elle commence par la lutte contre les différents vecteurs potentiels de la myxomatose. La maîtrise de ces facteurs étant tout de même relativement aléatoire, la vaccination reste un atout majeur pour la lutte contre la maladie.

Deux types de vaccins sont disponibles sur le marché :

- Virus du fibrome de Shope : virus vivant hétérologue qui permet de protéger les lapins sur une période de trois mois. Il possède une

parfaite innocuité mais demande des rappels fréquents (Shope, 1938).

- Souche vaccinale SG33 : c'est une souche homologue atténuée. Sa mise au point a été effectuée à l'ENV de Toulouse par Saurat et Gilbert (Saurat *et al.*, 1978). Cette souche présente un compromis excellent entre innocuité et immunogénicité. Quelques accidents post-vaccinaux, dans le contexte d'élevages dont le statut sanitaire est très hétérogène, ont suggéré la persistance d'un pouvoir immunodépresseur résiduel (Brun, 1981).

## **II] Généralités sur les poxvirus**

### *1. Cycle et structure*

La famille des *Poxviridae* est une famille composée de nombreux genres. On peut la diviser comme suit (Van Regenmortel *et al.*, 2000) :

**Sous famille des *Chordopoxvirinae***

**Genre** un grand nombre figurant dans le tableau 4

**Sous famille des *Entomopoxvirinae***

**Genre *Entomopoxvirus A/B/C***

### 1.1 Organisation et morphologie du virus

#### 1.1.1 Composants chimiques

L'analyse des poxvirus a révélé que:

L'ADN représente 3% du poids du virus, les lipides quand à eux représentent 4% et sont essentiellement présents dans les différentes membranes virales. On obtient aussi 3% d'hydrates de carbone qui sont présents sur les hémagglutinines des orthopoxvirus.

90% du poids du virus est représenté par des composants protéiques. Le génome code pour 150 à 300 protéines dont environ 100 sont présentes dans le virion. On retrouve des enzymes impliquées dans la réplication, la transcription ou les modifications post-traductionnelle des protéines (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Structure générale

Les poxvirus sont des virus à ADN. Ils comprennent une seule molécule d'ADN linéaire, double brin d'environ 130 à 375 kpb.

Le virion se compose de deux constituants principaux :

- Le core, partie centrale, qui contient le génome viral ainsi qu'une partie de ses protéines. Celles-ci sont essentiellement des enzymes nécessaires au cycle viral. L'association des deux constituants forme ce qu'on appelle un complexe nucléoprotéique. Une membrane (la membrane interne) l'entoure donnant à la structure un aspect biconcave. De part et d'autre de cet élément, on trouve des corps latéraux qui sembleraient être des artéfacts (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

- Une membrane entoure le tout. Elle est constituée de phospholipides et de protéines qui seront des cibles potentielles d'anticorps produit par l'hôte en réaction à l'infection. On la nomme membrane de surface ou membrane externe. Elle présente des structures tubulaires ou globulaires qui sont des antigènes viraux (Figure 4) et qui permettent une grande résistance face à l'attaque des anticorps synthétisés par l'hôte.

Le virus est présent sous deux formes infectieuses différentes : le virion intracellulaire mature (IMV) et le virion extracellulaire enveloppé (EEV) (Smith, 1993). Les IMV sont séquestrés dans le cytoplasme et ne sont libérés que lors de la lyse de la cellule. Une part infime de ces IMV peut acquérir une enveloppe d'origine golgienne ou endosomale : ils deviennent ainsi des virions intracellulaires enveloppés (IEV). Ils peuvent se déplacer dans le cytoplasme pour atteindre la membrane plasmique de la cellule. Il y a fusion et libération dans le milieu extérieur des EEV qui seront minoritaires. Elle sera la forme de dissémination du virus.

Deux morphologies différentes sont cependant visibles en microscopie électronique au sein d'un même genre : une forme ovoïde de 300nm de long pour 190nm de large, et une forme parallélépipédique de 400nm de long sur 200 de large et 150nm d'épaisseur.

GENRE	ESPECE TYPE	PRINCIPALES AUTRES ESPECES
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la vaccine	Cowpox Virus de la variole du buffle Virus de la variole du singe Rabbitpox, Mousepox Virus de la variole humaine
<i>Parapoxvirus</i>	Orf virus	Virus de l'ecthyma contagieux Virus de la stomatite papuleuse Pseudocowpox
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la clavelée	Virus de la variole caprine
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose	<b>Virus du Fibrome de Shope</b> <b>Virus du fibrome de l'écureuil</b> <b>Virus du fibrome du lièvre</b>
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	
<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapoxvirus de l'homme	Virus de la tumeur Yaba du singe
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus molluscum contagiosum	

**Tableau 4** : Classification des *Chordopoxvirinae* (D'après Moss, 1991)

## 1.2 Organisation génomique

Le génome est constitué d'une région centrale unique et très conservée au sein du genre (figure 5). Les gènes essentiels au cycle viral se retrouvent à ce niveau. Aux deux extrémités terminales, sont présentes des séquences répétées inversées (RIT) d'environ 10 à 15 kpb et codant pour les facteurs de pathogénicité. Il faut noter l'absence d'introns, l'existence de nombreuses ORF de petite taille, des séquences promotrices courtes.

On trouve trois types de gènes (Van Regenmortel *et al.*, 2000) :

**Gènes précoces** : ils permettent la production de protéines non structurales, type enzyme, pour la réplication et la modification de l'ADN ou de l'ARN. Ces protéines contribuent aussi à neutraliser la réponse de l'hôte.

**Gènes intermédiaires** : Ils codent pour les facteurs transcriptionnels tardifs. Ils s'expriment pendant la phase de réplication de l'ADN et sont nécessaires pour l'expression des gènes tardifs.

**Gènes tardifs** : Ils s'expriment pendant la phase post-réplicationnelle. Ils codent pour des protéines structurales et des facteurs précoces pour la transcription.

## 1.3 Le cycle viral

On retrouve 4 phases importantes (figure 6) (Cann, 1993).

### ❖ Pénétration du virus dans la cellule

L'attachement consiste en une reconnaissance spécifique entre des protéines à la surface de la cellule, et d'autres du virus. Les cibles en surface peuvent être de nature différentes et il est à noter que les poxvirus utilisent plus d'un récepteur. Cela leur offre maintes possibilités pour entrer dans la cellule et leur confère une grande capacité d'infection. La représentation ou l'absence de récepteurs cellulaires détermine le tropisme d'un virus, donc le type de cellule dans lequel il peut se répliquer.

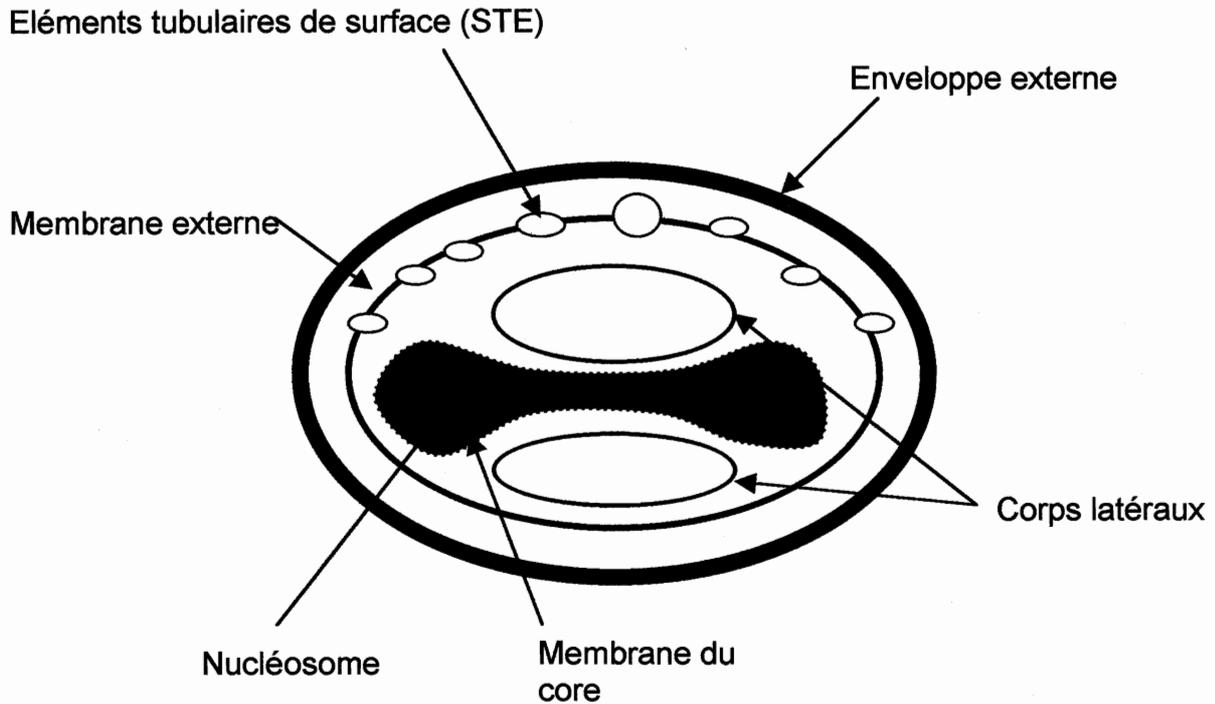


Figure 4 : Vue schématique d'un *Orthopoxvirus* (forme EEV) (Bertagnoli, 2002)

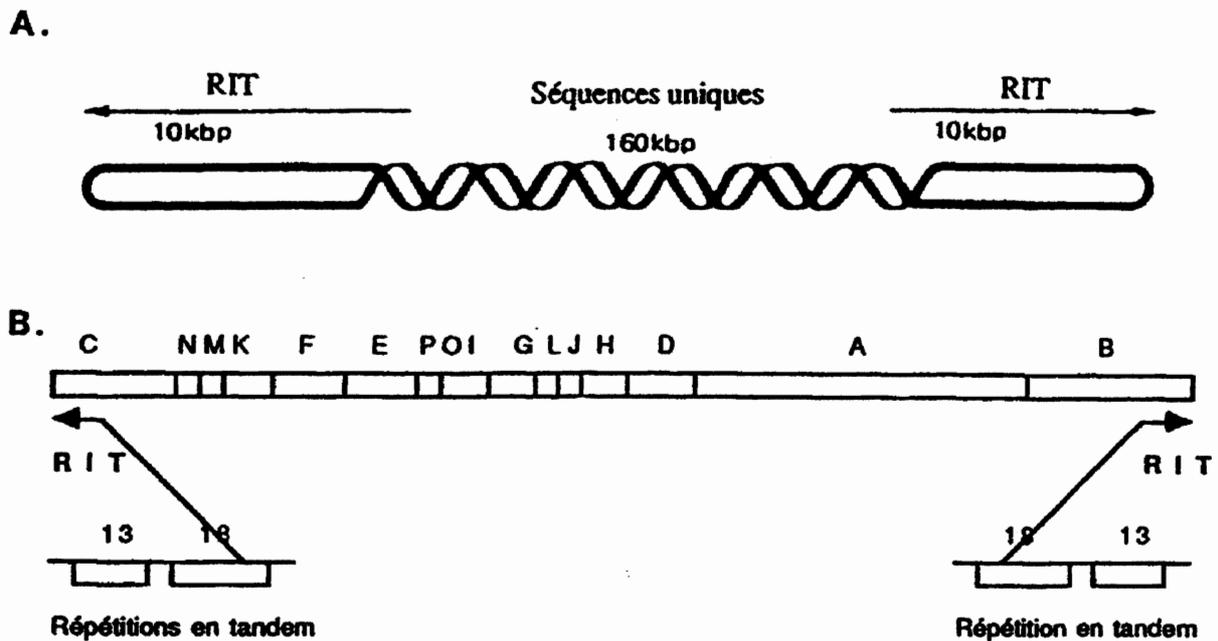


Figure 5 : Organisation du génome des *Poxviridae* (Van Regenmortel *et al.*, 2000)

A : Représentation schématique du génome viral (Modèle : virus de la vaccine)

B : Carte *Hind*III du génome du virus de la vaccine (Souche Copenhagen)

En général, la pénétration suit de près la phase d'attachement et est souvent un processus « énergie-dépendant ». La cellule doit être métaboliquement active. Trois mécanismes sont mis en jeu suivant le groupe viral, le type de virus... En ce qui concerne les poxvirus, virus enveloppés, on distingue deux modalités : la fusion de cette enveloppe avec la membrane plasmique ou la formation d'une vésicule d'endocytose . Il faut rappeler que cette fusion nécessite une protéine spécifique de fusion (par exemple, une hémagglutinine pour le virus de l'influenza). Cette vésicule a une durée de vie très courte, car il y a rapidement fusion avec un lysosome qui va se charger de détruire l'enveloppe du virion. Le pH de la vésicule étant très bas, le virus doit en sortir le plus rapidement possible afin d'éviter une dégradation totale.

❖ Déshabillage du virus

Cette phase regroupe les termes décrivant les événements qui arrivent après la pénétration. On peut donc y introduire le remodelage de la capsid, l'exposition du génome viral sous forme de complexe nucléoprotéique. La fusion entre l'enveloppe et la membrane de l'endosome, se fait grâce à l'intervention de protéines virales qui changent de morphologie sous l'effet d'un pH acide. On assiste donc au dévoilement d'un domaine de fusion jusque là caché. Il s'en suit des remodelages de la capsid. La composition chimique et la structure de cette nucléocapsid déterminent les étapes ultérieures de la réplication.

