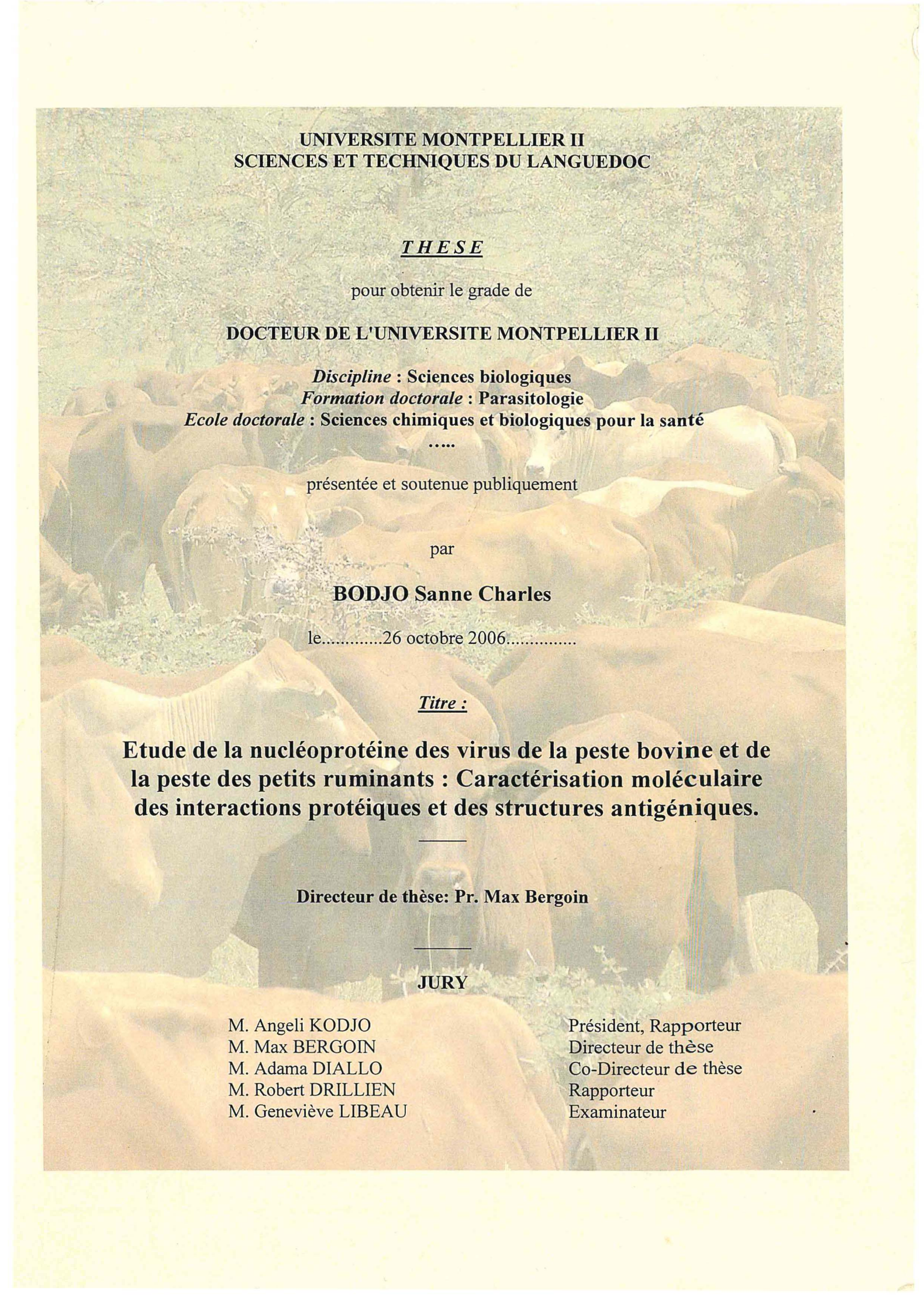




UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Sciences biologiques

Formation doctorale : Parasitologie

Ecole doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

.....

présentée et soutenue publiquement

par

BODJO Sanne Charles

le.....26 octobre 2006.....

Titre :

**Etude de la nucléoprotéine des virus de la peste bovine et de
la peste des petits ruminants : Caractérisation moléculaire
des interactions protéiques et des structures antigéniques.**

Directeur de thèse: Pr. Max Bergoin

JURY

M. Angeli KODJO
M. Max BERGOIN
M. Adama DIALLO
M. Robert DRILLIEN
M. Geneviève LIBEAU

Président, Rapporteur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse
Rapporteur
Examineur

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Sciences biologiques

Formation doctorale : Parasitologie

Ecole doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

.....

Présentée et soutenue publiquement

par

BODJO Sanne Charles

le.....26 octobre 2006.....

Titre :

**Etude de la nucléoprotéine des virus de la peste bovine et de
la peste des petits ruminants : Caractérisation moléculaire
des interactions protéiques et des structures antigéniques.**

—

Directeur de thèse: Pr. Max Bergoin

—

JURY

M. Angeli KODJO
M. Max BERGOIN
M. Adama DIALLO
M. Robert DRILLIEN
M. Geneviève LIBEAU

Président, Rapporteur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse
Rapporteur
Examineur

Remerciements

Je remercie particulièrement le Dr Adama DIALLO pour m'avoir permis de faire mes premiers pas en biologie moléculaire dans son unité de virologie CIRAD-EMVT Maisons-Alfort, où j'ai passé 6 mois à ma sortie d'école vétérinaire en 1994. C'est aussi grâce à lui que ce travail de recherche a pu aboutir à partir des différents financements qu'il a pu obtenir auprès de la Commission Européenne et la Fondation Wellcome Trust. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Max Bergoin pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir accordé sa confiance durant toute cette période qu'à durée de mes travaux.

Je tiens aussi à remercier très sincèrement les membres du jury:

Monsieur Angeli Kodjo, Professeur à l'école vétérinaire de Lyon pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs et de présider le jury de thèse. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude.

Dr Robert Drillien, d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et ainsi de partager vos larges connaissances en virologie.

Dr Geneviève Libeau pour avoir analysé ce travail en tant qu'examineur et aussi pour avoir guidé en collaboration avec le Dr Diallo. Les réactifs qu'elle a mis ma disposition ont été d'une grande utilité dans ce travail. Je tiens à lui adresser ma profonde reconnaissance.

Un autre remerciement particulier au Dr. Emmanuel Couacy-Hymann, le «Grand Frère», à qui je dois ma rencontre avec le Dr. Adama Diallo et mon intégration dans un laboratoire. Il a été d'un grand soutien, surtout dans les moments difficiles. Je voudrais lui témoigner ma reconnaissance et sa disponibilité constante durant cette longue période de ma thèse. Je voudrais lui dire dans le langage courant en Côte d'Ivoire qu'il est mon «Vieux Père», ce qui résume ma pensée.

Remerciements

Je remercie toute l'équipe de l'unité production et santé animale du laboratoire de biotechnologie de la division jointe FAO/IAEA à Seibersdorf en Autriche, particulièrement le Dr Mamadou Lelenta qui a pris une part importante dans le présent travail de recherche.

Je voudrais aussi remercier l'équipe de virologie du laboratoire du CIRAD pour le contrôle des maladies animales émergentes et exotiques, UPR15 TA A-15/G Campus International de Baillarguet avec à sa tête le Dr. Emmanuel Albina. Un très grand merci à Christian, Collette, Cécile et surtout à Olivier avec qui j'ai passé de bons moments lors de mes passages à Montpellier.

Merci également au Directeur du LANADA (Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole) de Côte d'Ivoire et à tous mes collègues du laboratoire central de pathologie animale de Bingerville.

Mes pensées vont à toute ma famille pour leur soutien durant toute la durée de ma thèse. Merci à «Maman» Cathy et à mes enfants Indy Aby et Nolane Charles-Cathérine pour avoir supporté ces longs moments d'absence. Qu'elles reçoivent de gros bisous de la part de «PAPOUNIE».

Bodjo S.C., Lelenta M., Couacy-Hymann E., Kwiatek O., Albina E., Gargani D., Libeau G. and A. Diallo. (2007). Mapping the Peste des Petits Ruminants Virus Nucleoprotein: Identification of two domains involved into the protein self-association. *Virus Research*; Manuscript accepted.

Bodjo S. C., O. Kwiatek, A. Diallo, E. Albina and G. Libeau. (2007). Mapping and structural analysis of B-cell epitopes on the morbillivirus nucleoprotein amino terminus. *J. Gen. Virol.*; 88: 1231-1242

S. C. Bodjo, A. Haffar, M. Lelenta, E. Couacy-Hymann, G. Libeau, E. Albina and A. Diallo. The Morbillivirus nucleoprotein conserved regions contain the matrix protein binding sites. **(Manuscrit en cours de préparation).**

Remerciements	2
Liste des publications	4
Table des matières	5
Liste des abréviations	8
Liste des illustrations	10
Résumé	12
Introduction générale	14
Chapitre I: Revue bibliographique	17
1. Historique	18
1.1. La Peste bovine	18
1.2. La Peste des Petits Ruminants.	18
2. Classification des virus de la Peste Bovine et de la Peste des Petits Ruminants.	19
3. Répartition géographique	21
3.1. La Peste bovine.	21
3.2. La Peste des Petits Ruminants.	24
4. Importance économique de la PB et de la PPR.	26
5. Biologie des virus RPV et PPRV	27
5.1. Structure de la particule virale.	27
5.2. Propriétés physico-chimiques	27
5.3. Organisation du génome.	29
5.4. Les protéines virales	31
5.4.1. Les protéines structurales externes	31
5.4.1.1. L'hémagglutinine (H)	31
5.4.1.2. La protéine de fusion (F)	32
5.4.2. Les protéines structurales internes	33
5.4.2.1. La nucléoprotéine (N)	33
5.4.2.1.1. Synthèse	33
5.4.2.1.2. Alignement de la séquence de la protéine N.	34
5.4.2.1.3. Structure de la nucléoprotéine et du complexe protéine N-ARN des mononegavirales.	37
5.4.2.1.4. Interactions et fonctions de la nucléoprotéine	40
5.4.2.2. La phosphoprotéine ou protéines P.	42

5.4.2.3. La protéine large (L)	42
5.4.2.4. La protéine de matrice (M)	43
5.4.3. Les protéines non structurales.	44
5.5. Le cycle de multiplication virale	45
5.5.1. Attachement et pénétration du virus dans les cellules.	45
5.5.2. Transcription.	46
5.5.3. Réplication de l'ARN viral.	46
5.5.4. bourgeonnement et diffusion des particules virales.	47
5.6. Pouvoir antigénique et immunogénicité des protéines virales.	49
5.6.1. Réponse immunitaire humorale.	49
5.6.2. Réponses immunitaires cellulaires.	50
5.6.3. Relations antigéniques.	51
5.7. Relation phylogénétique	52
6. Les maladies peste bovine et de la peste des petits ruminants.	55
6.1. Espèces sensibles.	55
6.1.1. La peste bovine.	55
6.1.2. La peste des petits ruminants	56
6.2. Facteurs de contagion	57
6.2.1. Facteurs climatiques ou saisonniers de la PPR.	57
6.2.2. Sensibilité des animaux	58
6.2.3. La virulence des souches virales.	58
6.2.4. Interaction RPV-PPRV.	60
6.3. Pathologie des infections à RPV et PPRV.	61
6.3.1. Propagation du virus dans l'organisme.	61
6.3.2. Immunosuppression induite par les Morbillivirus.	61
6.4. Symptômes.	64
6.5. Diagnostic.	66
6.6. Moyens de lutte.	68
6.6.1. Prophylaxie sanitaire.	68
6.6.2. Prophylaxie médicale.	68

Chapitre II: Travaux de recherche.	70
1. Etude de la structure antigénique de la nucléoprotéine de RPV	73
1.1. Article 1: Identification et analyse structurale des épitopes des anticorps du domaine N-terminale de la nucléoprotéine de Morbillivirus.	73
1.2. Résultats complémentaires.	75
1.2.1. Production d'AcMs contre la région variable aa 421-490 C-terminale et analyse pour un test cELISA.	75
1.2.1.1. Expression des aa 421-490 de la protéine N PPRV <i>in vitro</i> et immunisation de souris Balb/c pour la production d'anticorps.	75
1.2.1.2. Analyse des AcMs en cELISA.	79
1.2.2. Analyse de la capacité de la région variable en C-terminale à induire la production d'anticorps chez les animaux.	81
2. Etude des sites d'interactions N-N et N-M de la nucléoprotéine.	84
2.1. . Sites d'interaction N-N.	84
2.1.1. Article 2. Sites d'interaction de la Nucléoprotéine du virus de la peste des petits ruminants: Identification de deux domaines impliqués dans son auto-assemblage.	84
2.1.2. Résultats complémentaires: Mutation des acides amines 228 (S) et 229 (L) de la nucléoprotéine.	85
2.2. . Etude des sites d'interaction N-M sur la protéine N (manuscrit 3).	87
Chapitre III: Discussion & Perspectives.	88
1. Etude des structures antigéniques des nucléoprotéines de RPV et PPRV	90
1.1. Analyse des réactions croisées	90
1.2. La nucléoprotéine et la différenciation sérologique entre la RP et la PPR.	92
2. Analyse des interactions de la nucléoprotéine au cours de la réplication virale.	95
2.1. Interaction N-N pour la formation de la nucléocapside (article 2).	96
2.2. Interaction au cours de l'assemblage et du bourgeonnement du virion: Interaction N-M.	98
2.3. Modification génétique du virus vaccinal PPR à partir du gène de la nucléoprotéine: Délétion ou mutation des domaines non-essentiels de la nucléoprotéine	99
Références bibliographiques	101
Annexes	128

Liste des abreviations

aa	Acide Aminé
AcM	Anticorps Monoclonaux
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AGP	Promoteur antigénome
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
bELISA	ELISA de blocage
CDV	Virus de la maladie de Carré ou Canine Distemper Virus.
cELISA	ELISA de compétition
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPAg	cellules présentatrices d'antigène
C-terminale	Caboxyl-terminale
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
DMV	Morbillivirus du dauphin ou Dolphin Morbillivirus
DIVA	Différenciation entre Animaux Vaccinés et Infectés
ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay
FAO	Organisation mondiale pour l'alimentation
F	Fusion
GREP	Global rinderpest eradication programme
GP	Promoteur Génomique
H	Hémagglutinine
hP1V1	Virus Parainfluenza humain type 1
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine.
HSR	Hypersensibilité retardée
IFN- γ	Interféron gamma
iELISA	ELISA indirect
IG	Intergénique
IL	Interleukine
kDa	Kilo Dalton
LFA-13	Leukocyte function antigen-13
ME	Microscopie Electronique
MV	virus de la rougeole ou Measles virus

Liste des abreviations

N	Nucléoprotéine
NK13	Natural killer
N-terminal	Amino-terminal
OIE	Office International des Epizooties
ORF	Cadre de lecture ou Open Reading Frame.
PARC	Campagne pan africaine de lutte contre la peste
PC 15	Projet conjoint n° 15
PDV	Phocin Distemper Virus
PID	Protéines intrinsèquement désordonnées
PM	poids moléculaire
PMV	Morbillivirus du marsouin ou Porpoise Morbillivirus
PPR	Peste des petits ruminants
PPRV	Peste des petits ruminants virus
RNP	Ribonucléoprotéine
RP	Rinderpest
RPV	Rinderpest virus
SAREC	South Asian Rinderpest Eradication Campaign
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel polyacrylamide
SV	Virus sendai
TH1/TH2	Lymphocyte T Helper de type 1 ou 2
WAREC	West Asian Rinderpest Eradication Campaign
WB	Western Blot.

Figures.

Figure 1 : Relations phylogéniques des *Morbillivirus* établies par comparaison de séquence nucléotidique partielle du gène de la phosphoprotéine.

Figure 2: Derniers foyers persistants de la peste bovine.

Figure 3: Distribution mondiale du virus de la PPR.

Figure 4: structure des *Morbillivirus*.

Figure 5: Organisation du génome des Morbillivirus.

Figure 6: Alignement de séquences acides aminées de la nucléoprotéine de Morbillivirus.

Figure 7: représentation de monomère de la protéine N du virus de stomatite vésiculeuse (VSV).

Figure 8 : cycle réplicatif du virus de la rougeole.

Figure 9: Relation phylogénétique des souches de RPV basée sur le gène de la protéine F.

Figure 10: Relation phylogénétique des souches de PPRV basée sur le gène de la nucléoprotéine N.

Figure 11: Activation de la babésiose latente par le virus Rinderpest.

Figure 12: Cinétique des lymphocytes sanguins chez les bovins après infection par le RPV.

Figure 13: les phases différentes phases cliniques de la PB classique.

Figure 14: Expression de la séquence variable aa 421-490 de la protéine N en fusion avec la protéine MBP.

Figure 15: Détermination des épitopes des AcMs P4G5, P4A3 et P2A9 en iELISA avec à partir de peptides.

Figure 16: Comparaison des AcMs 38-4 et P4G5 en test ELISA.

Figure 17: Réactions des sérums PPR+ de petits ruminants avec les protéines N ppr et SynthN421-490.

Figure 18: Analyse structurale des protéiques native N PPRV et mutée NpNE avec les AcMs par WB.