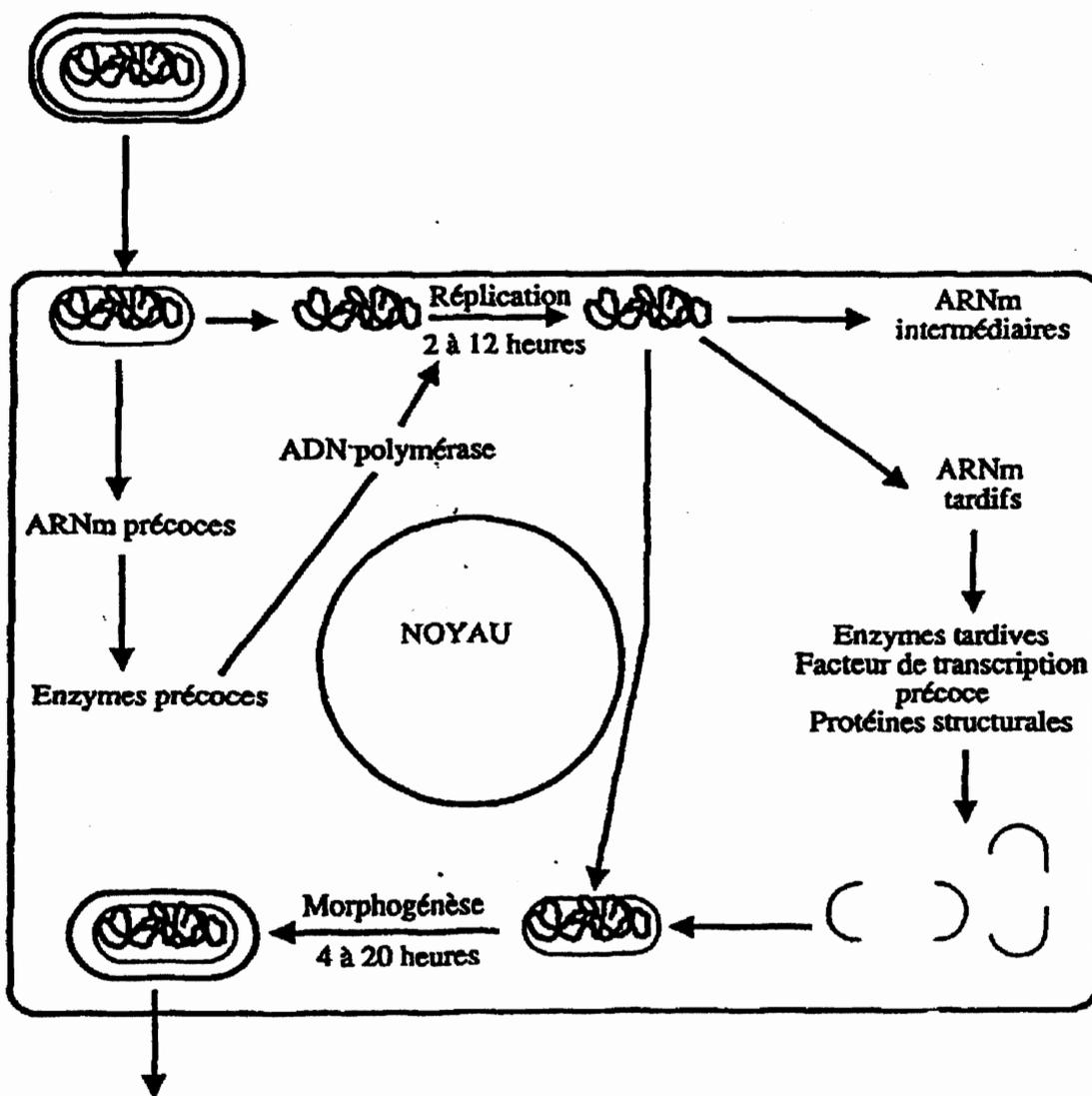
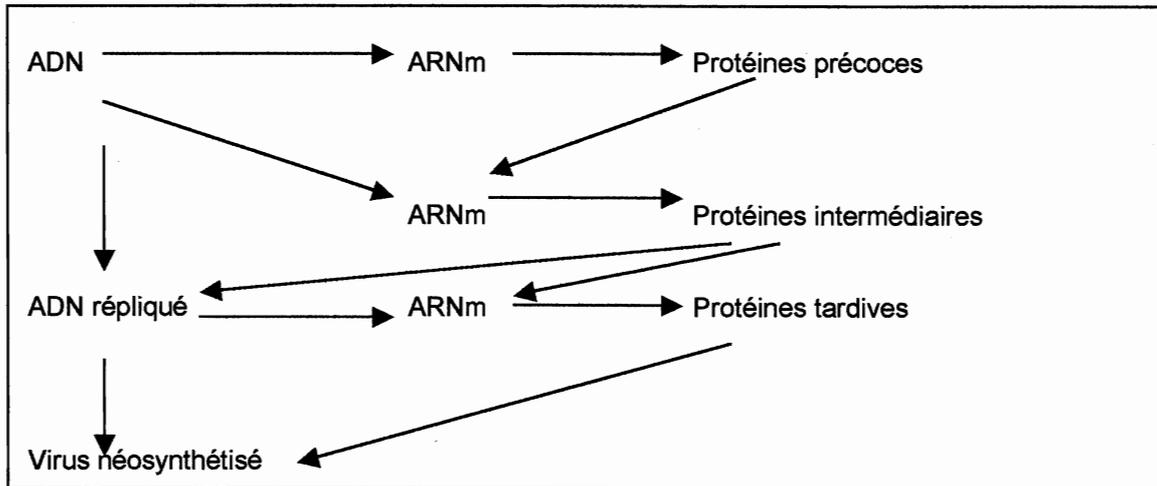


Figure 6 : Cycle récapitulatif des poxvirus (Modèle : virus de la vaccine). Adaptation de Moss, 1996.

❖ Réplication, expression du génome et régulation du cycle

La stratégie de réplication dépend de la nature du matériel génétique viral. On détermine ainsi sept groupes classés, par exemple, suivant le type d'acide nucléique. Les poxvirus se situent dans la classe I : ADN double brin, avec une réplication dans le cytoplasme (Tableau 5). Tous ont acquis ou développé des facteurs nécessaires à la transcription, à la réplication et sont donc indépendants des facteurs cellulaires ambiants.



**Tableau 5** : Stratégie de réplication des poxvirus (Cann, 1993)

On peut souligner que le contrôle de l'expression du gène détermine la stratégie d'infection du virus.

La régulation commence dès l'entrée du virus dans la cellule et prend fin lors de la phase d'assemblage.

La première phase consiste en l'expression des gènes précoces afin d'obtenir l'ARN polymérase, des facteurs spécifiques de transcription ainsi que des enzymes aidant à la synthèse d'ARNm. Ces ARNm sont extraits du core pour être associés aux ribosomes de la cellule hôte.

La seconde phase correspond à la réplication de l'ADN qui conditionne la transcription des gènes intermédiaires.

La troisième phase du cycle correspond à l'expression des gènes tardifs codant pour les protéines structurales, le système enzymatique viral et les facteurs précoces de transcriptions (Moyer et Turner, 1990).

❖ **Maturation et libération des nouveaux virions**

L'assemblage implique la présence de tous les constituants nécessaires à la formation de virions matures en un point particulier de la cellule. Le site d'assemblage de tous les constituants dépend du site de réplication dans la cellule et du mécanisme par lequel le virus est libéré par la cellule. En ce qui concerne les poxvirus, l'assemblage se fait dans le cytoplasme. Dans la plupart des cas, les membranes cellulaires sont utilisées pour ancrer les protéines virales, tout ceci initialisant le processus d'assemblage. Le contrôle est mal connu. On pense qu'une certaine concentration en particules virales déclenche le phénomène. Certaines sont concentrées dans des sites cellulaires formant ainsi ce qu'on nomme les corps d'inclusions.

Les étapes suivantes vont permettre aux virions de devenir infectieux. La maturation permet un remaniement des protéines de la capsidie par des phénomènes de clivages par exemple. Ces changements se font grâce à des enzymes virales ou cellulaires. Ces dernières étant moins spécifiques que les premières, il y a un risque de dégradation totale de la capsidie. Pour les virus enveloppés, la maturation se fait une fois l'assemblage effectué sur les membranes cellulaires ainsi qu'après la libération du virion dans le milieu extracellulaire.

Des sites cellulaires où les membranes virales se forment ont été identifiées par microscopie électronique. Ces structures sont appelées virosomes et apparaissent 4 à 5 heures post-infection. Il y a accumulation des membranes virales lipidiques formées par la modification des membranes du compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Sodeik *et al.*, 1993). Par la suite, les particules s'entourent d'une enveloppe supplémentaire dérivée du Golgi, migrent vers la surface grâce à la polymérisation de l'actine du cytoplasme de la cellule, et sont relarguées par fusion avec la membrane plasmique (Smith et Vanderplasschen, 1998).

## ***2. Les facteurs majeurs de pathogénicité du Virus myxomateux et leur rôle***

Le génome du virus myxomateux est composé d'une molécule d'ADN unique, linéaire, bicaténaire de taille variant entre 145 et 162 kpb (Cameron *et al.*, 1999). La région centrale de la molécule est fortement conservée et contient les gènes nécessaires au cycle viral. On retrouve des TIR (régions terminales répétées

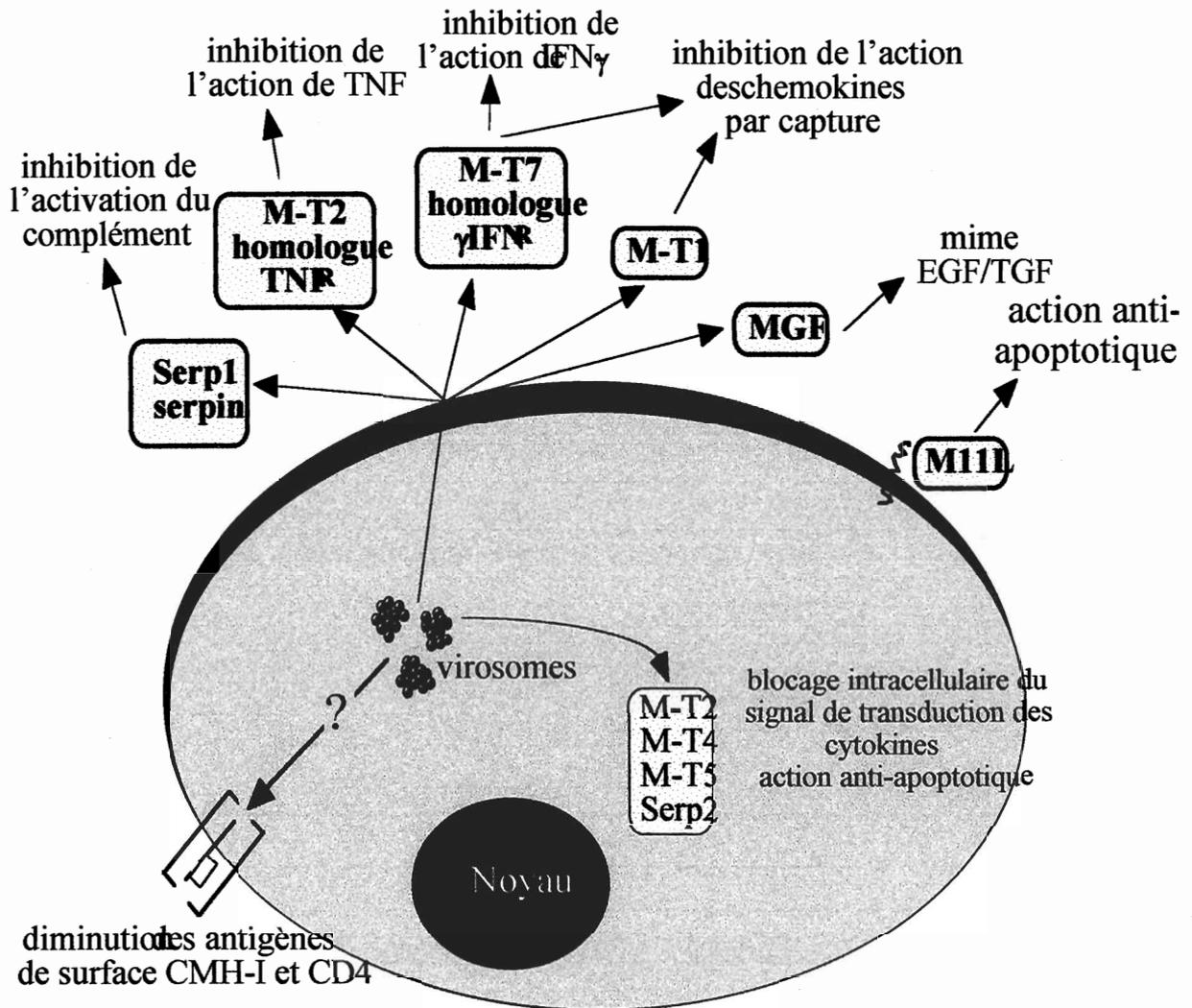
inversées) d'environ 10kpb dans le voisinage desquelles sont situés la plupart des gènes de virulence (Messud-Petit et Bertagnoli, 2000) (figure 7).

Une stratégie du virus myxomateux pour survivre dans l'hôte est la synthèse de molécules visant à provoquer une immunodépression importante. On retrouve des virokines et des virocepteurs qui vont bloquer les signaux extracellulaires visant à éliminer le virus (Messud-Petit et Bertagnoli, 2000).

### 2.1 Action stimulante sur la cellule hôte

Un couple de molécule, l'EGF (*epidermal growth factor*) et son récepteur, régule la prolifération et la différenciation cellulaire. On distingue chez les poxvirus quatre représentants de cette famille dont le MGF (*myxoma growth factor*) pour le virus myxomateux (Upon *et al.*, 1987). Tous les homologues poxviraux de l'EGF ont des structures secondaires et tertiaires similaires à celle de l'EGF, ainsi que le prédit la conservation des six résidus cystéine qui forment les ponts disulfure. Le gène codant pour MGF se trouve de façon unique au côté des séquences inversées gauches. Les virus mutant n'exprimant plus MGF provoquent les symptômes caractéristiques de la maladie, mais leur virulence est très diminuée (Opgenorth *et al.*, 1992).

L'hyperplasie de l'épithélium est fortement diminuée et les surinfections réduites. En revanche, les souris transgéniques exprimant le MGF présentent une prolifération et une arborisation des acini mammaires ainsi qu'une hyperplasie de l'épithélium gastrique (Strayers *et al.*, 1993). On peut imaginer que cette virokiné stimule l'anabolisme des cellules, qu'elles soient infectées ou non, fournissant un terrain favorable pour la réplication du virus.



### Facteurs de virulence du virus myxomateux

**Figure 7** : Les facteurs de pathogénicité codés par le virus myxomateux (Messud-Petit et Bertagnoli, 2000)

## 2.2 Action anti-inflammatoire

Les serpins sont des protéines synthétisées par les poxvirus, qui permettent la régulation de nombreux processus physiologiques (activation du complément, fibrinolyse, modulation de la réponse inflammatoire...). Actuellement, elles sont considérées comme des virokines puisqu'elles interfèrent avec la signalisation intracellulaire. SERP1 est spécifique du virus myxomateux. (Macen *et al.*, 1993). Elle présente une forte activité anti-inflammatoire. Lors d'inoculation de lapins par le virus délété du gène codant pour SERP1, on constate une diminution des surinfections du tractus respiratoire et un taux de survie plus élevé (Upton *et al.*, 1990). *In vitro*, cette serpine forme des complexes stables avec l'activateur du plasminogène tissulaire, l'urokinase, la plasmine, la thrombine et le facteur Xa (Lomas *et al.*, 1993, Nash *et al.*, 1998). Néanmoins, il subsiste un doute sur son action *in vivo*.

La protéine M11L, synthétisée précocement, semble impliquée dans la prévention de l'apoptose sans qu'un mécanisme d'action ne soit vraiment élucidé. Elle est composée d'un domaine extracellulaire dans la partie N-terminale et d'une hélice transmembranaire dans sa partie C-terminale. Une délétion de cette dernière réduit de 45% son expression et bloque son transport à la surface des cellules infectées. L'inoculation de mutants M11L-C-terminale(-) fait diminuer le pouvoir pathogène du virus myxomateux (Opgenorth *et al.*, 1992). On constate une augmentation du nombre de macrophages dans les myxomes, les signes respiratoires sont réduits et la guérison intervient dans les 30 jours. On remarque donc un accroissement de la réponse inflammatoire par rapport à l'inoculation d'un virus sauvage. M11L pourrait être en fait un ligand pouvant fixer un effecteur normal de l'inflammation, ce qui rendrait ce dernier très peu disponible pour pouvoir amplifier le processus inflammatoire.

## 2.3 Fabrication de leurres

Les virocepteurs jouent le rôle le leurre, piégeant et détournant ainsi les cytokines produites par l'hôte. Trois gènes situés aux extrémités terminales du génome ont été identifiés chez le virus myxomateux : M-T1, M-T2 et M-T7 (le numéro est en relation avec la position du gène par rapport à la boucle terminale du génome (Cameron *et al.*, 1999)).

M-T1 fait partie d'un groupe de protéines poxvirales dénomées T1/35 kd qui sont des inhibiteurs solubles de CC-chimiokines (Graham *et al.*, 1997). On a montré,

*in vitro*, qu'il existait une forte affinité entre M-T1 et certaines CC-chimiokines type MIP1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein*). Ceci mérite à penser que M-T1 empêcherait la fixation de ces ligands à leurs récepteurs (Lalani *et al.*, 1998). Sur des études *in vivo*, lors d'inoculation d'un virus mutant M-T1(-), on constate un afflux de cellules monocytaires et macrophagiques aux sites même d'inoculation (Lalani *et al.*, 1999) alors que ce phénomène reste absent lors d'une inoculation par la souche sauvage. Il est à noter que l'évolution clinique reste la même quel que soit l'inoculat, que le virus exprime ou non M-T1.

Le TNF est un facteur de nécrose tumorale qui est impliqué dans l'immunité antimicrobienne (Beutler *et al.*, 1992). Il agit soit par lyse directe des cellules infectées, soit de façon indirecte en synergie avec les interférons (Wong et Goeddel, 1986). Les deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  du TNF ont des activités biologiques très proches mais reconnaissent des récepteurs différents, respectivement TNFR1 et TNFR2. M-T2 est marquée d'une forte homologie avec la région extracellulaire de la famille des TNFR2, ce qui correspond au site de fixation du ligand. Cette protéine, sécrétée précocement sous la forme d'une protéine de 325 acides aminés, fut apparentée aux récepteurs de la famille du TNF $\beta$  (Smith *et al.*, 1991). Son gène fut mis en évidence sur le génome du virus myxomateux (Upton *et al.*, 1991). La protéine sécrétée se fixe aussi bien au TNF $\alpha$  que  $\beta$ , avec cependant une certaine préférence pour la cytokine de l'hôte naturel du virus. Dans ces conditions, M-T2 est capable d'inhiber la lyse cellulaire induite par le TNF du lapin. La capacité de fixation de la protéine T2 à TNF nécessite des répétitions N-terminales de domaines riches en cystéines ou CRD. Si on effectue des mutations au niveau de ce domaine, la protéine est incapable de se fixer à TNF (Schreiber *et al.*, 1996). Cette terminaison posséderait une activité anti-apoptotique. L'inoculation d'un virus délété montre une diminution importante du pouvoir pathogène par rapport à l'inoculation d'un virus sauvage (Upton *et al.*, 1991).

M-T7 présente une homologie dans sa partie N-terminale avec le récepteur de l'IFN $\gamma$  (Upton *et al.*, 1992). Elle est d'autant plus grande dans le domaine d'interaction avec le ligand. Fixé à un leurre, l'IFN $\gamma$  n'a pas la possibilité d'interagir avec son récepteur normal et d'exercer ses propriétés antivirales (Upton *et al.*, 1992). On retrouve la spécificité d'hôte comme pour la protéine M-T2. Par le biais d'analyse des tissus dermiques, on a pu montrer que M-T7 inhibait l'afflux leucocytaire mais la

signification biologique de M-T7 comme inhibiteur de chimiokines nécessite d'être confirmée (Mossman *et al.*, 1996).

#### 2.4 Limitation de l'apoptose cellulaire pour la survie

Les protéines caspases jouent un rôle majeur dans le déclenchement et le déroulement de l'apoptose. Le virus myxomateux va donc déployer une stratégie afin d'empêcher ces différents étapes. Serp2 est actuellement le seul inhibiteur de caspases identifié (Petit *et al.*, 1996). Cette protéine de 333 acides aminés est produite tout au long du cycle viral sans jamais être exportée dans le milieu extracellulaire. Elle serait capable d'inhiber la caspase 1 (enzyme de conversion de la pro-IL1 $\beta$ , ou ICE) (Petit *et al.*, 1996). L'inoculation de lapin par des virus mutant Serp2 (-) montre que la maladie est fortement atténuée (Messud-Petit *et al.*, 1998). L'analyse du nœud lymphatique drainant la région du site d'inoculation montre un fort taux d'apoptose chez les lymphocytes. Histologiquement, lorsque Serp2 est exprimée, on constate que la réponse inflammatoire est bloquée au niveau de la phase vasculaire. Tout ceci permet de conclure sur le rôle probable de Serp2 en temps qu'agent anti-apoptotique et inhibiteur d'IL1 $\beta$ .

Dans ce phénomène de modulation de l'apoptose des cellules infectées, on retrouve les produits des gènes T2, T4 et T5. Lors d'inoculation de virus mutant M-T2(-), on constate l'apoptose de cellule RL5 (Macen *et al.*, 1996). Il faut noter que cette action est indépendante de la fixation au TNF. Il semblerait donc que cette protéine ait deux actions différentes peut être en relation avec la partie intracytoplasmique de M-T2. M-T4 est localisée dans le réticulum endoplasmique et possède une séquence spécifique, nécessaire à sa localisation (Barry *et al.*, 1997). Lors d'inoculation de virus mutant M-T4(-) à des lymphocytes, on constate que ceux-ci meurent par apoptose (Barry *et al.*, 1997). L'inoculation de lignée RL5 par un virus mutant M-T5(-) provoque le même phénomène de façon indirecte. En effet, c'est l'arrêt des synthèses protéiques cellulaires et virales qui provoquent la mort des cellules RL5 (Mossman *et al.*, 1996). A contrario, des fibroblastes infectés ne subissent pas le même phénomène, orientant ainsi les hypothèses vers une spécificité de lignée cellulaire pour cette protéine. Lors d'inoculation de lapins par ce virus mutant, on constate quand même un taux de survie de 100%, l'absence de myxomes secondaires et aucune surinfection.

## 2.5 Réduction de l'expression de protéines membranaires

Un autre système d'échappement du virus myxomateux à la réponse de l'hôte est la baisse de l'expression des marqueurs membranaires CD4 et CMH1.

L'infection de cellules de singes (BGMK) par le virus myxomateux a montré une nette diminution de l'expression des molécules du CMH1 mais sans modifications pour les autres molécules de surface (Boshkov *et al.*, 1992). Ce phénomène est bien plus modéré lors de l'infection par le virus du fibrome de Shope. Lors de l'analyse des cellules à 4, 8, 12, 16 et 24 heures après l'infection par le virus myxomateux, il a été constaté une diminution progressive de l'expression des molécules de surface de classe I. Ce phénomène débiterait environ 4 heures après l'infection et montrerait un pic entre 16 et 24 heures post-infection. Il a été mis en évidence que la perte des molécules de surface de classe I n'était pas seulement due au blocage complet de l'expression des gènes de la cellule hôte. Il semblerait que le virus myxomateux ait le pouvoir de masquer des protéines de surface préexistantes ne permettant pas la reconnaissance antigénique (Boshkov *et al.*, 1992). Par ailleurs, lors d'une infection, le taux de récepteurs à transferrine reste inchangé laissant prévoir que la réaction du VM face aux molécules de classe I est spécifique.

On constate la même diminution de l'expression des molécules CD4 lors d'infection de la lignée RL5 (lymphocytes CD4+ de lapins) par le virus myxomateux (Barry *et al.*, 1995). Si tout ceci était confirmé *in vivo*, on pourrait aboutir à la conclusion que ce mécanisme d'action contribuerait à diminuer la réponse à médiation cellulaire, à participer au déficit de la réponse immunitaire et à l'immunodépression en générale. La figure 9 reprend les différents facteurs de virulence du VM.

## Conclusion

Le virus myxomateux présente une architecture particulière pour un matériel génétique peu complexe en apparence : une molécule d'ADN regroupe tous les gènes nécessaire à sa survie. Son cycle reste simple : il se réplique sans avoir impérativement recours à des protéines d'origine cellulaire. Il est donc quasi indépendant et assure lui même sa réplication.

A ce jour, la carte génétique du virus myxomateux a été entièrement établie (Cameron *et al.*, 1999). Il apparaît une longue liste de différents facteurs de pathogénicité dont les rôles ne sont pas tous déterminés. En revanche, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence son mode d'action favori : mettre en défaut le système immunitaire de l'hôte afin d'assurer sa survie.

Il apparaît donc comme une entité parfaitement adaptée à son hôte avec une capacité incroyable à déjouer les défenses immunitaires. Au fil des années, il a su s'adapter en développant des souches de différents grade de virulence permettant ainsi d'être présent aussi longtemps que l'espèce hôte se trouve sur le terrain. Mais la lutte continue pour trouver de nouvelles stratégies afin de lutter efficacement contre ce virus qui ravage encore des populations entières de lapins. C'est par l'étude de nouveaux gènes isolés que nous pourrons mieux comprendre son mode d'action et ainsi, à terme, développer de nouvelles approches prophylactiques.

C'est pour compléter ces recherches que nous avons étudié de plus près le génome du virus myxomateux. Pour cela, nous nous sommes servis du séquençage de la zone manquante du génome de la souche virale SG33 (Guérin, 2001b). C'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence un nouveau gène, *mv-lap*, codant pour un nouveau facteur dont la fonction était encore inconnue. Le rapprochement avec des gènes équivalents rencontrés chez d'autres virus, nous amène à émettre des hypothèses fonctionnelles. Le rôle de *mv-lap* dans la pathogénie du virus myxomateux sera validé par l'analyse *in vitro* et *in vivo*, d'un mutant délété de ce gène. Nous allons ainsi agrandir la liste non exhaustive mais déjà longue des facteurs de pathogénicité de ce poxvirus.



# ***DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE***



## Introduction

Ce travail consistera en l'analyse de l'effet d'un des gènes du virus myxomateux, gène identifié et caractérisé par l'UMR INRA-ENVT de Microbiologie Moléculaire de l'école vétérinaire de Toulouse.

En mai et juin 2000, deux groupes américains ont montré que deux protéines à motif LAP codées par le virus HHV-8 (associé au sarcome de Kaposi), K3 et K5, jouaient un rôle majeur dans la diminution de l'expression du CMH 1 à la surface des cellules infectées, en activant l'endocytose de ces molécules (Coscoy et Ganem, 2000 ; Ishido *et al.*, 2000). MV-LAP étant comparable à ces deux facteurs, d'un point de vue structurel, nous nous sommes intéressés à l'influence de ce gène sur la pathogénicité du virus de la myxomatose.

Afin de déterminer la fonction exacte de cette protéine, nous avons procédé par différentes étapes.

Tout d'abord, nous ferons une analyse de la séquence MV-LAP afin de déterminer l'architecture précise de cette protéine. Nous essayerons de la mettre en relation avec celle d'autres protéines, afin d'approcher sa fonction biologique.

Pour étudier le rôle de MV-LAP dans le pouvoir pathogène du virus myxomateux, nous construiront un virus délété, selon une technique éprouvée au laboratoire. L'étude comparée du pouvoir pathogène du virus délété et du virus sauvage de référence sera mis en évidence grâce à des inoculations expérimentales. Nous évaluerons l'impact de ce facteur sur la pathogénie clinique de la myxomatose, en comparant son phénotype avec celui du virus sauvage.

Pour terminer, nous chercherons à montrer si le facteur MV-LAP entraîne bien une diminution des molécules du CMH 1.

Dans une discussion générale, nous rassemblerons ces observations et nous présenterons les hypothèses susceptibles d'éclairer le mode d'action de ce nouveau

facteur de pathogénicité. Les perceptions de recherches visant à valider ces hypothèses seront présentées et discutées. L'étude clinique sera complétée par une analyse histologique, permettant d'évaluer plus finement les modifications lésionnelles au point d'inoculation, comme dans les tissus lymphoïdes drainant.

## **I] Matériel et méthode**

### *1. Virus et cellules*

La souche sauvage T1 du virus myxomateux et le mutant MV- $\Delta$ LAP ont été cultivés sur des cellules de reins de lapins (RK13) dans un milieu minimum de Eagle (Invitrogen) supplémenté de 2% de sérum de veau foetal.

Cette souche sauvage de virus fut isolé à l'école vétérinaire de Toulouse, d'une façon contemporaine à l'isolement de la souche Lausane (Bouvier, 1994) et fait depuis, office de souche de référence au laboratoire.

Les cellules sont multipliées tous les 6 à 7 jours : elles sont trypsinées, décollées du support et centrifugées. Elles sont ensuite réparties dans de nouvelles boîtes afin d'obtenir un nouveau tapis cellulaire.

### *2. Analyse de séquence, clonage et séquençage*

L'ADN viral entre les gènes *serp-1* et *serp-3* a été amplifié et séquencé comme il a été fait auparavant sur le gène *serp-3* (Guérin *et al.*, 2001). Le séquençage est réalisé selon une méthode enzymatique (méthode de SANGER), par la société Génome Express à Grenoble.

La séquence d'ADN a fait l'objet d'une analyse informatique grâce au logiciel DNA-strider<sup>TM</sup>. Les recherches d'homologie avec des séquences protéiques (ou nucléotidiques) connues ont été effectuées en consultant le logiciel BLAST sur le serveur *Medline* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Les séquences éditées ont été analysées à l'aide du programme GAP (SwissProt, version 33, March 1996).

La séquence nucléotidique du gène MV-LAP et du polypeptide déduit ont été déposées à la banque de données GenBank sous le numéro d'accès AF229033.

### *3. Extraction d'ARN et RT-PCR*

Des cellules RK13 à la concentration  $5 \times 10^6$  ont été infectées par la souche sauvage T1 ou par la souche délétée MV- $\Delta$ LAP. Nous avons isolé les ARN à 2, 4, 8, 12 et 16 heures post-infection grâce au réactif TRIzol de la société Invitrogen. Nous

les avons extraits des cellules en les traitant avec 40µg de cytosine arabinooside/ml à chacun des moments désirés.