Figure 19: Réactivité des AcM 38-4 et P4G5 sur les protéines N PPRV native ou dénaturé et mutée NpNE.

Tableaux.

Tableau 1: Taux d'identité (en pourcentage) des protéines N, P, M, F et H de RPV (souche Kabete "O") avec celles d'autres Morbillivirus.

Tableau 2: Virulence expérimentale des souches du RPV.

Tableau 3: Virulence expérimentale des souches du PPRV.

Tableau 4: Peptides de synthèse de la région C-terminale.

Tableau 5: Pourcentage d'inhibition (PI) de sérums PB+ avec les tests cELISA utilisant respectivement les AcMs P4G5 et 38-4.

RESUME en français

L'étude des structures antigéniques des nucléoprotéines (N) des virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants a montré que la région N-terminale est immunodominante. Les études de cartographie d'anticorps monoclonaux anti-N ont permis de localiser dans cette région des épitopes communs mais aussi des épitopes spécifiques à chacun des deux virus. Les tests de compétition ELISA (cELISA), développés avec certains de ces monoclonaux spécifiques à chaque virus détectent aussi bien des sérums anti-PPR et qu'anti-peste bovine. Ce croisement serait probablement la résultante d'encombrement stérique engendré par des anticorps fixés sur les épitopes communs aux deux virus mais proches des sites spécifiques.

Une partie de nos travaux a porté sur l'analyse des interactions protéine-protéine du virus PPR. Ils ont permis de localiser le domaine d'interaction N-N dans la zone couverte par les 240 premiers aminoacides de N. Quatre régions capables de se lier à la protéine M ont été identifiées sur la protéine N. Les séquences de ces zones d'interaction N-M sont conservées au sein groupe Morbillivirus.

TITRE en anglais: Study of the nucleoprotein of the viruses of Rinderpest and Peste des Petits Ruminants: Molecular characterization of the interactions domains and the antigenic structures.

RESUME en anglais

The study of the antigenic structures of the nucleoproteins of the viruses of Rinderpest and Peste des Petits ruminants showed that the N-terminal region of this protein is immunodominant.. The studies of cartography of anti-N monoclonal antibody show that it possible to locate in this region common epitopes and also specific epitopes for each of these two viruses. The tests competition ELISA (cELISA), developed with some of these specific monoclonal to each virus detect unfortunately as well anti-PPR and bovine anti-RP serums. This crossing would be probably the steric resultant of obstruction generated by antibodies fixed on the épitopes common to the both viruses but close to the specific sites. Part of our work concerned the analysis of the protein-protein interactions from PPRV. The results show that the N protein region at N-terminal, amino acids 1 to 240, covers the domain of the N-N interaction. Four sites on N protein are able to bind to the protein M were identified. These sites are preserved in the Morbillivirus groups.

Résumé

DISCIPLINE

Biologie santé, Virologie

MOTS-CLES

Morbillivirus, Peste bovine, Peste des petits ruminants, Nucléoprotéine (NP), Protéine de Matrice

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : Biological Systems Department – CIRAD, Control of Exotic and Emerging Animal Diseases (UPR15), TA A-15/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, Cedex 5, France.

Introduction générale

La peste bovine (PB) [ou Rinderpest (RP) en anglais] et la peste des petits ruminants (PPR) sont des maladies infectieuses d'origine virale extrêmement contagieuses. Elles constituent des fléaux redoutés par les éleveurs. Le virus de la peste bovine (RPV) affecte tous les animaux de l'ordre des artiodactyles, les bovidés constituant les hôtes naturels les plus sensibles. En revanche celui de la PPR (PPRV) n'est pathogène que pour les petits ruminants domestiques et sauvages. La peste bovine peut décimer des populations entières de bovins et de buffle avec des conséquences socio-économiques considérables. En effet, l'épidémie de peste bovine qui a frappé une grande partie de l'Afrique au début des années 80 a causé des pertes directes estimées à environ 2 milliards de dollars (FAO, 2003) sans compter les coûts indirects liés aux campagnes de lutte. Cette maladie est maintenant sur la voie de l'éradication grâce aux différents programmes de vaccination menés tant en Afrique (projet PARC : Pan African Rinderpest Campaign) qu'en Asie (SAREC et WAREC). L'agent causcoll., le virus de la RP (RPV) ne semble persister aujourd'hui que dans un dernier bastion situé dans la Corne de l'Afrique appelé "écosystème somalien" formé par le sud-est de l'Ethiopie, le nord-est du Kenya et le sud de la Somalie. A l'opposé, la peste des petits ruminants est une maladie en pleine expansion (OIE, 2007; Ozkul et coll., 2002; Amjad et coll., 1996; Nanda et coll., 1996; Lefèvre et Diallo, 1990; Shaila et coll., 1989; Lefèvre, 1987). Découverte en Côte d'Ivoire (Gargadennec et Lalanne, 1942), l'aire de répartition de la PPR couvre actuellement la zone d'Afrique compris entre le Sahara et l'équateur, de l'océan Atlantique à la mer Rouge. Elle est également présente au Moyen-Orient jusque dans la partie européenne de la Turquie et dans le sous-continent indien. La PPR évolue sous forme de grandes épizooties cycliques dans les pays où elle est enzootique avec des taux de mortalité très variables de 0 à 80% (Lefèvre, 1987). Par sa vaste répartition géographique et ses conséquences économiques importantes, la PPR revêt une importance particulière pour les éleveurs.

RPV et PPRV appartiennent au genre *Morbillivirus*, de la famille des *Paramyxoviridae* (Diallo, 2003a; Lefèvre, 2003; Blancou, 2000; Gibbs et coll., 1979). Ils partagent une grande communauté antigénique qui a autrefois été mise à profit pour protéger les petits ruminants contre la PPR avec le vaccin hétérologue RP (Lefèvre et Diallo, 1990 ; Taylor, 1979). La PB et la PPR partagent sur le plan épidémiologique le même spectre d'animaux sensibles aux deux virus. De plus sur le plan clinique, la ressemblance entre les

Introduction générale

deux maladies fait qu'il est indispensable de différencier clairement la RP de la PPR et vice versa. Les deux morbillivirus RP et PPR, antigéniquement très proches, induisent également des réactions sérologiques croisées. Aussi la différenciation entre RP et PPR est essentielle pour éviter toute confusion entre ces deux maladies surtout dans le contexte du programme mondial d'éradication de la RP (en anglais Global Rinderpest Eradication Programme: GREP) de la FAO (Organisation pour l'Agriculture et l'Alimentation) dont l'objectif est d'éliminer les derniers foyers de RP d'ici 2010. Si pour le diagnostic direct par la détection des composants viraux (ARN et protéines) avec les tests d'immunocapture (Libeau et coll., 1994) et de RT-PCR (Couacy-Hymann et coll., 2002) il est possible de différencier de façon certaine la RP de la PPR, cela n'est pas le cas en sérologie. Les tests sérologiques actuellement commercialisés (Anderson et coll., 1994 ; Libeau et coll., 1995 ; Libeau et coll., 1992) présentent d'importantes réactions croisées avec les sérums issus d'animaux vaccinés ou infectés par l'un ou l'autre virus. Ainsi dans le cadre du GREP et pour un diagnostic différentiel efficace entre RP et PPR le développement de tests sérologiques sensibles et spécifiques semble indispensable. De plus il est pour l'instant impossible de distinguer une séropositivité due à la vaccination ou à l'infection naturelle. Aussi pour une meilleure surveillance épidémiologique de la PPR, la différenciation sérologique entre les animaux vaccinés et infectés de façon naturelle semble également indispensable. Le vaccin homologue PPR actuellement utilisé ne permettant pas cette distinction, un nouveau vaccin portant un marqueur de sélection est donc nécessaire.

La nucléoprotéine (N) virale est la protéine majoritairement produite lors de la réplication virale. C'est une protéine très immunogène et contre laquelle est dirigée une grande partie des anticorps produits au cours des infections par les virus RP et PPR. La protéine N contient dans les régions N-terminale et C-terminale des domaines variables entre morbillivirus (Diallo et coll., 1994). Ces régions variables semblent contenir des épitopes suscitant la production d'anticorps monoclonaux spécifiques (Buckland et coll., 1989). Ainsi elles pourraient constituer des éléments importants pour le développement de tests sérologiques spécifiques pour chacune de ces deux maladies.

Bien que les anticorps monoclonaux anti-N lorsque qu'ils sont utilisés dans les tests de détection directe soient strictement spécifiques pour la RPV ou la PPR (Libeau et coll., 1997 ;

Introduction générale

Libeau et coll., 1995 ; Libeau et coll., 1992), des réactions croisées sont observées avec les sérums anti-RP dans les tests ELISA de compétition (cELISA) PPR ou avec les sérums anti-PPR pour le cELISA RP. Pour comprendre ce phénomène, il nous est apparu intéressant de chercher à caractériser les structures antigéniques de la nucléoprotéine reconnues par les différents anticorps monoclonaux anti-N, ainsi que celles reconnues par les sérums anti-RP ou anti-PPR d'animaux vaccinés ou infectés, dans le but de pouvoir développer pour chacune de ces maladies de nouveaux tests cELISA spécifiques. Aussi pour un meilleur contrôle de la PPR, notre laboratoire est associé à d'autres institutions pour développer un nouveau vaccin qui pourrait permettre de différencier des animaux vaccinés de ceux infectés avec les souches sauvages grâce un test de diagnostic approprié.

Pour ce projet, la nucléoprotéine (N) a été sélectionnée pour y identifier les séquences en acides aminés (aa) non essentiels qui pourront être éliminées et servir comme marqueurs de sélection dans un vaccin homologue PPR «marqué». Le gène de la protéine N sera par la suite remodelé par élimination des séquences nucléotidiques des aa non essentiels dans le génome du nouveau virus vaccinal. La protéine correspondante devra permettre de faire la différence entre les anticorps anti-PPR post vaccinaux dirigés contre elle et ceux produits après infection par le virus sauvage PPRV.

Le présent mémoire de thèse intitulé «Etude de la nucléoprotéine des virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants: caractérisation moléculaire des structures antigéniques et des interactions protéiques.» sera divisé en trois parties:

- La première partie est consacrée à la revue bibliographique où nous exposerons la biologie des virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants, l'épidémiologie et les moyens de lutte contre ces deux maladies.
- Dans la deuxième partie, nous présenterons les résultats de nos travaux expérimentaux à travers des articles publiés ou soumis à des revues scientifiques internationales.
- Enfin la troisième partie est consacrée à la discussion des résultats et la conclusion de nos travaux.

Chapitre I: Revue bibliographique de la peste bovine et de la peste des petits ruminants

1. Historique

1.1. La Peste bovine

La peste bovine (PB) (en anglais Rinderpest: RP), est une maladie connue depuis des siècles, voire des millénaires. Elle a été à l'origine de la création des premières écoles vétérinaires. L'agent responsable, le virus de la PB (RPV en anglais), infecte les artiodactyles domestiques et sauvages avec une sensibilité plus élevée pour les bovins et les buffles.

La PB est considérée comme une maladie d'origine asiatique. L'Europe bien que fortement infectée par le RPV s'est débarrassée de ce fléau dans la seconde moitié du 19^{ème} siècle par les méthodes de prophylaxie sanitaires. Elle est restée indemne jusqu'à nos jours malgré l'apparition de foyers occasionnels due à l'introduction d'animaux vivants contaminés venant d'Asie dans le courant des années 1900 (Blancou, 2000). La maladie s'est maintenue en Asie et au Moyen-Orient, zones à partir desquelles l'Afrique a été infectée. L'infection de l'Afrique par le RPV est donc beaucoup plus récente. Jusque vers 1880, seule l'Egypte se trouvait périodiquement infectée à partir du Moyen-Orient et de l'Europe (Curasson, 1932; 1942). La contamination à grande échelle de l'Afrique par le virus de la PB débute à partir du 19^{ème} siècle avec l'introduction de zébus asiatiques en Erythrée (Mammerickx, 2003; Hutcheon, 1902). Les continents d'Amérique et d'Océanie n'ont vraiment pas connu d'épidémie de peste bovine en dehors d'infections accidentelles vite maîtrisées (Mammerickx, 2003).

1.2. La Peste des Petits Ruminants.

La Peste des Petits Ruminants (PPR) est comme la PB, une maladie contagieuse virale. Le virus de la PPR (PPRV) infecte généralement les petits ruminants avec une sensibilité variable selon les espèces. Ces animaux sont également sensibles aux RPV, mais dans une moindre mesure. Sur le plan clinique la PPR partage avec la PB une similitude de symptômes. Ainsi la superposition des différentes données épidémiologiques connues de ces deux maladies a été pendant très longtemps à l'origine de l'ignorance de la PPR au profit de la PB. La distinction entre la PPR et la PB n'est que très récente.

La première description de la maladie comme une entité distincte de la PB date de 1942, en Côte d'Ivoire (Gargadennec et Lalanne, 1942) et le premier isolement viral a été réalisé au Sénégal (Gilbert et Monnier, 1962). A la fin des années 60, une maladie présentant des symptômes de type «stomato-pneumo-entéritique» dénommée «Kata» fut décrite au Nigeria sur des chèvres (Whitney et al, 1967). Les études comparatives menées par la suite ont permis de montrer que la PPR et le «kata» constituent une même entité (Rowland et al, 1971; 1970). Les études sérologiques et de protections croisées entre RPV et PPRV ont permis la classification du PPRV dans la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Morbillivirus* (Hamdy et Dardiri, 1976; Gibbs et al, 1979). Par la suite les analyses de biochimie moléculaire ont confirmé la distinction entre PPRV et RPV (Diallo et al, 1987; 1989a).

2. Classification des virus de la Peste Bovine et de la Peste des Petits Ruminants.

Le RPV comme le PPRV appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, sous-famille des *Paramyxovirinae*, genre *Morbillivirus*. Les morbillivirus ont des relations phylogéniques étroites entre eux (Figure 1). Ils sont d'une grande importance médicale en santé humaine et animale.

- En médecine humaine, le virus de la rougeole [en anglais Measles Virus (MV)] reste aujourd'hui l'une des principales causes de mortalité infantile dans de nombreux pays en voie de développement (Carmichael, 1997).

- En médecine vétérinaire, en plus des virus RPV et PPRV, d'autres morbillivirus constituent des agents pathogènes majeurs:

- Le virus de la maladie de Carré (CDV pour «Canine distemper Virus») infecte les canidés et félidés domestiques et sauvages (Haas et al, 1996; Harder et al, 1995).
- Des morbillivirus affectant des mammifères marins ont été décrits (Cosby et al, 1988; Mahy et al, 1988; Osterhaus et al, 1989, 1988; Kennedy et al, 1988; Domingo et al, 1990; Van Bressen et al, 1992). Il s'agit des morbillivirus du phoque (PDV pour «Phocine Distemper Virus»), du dauphin (DMV pour «Dolphin Morbillivirus») et du marsouin (PMV pour «Porpoise Morbillivirus»).

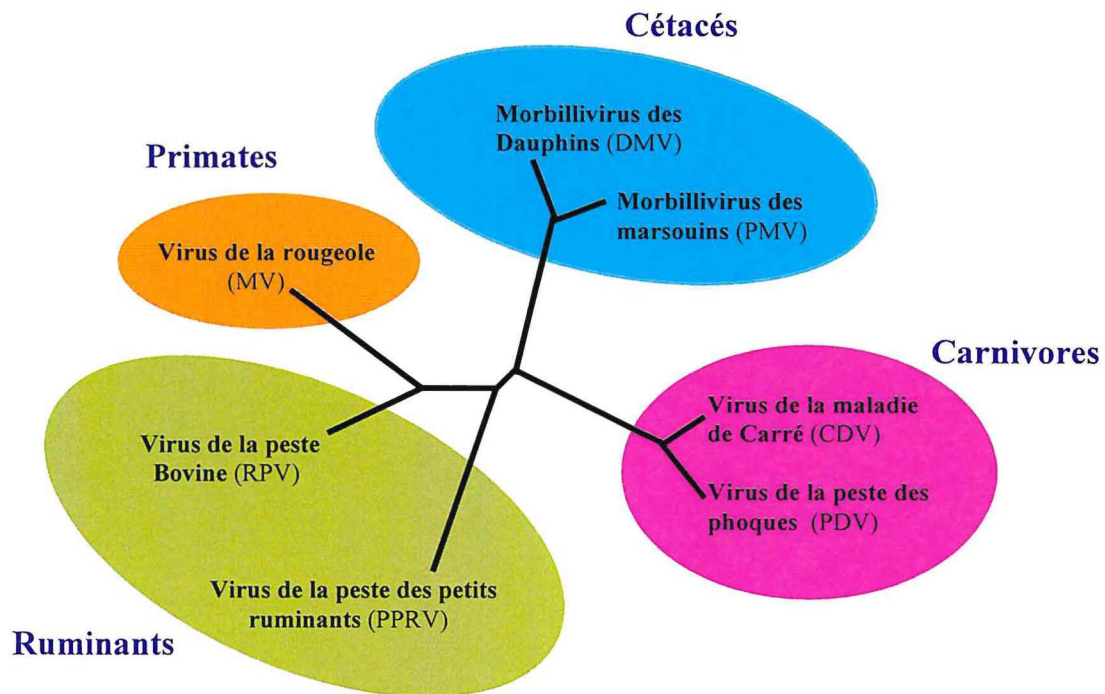


Figure 1 : Relations phylogéniques des morbillivirus établies par comparaison de séquence nucléotidique du gène de la nucléoprotéine (Banyard et al, 2006)

3. Répartition géographique

3.1. La Peste bovine.

La PB était largement répandue en Afrique entre 1957 et 1972 chez les bovins et les animaux sauvages en Afrique de l'Est et de l'Ouest (Robson et al, 1959; Plowright, 1963; Lies et Plowright, 1964; Macadam, 1968; El Hag Ali et Taylor, 1988). Son incidence sur l'élevage est très limitée actuellement. Son aire de répartition s'est rétrécie en raison des programmes d'éradication menés depuis plusieurs décennies, et la PB pourrait être la première maladie animale éradiquée au plan mondial. En Afrique, la campagne panafricaine de vaccination, le programme conjoint (PC15) mené entre 1962 et 1976 a permis l'élimination de la maladie à cette époque dans la plupart des pays d'Afrique mais avec des foyers résiduels en Afrique de l'Ouest (Mali et Mauritanie) et en Afrique de l'Est (Ethiopie et Soudan) (Provost, 1979). Cependant, l'absence de programmes de consolidation des acquis du PC 15 a donné lieu entre 1979 et 1980, à une re-émergence du virus à partir de ces foyers résiduels ce qui a causé d'importantes pertes économiques dans l'élevage du bétail de divers pays africains (Provost, 1982). Les souches virales impliquées dans cette nouvelle épidémie ont été d'une virulence « relativement moyenne » et la mortalité a été de l'ordre de 47 à 50% chez les animaux sensibles (Nawathe et Lamorde, 1984; Nawathe et al, 1983). Ceci a interpellé la communauté scientifique et les autorités politiques qui ont engagé des campagnes d'urgence de vaccination de 1980 à 1983 en Afrique de l'Ouest. Ensuite le projet Panafricain de lutte contre la PB communément appelée PARC (Pan African Rinderpest Campaign) a été instauré en 1986 à l'ensemble des pays compris entre le Sahara et l'équateur, allant de l'Afrique occidentale à l'Afrique de l'est.