Pour la RT-PCR, nous avons utilisé des amorces spécifiques de MV-LAP afin de reconstituer l'ADN complémentaire. Par la suite, nous avons amplifié ce brin grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques suivantes :

- ❖ MV-LAP-Fwd-*Bam*HI : 5'- CAGCGGATCCGGTAAACATGGCTACTGTTG- 3'
- ❖ MV-LAP-rev-*Pst*I : 5'- AAAGTGCAGTTTCTAAGCGGGTGACTCCA- 3'

Ces amorces correspondent respectivement aux terminaisons 5' et 3' du cadre de lecture de MV-LAP.

#### 4. Construction d'un virus mutant MV-ΔLAP et d'un virus révertant

Afin d'évaluer l'implication du gène MV-LAP dans la pathogénicité du virus myxomateux, nous l'avons inactivé en enlevant le site actif présumé (le domaine LAP) et en le remplaçant par une cassette *lacZ* placée en anti-sens.

Deux couples d'amorces comportant des sites de restrictions en partie 5' terminale, ont été utilisés afin d'amplifier les fragments situés juste en amont et en aval du domaine LAP, par PCR (polymérisation en chaîne).

<b>Préparation du mix de réaction pour :</b>	<b>50µl</b>
Tampon de réaction 10X :	5µl
Mélange de dNTP 50X :	1µl
Taq Polymérase (5UI / µl) :	0,5µl
Amorces 20X sens :	2,5µl
Amorces 20X anti-sens :	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> 33X :	1,5µl
Quantité d'eau suffisante pour 50µl :	36µl

Le mix est réparti dans les tubes de réaction dans lequel on rajoute 1µl d'ADN cible. Les cycles d'amplifications sont réalisés dans un thermocycleur Perkin-Elmer : une étape de dénaturation à 94°C puis 30 cycles d'amplifications.

Ils se déroulent de la façon suivante :

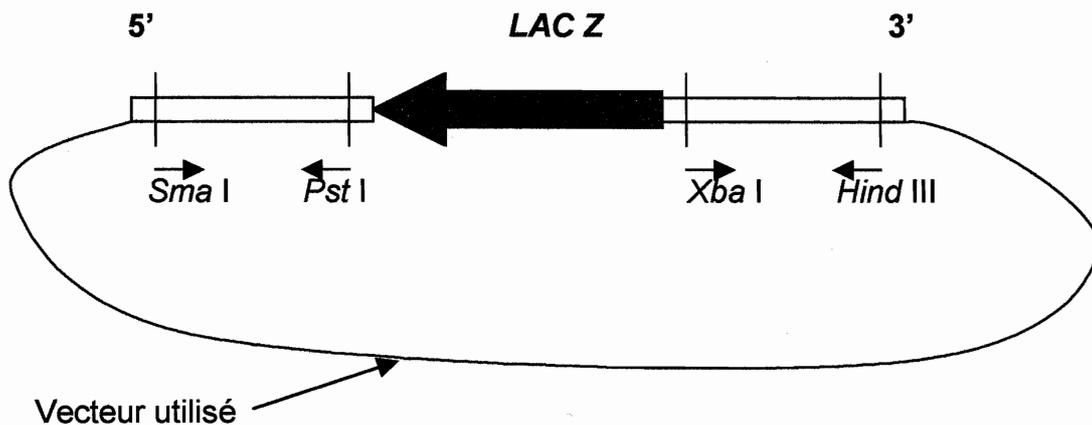
- 0 min 40 à 94°C
- 0 min 40 à 50°C (hybridation)
- 1 min à 72°C (élongation)

Couple numéro	Sens de l'amorce	Dénomination	Séquence
1	5'-3'	<b>Sma I</b>	CAGCAGCCCGGGTATGGATATCTTTAATCATT AAA
	5'-3'	<b>Pst I</b>	CAGCACTGCAGGCTTACATCGTCCAGGTTTAC
2	5'-3'	<b>Xba I</b>	CAGCTCTAGAGTCCGTACAACCTAAAGCGGC
	5'-3'	<b>Hind III</b>	CAGCAAGCTTTCTAAGCGGGTGACTCCACGA

**Tableau 6:** Séquences des amorces utilisées

Après digestion par les enzymes de restriction *PstI* et *XbaI*, le fragment restant a été cloné dans un vecteur plasmidique pGEM-T (Promega), en remplaçant le site LAP par un gène *PstI-XbaI-lacZ*, sous le contrôle du promoteur p7.5 du virus de la vaccine. Les différents morceaux obtenus ont été reliés entre eux par une ligase.

Le résultat fut le suivant :



**Figure 8 :** Représentation schématique du vecteur construit

Par la suite, nous avons utilisé ce plasmide afin d'obtenir le mutant MV- $\Delta$ LAP. Nous avons tout d'abord séquencé la portion pMV-LAP :Lac Z. Ensuite, elle a été utilisée pour transférer des cellules infectées par le virus myxomateux sauvage. Pour ce faire des bactéries compétentes ont été préparées. Une culture d'*Escherichia coli* est réalisée sur la nuit dans 3ml de milieu LB. On ensemence 50ml de milieu LB avec 0,5ml de cette préculture et on laisse pousser cette culture pendant 2h environ.

Les cellules sont laissées dans la glace 30mn et sont centrifugées 5min à 5000 rpm (à 4°C). Le surnageant est drainé et le culot est resuspendu dans 10ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM glacé : il reste 60mn dans la glace, centrifuger 5mn à 5000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 2ml de CaCl<sub>2</sub> 100mM glacé : les bactéries sont prêtes pour la transformation.

La transformation consiste en l'introduction du plasmide dans les bactéries compétentes. Pour cela nous avons mélangé le vecteur avec 200 $\mu$ l de bactéries. L'incubation se fait pendant 30 minutes dans la glace, puis un choc thermique est réalisé en incubant 2min à 42°C. Le tout est remis dans la glace pendant 5min et on rajoute 800 $\mu$ l de milieu LB et mis en incubation 1h à 37°C. Par la suite, 200 $\mu$ l de la préparation sont étalés sur une boîte LB-agar contenant 100 $\mu$ g d'ampicilline par ml.

Le mutant a été isolé grâce à la mise en évidence de la cassette Lac Z par dilution sur gélose. La technique de PCR a été utilisée sur le virus recombinant pour confirmer l'absence de la souche sauvage dans les préparations du virus MV- $\Delta$ LAP.

L'absence d'expression de la protéine MV-LAP dans les cellules infectées par le virus délété a été validée par une PCR inverse. Le virus inverse, contenant tout le matériel génétique du virus sauvage, a été obtenu en faisant une transfection du gène complet de MV-LAP dans le virus MV- $\Delta$ LAP, dans un milieu de culture composé de cellules infectées RK13.

##### *5. Inoculation expérimentale des lapins*

Les lapins sont âgés de huit semaines. Ils ont été obtenus auprès d'un fournisseur local et ont été logés en animalerie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

L'infection des lapins a été réalisée par une injection intradermique au niveau de l'oreille droite. Plusieurs lots ont été réalisés permettant l'inoculation d'une dose de  $5 \times 10^3$  PFU soit de virus sauvage T1, soit du virus mutant MV- $\Delta$ LAP ou encore du virus MV-LAP révertant.

Les lapins ont été suivis quotidiennement afin d'observer les différents signes cliniques associés à la myxomatose (Fenner et Ratcliff, 1965). Les lapins trop atteints furent anesthésiés à l'aide d'Imalgène<sup>TM</sup> (Merial) puis euthanasiés à l'aide de T61 (Distrivet), injecté par voie intraveineuse. Pour les études histologiques, six lapins ont été inoculés avec la souche sauvage T1 du virus myxomateux et six autres avec le virus MV- $\Delta$ LAP. Deux lapins de chaque groupe ont été euthanasiés à 4, 8 et 12 jours après l'inoculation.

## 6. Examen histologique

Tous les animaux ont été soumis à un examen post-mortem rigoureux. Les tissus prélevés sont le site d'inoculation (myxomes primaires) et les nœuds lymphatiques parotidiens drainant le myxome primaire. Ils ont été fixés dans une solution de formol à 10% tamponné, en vue d'une analyse ultérieure. Après fixation, les tissus ont été inclus dans la paraffine, découpés en sections de 4 $\mu$ m d'épaisseur et colorés en vue d'un examen au microscope optique.

Les lésions ont été classées de la façon suivante : minimale, légère, modérée, marquée et sévère. La méthode TUNEL a été utilisée pour mettre en évidence l'apoptose des lymphocytes dans les nœuds lymphatiques parotidiens (Messud-Petit *et al.*, 1998). Cette méthode consiste en une coloration qui permet de visualiser les corps apoptotiques.

La gradation de cette apoptose est fondée sur le nombre d'inclusions apoptotiques sur le champs du microscope au grossissement 400.

Nombre de corps apoptotiques	Interprétation
De 25 à 50	Apoptose minimum
De 50 à 75	Légère apoptose
De 75 à 100	Apoptose modérée
De 100 à 125	Apoptose marquée
Plus de 125	Sévère apoptose

**Tableau 7** : Grille d'évaluation de l'apoptose dans les tissus

### 7. Analyses des cellules infectées en cytométrie de flux

Des cellules BGMK sub-confluentes ont été infectées avec les souches virales T1 ou MV- $\Delta$ LAP, avec une M.O.I. de 5, ou incubées avec du milieu (cellules contrôle non-infectées). 36h post-infection, les cellules BGMK ont été détachées de leur support en les incubant 15min en tampon PBS EDTA 2mM, puis rincées en tampon PBS-BSA1% et incubées 30min à 4°C avec des anticorps monoclonaux conjugués avec la phycoerythrine (PE) dirigés contre les molécules de classe I du CMH humain (haplotypes A, B et C), Fas-CD95 ou le récepteur de la transferrine (CD71) (Pharmingen Becton Dickinson). Après rinçage en tampon PBS, les cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson).

## III Résultats

### 1. Analyse de la séquence de MV-LAP

#### 1.1 Séquençage

Le cadre de lecture ouvert a été mis en évidence sur le génome de la souche T1 du virus myxomateux, dans le cadre de l'analyse génétique de la souche atténuée vaccinale SG33 (Guérin, 2001b). Il compte 621 paires de bases (pb), en aval de *serp3* (figure 9). Ce gène semble très apparenté aux ORFs M153R et M153.1R décrits lors du séquençage complet de la souche Lausanne du virus

myxomateux (Cameron *et al.*, 1999). Cependant, ces deux derniers ne seraient en fait qu'une division du gène S153R (gène du virus du Fibrome de Shope) due à une erreur de lecture au niveau du codon 110. L'analyse de la séquence des 206 acides aminés nous a montré une certaine homologie avec un ensemble de protéines à motifs en « doigts de zinc », cellulaires ou virales (figure 10).

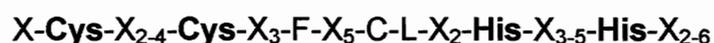
Cette protéine présente un motif atypique en C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> correspondant à la famille LAP (Saha *et al.*, 1995) ou PHD (Aasland *et al.*, 1995). On peut remarquer la présence de deux régions hydrophobes qui semblent correspondre à des domaines transmembranaires (figure 9). Nous baptiserons ce facteur MV-LAP.

### 1.2 Fonctions des protéines en doigt de zinc

L'interaction avec un ou plusieurs atomes de zinc peut être associée à de nombreuses fonctions de ce type de protéines. L'ion Zn<sup>2+</sup> peut être le support d'un grand nombre de liaisons avec les protéines mais il peut aussi fortement se lier à une grande variété de molécules, dont l'atome de soufre de la cystéine, l'azote de l'histidine, l'oxygène de l'aspartate, du glutamate ou de l'eau. Il est ainsi le médiateur des différentes interactions qui se créent entre de nombreuses macromolécules biologiques, protéines ou acides nucléiques.

Le motif doigt de zinc est l'un des principaux motifs qui est impliqué dans les interactions protéines-acide nucléiques ainsi que dans le fonctionnement de la cellule en générale ou ses relations avec des effecteurs extérieurs. Ces protéines en doigt de zinc représentent 1% des produits des gènes humains (Hoovers *et al.*, 1992). Il existe cependant différents motifs et il apparaît qu'il est très difficile d'associer une structure donnée à des propriétés d'interaction avec des acides nucléiques et/ou des protéines.

Le motif le plus classique fut identifié après l'analyse de la séquence des acides aminés du facteur de transcription TFIIIA de *Xenopus laevis*, qui présente 9 répétitions du consensus suivant :



Ce premier motif est impliqué dans le contrôle de la transcription de l'ARN 5S dans les ovocytes de xénopes (Miller *et al.*, 1985). La liaison protéine-ARN s'effectue au niveau d'une séquence cible de 50 nucléotides : on retrouve 9 doigts qui réagissent

chacun avec une guanine, avec une périodicité de  $5_{1/2}$  nucléotides donc un demi tour d'hélice d'acide nucléique. Les cystéines et les histidines formant le motif se lient avec l'ion  $Zn^{2+}$  ce qui forme un doigt de liaison à l'acide nucléique (Perutz, 1996).

On retrouve bien d'autres motifs comme nous le montre la figure 11. Les récepteurs d'hormones stéroïdes sont des activateurs de transcription qui vont se lier à de courtes séquences d'ADN et qui vont ainsi réguler l'expression de gènes dans la cellule cible. GATA-1 un facteur qui est essentiellement exprimé dans la lignée des érythroïdes, où il régule l'expression de plusieurs gènes (Evans and Felsenfeld, 1989). Un nouveau groupe au sein de la grande famille des protéines en doigt de zinc se nomme RING pour *Really Interesting New Gene*. Les protéines sont riches en cystéine et contiennent une séquence consensus du type :

**Cys-X-(I/V)-Cys-X<sub>9-27</sub>-Cys-X<sub>1-3</sub>-His-X-(P/I/L)-Cys-(I/L/M)-X-Cys-X<sub>4-48</sub>-Cys-P-X-Cys**  
(Freemont, 1993).

Ce motif est retrouvé dans des protéines impliquées dans la régulation des gènes, la recombinaison ou la réparation de l'ADN. On ne sait pas vraiment si ces protéines interagissent avec les acides nucléiques ou plutôt avec des protéines, elles-mêmes liées à l'ADN. Plusieurs protéines de ce groupe ont été identifiées chez les virus comme les herpesvirus et les poxvirus : chez le virus du fibrome de Shope, la protéine N1R est localisée dans les virosomes des cellules infectées, se lie à l'ADN simple ou double brin et inhibe le déclenchement de l'apoptose. Une délétion, même partielle, du motif RING abolit sa localisation et sa fonction, même si ce motif n'intervient pas seul (Upton *et al.*, 1994).