Le projet PARC avait un double objectif, la lutte contre la peste bovine par des campagnes massives de vaccination et la libéralisation de la profession vétérinaire ainsi que des secteurs de production d'élevage. Ce programme a pris fin en 1999 et les résultats obtenus ont été satisfaisants. En effet, la plupart des pays concernés sont actuellement indemnes de PB. En 1996, seule une zone d'enzootie de PB était signalée en Afrique, à l'est du continent, dans la région frontalière du sud du Soudan, Ethiopie, Kenya et sud Somalie (Rweyemamu, 1996). Un programme spécifique de vaccination contre la PB pour cette région a été mis en place par la FAO. Ainsi, entre 2001 et 2002 la vaccination de masse de près d'un million de bovins dans le sud-est du Soudan aurait permis l'élimination du virus du pays (FAO, 2003).

En 2001, la PB a été diagnostiquée et confirmée par le laboratoire de Pirbright au Kenya sur des buffles du Parc National Meru (FAO, 2003; 2004). Pour consolider les acquis de la lutte contre la PB, un nouveau projet dénommé PACE (Programme Panafricain de Control des Epizootie) a pris la relève du PARC pour une recherche active du virus chez les animaux sensibles. Il vient de prendre fin en Octobre 2006. Actuellement d'immenses efforts sont concentrés sur l'écosystème pastoral somalien comprenant le nord-est du Kenya, le sud de l'Éthiopie et le sud de la Somalie (Figure 2), pour éviter que le virus ne s'échappe de ce dernier bastion de PB à partir des exportations de bétail et des mouvements des éleveurs nomades aggravés par les crises politiques dans cette région.

Sur le continent asiatique, berceau de la maladie, des foyers de PB ont été signalés dans les années 90 au Sri Lanka (Anderson E.C. et al, 1990) et en Inde où des porcs ont été infectés (Govindarajan et al, 1996). La présence de la PB a été aussi confirmée en Turquie (Shal, 1992) et à la frontière de la Mongolie avec la Russie (Barrett et al, 1993). Les campagnes de vaccination menées dans ces régions avec les projets WAREC (West Asian Rinderpest Eradication Campaign) et SAREC (South Asian Rinderpest Eradication Campaign) se sont tous aussi révélées efficaces. Le dernier foyer de peste bovine signalé en Asie a été dans la province de Sindh au Pakistan, en octobre 2000. Il semble être éradiqué selon les enquêtes menées avec le soutien de la Commission Européenne et de la FAO (FAO, 2003; 2004). Au Proche-Orient, les études menées au Yémen, pays où des cas de PB avaient été détectés à cause des importation de bovins en provenance d'Asie et d'Afrique, ont aussi montré que l'absence de cette maladie (FAO, 2003).

Le Programme mondial d'éradication de la peste bovine ou Global Rinderpest Eradication Programme (GREP) coordonné par la FAO a pour objectif l'élimination totale de cette maladie d'ici l'an 2010. Pour certifier l'éradication de la PB, les pays africains et asiatiques se sont engagés à vérifier l'absence de circulation de virus suivant les normes de l'Office International des Epizooties (annexe) (OIE, 2006).

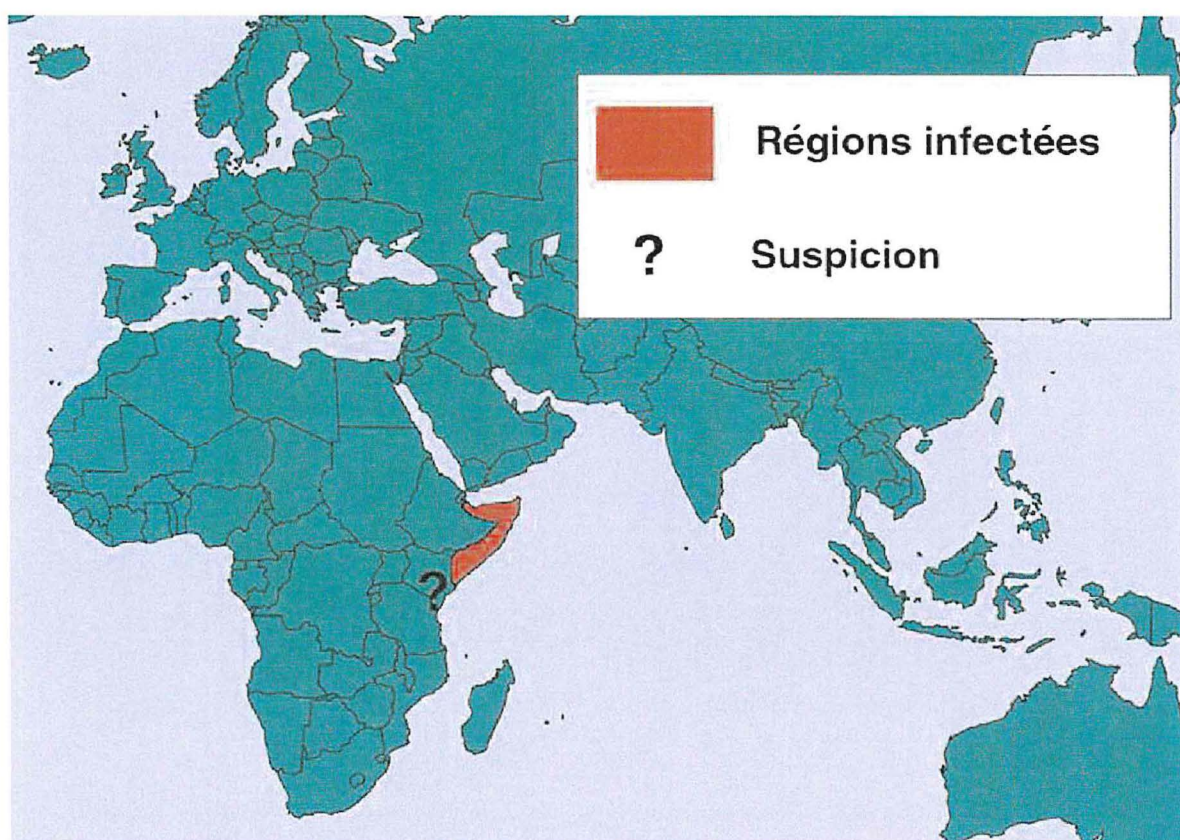


Figure 2: Derniers foyers persistants de la peste bovine (CIRAD, 2004)

3.2. La Peste des Petits Ruminants.

L'aire de répartition de la PPR, à l'inverse de celle de la PB, a beaucoup évolué. La maladie initialement signalée en Afrique de l'ouest, est en pleine expansion (Figure 3). Son aire d'extension s'est élargie pour couvrir pratiquement tous les pays d'Afrique compris entre le Sahara et l'équateur, allant de l'océan Atlantique à la mer Rouge. La PPR est aujourd'hui présente au Moyen-Orient (Abu Elzein et al, 2004; al-Naeem et al, 2000; Lefèvre et al, 1991; Abu Elzein et al, 1990; Lefèvre et Diallo, 1990; Taylor et al, 1990; Lefèvre, 1987), au Pakistan (Amjad et al, 1996), dans le sous-continent indien (Nanda et al, 1996, Singh et al, 2004a; Shaila et al, 1989), en Chine (OIE, 2007) et en Turquie (Cam et al, 2005; Yesilbag et al, 2005; Ozkul et al, 2002). Cette extension, relativement rapide de la PPR ces dernières années pourrait s'expliquer par les mouvements de transhumance ou de nomadisme des populations à la recherche de pâturages pour les besoins de l'élevage extensif et aussi par les exportations vers les pays arabes à partir de la corne de l'Afrique. Aussi faut-il noter que les techniques modernes de diagnostic spécifique ont permis une différenciation beaucoup plus efficace entre PPRV et RPV, deux virus apparentés. Il est fort probable aussi que la PPR ne soit pas une maladie nouvellement introduite dans certaines de ces régions. Elle a été ignorée à la faveur d'autres entités pathologiques telle que la PB et la pasteurellose, cette dernière étant d'ailleurs une complication d'une infection primitive de PPR.

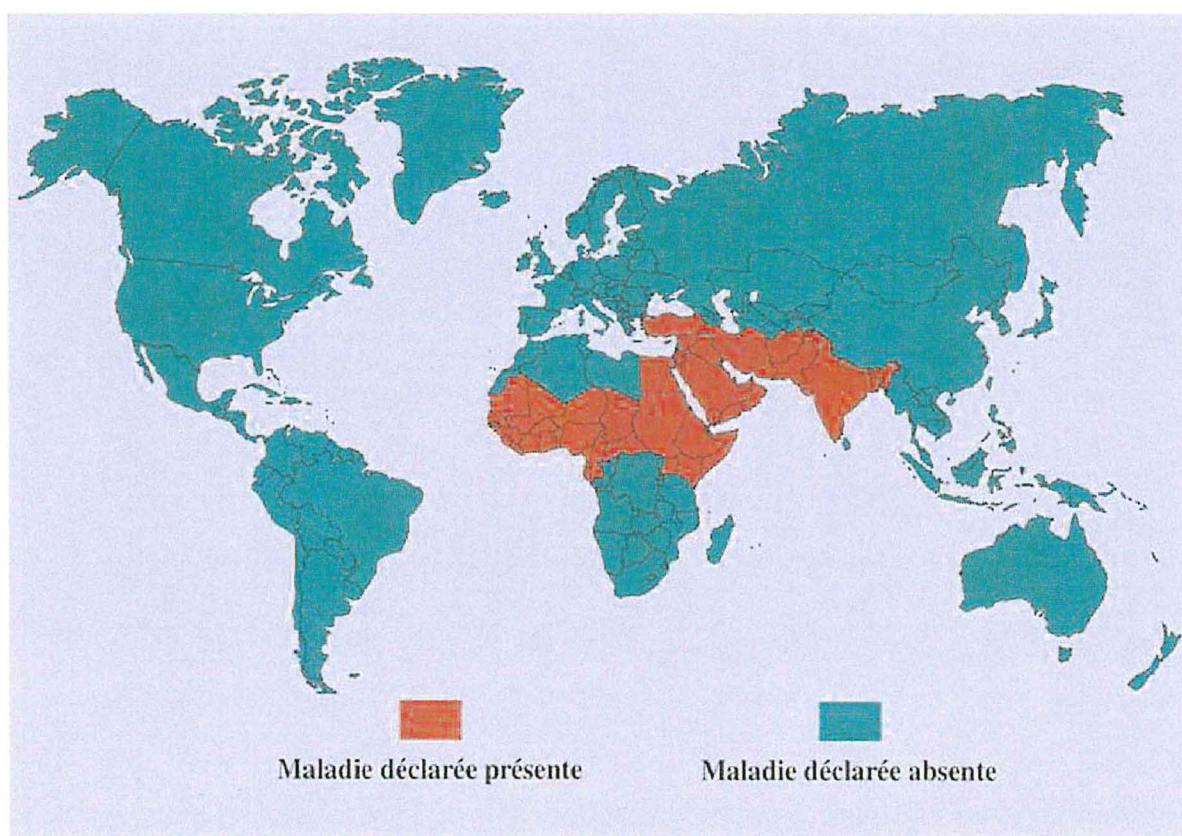


Figure 3: Répartition mondiale du virus de la PPR (Diallo, 2003a)

4. Importance économique de la PB et de la PPR.

La PB a été un des fléaux les plus redoutés par les éleveurs. En raison de sa très grande contagiosité, elle peut décimer des populations entières de bovins et de buffles. Les dégâts économiques et sociaux causés par le RPV ont été à l'origine de famines dans certaines régions. A la fin du 19ème siècle, une épidémie de PB en Afrique a tué 80 à 90% du cheptel bovin et causé une pénurie de viande dans le Transvaal, actuelle Afrique du Sud (Lefèvre, 2003), ce qui a nécessité des importations de viande à partir de l'Australie pour couvrir les déficits constatés (Meuleman, 1907; Tobback, 1951). Plus récemment, au début des années 80, la flambée épidémique de PB qui a de nouveau frappé une grande partie de l'Afrique a causé des pertes économiques estimées à plus de 2 milliards de dollars (FAO, 2003). En 1994 et 1995, une épizootie meurtrière de PB aurait causé la mort de près de 80% du bétail dans les régions du nord du Pakistan et une perte économique de près de 20 millions de dollars US (Rossiter et al, 1998).

L'impact économique de la PPR varie selon les zones, en fonction des schémas épidémiologiques. Ainsi en Afrique, dans les zones côtières où sont élevées les races naines de petits ruminants, la PPR évolue sous forme de grandes épidémies cycliques et peut se révéler dramatique pour les éleveurs. La morbidité peut atteindre 90% et la mortalité 50 à 80% dans les populations naïves de chèvres et de moutons (Kitching, 1988). Au Nigeria, les pertes occasionnées annuellement, en l'absence de toute intervention, auraient été estimées à plus de 1,5 million de dollars dans les années 70 (Hamdy et Dardiri, 1976). En Inde la PPR est responsable d'importantes pertes économiques annuelles estimées à environ 18 millions d'Euro (Venkataramanan et al, 2005).

5. Biologie des virus RPV et PPRV

5.1. Structure de la particule virale.

Les morbillivirus sont des virus enveloppés dont le cœur est constitué d'une nucléocapside à symétrie hélicoïdale (Figure 4) (Pastoret et al, 1991; Gibbs et al, 1979; Fraser et Martin, 1978; Bourdin et Laurent-Vautier, 1967). Le génome est constitué par un brin d'ARN monocaténaire de polarité négative d'une taille d'environ 16,000 nucléotides (Barrett et al, 2006; Lamb et Kolakofsky, 2001; Diallo, 1990). Ce génome sert de matrice pour la synthèse d'ARN messagers (ARNm) correspondant aux différentes protéines virales et pour la synthèse d'un ARN antigénome de polarité positive qui est, par la suite, utilisé pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN génomique. Six protéines entrent dans la composition de la particule virale (Diallo, 2003a; Barrett, 1999; Haffar et al, 1999). La nucléoprotéine (N) ou protéine N forme un manchon de protection autour du génome viral sur lequel vient se fixer le complexe polymérase composé de la phosphoprotéine (P) et de la protéine large (L), le tout formant ainsi la nucléocapside. L'enveloppe virale dérive de la membrane plasmique de la cellule hôte sur laquelle sont fixées les glycoprotéines externes, la protéine de fusion (F) et l'hémagglutinine (H). La protéine de matrice (M) couvre la face interne de l'enveloppe et sert de pont entre les glycoprotéines virales et la nucléocapside. Les particules virales sont pléomorphes avec un diamètre variant de 100 à 300 nm (Lund et al, 1984; Gibbs et al, 1979).

5.2. Propriétés physico-chimiques

RPV et PPRV comme tous les virus enveloppés, sont d'une grande fragilité dans le milieu extérieur. Leur transmission nécessite un contact étroit entre animaux. Ces virus sont sensibles à la chaleur et aux rayons ultraviolets (Diallo, 2003a; Lefèvre, 2003; Rossiter et Taylor, 1994). Des expériences d'exposition à des températures variables ont montré que le RPV et le PPRV sont inactivés à 56°C (Diallo, 2003a; Lefèvre, 2003). Ils sont aussi inactivés par les agents chimiques (solvants lipidiques), l'alcool, l'éther, chloroforme et par la plupart des désinfectants tels que le phénol, la soude, le formol (Diallo, 2003a; Lefèvre 2003; OIE, 2002a; 2002b). Le RPV et le PPRV se conservent bien par le froid (Diallo, 2003a; Lefèvre, 2003) et sont stables à des pH compris entre 5 et 10 (Rossiter et Taylor, 1994; Plowright, 1968). La lyophilisation permet de bien les conserver.

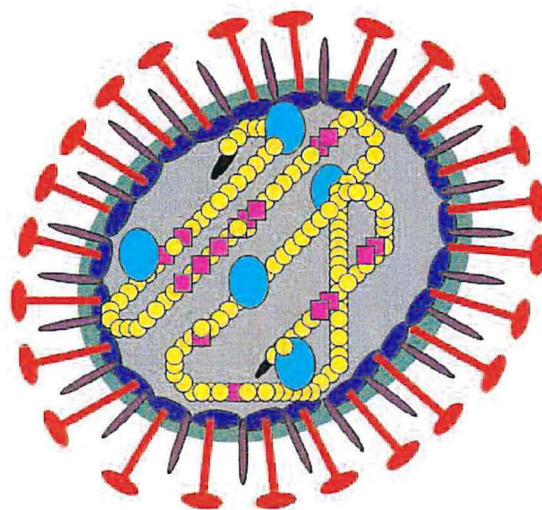


Figure 4: structure des morbillivirus (modifié d'après Fraser et Martin, 1978)

● Protéine N, ■ Protéine P ● Protéine M ● Protéine F
— Génome ARN T Protéine H ● Protéine L,

5.3. Organisation du génome.

Le génome des morbillivirus peut être découpé physiquement en segments successifs de l'extrémité 3' à l'extrémité 5' (Figure 5):

- une première région d'une séquence de 52 nucléotides à l'extrémité 3' définie comme extracistronique parce qu'elle ne participe pas à la composition des ARNm. Cette région non codante appelée séquence "leader" est suivie d'un triplet GAA et de la partie non codante du gène N, l'ensemble d'une longueur de 109 nucléotides possède les fonctions de promoteur (Barrett et al, 2006). Ce promoteur de la région 3' appelé promoteur du génome (en anglais Genome Promoter: GP) est le promoteur unique pour la transcription des ARNm des protéines virales et la synthèse de l'ARN antigénome (Barrett et al, 2006).

- Une série de six unités de transcription, matrices d'autant d'ARNm codant les différentes protéines virales. La disposition des gènes de ces protéines à l'intérieur du génome est dans l'ordre 3'-N-P (CV)-M-F-H-L-5' (Bailey et al, 2005; Barrett, 1999; Diallo, 1990). Le cadre de lecture ou "Open Reading Frame" (ORF) du gène de la nucléoprotéine (N) se présente juste à la fin du "GP". Chaque gène de morbillivirus débute par le motif conservé UCCC/U et se termine par un signal de polyadénylation, poly uracyl de 6 nucléotides (Barrett et al, 2006; Diallo, 1990). Une séquence intergénique (IG) de trois nucléotides GAA permet de séparer chaque gène du gène suivant. Ce triplet "IG" est généralement bien conservé à chaque jonction des gènes sauf entre les gènes H et L et entre le gène L et la séquence extracistronique de l'extrémité 5'. A la jonction H/L le triplet GAA est modifié en GCA pour le MV, RPV, et la souche PPRV Côte d'Ivoire/89 (Barrett et al, 2006). A la fin du gène de la protéine L le triplet GAA est remplacé par GAU pour le PPRV et GUU pour le CDV, PDV et DMV (Barrett et al, 2006). Toute la séquence des gènes n'est pas traduite en protéine. On peut distinguer, une partie non codante ($_{NC}D$) avant le codon d'initiation AUG de la phase de lecture et une autre partie non codante ($_{NC}F$) après le codon stop. La longueur de ces différentes parties non codantes est variable selon les gènes. Le gène F des morbillivirus présente une longue séquence $_{NC}D$ (580 nucléotides pour le MV) très variable et riche en G-C (Barrett et al, 2006; Meyer et Diallo, 1995; Evans et al, 1990 ; Richardson et al, 1986).

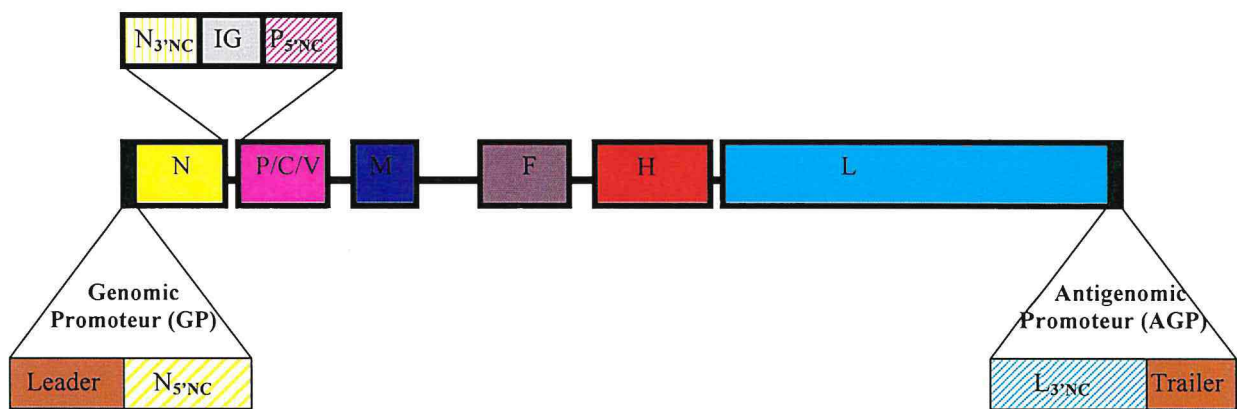


Figure 5: Organisation du génome des morbillivirus (Modifié d'après Barrett et al, 2006)

- Enfin l'ARN viral présente à son extrémité 5' une séquence de 37 à 38 nucléotides appelé séquence "Trailer" et forme avec la séquence non codante à la fin du gène L le promoteur antigénomique ou AGP (Antigenomic Promoteur) qui est celui de la réplication du génome viral réalisée à partir de l'antigénome (Barrett, 2006; Bailey et al, 2005).

5.4. Les protéines virales

Le génome des morbillivirus code six protéines structurales (N, P, M, F, H et L) et des protéines non structurales.

5.4.1. Les protéines structurales externes

5.4.1.1. L'hémagglutinine (H)

La protéine H est une glycoprotéine virale transmembranaire. Sa longueur varie selon les morbillivirus, 604 acides aminés (aa) pour le DMV, 609 aa pour le RPV et PPRV et 617 aa pour le MV (Barrett et al, 2006). La protéine H est la protéine d'attachement des morbillivirus. Elle interagit avec les récepteurs membranaires des morbillivirus présents à la surface des cellules (Barrett et al, 2006; Choppin et Scheid, 1980). Après synthèse, la protéine H subit des étapes de glycosylation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elle possède 5 sites potentiels de glycosylation (Alkhatib et Briedis, 1986). Des liaisons di-sulfures permettent sa dimerisation (Hu et al, 1994, Ogura et al, 1991) avant son transport à la surface cellulaire où elle est retrouvée sous forme de tétramères par association non-covalente de deux dimères covalents (Plempner et al, 2000; Malvoisin et Wild, 1993).

La protéine H des Paramyxovirus a généralement des activités hémagglutinine et neuraminidase. Cependant, pour les morbillivirus cela varie selon les virus (Barrett et al, 2006). La protéine H de PPRV a à la fois des activités hémagglutinine et neuraminidase. Pour les souches de MV adaptées à la culture cellulaire, leur protéine H possède uniquement une activité hémagglutinine et est dépourvue de toute activité neuraminidase. Chez le RPV la protéine H a une activité neuraminidase limitée et elle est incapable d'agglutiner les hématies.

Sur le plan structurel, la protéine H présente un domaine transmembranaire d'ancrage du côté N-terminal intracytoplasmique et un domaine extra-membranaire composé de la région C-terminale (Barrett et al, 2006; Alkhatib et Briedis, 1986). La protéine H des morbillivirus est la moins conservée (Tableau 1). La spécificité de l'attachement des morbillivirus à leurs récepteurs dépendrait ainsi du degré de variation de la protéine H, ce qui serait certainement le facteur déterminant du spectre d'hôte des virus.

5.4.1.2. La protéine de fusion (F)

La protéine de fusion (F) est la deuxième glycoprotéine transmembranaire. Elle est responsable de la fusion entre la membrane virale et celle de la cellule hôte pour libérer la nucléocapside dans le cytoplasme. Au cours de ce processus la coopération de la protéine H est nécessaire (Barrett et al, 2006; Plemper et al, 2002; Wild et al, 1991). La protéine F est aussi responsable de la fusion membranaire entre les cellules infectées et les cellules saines voisines, processus permettant la dissémination du virus sans libération de particules virales. Dans les cellules infectées, la protéine de fusion est synthétisée sous la forme d'un précurseur (F_0) d'environ 537-552 acides aminés avec un poids moléculaire de 60 kDa en migration sur gel SDS-PAGE (Meyer et Diallo, 1995). Durant sa migration vers la membrane, la F_0 est clivée dans l'appareil de Golgi par une protéase cellulaire en deux sous unités F1 (41 kDa) et F2 (18 kDa) qui restent liées par un pont disulfure pour constituer la forme active de la protéine F (Graves et al, 1978). Le site de clivage est une séquence polybasique constituée de cinq aa, résidus 108 à 112 dans l'ordre Arg-Arg- X_1 - X_2 -Arg, X_1 et X_2 étant des aa variables d'un morbillivirus à l'autre (Barrett et al, 2006). La mutation des asparagines altère la conformation de F et la capacité fusogénique de la protéine (Alkhatib et al, 1994a; 1994b).

La sous-unité F1 a sa région C-terminale qui est intra cytoplasmique et sa région N-terminale est extracellulaire. La région N-terminale contient à son extrémité un peptide contenant des aa hydrophobes bien conservés. Ce peptide dit de fusion joue un rôle très important dans le processus de fusion, en s'insérant dans la membrane de la cellule cible. Un autre peptide participant au processus de fusion a été identifié à l'intérieur du fragment F1 (Samuel et Shai, 2001). Le fragment F1 contient en plus deux domaines structurés en hélices α impliqués également dans le processus de fusion (Buckland et al, 1992) et un domaine riche en cystéines (résidus 337 à 381) impliqué dans l'interaction avec la protéine H (Wild et al, 1994).

		Morbillivirus			
		PPR	MV	CDV	DMV
Protéines virales	N	79,66	82,70	75,38	79,69
	P	58,65	65,35	53,57	57,91
	C	54,02	65,34	52,91	55,29
	V	54,61	64,55	44,67	50,50
	M	89,82	92,26	83,93	89,26
	F	82,74	85,98	78,75	84,52
	H	59,14	67,33	46,26	57,14
	L	83,44	87,73	81,05	83,29

Tableau 1: Taux d'identité (en pourcentage) des protéines N, P, M, F et H de RPV (souche Kabete "O") avec celles d'autres morbillivirus (Barrett et al, 2006).

La sous unité F2 contient les sites potentiels de N-glycosylation (résidus asparagine 29, 61 et 67). La glycosylation est nécessaire pour le repliement, la dimerisation et l'exportation de la protéine vers la membrane cellulaire.

5.4.2. Les protéines structurales internes

5.4.2.1. La nucléoprotéine (N)

La protéine N joue un rôle central dans la réplication de l'ARN génomique des virus à ARN négatif. Elle est aussi impliquée dans différentes interactions nécessaires pour ses fonctions..

5.4.2.1.1. Synthèse

La protéine N est la protéine majoritaire synthétisée au cours de la réplication des morbillivirus (Barrett et al, 2006; Graves et al, 1978). Elle est longue de 525 aa pour les virus MV, RPV et PPRV mais de 523 aa pour le CDV, DMV, PMV et PDV (Barrett et al, 2006; Diallo et al, 1994; 1987). Soumise à l'électrophorèse sur un gel d'acrylamide dénaturant-SDS (SDS-PAGE), la protéine N des morbillivirus migre à un poids moléculaire apparent de 60 kDa (Diallo et al, 1994). Cependant cette valeur peut varier suivant le degré de phosphorylation pour certaines souches de RPV et PPRV (Barrett et al, 2006; Libeau, 1998; Diallo et al; 1987). La protéine N des morbillivirus, comme celle de tous les Mononegavirales, s'assemble sur l'ARN viral génomique pour former un manchon de protection contre les attaques des nucléases cellulaires. Cette structure est de type hélicoïdale. Synthétisée dans divers systèmes d'expression de protéines en absence de l'ARN viral et des autres protéines virales, la protéine N s'auto-assemble autour des ARN cellulaires pour former des pseudo-nucleocapsides (**Article.2**).

5.4.2.1.2. Alignement de la séquence de la protéine N.

La comparaison de la séquence des protéines N de différents morbillivirus montre une grande conservation au sein de ce groupe (Tableau 1, Figure 6). Cependant cette conservation n'est pas uniforme tout au long de la protéine et des zones variables sont observées dans la région C-terminale (Diallo et al, 1994). En effet, cette région un fragment de 70 aa très variable entre virus de ce groupe. La nucléoprotéine de morbillivirus peut donc être divisée en deux régions:

- La région N-terminale appelée N-core qui s'étend de l'acide aminé 1 à 400. Ce domaine est lui-même subdivisé en deux régions:
 - la séquence en acides aminés 1 à 145 dont l'homologie entre morbillivirus est de l'ordre de 40% à 50% avec une portion de 25 aminoacides (120-145) de variabilité élevée;
 - la séquence 146 à 400 très bien conservée qui constitue la partie centrale de la protéine. La grande conservation de cette région pourrait indiquer que celle-ci est fondamentale pour les fonctions de la protéine et le moindre changement pourrait être létal pour le virus. Les études de mutations d'acides aminés ont permis de comprendre l'importance de cette région pour la formation de la nucléocapside (chapitre résultats).
- La région C-terminale appelée N-tail est constituée des acides aminés allant de 401 à la fin de la protéine. Le fragment aa 421 à 490 de cette région est très variable entre les morbillivirus. N-tail est facilement clivée de la protéine par les protéases cellulaires (Karlin et al, 2002).