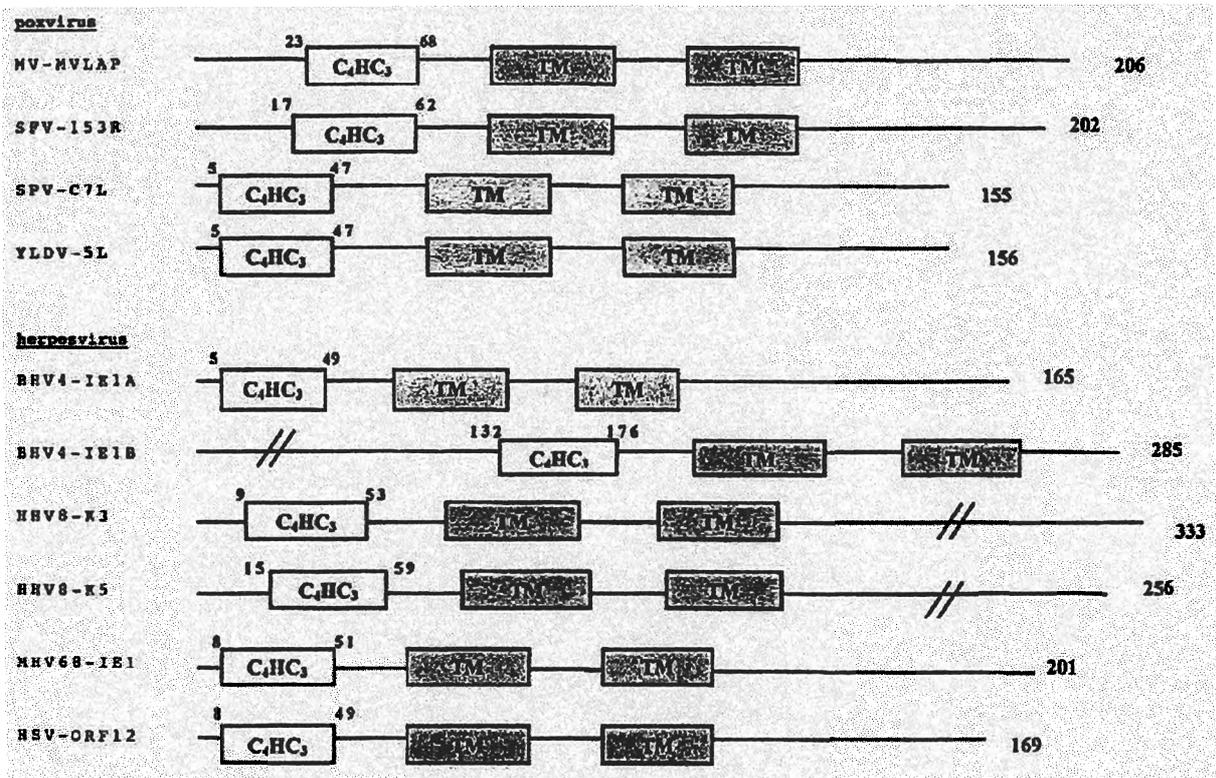


Figure 9: Séquences nucléotidique et polypeptidique de MV-LAP. Le polypeptide correspondant est décrit par les lettres, sous la séquence d'ADN. \* : codon stop ; souligné : signal de terminaison ; lettres entourées : motif C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> (LAP) ; surligné : domaines transmembranaires (Guérin, 2001a)

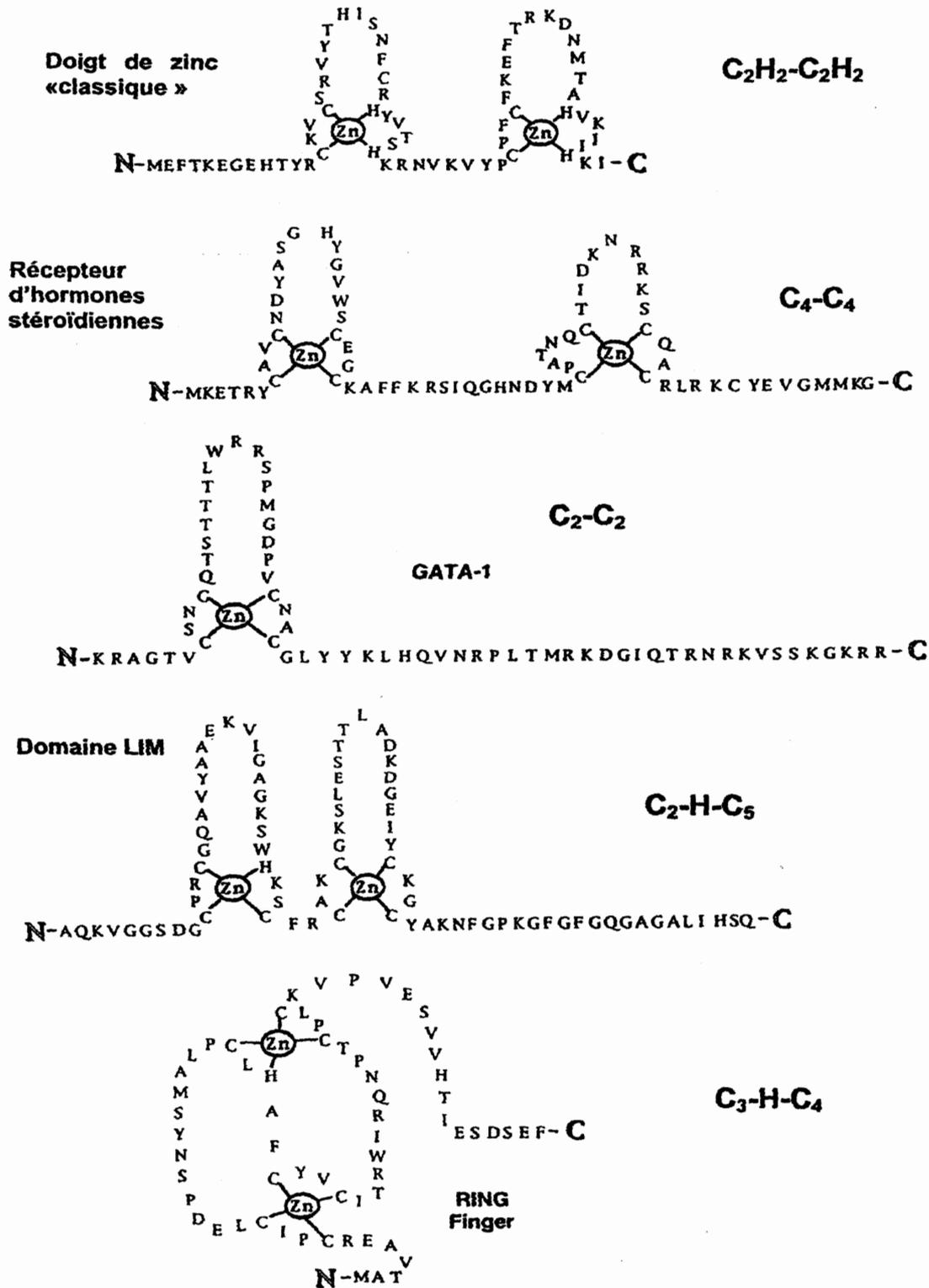
<u>poxvirus</u>	
MV-MVLAP	CWICKRACDI-VFNYCKCRGDNKIVKKECLEEWINTDVVKNKSCAIC
SFV-153R	CWICKRSCDV-VRNYCKCRGDNKIVKKECLEEWINTDTVKNKSCAIC
SPV-C7L	CWICKDDYSI-BKNYCNCKNEYKVVDECHKKWIQYS--RERSCKL
YLDV-5L	CWICNDVCDE-RNNFCGCMBEYKVVHIKCHQLWINYS--KKKECNLC
<u>herpesvirus</u>	
BHV4-IE1A	CWICRDGESLPEARYCNCYGDLOYCHKEECLKTWISMS--GEKRCKFC
BHV4-IE1B	CWICKGSEGIIDVKYCHCIGDLOYVHSECLVHWIRVS--GTKOCKFC
HHV8-K3	CWICMBELGNERFRACGCTGELENVHRSCLSTWLTIS--RNTACQIC
HHV8-K5	CWICREEVGNEGIHPCACTGELDVVHPQCLSTWLTVS--RNTACQMC
HHV68-IE1	CWICHQPEG-PLKRFCKGKSCAVSHODCLRGWLETS--RRQTCALC
HSV-ORF12	GLICCNIGEEELLQACDCPSR---VNHTCLOSHIQCF--KSSHCTEC
<b>Consensus</b>	<b>C--C-----C-C-----H-C-----C--C</b>

Figure 10: Homologie entre les motifs LAP identifiés chez les poxvirus et les herpesvirus (Guérin, 2001a).

### 1.3 Le motif C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> ou LAP/PHD

Ce motif a longtemps été considéré comme un motif Ring Finger atypique (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>). C'est en 1995 que le groupe de Bryan Young a décrit un nouveau type de motif dans la protéine CEZF de *Caenorhabditis elegans*. On retrouve ce motif dans environ 25 protéines chez les animaux, les plantes et même la levure (Saha *et al.*, 1995). Sachant que l'interruption du domaine fonctionnel dans deux types de translocation chromosomiques était associée à des leucémies, les auteurs ont donné le nom de LAP, pour *leukemia-associated-protein*. Cependant, la fonction précise de ces protéines à motif LAP n'a pas vraiment été élucidée. Elles pourraient se lier de manière non spécifique à de grands fragments d'ADN (Schindler *et al.*, 1993) et exercer ainsi des fonctions de régulation de l'expression des gènes.

Dans les protéines complexes décrites chez les eucaryotes, le motif LAP est le plus souvent retrouvé en associations avec d'autres types plus classique de doigt de zinc, ce qui a amené les auteurs à évoquer une complémentarité entre le motif LAP, assurant la cohésion, et d'autres motifs contrôlant la spécificité de l'interaction (Saha *et al.*, 1995). Un autre groupe de chercheur a décrit ce type de motif sous l'appellation PHD (pour Plant homeo domain) (Aasland *et al.*, 1995).



**Figure 11 :** Structures des différentes classes de motif en doigts de zinc (Green et al., 1998)

#### 1.4 Modalité d'expression du gène

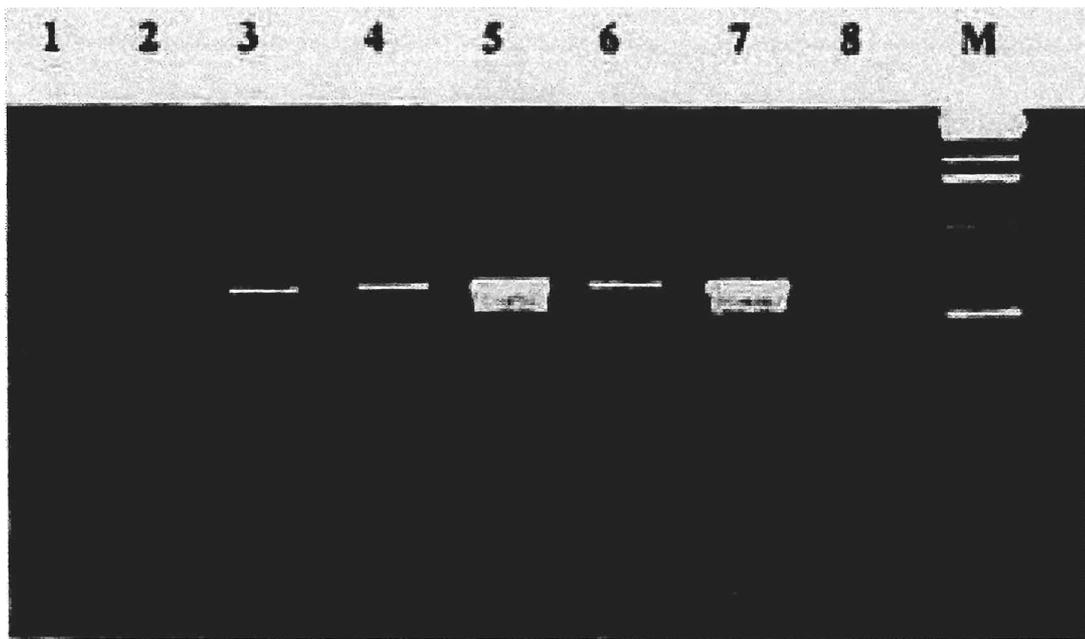
Nous avons vu que les différents gènes du virus myxomateux s'exprimaient à des temps différents de l'infection. Nous avons voulu déterminer le moment de l'expression de ce gène afin de déterminer s'il fait partie des gènes précoces, intermédiaires ou tardifs. Pour ce faire, nous avons récolté les ARN messagers à différents moments de l'infection de la cellule et effectué une RT-PCR.

C'est à partir de la 4<sup>ème</sup> heure post-infection que les 1<sup>ers</sup> ARNm ont été détectés avec un pic de présence vers la 12<sup>ème</sup> heure après l'inoculation (figure 12). En empêchant la transcription des gènes intermédiaires et tardifs par l'introduction d'AraC, nous n'avons pas altéré la transcription du gène *mv-lap* ce qui suggère que ce gène est exprimé de façon précoce, indépendamment de la réplication de l'ADN. Nous rappelons que l'AraC, ou cytosine arabinoside, est un inhibiteur de la réplication de l'ADN, et à ce titre bloque l'expression des gènes tardifs.

#### 2. Construction d'un virus mutant $\Delta$ LAP ; Symptômes et lésions observés lors de l'inoculation par les souches T1 et MV- $\Delta$ LAP

Un virus mutant délété du gène *mv-lap* a été construit. Nous avons vérifié par RT-PCR que ce virus n'exprimait pas l'ARN messager de ce même gène (figure 12).

Afin d'évaluer le rôle de MV-LAP sur la pathogénicité de la myxomatose, nous avons inoculé des lapins européens avec la souche T1 du virus myxomateux, avec le virus mutant MV- $\Delta$ LAP ainsi qu'avec le virus révertant. Nous avons observé les lapins quotidiennement durant 28 jours. Nous pouvons constater une différence importante entre les deux types de virus, avec une forte diminution de la virulence suite à l'inoculation du virus MV- $\Delta$ LAP.



**Figure 12 :** Expression de l'ARN messager du facteur MV-LAP en culture cellulaire. Les ARNm ont été extraits et soumis à une RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de MV-LAP. En 1 : Témoin négatif cellulaire ; De 2 à 6 : Extraction des cellules infectées à 2, 4, 8, 12 ou 16 heures ; En 7 : extraction de cellules après 12h d'infection par le virus sauvage sous incubation d'AraC; En 8 : cellules infectées avec le virus mutant MV- $\Delta$ LAP ; En M : place du marqueur.

Jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour post-infection, les trois groupes de lapins ont présenté les mêmes symptômes, correspondant à l'évolution typique de la myxomatose à savoir des lésions au site d'inoculation (myxome primaire) et des lésions satellites (myxomes secondaires) sur la face et les oreilles. Ils ont tous présenté une affection respiratoire et une baisse de leur activité. Cette atteinte respiratoire a donné lieu à des surinfections bactériennes.