CDV N	MASLLKSLILFKNTIRDQPPPLASGSGGAISRGIKHVIIIVLIPGSSSYTRSR	50
PDV N	MASLLKSLILFKNTIRDQPPPLASGSGGAISRGIKHVIIIVLIPGSSSYTRSR	50
MEV N	MATLLRSLALFKRNKOKPPIISGSGGAIIRGIKHVIIIVLIPGSSSYTRSR	50
RPV N	MASLLKSLALFKRNKOKPPIISGSGGAIIRGIKHVIIIVLIPGSSSYTRSR	50
PPRV N	MATLLKSLALFKRNKOKPPIISGSGGAIIRGIKHVIIIVLIPGSSSYTRSR	50
CDV N	LLDRLVRLVGGPILVNCPKLTGILISILSLFVESPGOLIIRITDDPOVSIK	100
PDV N	LLDRLVRLVGGPILVNCPKLTGILISILSLFVESPGOLIIRITDDPOVSIK	100
MEV N	LLDRLVRLVGGPILVNCPKLTGILISILSLFVESPGOLIIRITDDPOVSIK	100
RPV N	LLDRLVRLVGGPILVNCPKLTGILISILSLFVESPGOLIIRITDDPOVSIK	100
PPRV N	LLDRLVRLVGGPILVNCPKLTGILISILSLFVESPGOLIIRITDDPOVSIK	100
CDV N	LVEVILPSINSLACGLTFASRGASLWLRADIEFFKIVDEGSKAQGOGLGWLENK	150
PDV N	LVEVILPSINSLACGLTFASRGASLWLRADIEFFKIVDEGSKAQGOGLGWLENK	150
MEV N	LLEVVQSILQSSGLIFASRGATNMEDEADQYFSDOPISISDQSSAFGWLENK	150
RPV N	LVEVILPSINSLACGLTFASRGASLWLRADIEFFKIVDEGSKAQGOGLGWLENK	150
PPRV N	LVEVILPSINSLACGLTFASRGASLWLRADIEFFKIVDEGSKAQGOGLGWLENK	150
CDV N	DIIVDIEVNDIAEENFILLASILAOIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYT	200
PDV N	DIIVDIEVNDIAEENFILLASILAOIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYT	200
MEV N	EISDIEVNDIAEENFILLASILAOIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYT	200
RPV N	EISDIEVNDIAEENFILLASILAOIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYT	200
PPRV N	EISDIEVNDIAEENFILLASILAOIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYT	200
CDV N	QORRVVGEFRNKNKIWLQIVNRNIAEDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRI	250
PDV N	QORRVVGEFRNKNKIWLQIVNRNIAEDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRI	250
MEV N	QORRVVGEFRNKNKIWLQIVNRNIAEDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRI	250
RPV N	QORRVVGEFRNKNKIWLQIVNRNIAEDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRI	250
PPRV N	QORRVVGEFRNKNKIWLQIVNRNIAEDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRI	250
CDV N	AEMI CDIDNYI VEAGLASFILTIKFCIETMYPALCLHEFSGELTTTIESLM	300
PDV N	AEMI CDIDNYI VEAGLASFILTIKFCIETMYPALCLHEFSGELTTTIESLM	300
MEV N	AEMI CDIDNYI VEAGLASFILTIKFCIETMYPALCLHEFSGELTTTIESLM	300
RPV N	AEMI CDIDNYI VEAGLASFILTIKFCIETMYPALCLHEFSGELTTTIESLM	300
PPRV N	AEMI CDIDNYI VEAGLASFILTIKFCIETMYPALCLHEFSGELTTTIESLM	300
CDV N	MLYQOMGEITAPYMVILENSVONKFSAGSYPLLWSYANGVGVLENSMGGCL	350
PDV N	MLYQOMGEITAPYMVILENSVONKFSAGSYPLLWSYANGVGVLENSMGGCL	350
MEV N	MLYQOMGEITAPYMVILENSVONKFSAGSYPLLWSYANGVGVLENSMGGCL	350
RPV N	MLYQOMGEITAPYMVILENSVONKFSAGSYPLLWSYANGVGVLENSMGGCL	350
PPRV N	MLYQOMGEITAPYMVILENSVONKFSAGSYPLLWSYANGVGVLENSMGGCL	350
CDV N	GFGRSYFDPAYFRLGQEMVRRSAGKVSSIALAAELGITEEAKLVSEIASK	400
PDV N	GFGRSYFDPAYFRLGQEMVRRSAGKVSSIALAAELGITEEAKLVSEIASK	400
MEV N	GFGRSYFDPAYFRLGQEMVRRSAGKVSSIALAAELGITEEAKLVSEIASK	400
RPV N	GFGRSYFDPAYFRLGQEMVRRSAGKVSSIALAAELGITEEAKLVSEIASK	400
PPRV N	GFGRSYFDPAYFRLGQEMVRRSAGKVSSIALAAELGITEEAKLVSEIASK	400
CDV N	ITEEDRIIRAIGPKOSDITFLHSELRSEVAMQDPPTINKRSENQGGDKYPIH	450
PDV N	ITEEDRIIRAIGPKOSDITFLHSELRSEVAMQDPPTINKRSENQGGDKYPIH	450
MEV N	ITEEDRIIRAIGPKOSDITFLHSELRSEVAMQDPPTINKRSENQGGDKYPIH	450
RPV N	ITEEDRIIRAIGPKOSDITFLHSELRSEVAMQDPPTINKRSENQGGDKYPIH	450
PPRV N	ITEEDRIIRAIGPKOSDITFLHSELRSEVAMQDPPTINKRSENQGGDKYPIH	450
CDV N	FSDERLLDGYTPQVNSSEERSGSRYSITQIVQDGGNDQDRKSMETAKNRM	498
PDV N	FSDERLLDGYTPQVNSSEERSGSRYSITQIVQDGGNDQDRKSMETAKNRM	498
MEV N	FSDERLLDGYTPQVNSSEERSGSRYSITQIVQDGGNDQDRKSMETAKNRM	498
RPV N	FSDERLLDGYTPQVNSSEERSGSRYSITQIVQDGGNDQDRKSMETAKNRM	498
PPRV N	FSDERLLDGYTPQVNSSEERSGSRYSITQIVQDGGNDQDRKSMETAKNRM	498
CDV N	LITKMLTSGPTSEDNPRVYNDRKELLN	523
PDV N	LITKMLTSGPTSEDNPRVYNDRKELLN	523
MEV N	LITKMLTSGPTSEDNPRVYNDRKELLN	523
RPV N	LITKMLTSGPTSEDNPRVYNDRKELLN	523
PPRV N	LITKMLTSGPTSEDNPRVYNDRKELLN	523

Figure 6: Alignement de séquences acides aminées de la nucléoprotéine de morbillivirus, (Diallo et al, 1994)

5.4.2.1.3. Structure de la nucléoprotéine et du complexe nucléoprotéine-ARN des Mononegavirales.

L'écueil majeur à l'étude structurale de la nucléoprotéine des Mononegavirales est dû à la difficulté à obtenir des molécules solubles, individualisées, homogènes et régulières. En effet comme signalé beaucoup plus haut, les différentes nucléoprotéines recombinantes exprimées seules dans les différents systèmes (eucaryotes et bactériens) s'auto-assemblent et s'associent autour des ARN cellulaires pour former des complexes N-ARN qui ressemblent aux nucléocapsides virales (**article 2**). Les structures nucléocapsidiques ainsi formées sont hétérogènes sur le plan morphologique pour un même virus, ce qui rend impossible les études de cristallographie de la protéine N. Pour remédier à cette difficulté, Green et al, (2000) ont co-exprimé la protéine N et la phosphoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). Ils ont ainsi pu obtenir des complexes constitués d'oligomères de la protéine N liés à la phosphoprotéine. Ces complexes ont une structure en anneaux, sont homogènes et beaucoup plus solubles. La phosphoprotéine est dissociée des oligomères de protéines N par un abaissement du pH. En adoptant cette stratégie, les structures de protéines N des virus de la rage et de la VSV obtenus ont servi pour les études de cristallographie (Albertini et al, 2006; Green et al, 2006). L'analyse structurale de la nucléoprotéine de ces virus montre deux domaines globulaires (Figure 7), l'un en région N-terminale (vert) et l'autre en région C-terminale (jaune) et composés chacun d'hélices α . Pour son encapsidation, l'ARN génomique se loge dans les lobes formés par ces domaines globulaires. A l'extérieur des lobes, un petit feuillet amino-terminal et une large boucle du lobe carboxy-terminal permettent les interactions avec les deux monomères voisins (Green et al, 2006).

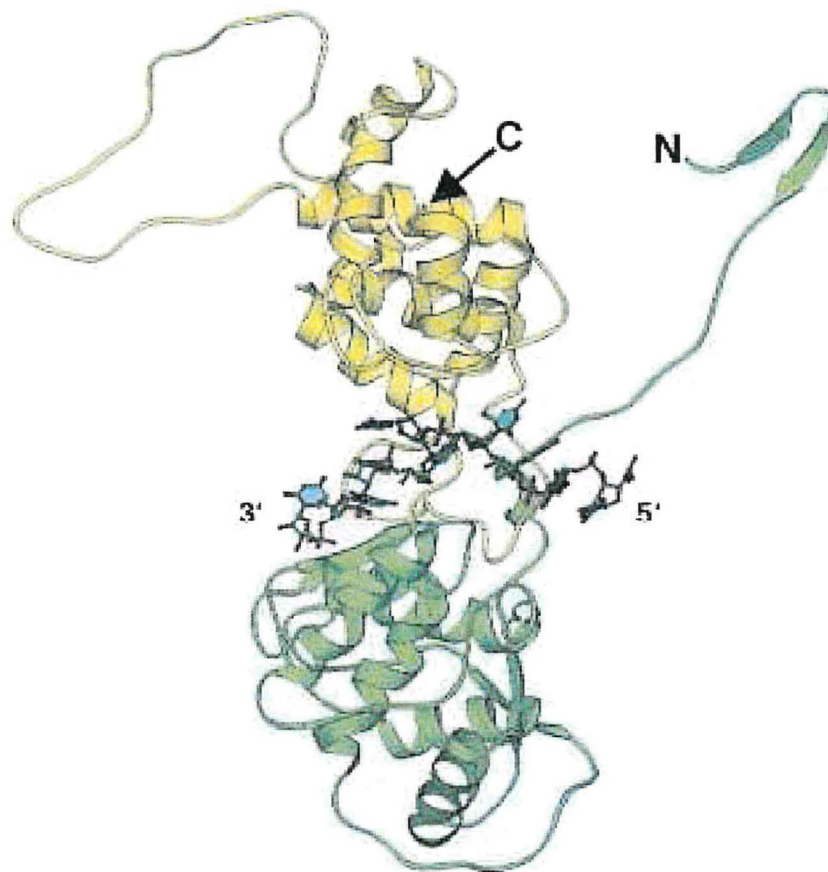


Figure 7: Représentation de monomère de la protéine N du virus de stomatite vésiculeuse (VSV) associé à 9 nucléotides de l'ARN génomique. La protéine N a deux lobes, N-terminale et C-terminale, colorés en vert et jaune, respectivement. (Green et al, 2006).

Diverses études ont montré que la région C-terminale de la nucléoprotéine du MV est exposée à la surface de la nucléocapside (Barrett et al, 2006; Longhi et al, 2003; Liston et al, 1997; Bourhis et al, 2005; Schoehn et al, 2004). Elle possède les caractéristiques des protéines intrinsèquement désordonnées (PID) (Bourhis et al, 2006; 2005; 2004). Les PID sont des protéines dépourvues de structures secondaire et tertiaire stables à l'état natif dans les conditions physiologiques en l'absence de partenaire (Dunker et al, 2001). L'incapacité de ces protéines à adopter une structure tridimensionnelle précise leur confère une grande flexibilité structurale, ce qui leur permet d'interagir avec plusieurs partenaires structuralement différents. Cette propriété permet aux PID d'agir comme des "linkers". La présence de la région N-tail flexible à la surface de la nucléocapside permet à la nucléoprotéine d'interagir avec plusieurs partenaires, viraux et cellulaires. En effet, au-delà de l'interaction avec la protéine P (et le complexe L-P), la région N-tail de la protéine N de MV interagit avec la protéine de choc thermique Hsp72, le facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF-3) et un récepteur cellulaire appelé NR pour «Nucleoprotein Receptor» (Bourhis et al, 2007).

La région N-tail semble important pour la flexibilité conformationnelle de la nucléocapside. Les études de microscopie électronique réalisées sur des produits purifiés correspondant à la protéine N entière du MV et à la région N-core de celle-ci ont mis en évidence des différences morphologiques significatives dans les structures qui sont formées et par la même occasion le rôle de la région N-tail (Albertini et al, 2005; Schoehn et al, 2004; Longhi et al, 2003). En effet, l'auto-assemblage des monomères de la protéine N forme des structures hétérogènes (Gaudin, 2006; Bourhis et al, 2005; Bhella et al, 2004). On observe des pseudo-nucléocapsides mais une prédominance des structures en anneaux qui semblent correspondre à des nucléocapsides sectionnées à cause de leur flexibilité. A l'inverse les pseudo-nucléocapsides formées uniquement par la région N-core apparaissent plus rigides et homogènes. La présence de la région N-tail à la surface de la nucléocapside semble donc être important pour la flexibilité de celle-ci. Cette souplesse de la nucléocapside semble être indispensable pour le passage du complexe polymérase viral pour l'accès à l'ARN viral pendant les phases de transcription et de réplication.

La nucléocapside des *Mononegavirales* est en forme de tubes creux avec une morphologie particulière en «arête de hareng» (Bhella et al, 2004; 2002; Karlin et al, 2002). Elle peut adopter différents tours d'hélice selon les virus. Le nombre de monomères dans les tours varie en fonction des virus:

- 10 pour le VSV et le virus respiratoire syncytial (Green et al, 2006 ; Bhella et al, 2002),
- 11 pour le virus de la rage (Albertini et al, 2006).
- 12,35 en moyenne pour le MV (Schoehn et al, 2004).
- 13 pour le virus de Nipah (Albertini et al, 2005).

5.4.2.1.4. Interactions et fonctions de la nucléoprotéine.

La nucléoprotéine interagit avec différents partenaires viraux et cellulaires (Bourhis et al, 2007; 2005; 2004; Longhi et al, 2003; Johansson et al, 2003; Karlin et al, 2002; Bankamp et al, 1996 ; Liston et al, 1997; Spehner et al, 1997; 1991; Harty et Palese, 1995; Curran et al, 1993) et les interactions suivantes sont été décrites:

- Interaction N-N entre les structures monomériques pour former la nucléocapside (**article 2**).
- Les nucléoprotéines de *Mononegavirales* s'associent à l'ARN viral par l'intermédiaire du squelette ribose-phosphate, laissant ainsi les bases des nucléotides accessibles à la polymérase virale (Iseni et al, 2002; 2000). Cette fixation se fait sur un nombre entier de nucléotides qui est différent et spécifique pour chaque famille virale: 6 pour les *Paramyxoviridae* (Egelman et al, 1989), 9 pour les *Rhabdoviridae* (Flamand et al, 1993) et entre 12 et 15 pour les *Filoviridae* (Mavrakis et al, 2002).
- Interaction de la protéine N avec le complexe polymérase via la phosphoprotéine. La polymérase virale se fixe sur la nucléoprotéine auto-assemblée sur l'ARN viral par l'intermédiaire de la phosphoprotéine pour permettre la transcription et la réplication. La phosphoprotéine peut aussi se lier également à la forme monomérique libre de la nucléoprotéine (N₀) pour empêcher l'auto-assemblage illégitime de celle-ci. Le complexe N₀-P formé sert de substrat à l'encapsidation de l'ARN nouvellement formé (Bourhis et al, 2005 ; Spehner et al, 1997 ; Curran et al, 1995).

Diverses études ont montré que le domaine d'interaction de la nucléoprotéine avec la phosphoprotéine est localisé dans sa région C-terminale (Bourhis et al, 2006; 2005, Kingston et al, 2004; Johansson et al, 2003; Liston et al, 1997; Homann et al, 1991).

- Interaction avec la protéine de matrice (M) au cours du processus de bourgeonnement qui fait suite à la phase d'assemblage des éléments du complexe RNP dans les cellules infectées. Elle permet la libération de la particule virale à partir de la membrane plasmique de la cellule infectée. Pour les virus Sendai (SV) et Parainfluenza humain de type 1 (hPIV1) l'interaction M-N semble être spécifique. La région variable C-terminale de la nucléoprotéine constituerait le site d'interaction avec la protéine de matrice (Coronel et al, 2001).

Au delà des interactions avec ses partenaires viraux, la nucléoprotéine du MV, interagit avec:

- la protéine du choc thermique Hsp72 pour stimuler la transcription et la réplication virale (Zhang et al, 2002).
- le facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF-3), ce qui pourrait conduire à une stimulation de la synthèse de l'interféron (Bourhis et al, 2007; tenOever et al, 2002).
- Les récepteurs cellulaires NR pour "Nucleoprotein Receptor" et FcγRII pour ses actions immunosuppressives. L'identification des sites d'interaction de la protéine N avec ces deux récepteurs a permis d'identifier le domaine N-core pour le FcγRII et N-tail pour le NR (Laine et al, 2003).

5.4.2.2. La phosphoprotéine ou protéine P.

Le gène de la protéine P code une protéine longue de 506-509 aa et d'une masse moléculaire de 54-55 kDa selon les morbillivirus (Barrett et al, 2006). En électrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE) la protéine P présente une poids moléculaire (PM) plus élevé, 84 kDa pour le RPV et 86 kDa pour le PPRV ((Diallo et al, 1987). 70-76 pour le MV et 73-80 pour le CDV (Rima, 1983; Diallo et al, 1987). Cette grande différence entre le PM réel et le PM apparent de la protéine est due à sa phosphorylation (Diallo et al, 1987). La protéine P fait partie de la nucléocapside et elle constitue un composant du complexe polymérasique (Huber et al, 1991). Deux fonctions distinctes sont attribuées à la protéine P lors de la réplication virale:

- Elle sert de co-facteur de la polymérase, «Large protéine» et permet sa fixation sur la nucléocapside,
- La protéine P possède la capacité de se lier à la nucléoprotéine libre et d'empêcher ainsi l'auto-assemblage non spécifique de cette dernière sur les ARN cellulaires (Lamb et Kolakofsky, 2001; Nishio et al, 1996; Shaji et Shaila, 1999; Harty et Palese, 1995).

Les différents travaux réalisés à partir de la protéine P du virus Sendai ont permis de déterminer deux régions fonctionnelles, les régions N-terminale (PNT) et C-terminale (PCT). La région PCT, mieux conservée par rapport au PNT (Barrett et al, 2006), se lie à la protéine L (Liston et al, 1995; Smallwood et al, 1994) et à la nucléocapside pour permettre la transcription et la réplication (Curran, 1996). La région PNT se lie à la forme monomérique soluble de la N (N_o) pour prévenir l'auto-assemblage de cette dernière comme décrit plus haut.

5.4.2.3. La protéine large (L)

La protéine L est la moins abondante des protéines virales produites. Elle est longue de 2183 aa et a un poids moléculaire élevé d'environ 247 kDa (Blumberg et al, 1988; Baron et Barrett 1995). La comparaison de séquences de la protéine L des morbillivirus a permis d'identifier trois domaines conservés séparés par deux régions présentant des variations en aa (McIlhatton et al, 1997).

Les études de mutation sur la protéine L de différents virus à ARN négatif montrent que chacun des trois domaines conservés jouent des fonctions bien spécifiques (Malur et al, 2002; Cartee et al, 2003). Le premier domaine est constitué des aa 1 à 606 et contient le motif KExxRLxxKMxxKM qui se lie à l'ARN viral. Le second domaine conservé, aa 650-1694, contient la séquence QGDNQ flanquée de domaines hydrophobes, semble être le site fonctionnel du complexe polymérase (Malur et al, 2002, Blumberg et al, 1988). Le troisième domaine, aa 1717 à 2183, possède une activité kinase et peut aussi se lier à l'ATPase (Barrett et al, 2006, Canter et al, 1993) nécessaire pour la synthèse d'ARN.

5.4.2.4. La protéine de matrice ou protéine M.

La protéine M tapisse la surface interne de la membrane virale. C'est une protéine basique longue de 335 aa et qui en migration sur gel SDS-PAGE à un poids moléculaire apparent de 36 à 41 kDa selon les morbillivirus (Haffar, 1999). La protéine M est la protéine structurale la mieux conservée entre morbillivirus (Tableau 1). Elle sert de pont entre les glycoprotéines virales d'enveloppe (F et H) et le complexe ribonucléoprotéique (Haffar et al : 1999; Hirano et al, 1993; 1992). La protéine M semble être essentielle pour la formation de nouvelles particules virales qui s'opèrent par bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire. Au cours de ce processus divers types d'interactions se déroulent et pour lesquelles la protéine M joue un rôle central (Rodriguez et al, 2004; Takimoto et Portner, 2004; Takimoto et al, 2001; Peeples, 1991). Elle interagit avec la protéine N (Coronel et al, 2001; Haffar, 1999; Peeples, 1991; Kaptur et al, 1991) et avec les régions intra-cytoplasmiques des glycoprotéines F et H de l'enveloppe virale (Griffin, 2001). L'absence d'expression de la protéine M augmente la capacité de fusion cellule à cellule et réduit la production de virus infectieux (Cathomen et al, 1998). Dans le cas des infections persistantes à MV (panencéphalite sclérosante subaiguë) ou à CDV ("Old Dog Encephalitis"), l'absence ou l'inactivation de la protéine M serait responsable de la défaillance du processus de bourgeonnement (Hirano et al, 1993; 1992; Cattaneo et al, 1989).

5.4.3. Les protéines non structurales.

Le gène de la protéine P des morbillivirus code des protéines non structurales en plus de la protéine P. On dénombre les protéines suivantes:

- La protéine C qui est synthétisée à partir de l'ARNm de la protéine P mais avec un "ORF" différent. Le codon initiateur AUG est ainsi décalé de 19 nucléotides en aval par rapport au AUG de l'"ORF" de la protéine P (Bellini et al, 1985). Le poids moléculaire (PM) de la protéine C est de 19-21 kDa (Barrett et al, 2006).
- La protéine V est par contre produite à partir d'un ARNm différent de celui de la protéine P par rajout d'un nucléotide supplémentaire ('editing'), guanosine en position 751, au cours de la transcription. La protéine V partage le même codon initiateur que la protéine P mais le cadre de lecture est modifié à cause du nucléotide supplémentaire. Les premiers 231 aa de la protéine V sont identiques à la protéine P et le reste de la séquence, 68 aa, est par contre différent, riche en cystéine et possède la propriété de se lier au zinc (Cattaneo et al, 1989, Liston et Briedis, 1994). La protéine V est phosphorylée et distribuée de façon diffuse dans le cytoplasme des cellules infectées. Son PM est de 40 kDa.
- La troisième protéine non structurale, la protéine R n'a été pour l'instant identifiée que dans les cellules infectées par le MV (Barrett et al, 2006). Elle résulterait d'une anomalie traductionnelle ('ribosomal frameshifting') de l'ARNm de la protéine P (Liston et Briedis, 1995). Elle partage en commun avec la protéine P les premiers 294 aa (Barrett et al, 2006).

Aucune fonction précise n'a été assignée aux protéines non structurales, mais elles joueraient un rôle dans la réplication et la virulence des virus (Patterson et al, 2000, Tober et al, 1998, Valsamakis et al, 1998). In vivo l'absence des protéines C et V entraînerait une diminution de la réplication du MV (Escoffier et al, 1999, Valsamakis et al, 1998) ; par contre la surexpression de la protéine V semble être associée à une réplication virale plus rapide (Valsamakis et al, 1998).

5.5. Le cycle de multiplication virale

Les données obtenues à partir du virus de la rougeole serviront de modèle pour la description du mécanisme de réplication des morbillivirus.

5.5.1. Attachement et pénétration du virus dans les cellules

Les glycoprotéines virales H et F servent respectivement à l'attachement du virus à son récepteur et à sa pénétration dans la cellule de l'hôte (Wild et al, 1991). Le virus se fixe à la cellule grâce à la protéine H qui interagit avec les récepteurs membranaires présents à la surface de la cellule. La spécificité de cette interaction définit le spectre d'hôte et le tropisme du virus (Johnstone et al, 1993). Le récepteur cellulaire des morbillivirus appartient aux molécules d'activation SLAM pour «Signalling Lymphocyte Activation Molecule» (Tatsuo et Yanagi, 2002; Tatsuo et al, 2001; 2000). Il est exprimé à la surface des lymphocytes, des monocytes et macrophages activés et des cellules dendritiques matures (Tatsuo et Yanagi, 2002; Howie et al, 2002; Bleharski et al, 2001, Kruse et al, 2001; Cocks et al, 1995, Sidorenko et Clark, 1993). Un second récepteur, le CD46 initialement décrite comme un des éléments de régulation de l'activité du complément (Liszewski et al, 1991), est aussi identifié comme un récepteur de la souche vaccinale de la rougeole (Manchester et al, 2000; Galbraith et al, 1998; Dorig et al, 1993, Naniche et al, 1993). Les virus RPV et PPRV ne semblent pas requérir l'interaction avec la molécule CD46 pour leur pénétration dans la cellule (Schneider-Schaulies et al, 2001; Galbraith et al, 1998). Après fixation des virus aux récepteurs cellulaires, La protéine F va permettre la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire pour libérer la nucléocapside virale dans le cytoplasme cellulaire où ont lieu les étapes de transcription et réplication.

5.5.2. Transcription

A la différence des virus à ARN positif dont le génome est utilisé comme un ARNm, celui des virus négatif est copié en différents ARNm monocistroniques grâce à leur propre polymérase. Le complexe de réplication est formé de l'ARN génomique encapsidé par la protéine N et de la polymérase formée des protéines P et L. La transcription du génome en ARNm débute par la synthèse d'un ARN complémentaire de la région leader à l'extrémité 3'. Les différents ARNm qui codent chaque protéine virale sont ensuite synthétisés individuellement par la polymérase virale de façon séquentielle selon l'ordre de disposition de chaque gène dans le génome viral. La fréquence avec laquelle la polymérase réinitie la synthèse de chaque ARNm est élevée mais imparfaite. Il en découle un gradient de la quantité de chaque ARNm (et des protéines correspondantes) lié à la position du gène par rapport au point de départ de la transcription. De ce fait, L'ARNm de la nucléoprotéine représente plus de 50% des transcrits et celui de la protéine L est le moins abondant. Le processus de synthèse des ARNm est un phénomène essentiel et il se différencie de celui de la réplication du génome viral grâce à la double fonction de "transcriptase" et de "réplicase" de la polymérase. Les ARNm formés ont une coiffe en leur extrémité 5' et polyadénylés en 3'.

5.5.3. Réplication de l'ARN viral

La phase de réplication commence juste après la synthèse des protéines virales. C'est la même polymérase, jusqu'ici engagée dans la transcription qui copie tout le génome viral en ignorant cette fois-ci les jonctions entre les gènes, processus qui aboutit à la synthèse d'un ARN entier de polarité positive : l'antigénome. Ce dernier sert à son tour de matrice pour la synthèse de l'ARN viral génomique de polarité négative. La caractéristique de la réplication, qui la distingue de la transcription, est le couplage de la synthèse de l'antigénome et du génome avec leur encapsidation de façon concomitante par la nucléoprotéine.

5.5.4. bourgeonnement et diffusion des particules virales.

L'assemblage des constituants du virion se fait en plusieurs étapes (Figure 8):

1. formation du complexe ribonucléoprotéique RNP constitué de l'ARN génomique encapsidé par la protéine N sur laquelle sont fixées les protéines P et L.
2. transport et fixation des protéines H et F à la membrane cellulaire.
3. La protéine M va se positionner à la face interne de la membrane plasmique où elle se lie aux extrémités cytoplasmiques des glycoprotéines H et F et également au complexe RNP.
4. bourgeonnement des particules virales à partir de la membrane cellulaire pour infecter d'autres cellules.

L'infection virale peut aussi se propager de cellule à cellule sans libération de virions. En effet l'expression des protéines H et F à la surface des cellules infectées peut induire la fusion entre des cellules infectées et des cellules saines entraînant la formation de syncytiums.

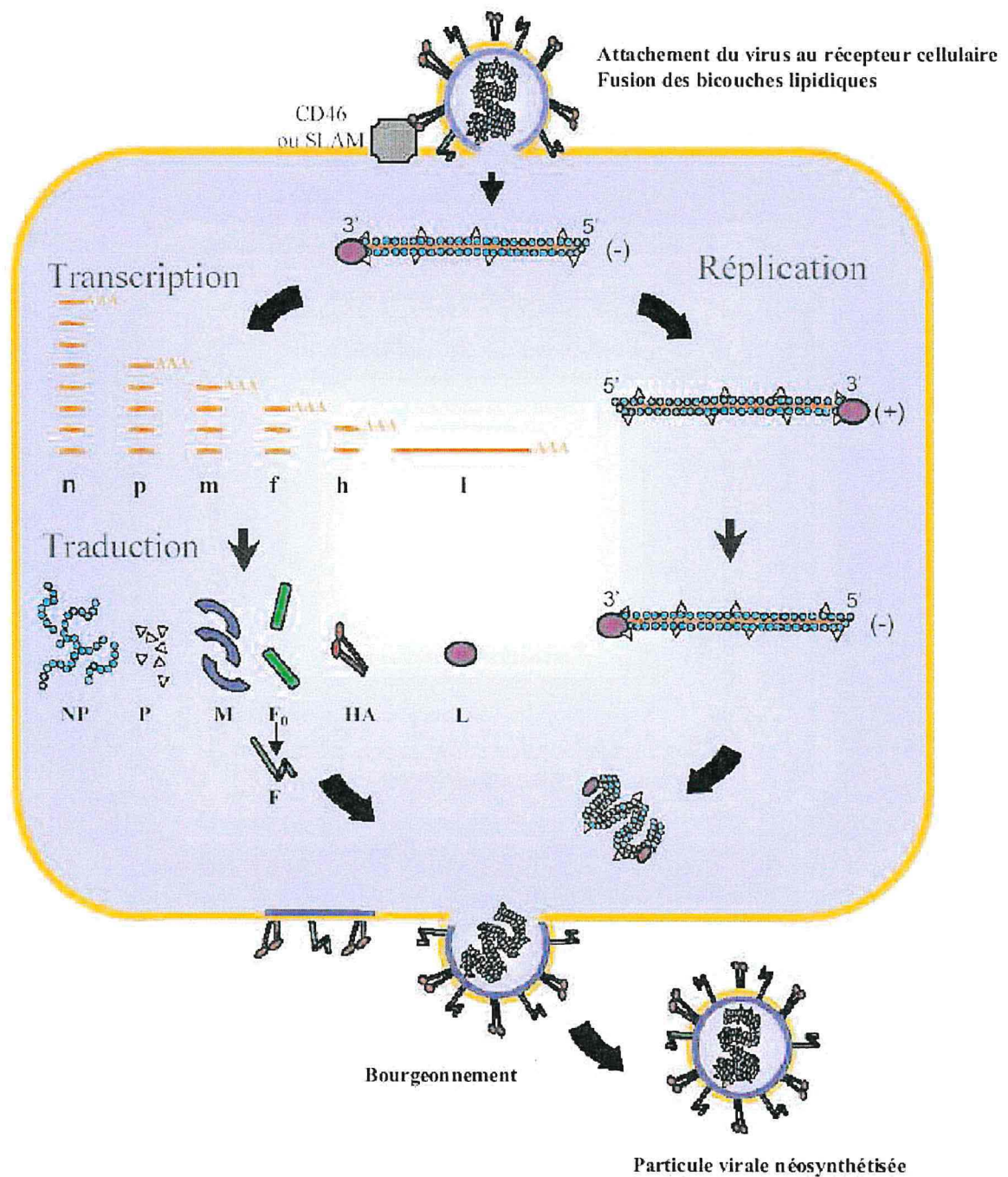


Figure 8 : cycle réplcatif du virus de la rougeole (Massé, 2004). A la surface du virus et de la cellule, les glycoprotéines H et F sont représentées respectivement sous forme dimérique et monomérique.

5.6. Pouvoir antigénique et immunogénicité des protéines virales.

La réponse immunitaire générée chez les animaux guéris à la suite des infections par les souches sauvages de RPV et après une vaccination est efficace et permet une protection à vie contre la PB (Plowright, 1984; 1968). Il pourrait en être de même pour le PPRV. Les réponses immunitaires générées par l'hôte sont de type humoral (anticorps neutralisants et non neutralisants) et cellulaire (lyse des cellules infectées).

5.6.1. Réponse immunitaire humorale

Au cours des infections à RPV les anticorps spécifiques sont détectables à partir des 2^{ème} et 5^{ème} jours après l'apparition des symptômes (Lefèvre, 2003). En ce qui concerne l'infection par le PPRV, les premiers anticorps produits seraient détectable à partir du 6^{ème} jour (Couacy-Hymann et al, 2007c). Les IgM produits, indicateurs d'une primo-infection (souche sauvage ou vaccinale), disparaissent rapidement (3 à 4 jours après le début des signes cliniques) et sont suivis des IgG et des IgA. Le niveau des IgG est stable pendant plusieurs années et décroissent par la suite (Scott et al, 1986). Les anticorps anti-RPV et anti-PPRV sont transmissibles au nouveau-né par colostrum. Chez les veaux les anticorps maternels spécifiques anti-RPV peuvent persister jusqu'à l'âge de 4 à 8 mois (Brown, 1958). Chez les agneaux et chevreux les anticorps maternels anti-PPRV sont détectables pendant les 3 à 4 premiers mois après la naissance (Bodjo et al, 2006; Awa et al, 2002).

Les anticorps produits à la suite d'une infection par les morbillivirus sont dirigés contre la plupart des protéines virales et peuvent être protecteurs ou non.

Les anticorps protecteurs sont de type neutralisant et sont dirigés contre les protéines F et H (Berhe, 2006; Berhe et al, 2003; Ngichabe et al, 2002; Verardi et al, 2002; Sinnathamby et al, 2001; Drillien et al, 1988; Varsanyi et al, 1987; Giraudon et Wild, 1981). Les anticorps neutralisants représentent la première barrière contre les infections à morbillivirus mais l'élimination du virus est essentiellement due à l'immunité cellulaire.

Les anticorps anti-N bien qu'ils soient majoritaires (Bankamp et al, 1991; Graves et al, 1984), ne sont pas protecteurs (Lefèvre, 2003; Diallo, 2003a; Oshishi et al, 1999; Nakamura et al, 1998; Bankamp et al, 1991). Ils peuvent être facilement détectés chez les animaux et constituent d'excellents témoins d'infection pour le diagnostic sérologique avec les tests ELISA (Choi et al, 2005a; 2003; Libeau et al, 1995, 1994, 1992). Ces anticorps anti-N sont responsables de réactions sérologiques croisées entre morbillivirus (Couacy-Hymann et al, 2007a; Anderson J. et al, 2006; Choi et al, 2005a; Lefèvre, 2003). Les anticorps monoclonaux (AcMs) anti-RPV ou anti-PPRV obtenus à partir de souris immunisés avec les virus entier sont aussi majoritairement dirigés contre la protéine N (Diallo, 2003a; Libeau et al, 1997). Ils ont pour certains, montré leur pouvoir discriminatoire pour une détection spécifique des virus RPV et PPRV (Libeau et al, 1997; McCullough et al, 1991; Libeau et Lefèvre, 1990). Certains de ces AcMs ont des épitopes qui sont conservés au sein des morbillivirus (Libeau et al, 1997; Sugiyama et al, 1987). L'étude de l'immunogénicité de la protéine N a montré que les domaines variables N-terminal et C-terminal de la protéine N de morbillivirus contiennent des sites reconnus par les AcM dont certains seraient immunodominants (articles 1 et 2; Choi et al, 2004; Buckland et al, 1989). Utilisés en test cELISA, les AcMs anti-N présentent des réactions de détection croisées avec des sérums anti-virus hétérologues (Couacy-Hymann et al, 2007a; Choi et al, 2005a).

5.6.2. Réponses immunitaires cellulaires

Les infections à morbillivirus induisent également une réponse immunitaire à médiation cellulaire spécifique. Avec le MV l'immunité à médiation cellulaire spécifique est obtenue suite à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ (Nanan et al, 2000; Jaye et al, 1998; Griffin, 1995). Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), spécifiques sont détectables dans le sang au début des symptômes et persistent pendant des mois après l'infection. Les protéines virales N, H et F seraient à l'origine de cette réponse immunitaire à médiation cellulaire (Etchart et al, 1997; 2001 ; Cardoso et al, 1998; 1996a; 1996b; Beauverger et al, 1996). Chez le bovin, une immunité à médiation cellulaire anti-N a été induite par le virus de la vaccine exprimant la protéine N de RPV (Oshishi et al, 1999).