A partir du 12<sup>ème</sup> jour, la répartition des myxomes secondaires change. Les lapins infectés avec le virus sauvage présentent des lésions secondaires importantes en de multiples points alors que les lapins atteints par le virus mutant ne présentent des myxomes secondaires que sur la face et sur les oreilles. L'atteinte respiratoire fut tellement importante chez les lapins inoculés avec la souche sauvage et le virus reverse, que nous les avons euthanasiés pour une raison éthique. En revanche, cette atteinte fut plus modérée chez les lapins inoculés avec le virus mutant même si certains d'entre eux présentèrent des signes très importants d'atteinte respiratoire. Ceci leur permit d'être moins prostrés et de pouvoir se mouvoir et se nourrir plus que les autres lapins. 4 lapins sur 12 durent quand même être euthanasiés au vu de l'importance des symptômes. Les 8 lapins restants purent se remettre complètement au bout du 28<sup>ème</sup> jour.

<b>Jours</b>	<i>Infection par le virus sauvage et le virus MV-LAP révertant</i>	<i>Infection par le mutant MV-ΔLAP</i>
<b>0</b>	Inoculation intradermique à l'oreille droite de 4 lapins avec 5000 PFU de souche sauvage et 4 autres avec 5000 PFU de virus révertant	Inoculation intradermique à l'oreille droite de 12 lapins avec 5000 PFU de virus mutant
<b>4</b>	Le myxome primaire au site d'inoculation mesure environ 1 cm, une légère congestion est présente mais la lésion reste souple	Le myxome primaire mesure 1,5 cm en moyenne, est légèrement congestionné mais il reste souple
<b>7</b>	La myxome primaire devient plus large et diffus. Une rhinite et une conjonctivite s'installent ainsi qu'un œdème des testicules. Les myxomes secondaires sont multiples et visibles sur la face et les oreilles des lapins.	La myxome primaire devient plus large et diffus. Une rhinite et une conjonctivite s'installent ainsi qu'un œdème des testicules. Les myxomes secondaires sont visibles sur la face et les oreilles des lapins.
<b>12</b>	De nombreux myxomes secondaires deviennent nécrotiques. Une grave détresse respiratoire s'installe, traduisant une sévère infection respiratoire. L'état général des lapins se dégrade avec une prostration des animaux, un amaigrissement et une blépharoconjonctivite tellement importante que les lapins deviennent aveugle. Les testicules sont très inflammés. Ces lapins sont euthanasiés pour des raisons éthiques	Peu de myxomes secondaires se développent. Ils apparaissent surtout sur les paupières. L'atteinte respiratoire est variable, montrant une atteinte modérée mais pouvant quand même aller jusqu'à une atteinte sévère. L'inflammation des testicules reste moyenne.
<b>14</b>		4 lapins sur 12 sont euthanasiés pour raisons éthiques.
<b>21</b>		Régression des signes respiratoires et rétablissement de 8 sur 12. les sujets sont euthanasiés au 28 <sup>ème</sup> jour post-inoculation.

**Tableau 8** : Analyse clinique de l'influence de MV-ΔLAP sur la pathogénicité du virus myxomateux

### 3. Analyse histologique de tissus d'animaux infectés expérimentalement

Tous les animaux ont été soumis à un examen post-mortem complet. Les différents résultats sont répertoriés dans le tableau 9.

Entre les 4<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour post-infection, les deux groupes présentent les mêmes types de lésions avec une légère et localisée broncho-pneumonie interstitielle, quelques cellules hétérophiles autour des bronchioles et adjacentes aux alvéoles. On note l'hyperplasie des tissus lymphoïdes associés (BALT).

C'est à partir du 12<sup>ème</sup> jour qu'il commence à apparaître une certaine différence. Au niveau du myxome primaire, chez les lapins infectés par le virus sauvage, la réaction inflammatoire se présente sous la forme d'une réaction au niveau des capillaires du derme, avec un œdème marqué, des fibroblastes activés, une infiltration importante par des hétérophiles (neutrophiles) mais une infiltration plus modérée de cellules mononucléées.

Chez les lapins infectés avec le virus mutant, tous ces phénomènes sont plus modérés : œdème plus léger, peu d'hétérophiles et une infiltration modérée par les cellules mononucléées (figure 12).

Dans les nœuds lymphatiques parotidiens, les lésions étaient identiques : ils étaient réactifs avec une hyperplasie de la paracorticale, histiocytose sinusale, et une infiltration avec des cellules géantes plurinucléées.

En ce qui concerne la rate des deux groupes de lapins, nous avons constaté une légère hyperplasie de la paroi des vaisseaux ainsi qu'une légère infiltration de la pulpe rouge par des hétérophiles, comme nous avons pu l'observer au 4<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jours.

La méthode TUNEL a été utilisée pour quantifier les phénomènes apoptotiques dans les nœuds lymphatiques parotidiens. Pour les deux groupes de lapins, nous avons pu constater une apoptose très faible et similaire en intensité comme en localisation. MV-LAP n'a donc aucune action, *in vivo*, sur l'apoptose des lymphocytes.

Symptômes et site analysés	Intensité des lésions avec les différents types de virus					
	4 <sup>ème</sup> jour		8 <sup>ème</sup> jour		12 <sup>ème</sup> jour	
	Virus 1	Virus 2	Virus 1	Virus 2	Virus 1	Virus 2
<b>Myxome primaire</b>						
Œdème	++ (f)	++ (f)	+++ (d)	++	++++ (d)	+++
Hétérophiles	++ (s)	++ (s)	+++	++ (s)	++++	++ (s)
Cellules mononucléées				+ (s)	+	+++
<b>Nœuds parotidiens</b>						
Hyperplasie paracorticale	++	++	++++	+++	++++	+++
Histiocytose sinusale	++	++	++++	+++	++++ (e)	+++
Infiltration d'hétérophiles	++	++	++++	+++	++++ (e)	+++
<b>Rate</b>						
Hyperplasie lymphoïde des gaines périartériolaire	++	++	++	++	++	++
Infiltration par les hétérophiles	++	++	++	++	++	++
<b>Poumons</b>						
Pneumonie broncho-interstitielle	++ (f)	++ (f)	+	+	-	-
Hétérophiles autour des bronchioles	++ (s)	++ (s)	+ (s)	+ (s)	-	-
Hyperplasie des BALT	++	++	+	+	-	-

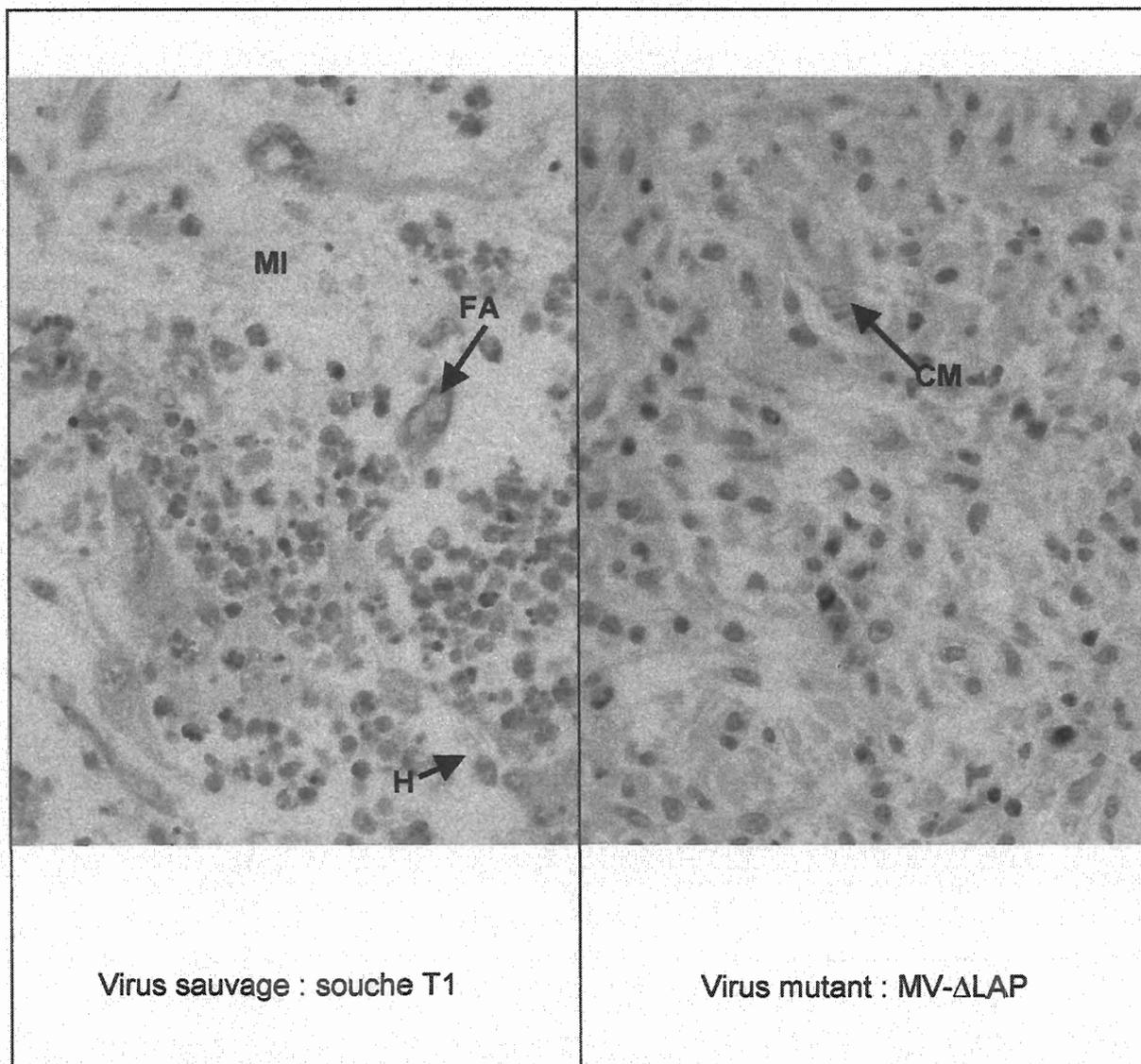
**Tableau 9 :** Observations histologiques des lésions pour les deux groupes de lapins

Légende :

Virus 1 : inoculation des lapins avec le virus sauvage

Virus 2 : inoculation des lapins avec le virus délété MV-ΔLAP

Lésions topographiques : s : parsemées, f : focale, d : diffuses, e :étendues



**Figure 13 :** Comparaison de coupes histologiques au niveau du myxome primaire. MI : Mucinose interstitielle ; FA : Fibroblaste activé ; H : Hétérophile ; CM : Cellules mononucléées

#### 4. Réplication virale *in vivo*

Afin de nous assurer que la différence des signes cliniques et histologiques entre les deux groupes de lapins n'était pas due à une moindre capacité du virus MV- $\Delta$ LAP à se répliquer *in vivo*, nous avons mesuré la charge virale dans les nœuds parotidiens, les poumons, la rate, les testicules et les cellules blanches du sang aux 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, 8<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jours. Il n'y a pas eu de différence significative sur les titres trouvés entre ses différents tissus ou dans les cellules sanguines. Nous concluons que la faculté du virus MV- $\Delta$ LAP à se répliquer *in vivo* n'a pas été affectée par la déletion de MV-LAP.

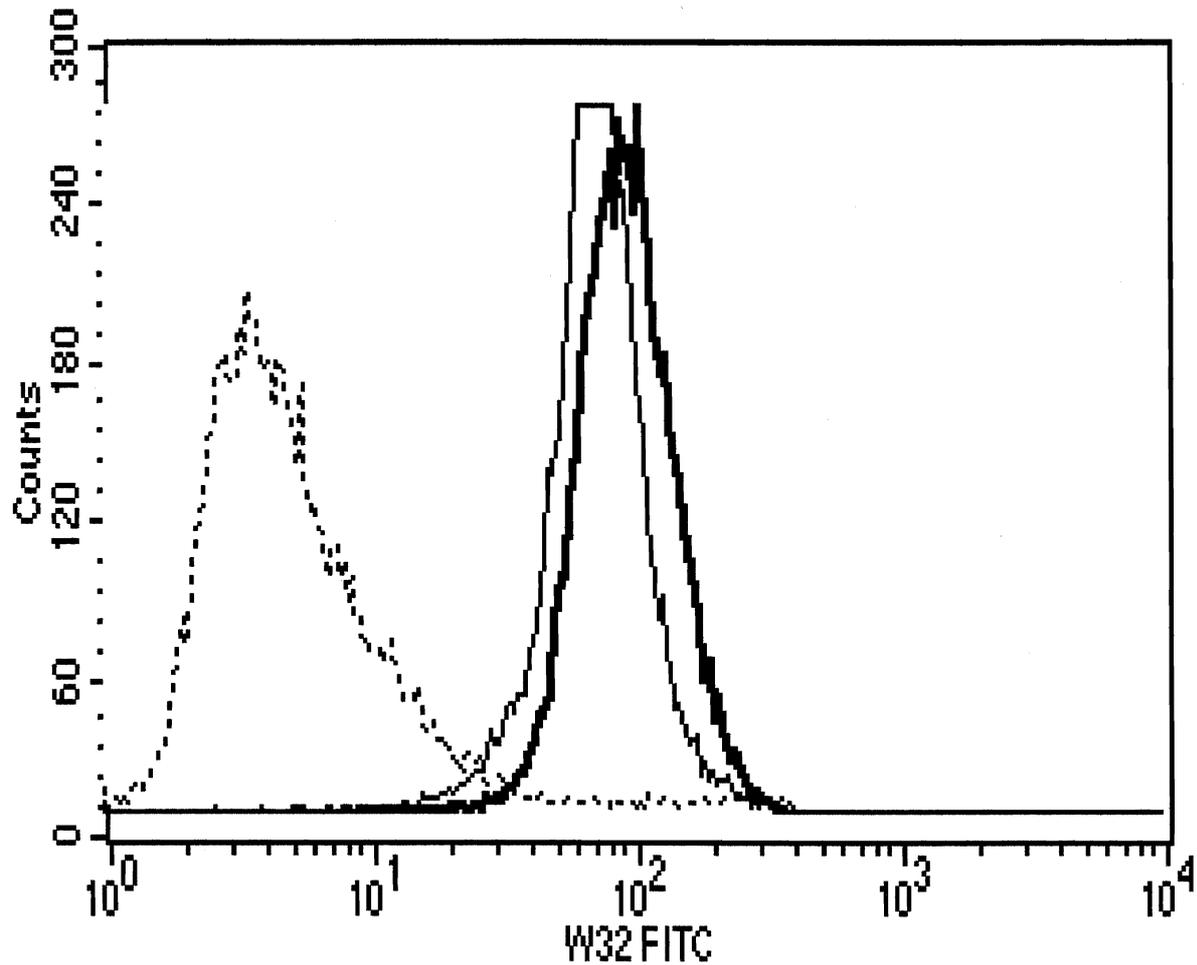
#### 5. Implication du facteur MV-LAP dans la dérégulation des molécules de CMH 1

Tout d'abord, pour déterminer la localisation exacte de cette protéine, des travaux ont été fait en construisant des protéines de fusions comprenant soient la protéine MV-LAP avec en N-Terminal la protéine GFP, soient cette même protéine tronquée. Cette dernière possibilité permettra de déterminer le fragment d'attache de la protéine dans la cellule.