5.6.3. Relations antigéniques

Les analyses sérologiques montrent l'existence d'une forte parenté antigénique entre les différents morbillivirus (Gibbs et al, 1979).

Les travaux menés à partir d'AcMs ont montré la présence d'épitopes conservées au sein des protéines N et F très conservées entre morbillivirus (Saliki et al, 1993; Sugiyama et al, 1991; Harder et al, 1991; Libeau et Lefèvre 1990; Sheshberadaran et al, 1986; Norrby et al, 1985). Ces épitopes sont probablement responsables de la plupart des réactions croisées observées entre les différents virus du ce groupe (Lefèvre, 2003; Appel et al, 1984). Pour la protéine H, les études ont montré de faibles réactions croisées entre morbillivirus, ce qui est en corrélation avec le degré de variation importante de sa séquence (Tableau 1).

Des relations entre morbillivirus ont été définies à partir des résultats des études d'homologie d'épitopes avec les AcM. Ainsi des AcM préparés contre le RPV montrent des réactions croisées avec le MV et le CDV (Libeau et Lefèvre, 1990; Sugiyama et al, 1991). Ces AcMs anti-RPV montrent que le virus de la PB est beaucoup liée sur le plan antigénique avec le PPRV qu'avec le MV (Libeau et Lefèvre, 1990; McCullough et al, 1991; 1986). Les études réalisées pour la caractérisation des morbillivirus responsables de mortalités chez des mammifères marins [Phoques (PDV), Marsouins (PMV) et dauphin (DMV)], montrent que le PDV est beaucoup plus proche du CDV (Harder et al, 1991; Visser et al, 1990). Le DMV est lui proche du PMV et sont tous les deux bien distincts du CDV (Visser et al, 1993).

Il faut tout de même noter que certaines de ces relations obtenues sur le plan antigénique sont bien différentes sur le plan phylogénétique avec les arbres qui ont été définis grâce à la comparaison de séquences nucléotidiques des gènes viraux.

5.7. Relation phylogénétique

Les analyses des séquences des gènes des protéines ont permis de mieux préciser les relations entre les morbillivirus. L'arbre phylogénétique obtenu à partir de l'alignement des aa de la nucléoprotéine des morbillivirus (Figure 1) (Banyard et al, 2006; Diallo et al, 1994) montre les relations suivantes entre les virus:

- le CDV et PDV (morbillivirus de carnivores) sont très proches,
- le DMV et PMV forment le groupe de morbillivirus de cétacés,
- le RPV est très proche du MV et non du PPRV contrairement aux résultats des analyses réalisées avec les anticorps monoclonaux qui faisaient apparaître le PPRV plus proche du RPV.

Les relations phylogénétiques entre morbillivirus semblent être identiques indépendamment de la protéine virale qui est analysée. Les arbres phylogénétiques obtenus par comparaison des séquences d'un fragment du gène de la phosphoprotéine (Barrett, 1999) ou de toute la séquence de la protéine M (Haffar et al, 1999) montrent des résultats similaires à celui obtenu avec la protéine N.

La comparaison de séquences nucléotidiques de protéines de différents isolats au sein d'un même virus, a permis l'établissement des lignées virales réparties selon les origines géographiques. Ainsi pour le RPV, trois lignées, une asiatique et deux africaines (Figure 9) ont été distinguées à partir du séquençage et de la comparaison de séquence du gène de la protéine F. Cela permet de retracer le parcours des épizooties et d'en établir l'origine. Barrett et Rossiter (1999) ont ainsi montré que la souche virale de PB isolée en 1962 au Kenya (RGK-1) est similaire à celle retrouvée dans les années 1994-1996 dans la même région.

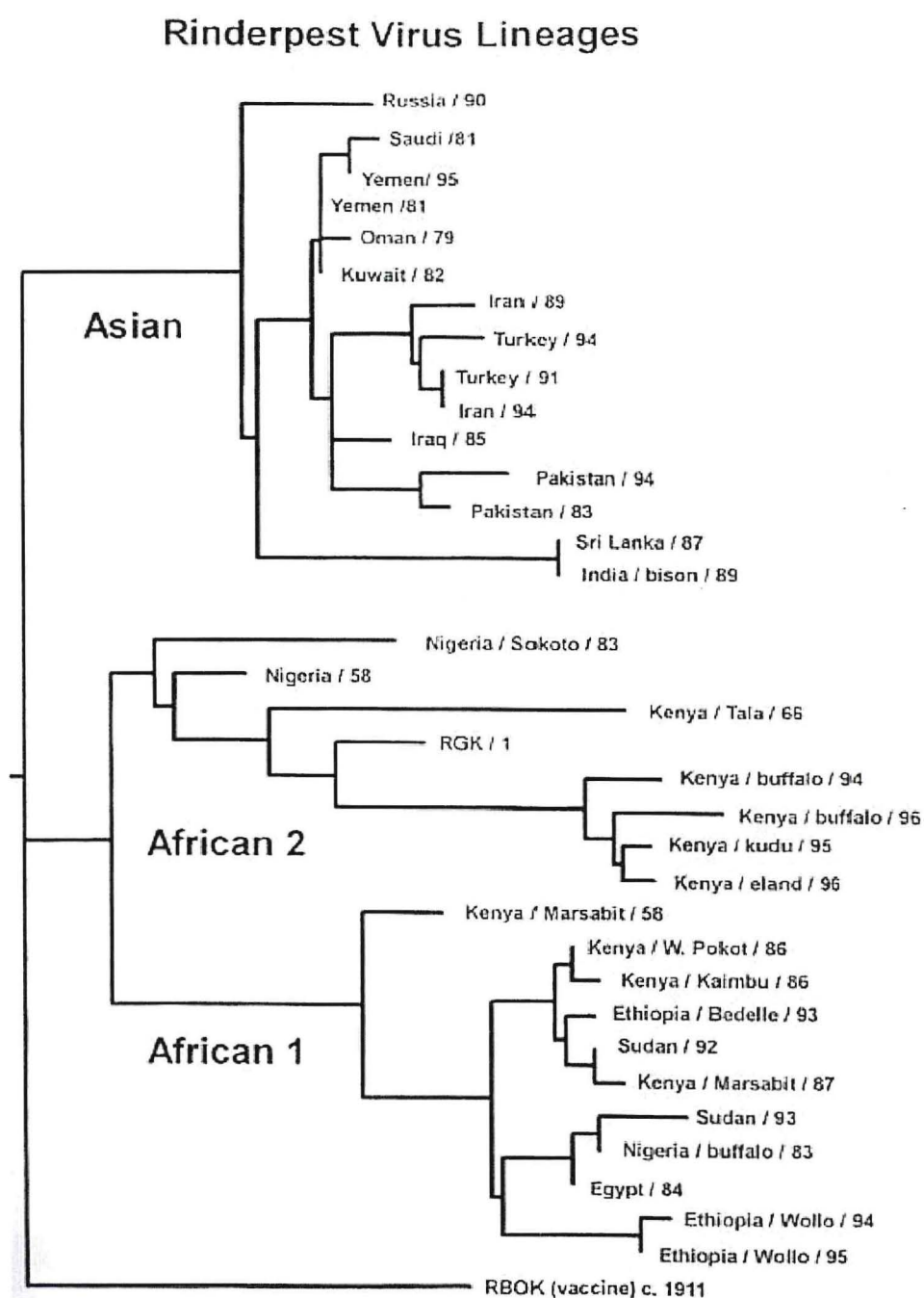


Figure 9: Relation phylogénétique des souches de RPV basée sur le gène de la protéine F (Diallo, 1999)

Pour les souches de PPRV, les lignées ont été établies à partir de la comparaison de la séquence de la région C-terminale du gène de la nucléoprotéine (Kwiatek et al, 2007). Ces lignées comme celle déterminées avec la protéine F de RPV correspondent à une répartition géographique des souches virales. Elles se répartissent en quatre groupes dont trois (I, II et III) sont d'origine africaine et une, la lignée IV d'origine asiatique (Figure 10).

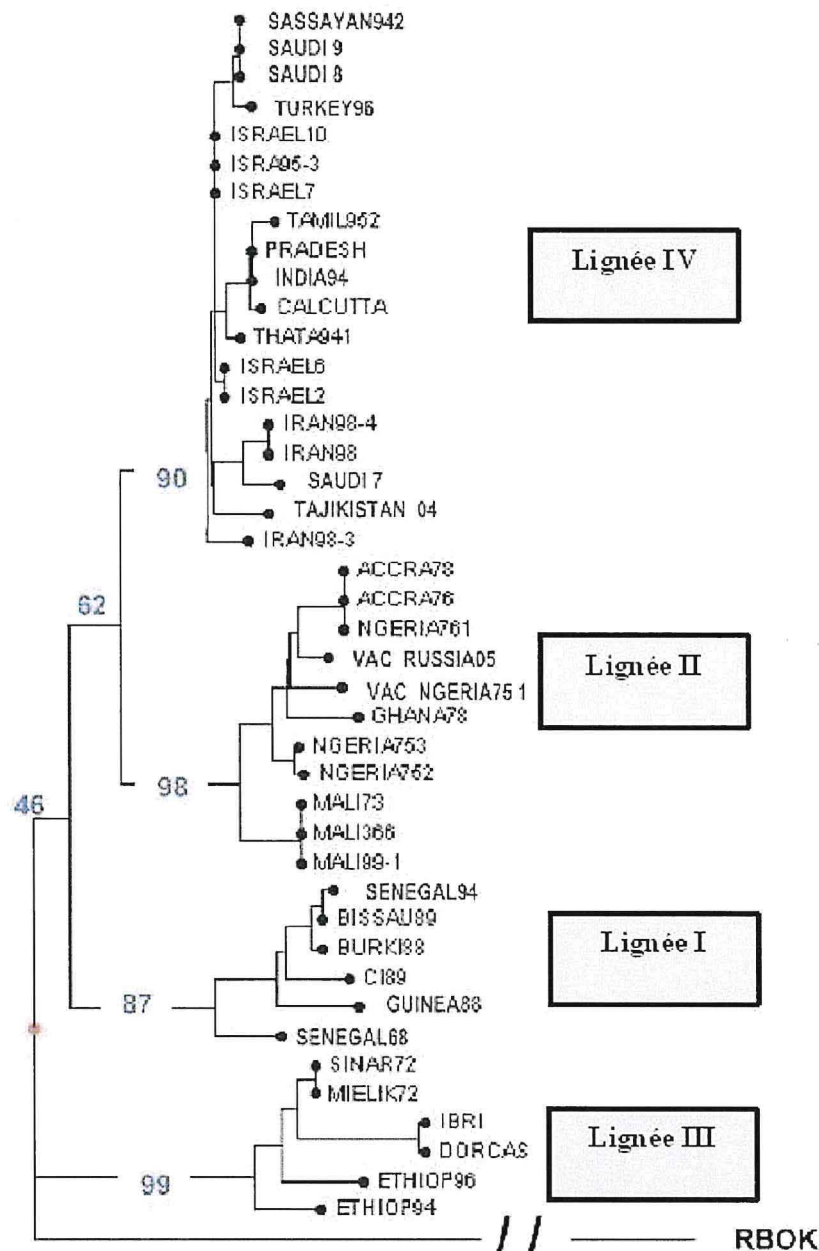


Figure 10: Relation phylogénétique des souches de PPRV basée sur le gène de la nucléoprotéine N (Kwiatek et al, 2007).

6. Les maladies peste bovine et de la peste des petits ruminants.

6.1. Espèces sensibles.

6.1.1. La peste bovine.

Le virus de la peste bovine infecte tous les Artiodactyles (animaux à nombre pair de doigts) mais avec des degrés de sensibilité divers. Les bovins (taurins et zébus), buffles domestiques sont les hôtes naturels les plus sensibles au RPV et ils développent les formes typiques de la maladie. Chez les ovins et les caprins les signes cliniques dus à l'infection par le RPV sont rares, surtout en Afrique, mais en Inde des cas typiques de PB ont été signalés (Lefèvre et al, 2003). Les petits ruminants infectés par le RPV contribuent à la diffusion du virus avec possibilité de transmission aux bovins (Bidjeh et al, 1997; Couacy-Hymann et al, 1995). Une telle situation a été évoquée comme source de l'épizootie de PB survenues au Sri-Lanka en 1987 (Lefèvre, 2003). Chez les porcs, la sensibilité au RPV dépend de la race; les porcs domestiques asiatiques et européens sont plus vulnérables que les porcs africains (Govindarajan et al, 1996; Anderson J. et al, 1996; Scott et al, 1986; Plowright, 1968). Les camélidés d'Afrique réceptifs à l'infection du RPV ne produisent que des anticorps neutralisants sans pour autant exprimer de symptômes cliniques (Lefèvre, 2003, Ismail et al, 1992; Taylor, 1968) ce qui n'est pas le cas en Inde (Lefèvre, 2003). Enfin de nombreuses espèces sauvages telles que le buffle (*Syncerus caffer*), l'élan (*Taurotragus oryx*), le cob (*Kobus*), le koudou, le guib harnaché (*Tragelaphus scriptus*), diverses antilopes, girafes, phacochères (*Phacochoerus aethiopicus*) sont également réceptives au RPV. Parmi ceux-ci le buffle, l'élan et le phacochère sont les plus sensibles (Anderson E.C., 1995; Plowright, 1982).

La différence de sensibilité des espèces animales qui semble beaucoup plus élevée sur le sous-continent indien qu'en Afrique, pourrait s'expliquer par les pouvoirs pathogènes variables des souches virales. En effet les virus de la lignée asiatique auraient un pouvoir pathogène plus élevé comparé aux souches des lignées africaines (Lefèvre, 2003).

6.1.2. La peste des petits ruminants

Les petits ruminants domestiques, caprins et ovins sont les plus sensibles au PPRV, mais avec un degré de sensibilité beaucoup plus élevé pour les caprins (OIE, 2004; Roeder et al, 1994). Cependant, il a été signalé des cas de PPR en Inde où les moutons ont payé un lourd tribut à la maladie (Govindarajan et al, 1997; Shaila et al, 1989).

D'autres espèces domestiques telles que les bovins, les buffles, les dromadaires et les porcs, peuvent être infectées par le virus de la PPR sans pour autant présenter les symptômes de la maladie. Les bovins infectés par le PPRV présentent une hyperthermie transitoire sans signes cliniques particuliers. Ils constitueraient, de ce fait, un cul-de-sac épidémiologique pour le virus de la PPR. Les bovins infectés dans la nature ne sont découverts que lors des enquêtes sérologiques (Couacy-Hymann et al, 1995; Mornet et al, 1956). Cependant, une maladie due au PPRV a été rapportée chez le buffle en Inde (Govindarajan et al, 1997). En Ethiopie, lors d'une maladie épizootique qui a affectée les dromadaires au cours des années 1995 et 1996, la PPR a été suspectée (Roger et al, 2001; 2000). L'antigène et l'acide nucléique de PPRV ont été détectés dans des échantillons pendant cette épizootie, mais aucun virus n'a été isolé.

Chez les petits ruminants sauvages des cas de maladies dues au PPRV ont été signalés. Le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) a développé une maladie typique de PPR à la suite d'une infection expérimentale (Hamdy et Dardiri, 1976). Des cas cliniques ont été aussi rapportés chez les gazelles (*Gazella dorcas*), le bouquetin de Nubie (*Capra ibex nubiana*), le gemsbok (*Oryx gazella*) et des moutons de Laristan (*Ovis orientalis laristanica*) dans un parc zoologique d'Oman (Furley et al, 1987). Des antilopes ont été décrits comme pouvant être sévèrement affectés (Abu Elzein et al, 2004) par le PPRV. Des recherches actives de PPRV sur les animaux sauvages en Côte d'Ivoire ont permis de déceler la présence du virus chez les buffles (*Syncerus caffer*) et les cobs (*Kobus kob* et *Kobus defassa*) (Couacy-Hymann et al, 2005). Cependant le rôle de ces animaux sauvages dans l'épidémiologie de la maladie est moins connu.

6.2. Facteurs de contagion

Certains facteurs peuvent influencer la contagiosité de RPV et PPRV. Comme tous les virus enveloppés, RPV et PPRV sont peu résistants dans le milieu extérieur. La transmission des virus entre animaux nécessite un contact étroit et leur porte d'entrée dans l'organisme est la voie nasopharyngée. Le RPV et PPRV sont excrétés précocement, un à deux jours avant l'apparition de l'hyperthermie dans les larmes, le jetage et la salive (Diallo, 2003a; Lefèvre, 2003). Au cours d'une étude expérimentale avec des chèvres infectées par des souches sauvages de PPRV la technique RT-PCR a montré que le virus est excrété entre le 3ème et 4ème jour d'infection dans les sécrétions salivaires, oculaires et nasales (Couacy-Hymann et al, 2007b). L'urine et les fèces sont infectantes, mais à un moindre degré. La période d'excrétion dure jusqu'à l'apparition des anticorps ou la mort de l'animal, soit 15 à 16 jours au maximum.