Les fragments marqués ont été exprimés dans des cellules RK13, après les avoir colorées grâce à une teinture spécifique du Réticulum Endoplasmique (RE). Les cellules transfectées ont été examinées par immunofluorescence en utilisant un microscope confocal.

Nous avons pu conclure que le facteur MV-LAP se localisait au niveau du réticulum et s'accrochait à cette structure grâce à la partie C-terminale, lieu de présence des deux domaines transmembranaires.

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), participe de façon importante à la réponse immunitaire vis à vis des agents infectieux. Il concourt notamment à l'activité cytotoxique des cellules CD8+. Les gènes du CMH codent pour des glycoprotéines de surfaces cellulaires qui vont s'associer avec des peptides endogènes, dérivés de protéines intracellulaires (et dans une plus faible fréquence, extracellulaire), pour les présenter, lorsqu'elles arrivent en surface, aux effecteurs du système immunitaire.



**Figure 14 :** MV-LAP dérégule l'expression des molécules de surface de classe I du CMH.

Les cellules BGMK infectées avec le virus T1 (en pointillé) ou MV- $\Delta$ LAP (en gras), ou non-infectées (trait simple), sont analysées en cytométrie de flux pour l'expression du CMH1.

Les gènes du CMH sont divisés en deux familles majeures : les gènes de classe I et II. Les molécules codées par les gènes de classe I sont distribuées à la surface de toutes les cellules mononuclées. Ces molécules sont des hétérodimères composées d'une chaîne lourde (44kDa) et d'une chaîne légère ( $\beta 2$  microglobuline). Ces deux parties s'assemblent dans le RE avec les fragments peptidiques dégradés par les protéases cytosoliques qui sont amenés dans le RE grâce à un transporteur TAP (*Transporter Associated with Antigen Processing*), lui même codé par les gènes de classe II. Après la fixation du peptide, le tout est dirigé vers la surface cellulaire où le peptide est présenté aux lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (Guérin, 2001b).

L'infection de cellules BGMK avec le virus sauvage T1 entraîne une diminution très significative des molécules du CMH 1 à la surface des cellules (figure 14), alors que cette diminution n'est jamais observée avec le virus délété MV- $\Delta$ LAP. Il est à noter que l'expression des molécules CD71 (récepteur de la transferrine) reste, quand à elle, inchangée, ce qui démontre la spécificité du phénomène.

### III] Discussion

Nous avons caractérisé un nouveau facteur codé par le virus myxomateux (VM), dans la partie proche de la Répétition Inversée Terminale (RIT) droite du génome, riche en gènes non-essentiels dont plusieurs sont déjà caractérisés comme gènes de pathogénicité (Guérin, 2001b). Ce facteur, MV-LAP, comporte un « motif en doigt de zinc » de type  $C_4HC_3$ . Ces facteurs LAP/PHD sont présents chez plusieurs gammaherpesvirus et quelques poxvirus : virus du Fibrome de Shope, Swinepox et Capripox. Le séquençage complet du virus myxomateux (VM), publié en 1999 (Cameron *et al.*, 1999), a confirmé la présence de *mv-lap* sur le génome du VM, même si le gène correspondant, M 153R, apparaissait scindé en 2 cadres de lecture ouverts ; il est clair aujourd'hui qu'il s'agissait d'une erreur de séquençage de la souche de référence Lausanne.

Au delà du motif  $C_4HC_3$ , tous les facteurs de type LAP/PHD présentent une organisation très conservée : 2 domaines transmembranaires et une région C-terminale comportant un domaine conservé d'une trentaine de résidus, dont la fonction est encore inconnue.

Pour approcher la fonction de MV-LAP, nous avons exploité cette homologie avec des protéines codées par des virus de la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*. En Mai et juin 2000, deux groupes américains ont montré que deux protéines à motif LAP/PHD codées par le virus HHV-8 (associé au sarcome de Kaposi), K3 et K5, jouaient un rôle majeur dans la diminution de l'expression du CMH 1 à la surface des cellules infectées (Coscoy et Ganem, 2000 ; Ishido *et al.*, 2000).

Une analyse en microscopie confocal a été réalisée: la transfection de cellules par le plasmide MV-LAP-GFP (*green fluorescent protein*) a permis d'établir la localisation réticulaire de la protéine MV-LAP, vraisemblablement associée à ses deux domaines transmembranaires

L'analyse de séquence de MV-LAP et sa caractérisation biologique en transfection permettait donc d'envisager un rôle dans le pouvoir pathogène du VM : ce rôle a été validé par l'analyse du mutant délété du gène *mv-lap*.

La construction du virus mutant MV- $\Delta$ LAP obéit à une stratégie classiquement employée au laboratoire : recombinaison de la souche sauvage avec un plasmide de transfection, comportant le gène cible délété et interrompu avec une cassette *lacZ*, et sélection phénotypique de virus recombinants. Suite à l'inoculation du virus mutant MV- $\Delta$ LAP, nous avons constaté un taux de survie de 60% à 21 jours post-infection (p.i), à comparer avec un taux de survie de 0% à 14 jours p.i lors d'une infection par la souche sauvage de référence T1. Les observations cliniques ont fait ressortir une réduction de la distribution des myxomes secondaires lors de l'infection par MV- $\Delta$ LAP et surtout, une atténuation des surinfections respiratoires à partir de 8 jours p.i.

Nous pouvons mettre ces résultats en parallèle avec les travaux réalisés sur d'autres facteurs de pathogénicité du VM caractérisés au laboratoire, Serp2 et Serp3. L'inoculation du VM délété du gène *serp2* aboutit à un taux de survie de 70% (Petit *et al.*, 1996), une absence de myxomes secondaires, une blépharoconjonctivite certes importante mais des signes respiratoires nettement diminués. L'inoculation par la souche virale Serp3- aboutit quant à elle à un taux de survie de 40%, une absence de myxomes secondaires sur les plans cutanés et dans les nœuds lymphatiques et un myxome primaire bien moins réactionnel (Guérin *et al.*, 2001).

A l'histologie, la principale différence réside dans le déroulement du processus inflammatoire au niveau du myxome primaire. Du 8<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> jour post-infection,

l'infiltration par les cellules hétérophiles (correspondant aux neutrophiles chez le lapin) est persistante chez les lapins infectés par la souche sauvage alors que la réaction inflammatoire évolue plus rapidement vers une infiltration de cellules mononucléées lors d'une infection par le virus mutant. En d'autres termes, la réaction inflammatoire est « bloquée » en phase vasculaire suite à l'infection par le virus sauvage (Messud-Petit *et al.*, 1998), alors qu'elle évolue « normalement » vers la phase cellulaire (infiltration du myxome primaire par les lymphocytes et histiocytes) lors de l'infection par le virus MV- $\Delta$ LAP.

Notons cependant que ces analyses histologiques ne peuvent pas expliquer les différences de scores de survie, d'autant que l'on ne connaît pas les événements pathogéniques qui conduisent à la mort de l'animal infecté. Ainsi, au niveau pulmonaire, on retrouve des lésions modérées avec les deux virus. L'exploration de l'apoptose dans les nœuds lymphatiques montre que la délétion de MV-LAP n'influence en rien l'apoptose lymphocytaire avec, dans les deux cas, un degré d'apoptose non significatif.

Nos travaux en cytométrie de flux ont permis d'étudier l'expression des molécules du CMH1 à la surface des cellules : l'infection de cellules BGMK avec les virus sauvage T1 entraîne une diminution significative des molécules du CMH1 à leur surface. En revanche, le virus délété MV- $\Delta$ LAP ne provoque pas le même phénomène. Nous avons donc pu mettre en évidence le fait que MV-LAP est nécessaire pour la dérégulation du CMH 1 au cours de l'infection.

En bilan, MV-LAP est un facteur de pathogénicité, majeur dans ses effets et codé dans un îlot de pathogénicité situé en partie terminale droite du génome du VM.

Ces travaux représentent à ce jour la seule démonstration *in vivo* de l'effet de facteurs viraux de type LAP/PHD ; en effet, le virus HHV-8 n'est pas cultivable et ne permet donc pas de construire un virus mutant : tous les travaux réalisés dans ce modèle sont fondés sur des transfections de protéines de fusion et sont donc peu représentatifs du contexte de l'infection, marqué par des interactions complexes de facteurs viraux et cellulaires. En outre, l'homme, hôte unique du HHV-8, se prête difficilement à des travaux de pathologie expérimentale !

Ces investigations ouvrent la voie à de nouveaux travaux de fond. Il reste à établir le mécanisme qui sous-tend l'activation de l'endocytose de marqueurs cellulaires : il a été récemment montré chez le HHV-8 que K5 se comporte comme une ligase de type E3, qui entraîne l'accrochage de la molécule ubiquitine aux chaînes lourdes du CMH1 (Coscoy *et al.*, 2001). Les molécules ainsi « marquées » sont ensuite dérivées vers les compartiments de protéolyse, lysosome et/ou protéasome, au lieu d'être recyclées. Des travaux en cours au laboratoire visent à établir si MV-LAP, comme K5, est associée à l'ubiquitination des chaînes lourdes du CMH et à évaluer dans quelle mesure celle-ci rendrait compte de toute l'activité biologique de MV-LAP. Il ne faut pas perdre de vue que d'autres molécules que le CMH 1 peuvent être dérégulées par l'action de MV-LAP comme les molécules FAS-CD95 par exemple. De nouveaux travaux sont en cours afin de déterminer l'influence exacte de MV-LAP sur ces l'évolution de ces molécules.

Dans une perspective plus finalisée, il faut se rappeler que les poxvirus sont des vecteurs potentiels d'antigènes vaccinaux (Cox *et al.*, 1992). Le virus myxomateux est un candidat vecteur pour exprimer des antigènes à des fins de protections vaccinales (Bertagnoli *et al.*, 1996) ou en vue d'une immunostérilisation comme il en est question sur le continent australien (Hollande et Jackson, 1994 ; Tydale-Biscoe, 1994). On retrouve dans la catégorie vecteurs vaccinaux, les *capripoxvirus* utilisés pour lutter contre la peste des petits ruminants (Romero *et al.*, 1993) ou encore la fièvre catarrhale (Wade-Evans *et al.*, 1996). Le swinepox fait aussi l'objet de différentes recherches dans ce type de programme (Tripathy, 1999).

Dans tous les cas, la protection vaccinale repose sur la présentation des antigènes par le CMH1 aux effecteurs cytotoxiques et aux cellules mémoires. Il est donc aisé de comprendre qu'une protéine LAP peut être un facteur limitant dans l'efficacité d'un vaccin recombinant.

La souche SG33, utilisée comme vecteur de la protéine VP60 du *calicivirus* de la maladie hémorragique virale du lapin est LAP- (Bertagnoli *et al.*, 1996). En est-il de même pour toutes les souches vaccinales ? Dans cet esprit, chez les *poxvirus* potentiellement utilisables en temps que vecteurs vaccinaux, le caractère LAP- pourrait sans doute être le garant d'une meilleure efficacité vaccinale (Guérin, 2001a).

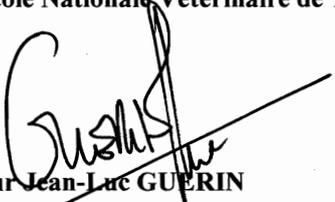
**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**Mlle BELLANGER Frédérique-Anne**  
a été admis(e) sur concours en : 1996  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 23 mai 2002  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, J.-L. GUERIN, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
autorise la soutenance de la thèse de :  
**Mlle BELLANGER Frédérique-Anne**  
intitulée :  
*"Implication de la protéine MV-LAP dans la pathogénicité du virus myxomateux"*

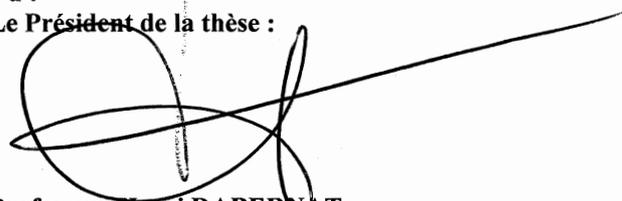
**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**

  
**Docteur Jean-Luc GUERIN**

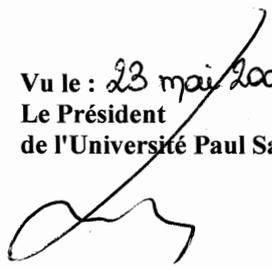
**Vu :  
Le Directeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**

  
**Docteur Pierre DESNOYERS**

**Vu :  
Le Président de la thèse :**

  
**Professeur Henri DABERNAT**

**Vu le : 23 mai 2002  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier**

  
**Professeur Raymond BASTIDE**



***REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES***

Aasland, R., Gibson, T.J. and Stewart, A.F. (1995) The PHD finger : implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 20 :56-59.

The Australian National University. (Page consultée le 12 décembre 2001). Site de la bibliothèque de l'Université Nationale de l'Australie, [en ligne]. Adresse URL : <http://rubens.anu.edu.au/student.projects/rabbits/myxo.html>.

Barry, M., Lee, S.F., Boshkov, L. and McFadden, G. (1995) Myxoma virus induces extensive CD4 downregulation and dissociation of p56ck in infected rabbit CD4+ T lymphocytes. *J Virol*, 69:5243-51.

Barry, M., Hnatiuk, S., Mossman, K., Lee, S.F., Boshkov, L. and McFadden, G. (1997) The myxoma virus M-T4 gene encodes a novel RDEL-containing protein that is remained within the endoplasmic reticulum and is important for the productive infection of lymphocytes. *Virology*, 239:360-77.

Bertagnoli, S., Gelfi, J., Le Gall, G., Bouilletot, E., Vautherot, J. F., Rasschaert, D., Laurent, S., Petit, F., Boucraut-Baralon, C. and Million, A. (1996) Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol*, 70:5061-5066.

Bertagnoli, S. Les poxvirus. In : Lefèvre, P.C., Blancou, J., Chermette, R. *Maladies infectieuses et parasitaires du bétail des régions chaudes*. A paraître.

Best, S.M. and Kerr, P.J. (2000) Coevolution of Host and Virus: The Pathogenesis of Virulent and Attenuated Strains of Myxoma Virus in Resistant and Susceptible European Rabbits. *Virology*, 267:36-48.

Bouvier, G. (1954) Quelques remarques sur la myxomatose. *Bull. Off. Int Epizoot*, 46:76-77.

Boshkov, L.K., Macen, J.L. and McFadden, G. (1992) Virus-induced loss of class I MHC antigens from the surface of cells infected with myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus. *J Immunol*, 148:881-7.

Brun, A., Saurat, P., Gibert, Y., Godard, A. and Bouquet, J.F. (1981) Données actuelles sur l'épidémiologie, la pathogénie et la symptomatologie de la myxomatose. *Rev Med Vet*, 132 :585-590.

Cammeron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J.X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. and McFadden, G. (1999) The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*, 264:298-318.

Cann, A.J. (1993) *Principles of Molecular Virology*. Academic Press, 91-109.

Coscoy, L. and Ganem, D. (2000) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC Class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:8051-8056.

Coscoy, L., Sanchez, D.J. and Ganem, D. A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. *J Cell Biol*, 155:1265-1273.

Cox, W.I., Tartaglia, J. and Paoletti, E. (1992) Poxviruses recombinants as live vaccines. In Press, C. (et.) *Recombinant poxviruses*. Binns MM and Smith GL, Boca Raton, pp. 123-162.

Evans, T. and Felsenfeld, G. (1989) The erythroid-specific transcription factor Eryf1: A new finger protein. *Cell*, 58:877-885.

Fenner, F., Day, M.F., and Woodroffe, G.M. (1956) Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *J. Hyg*, 54:284-303.

Fenner, F. and Marshall, I.D. (1957) A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J. Hyg*, 55:149-151.

Fenner, F. and Ratcliffe, F.N. (Ed). (1965) *Myxomatosis*. Cambridge University press, Cambridge.

Freemont, P.S (1993) The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger [Review]. *Ann NY Acad Sci*, 684:174-192.

Fu, J., Pirozzi, G., Sanjay, A., Levy, R., Chen, Y. De Lemos-Chiarandini, C., Sabatini, D., and Kreibich, G. (2000). Localization of ribophorin II to the endoplasmic reticulum involves both in transmembrane and cytoplasmic domains. *Eur J Cell Biol*, 79:219-228.

Graham, K.A., Lalani, A.S., Macen, J.L., Ness, T.L., Barry, M., Liu, L.Y., Lucas, A., Clark-Lewis, I., Moyer, R.W. and McFadden, G. (1997) The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology*, 229:12-24.

Green, A., Parker, M., Conte, D. and Sarkar, B. (1998) Zinc proteins: a bridge between transition metals and gene regulation. *J Trace Elements Exp Med*, 11:103-118.

Guérin Jean-Luc, 2001b. Analyse biologique et fonctionnelle de Serp 3 et MV-LAP, deux facteurs de pathogénicité du virus myxomateux. *Thèse pour le Doctorat de l'Université Paris XI, Châtenay-Malabry*, soutenue le 15 juin 2001.

Guérin Jean-Luc, 2001a. Analyse moléculaire de la souche SG33 du virus myxomateux : à la recherche des gènes perdus. *Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur Vétérinaire, Toulouse*, soutenue le 29 juin 2001.

Guérin, J.-L., Gelfi, J., Camus, C., Delverdier, M., Whisstock, J.C., Amerdeilh, M.-F., Py, R., Bertagnoli, S. and Messud-Petit, F. (2001) Characterization and functional analysis of Serp3, a novel Myxoma virus-encoded serpin involved in virulence. *J Gen Virol*, 82:1407-1417.

Guérin, J.L., Gelfi, J., Boullier, S., Delverdier, M., Bellanger, F.A., Bertagnoli, S., Drexler, I., Sutter, G. and Messud-Petit, F. (2002) 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 of virol*, 76:1-12.

Holland, M.K. and Jackson, R.J. (1994) Virus-vectored immunocontraception for control of wild rabbits: identification of target antigens and construction of recombinant viruses. *Reprod Fertil Dev*, 6:631-642.

Hoovers, J.M., Mannens, M., John, R., Bliet, J., Van Heyningen, V., Porteu, D.J., Leschot, N.J., Westerveld, A. and Little, P.F. (1992) High resolution localization of 69 potential human zinc finger protein genes: A number are clustered. *Genomics* 12:254-263.

Ishido, S., Choi, J.K., Lee, B.S., Wang, C., DeMaria, M., Johnson, R.P., Cohen, G.B. and Jung, J.U. (2000) Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protein. *Immunity*, 13:365-374.

Jackson, M. R., Nilsson, T. and Peterson P. A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9:3153-3162.

Joubert, L., Leftheriotis, E. and Mouchet, J. (1972) La myxomatose, T.1 et 2. L'expansion scientifique française, Edt. Paris , T.1 :7-31.

Kerr, P.J. and Best, S.M. (1998) Myxoma virus in rabbits. *Rev Sci Tech*, 17:256-268.

Lalani, A.S., Ness, T.L., Singh, R., Harrison, J.K., Seet, B.T., Kelvin, D.J., McFadden, G. and Moyer, R.W. (1998) Functional comparaisons among members of the poxvirus T1/35kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Virology*, 250:173-84.

Lalani, A.S., Masters, J., Graham, K., Liu, L., Lucas, A. and McFadden, G. (1999) Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology*, 256:233-45.

Lomas, D.A., Evans, D.L., Upton, C., McFadden, G. and Carrell, R.W. (1993) Inhibition of plasmin, urokinase, tissue plasminogen activator, and C1S by a myxoma virus serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem*, 268:516-21.

Macen, J.L., Upton, C., Nation, N. and McFadden, G. (1993) SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation. *Virology*, 195:348-63.

Macen, J.L., Garner, R.S., Musy, P.Y., Brooks, M.A., Turner, P.C., Moyer, R.W., McFadden, G. and Bleackley, R.C. (1996) Differential inhibition of the Fas- and granule-mediated cytotoxicity pathways by the orthopoxvirus cytokine response modifier A/SPI-2 and SPI-1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:9108-13.

Marshall, I.D. and Fenner, F. (1958) Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits. V. Changes in the innate resistance of Australian wild rabbits exposed to myxomatosis. *J Hyg*, 56:288-302.

Messud-Petit, F., Gelfi, J., Delverdier, M., Amardeilh, M.F., Py, R., Sutter, G. and Bertagnoli, S. (1998) Serp2, an inhibitor of the interleukin-2-converting enzyme, is critical in the pathobiology of myxoma virus. *J Virol*, 72:7830-7839.

Messud-Petit, F., Bertagnoli, S. (2000) Le virus myxomateux : De l'agent pathogène au vecteur vaccinal. *Virologie*, 4 :453-62.

Miller, J., MeLaehlin, A.D. and Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J* 4:1609-1614.

Moss, B. (1991) *Poxviridae* and their replication. In *Fundamental Virology*. 2<sup>nd</sup> edition, B.N. FIELDS and D.M. KNIPE Editors, Raven Press, New York.

Moss, B. (1996) *Poxviridae* : The viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Field's Virology-third Edition- Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers, pp. 2637-2671.

Mossman, K., Lee, S., Barry, M., Boshkov, L. and McFadden, G. (1996) Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of the poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *J Virol*, 70:4394-410.

Mossman, K., Nation, P., Macen, J., Garbutt, M., Lucas, A. and McFadden, G. (1996) Myxoma virus M-T7, a secreted homolog of the interferon-gamma receptor, is a critical virulence factor for the development of myxomatosis in European rabbits. *Virology*, 215:17-30.

Moyer, R.W., and Turner, P.C. (1990) Current Topics in Microbiology and immunology: Poxviruses. Springer-Verlag, 41-70.

Nash, P., Whitty, A., Handwerker, J., Macen, J. and McFadden, G. (1998) Inhibitory specificity of anti-inflammatory myxoma virus serpin, SERP-1. *J Biol Chem*, 273:20982-91.

Opgenorth, A., Graham, K., Nation, N., Strayr, D. and McFadden, G. (1992) Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and myxoma growth factor. *J Virol*, 66:4720-31.

Perutz, M. (Ed). (1996) Structure des protéines: pathologie et approches thérapeutiques. John Libbey Eurotext, Paris, 68-78.

Petit, F., Bertagnoli, S., Gelfi, J., Fassy, F., Boucraut-Baralon, C. and Milon, A. (1996) Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1beta-converting enzyme. *J Virol*, 70:5860-6.

Petit, F., Boucraut-Baralon, C., Py, R. and Bertagnoli, S. (1996) Analysis of myxoma virus genome using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol*, 50:27-32.

Romero, C. H., Barrett, T., Evans, S. A., Kitching, R. P., Gershon, P. D., Bostock, C. and Black, D. N. (1993) Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, 11:737-742.

Saha, V., Chaplin, T., Gregorini, A., Ayton, P. and Young, B.D. (1995) The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cysteine-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:9737-9741.

Saurat, P., Gilbert, T. and Ganiere J.-P. (1978) Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev Med Vet*, 129 :415-451.

Schreiber, M., Sedger, L. and McFadden, G. (1997) Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J Virol*, 71:2171-81.

Shindler, U., Beckmann, H., and Cashmore, A.R. (1993) HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant J*, 4:137-150.

Shope, R.E. (1938) Protection of rabbits against naturally acquired infectious myxomatosis by previous infection by fibroma virus. *Proc Soc Exp Biol*, 38 :86.

Smith, C.A., Danis, T., Wignall, J.M., Din, W.S., Farrah, T., Upton, C., McFadden, G. and Goodwin R.G. (1991) T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 176:335-42.

Smith, G.L. (1993) Vaccinia virus glycoproteins and immune evasion. The sixteenth Fleming Lecture. *J Gen Virol*, 74:1725-1740.

Smith, G.L. and Vanderplasschen, A. (1998) Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Adv Exp Med Biol*, 440:395-414.

Sodeik, B., Doms, R.W., Ericsson, M., Hiller, G., Machamer, C.E., Van't Hof, W., Van Meer, G., Moss, B. and Griffiths, G. (1993) Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartement between the endoplasmic reticulum and the golgi stacks. *J Cell Biol*, 121:521-541.

Strayer, D.S., Tang, S. and Schwartz, M.S. (1993) Epidermal growth factor-like growth factors. I. Breast malignancies and other epithelial proliferations in transgenic mice. *Lab Invest*, 69:660-73.

Tripathy, D. N. (1999) Swinepox virus as a vaccine vector for swine pathogens. *Adv Vet Med*, 41:463-480.

Tydale-Biscoe, C.H. (1994) Virus-vectored immunocontraception of feral mammals. *Reprod Fertile Dev*, 6:281-287.

Upton, C., Macen, J.L. and Mfadden, G. (1987) Mapping and sequencing of a gene from myxoma virus that is related to those encoding epidermal growth actor and transforming growth factor alpha. *J Virol*, 61:1271-5.

Upton, C., Macen, J.L., Wishart, D.S. and McFadden, G. (1990) Myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus encode a serpin-like protein important for virus virulence. *Virology*, 179:618-31.

Upton, C., Macen, J.L., Schreiber, M. and McFadden, G. (1991) Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology*, 184:370-82.

Upton, C., Mossman, K. and McFadden, G. (1992) Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science*, 258:1369-72.

Upton, C., Schiff, L., Rice, S.A., Dowdeswell, T., Yang, X. and McFadden, G. (1994) A poxvirus protein with a RING finger motif binds zinc and localizes in virus factories. *J Virol*, 68:4186-4195.

Références bibliographiques

Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estens, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B (Eds). (2000) Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the international Committee on Taxonomy of viruses. Academic press, New York San Diego.

Wade-Evans, A.M., Romero, C.H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasgayam, J., Fleming, M.J., Mertens, P.P. and Black, D.N. (1996) Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology*, 220:227-231.

Wickner, R.B. (2000) Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on taxonomy of viruses. Academic Press, pp. 137-157.

Toulouse, 2002

NOM : BELLANGER

PRENOM : Frédérique

TITRE : IMPLICATION DE LA PROTEINE MV-LAP DANS LA PATHOGENICITE DU VIRUS MYXOMATEUX

RESUME : Le virus myxomateux (VM) est un poxvirus à spectre d'hôte très étroit, agent de la myxomatose du lapin européen. Il code pour de nombreux facteurs de pathogénicité, capables de moduler la réponse de l'hôte. En particulier, il entraîne la diminution de l'expression de molécules de classe I du CMH à la surface des cellules infectées, selon un mécanisme inconnu. Nous avons caractérisé un facteur codé par le VM, de 206 amino-acides, comportant un domaine en doigt de zinc de type C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub>. Ce motif atypique, désigné LAP/ PHD (Leukemia-Associated-Protein / Plant Homeodomain) a été identifié sur des protéines cellulaires ou codées par des gammaherpesvirus et des poxvirus. Des fusions traductionnelles de ce facteur, baptisé MV-LAP, avec la GFP (*green fluorescent protein*) suggèrent un adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Il a été récemment montré que K3 et K5, homologues de MV-LAP codés par le virus HHV-8 associé au sarcome de Kaposi, exacerbent l'endocytose des molécules de classe I du CMH.

Un virus mutant délété du gène *mv-lap* présente *in vivo* une pathogénicité très diminuée par rapport au virus sauvage. Nous avons pu constater une mortalité de 100% lors d'infection par le virus sauvage contre 40% avec le virus mutant. MV-LAP est donc un facteur de pathogénicité du VM, qui joue un rôle original pour un poxvirus dans la diminution de la présentation de marqueurs de la cellule à son environnement.

MOTS-CLES : LAPIN/ MYXOMATOSE/ POXVIRUS/ DOIGT DE ZINC/ CMH1

---

ENGLISH TITLE : INVOLVEMENT OF THE PROTEIN MV-LAP IN THE PATHOBIOLOGY OF MYXOMA VIRUS

ABSTRACT : The Myxoma virus (MV) is a poxvirus with a limited host spectrum, and a myxomatosis agent of the European rabbit. MV encodes for many factors of pathogenicity involved in modulation of the host's response. It particularly reduces the expression of the MHC 1 molecules at the surface of infected cells, by an unknown mechanism. We characterised a new factor which is encoded by the MV, with 206 amino-acids and composed of a zinc domain with a C<sub>4</sub>HC<sub>3</sub> pattern. This untypical concensus called LAP/PHD (Leukemia-Associated-Protein / Plant Homeodomain) was identified on cellular proteins or by gammaherpesviruses and poxviruses. Fusions of this factor named MV-LAP with GFP (*green fluorescent protein*) suggest an addressing into the endoplasmic reticulum membranes. It was recently discovered that K3 and K5 that are both homologous with MV-LAP and encoded by HHV-8, increase the endocytosis of MHC 1 molecules.

Deletion of *mv-lap* gene induces, *in vivo*, a real decrease of pathogenicity compared to the wild type virus. We could notice a 100% mortality rate with the wild type virus compared to a 40% rate with the mutant virus. MV-LAP is a major factor of pathogenicity, playing an unusual role for a poxvirus in down-regulating cell's markers involved in Immune Recognition.

KEY WORDS : RABBIT/ MYXOMATOSIS/ POXVIRUS/ ZINC FINGER/ MHC 1