La diffusion du virus va dépendre de plusieurs facteurs : le climat, l'âge et la race des animaux et la virulence des souches virales,

6.2.1. Facteurs climatiques ou saisonniers de la PPR.

Le PPRV serait plus stable, dans les conditions atmosphériques sèches dans les pays sahéliens, ce qui entraînerait une persistance et une circulation du virus dans les troupeaux (Lefèvre, 1987). En effet, en Afrique de l'Ouest on note un nombre élevé de foyers de PPR au cours de la période de l'Harmattan (décembre-février), vent sec et froid qui favorise la dissémination de poussière et de germes à l'origine de bon nombre d'affections respiratoires. Les enquêtes réalisées sur la PPR dans cette partie du continent africain ont montré deux cas de figures (Lefèvre, 1987):

- Dans les régions côtières de l'Afrique de l'ouest, la PPR présente une forme d'apparition épidémiologique cyclique dans les villages, avec une mortalité élevée, de l'ordre de 70 à 80%, tous les quatre à cinq ans, délai qui correspond à la reconstitution d'une population réceptive.

- En revanche, dans les régions arides ou semi-arides (Mali, Niger, Tchad) la PPR évolue de manière enzootique. Les infections sont inapparentes avec une mortalité faible, mais elles touchent la plupart des animaux (au Tchad, près de 70 pour cent des chèvres présentent des anticorps anti-PPR). Ce phénomène est dû à une persistance virale dans le milieu extérieur à cause de sa relative résistance en atmosphère sèche, ce qui faciliterait une circulation plus longue dans les troupeaux. Cela aurait deux conséquences possibles:

- à court terme, un contact précoce des jeunes avec le virus alors qu'ils sont encore protégés par les anticorps d'origine maternelle;
- à long terme, une sélection des races et l'acquisition d'une résistance à l'infection et des manifestations cliniques moins sévères.

6.2.2. Sensibilité des animaux

La diffusion de la PB et de la PPR va dépendre du statut immunitaire des animaux dans une région donnée. Les RPV et PPRV pourront difficilement se disséminer dans les régions où les animaux possèdent une couverture immunitaire consécutive à une vaccination ou à une guérison après infection par des souches sauvages. Dans de telles régions les jeunes animaux sevrés ne disposant plus de la protection des anticorps maternels sont les plus à risque, animaux de plus de 6 mois pour les bovins (Couacy-Hymann, 1994; Provost, 1982) et 3 mois pour les petits ruminants (Bodjo et al, 2006, Awa et al, 2002). Pour le PPRV, la race joue également un rôle dans la sensibilité des animaux. Les races naines de caprins des côtes en Afrique de l'ouest sont plus sensibles que les grandes races sahéliennes (Diallo, 2003a; Lefèvre, 1987).

6.2.3. La virulence des souches virales.

Les infections expérimentales réalisées avec diverses souches de RPV ont mis en évidence une variation de leur pouvoir pathogène et une classification a été réalisée en fonction de la virulence (Tableau 2) (Taylor, 1986). On distingue des souches hypovirulentes avec une infection inapparente (0% de mortalité) et des souches hypervirulentes dont l'infection est fatale à 100% pour l'animale. Entre ces deux extrêmes, des souches de virulence moyenne permettent la reproduction de la forme classique de la maladie.

Pays d'origine	Année d'isolement	Mortalité (%)	Temps moyen de survie (jours)
Arabie Saoudie	1981	100	4,5
Yémen	1981	100	5,8
Koweït	1982	100	5,9
Liban	1982	100	5,8
Nigeria	1983	100	7,8
Nigeria	1984	33	ND
Egypte	1984	0	ND

Tableau 2: Virulence expérimentale des souches du RPV (Taylor, 1986)

Pays d'origine	Année d'isolement	Mortalité (%)	Temps moyen de survie (jours)
Cote d'Ivoire	1989	100	9
Guinée	1981	100	9,6
Guinée Bissau	1982	100	9
Inde	1982	100	10,2
Soudan	1983	60	9,6
Nigeria 75/1	1984	0	ND

Tableau 3: Virulence expérimentale des souches du PPRV (Couacy-Hymann et al, 2007c)

Pour la PPR, une étude similaire sur le pouvoir pathogène menée par Couacy-Hymann et al, (2007c) a permis également de déterminer le degré de virulence de certaines souches virales isolées de différentes régions géographiques (Tableau 3). Le pourcentage de mortalité avec les souches virulentes va de 60 à 100%. Seule la souche sauvage Nigeria 75/1 à partir de laquelle dérive la souche vaccinale 75/1 (Diallo et al, 1989b) a généré une maladie d'intensité faible et dont tous les animaux ont été guéris.

6.2.4. Interaction RPV-PPRV.

Les relations antigéniques particulièrement étroites entre les virus de la PB et de la PPR ont été mis à profit pour la protection des petits ruminants contre la peste des petits ruminants par l'usage du vaccin hétérologue, anti-PB (Mariner et al, 1993; Bonniwell, 1980; Taylor, 1979; Bourdin et al, 1970). Des études ont montré que le PPRV a aussi joué un rôle dans l'épidémiologie de la PB et dans les programmes de lutte contre la PB. Il a été observé des taux de séroconversion anti-PB moins élevés chez les animaux vaccinés au cours des campagnes de vaccination contre la PB dans certaines régions en Afrique (Diop et al, 2005). Les analyses sérologiques ont montré la présence d'anticorps anti-PPRV chez ces animaux, ce qui pourrait expliquer le faible taux de séroconversion à la suite de la vaccination contre le RPV (Anderson et Mc Kay, 1994). Au cours d'une étude récente, Couacy-Hymann et al, (2006) ont montré que la présence des anticorps anti-PPR chez les bovins interfèrent sur la séroconversion vaccinale anti-PB. Il a fallu trois rappels successifs de la vaccination anti-PB pour obtenir un nombre significatif d'animaux présentant une séroconversion spécifique anti-PB. La proportion d'animaux ayant fait une séroconversion à la suite des trois injections vaccinales successives a été de 21/88, 31/67 et 28/36 respectivement.

Les petits ruminants qui ont survécu à une atteinte par le PPRV sont à la fois protégés contre la peste des petits ruminants et la peste bovine. Ce qui signifie que dans les régions où la prévalence de la PPR est élevée, les moutons et les chèvres ne peuvent intervenir (ou très peu) dans la transmission du virus RPV.

6.3. Pathologie des infections à RPV et PPRV.

6.3.1. Propagation du virus dans l'organisme

Le modèle de propagation du RPV et PPRV dans l'organisme est commun aux morbillivirus. Les souches sauvages de RPV et PPRV sont lymphoépithéliotropes et les lésions les plus importantes apparaissent dans les organes riches en tissus lymphoïdes et épithéliaux (Scott et al, 1990a; 1990b; Scott, 1981). La voie naturelle d'entrée des virus dans l'organisme est le nasopharynx. Les particules virales contenues dans des "aérosols" émis par l'animal malade, lors d'éternuement ou de la toux, sont respirées par les animaux sensibles en contact. Les virus se multiplient dans les amygdales et les ganglions lymphatiques pharyngés, sites de multiplication primaire (Lefèvre, 2003, Diallo, 2003a). Ils sont, par la suite, disséminés dans tout l'organisme par les cellules de la lignée blanche, macrophages ou cellules dendritiques comme cela a été montré pour le MV (Sergiev, 1960). Les virus se propagent et atteignent différents organes, les poumons, les muqueuses digestives, respiratoires et urogénitales où ils se multiplient de nouveau. La virémie augmente et reste élevée au cours des phases prodromale et érosive puis déclinent rapidement avec l'apparition d'anticorps neutralisants dès le 5ème jour (Lefèvre, 2003). Les virus RPV et PPRV sont éliminés dans les excréments et les sécrétions (mucus nasal, salive, urine, larmes et fèces) vers la fin de la phase d'incubation (4 à 7 jours pour la PB et 3 jours en moyenne pour la PPR) pour disparaître au début de la convalescence (Libeau, 1998).

6.3.2. Immunosuppression induite par les morbillivirus.

Une des caractéristiques des infections à morbillivirus est que concomitamment à la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique pour combattre le virus, il s'installe une profonde immunodépression (Heaney et al, 2002; Mondal et al, 2001; Lund et al, 2000; Stevenson et al, 1999; Rossiter et al, 1993). Elle contribue à augmenter la sensibilité des animaux aux pathogènes opportunistes avec apparition d'infections de complication (Figure 11). La vaccination contre la peste bovine peut aussi induire une immunosuppression transitoire suivie d'infections opportunistes (Anderson J. et al, 1996; Jeggo et al, 1987; Scott et al, 1986).

Les études sur l'immunosuppression induite par les morbillivirus ont permis de mieux caractériser les différents processus qui participent à ce phénomène. Plusieurs mécanismes se superposent au cours de ce phénomène.

- Une lymphopénie (Figure 12) caractérisée par une diminution du nombre de lymphocytes T circulants dans le sang, sans modification drastique du ratio CD4+/CD8+ (Griffin, 2001, Arneborn et al, 1983). La lymphopénie observée lors de l'infection expérimentale du rat du cotonnier avec le MV résulterait d'une altération de la génération de thymocytes par le thymus (Auwaerter et al, 1999). Le PPRV serait responsable de la mort des cellules lymphocytaires par apoptose (Mondal et al, 2001). Egalement une déplétion lymphocytaire est observée chez les bovins dans le thymus, les plaques de Peyers et les ganglions pulmonaires au cours l'infection avec le RPV (Wohlsein et al, 1995; 1993).

- Une Inhibition ou altération de la prolifération lymphocytaire chez des sujets infectés ou après vaccination (Lund et al, 2000 ; Hirsch et al, 1984). L'hémagglutinine (H) et la protéine de fusion (F) seraient impliquées dans ces phénomènes en bloquant le cycle cellulaire des lymphocytes en phase G0/G1 (Schnorr et al, 1997; McChesney et al, 1988; 1987). La protéine N jouerait aussi un rôle majeur dans l'altération de la prolifération lymphocytaire (Kerdiles et al, 2006; Laine et al, 2003, Marie et al, 2001). En plus de l'arrêt du cycle cellulaire, la protéine N serait responsable de l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales thymiques par apoptose (Laine et al, 2005). Elle inhibe la production d'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène (CPAg) ce qui entraîne une perte ou un défaut de l'activation des lymphocytes T CD8 (Marie et al, 2001; Sutterwala et al, 1997).

- On note également au cours de l'infection par le MV une inhibition des réactions inflammatoires en particulier les réactions d'hypersensibilité de type retardée (Tamashiro et al, 1987).

- L'analyse de la production de cytokines indique une dérégulation de celles-ci avec augmentation de la production d'interleukine 4 (IL-4) tandis que celle de l'IL-2 et l'interféron gamma (IFN- γ) est diminuée (Schneider-Schaulies et al, 2001). On observe également une diminution voire la suppression de la production d'IL-12 (Marie et al, 2001), chimiokine essentielle pour activer les TH1 et les NK (Fugier-Vivier et al, 1997, Karp et al, 1996).

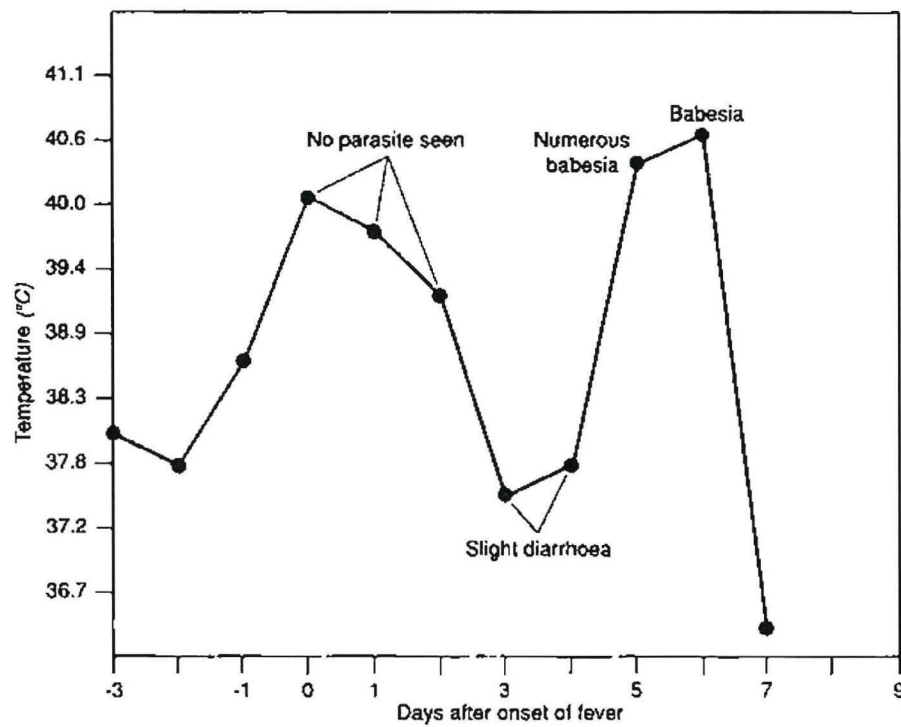


Figure 11: Activation de la babésiose latente par le virus Rinderpest (Anderson J et al, 1996; Scott, 1986)

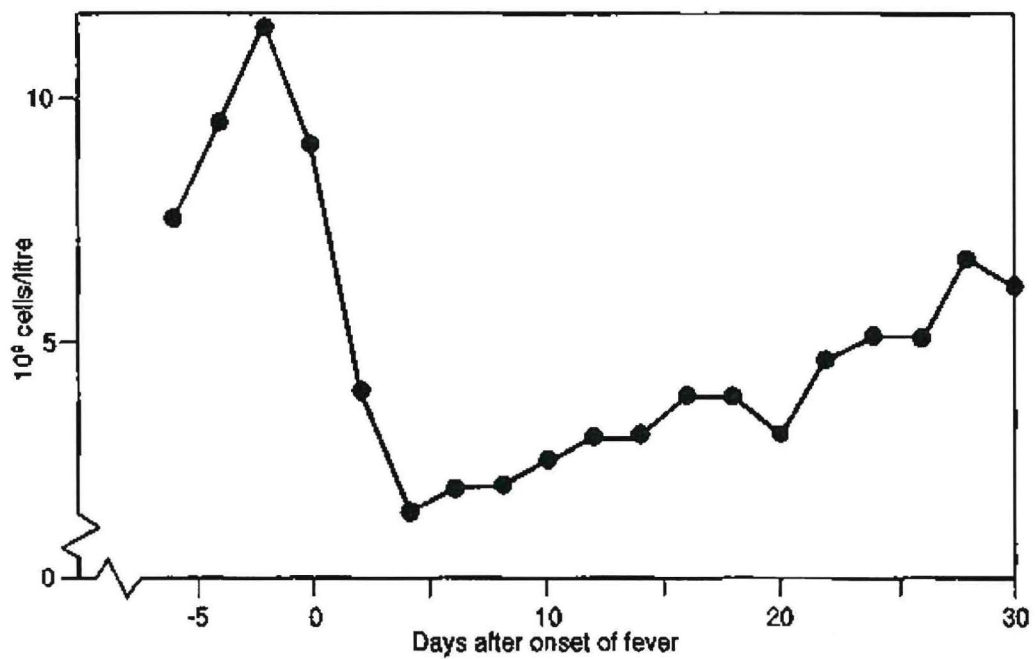


Figure 12: Cinétique des lymphocytes sanguins chez les bovins après infection par le RPV (Anderson J et al, 1996; Scott, 1986)

6.4. Symptômes:

Cliniquement, il est très difficile, voire impossible, de distinguer la PPR de la PB. De ce fait la PPR a été ignorée pendant longtemps de nombreux pays au profit de la PB. La description clinique de la PB et de la PPR (FAO, 2000; Anderson J. et al, 1996; Lefèvre, 1987; Plowright, 1968; Provost et Borredon, 1963; Curasson, 1932) indique:

- Une forme suraiguë: Elle est observée surtout chez les jeunes animaux et est caractérisée par l'apparition brusque d'un état févreux, un état d'abattement très profond. Dans la PB la mort intervient rapidement en 3 à 4 jours sans autres symptômes (Lefèvre, 2003). Avec le PPRV, une diarrhée profuse survient en général 1-2 jours plus tard et précède de peu une issue toujours fatale au bout de 5-6 jours maximum (Diallo, 2003a).
- Une forme aiguë, forme la plus courante de PB et PPR où les différentes phases sont observées (Figure 13). Après une phase d'incubation qui dure entre 5 et 11 jours, il est observé une forte fièvre (40 à 42°C). L'animal manifeste alors tous les symptômes du syndrome de la fièvre: dépression, anorexie, poil piqué, souffle court et rapide, congestion des muqueuses, souvent catarrhe oculo-nasal devenant séro-muqueux. Au bout de 2 à 3 jours les lésions épithéliales apparaissent sous forme de plaques d'érosion dans la cavité buccale. Ces plaques s'élargissent pour prendre l'aspect d'ulcères et atteignent les muqueuses nasales, digestives et urogénitales; les sécrétions oculo-nasales claires au début, deviennent mucopurulentes. On note à ce stade de la maladie, pour la PPR, une atteinte pulmonaire due à des infections bactériennes secondaires, notamment une broncho-pneumonie à pasteurellas (*Pasteurella haemolytica* ou *P. multocida* type A ou D). Dans les derniers stades de PB ou de PPR, les animaux malades présentent une diarrhée profuse, incoercible et qui souille l'arrière-train. La déshydratation et l'amaigrissement sont nets. La mortalité survient généralement dans du marasme.

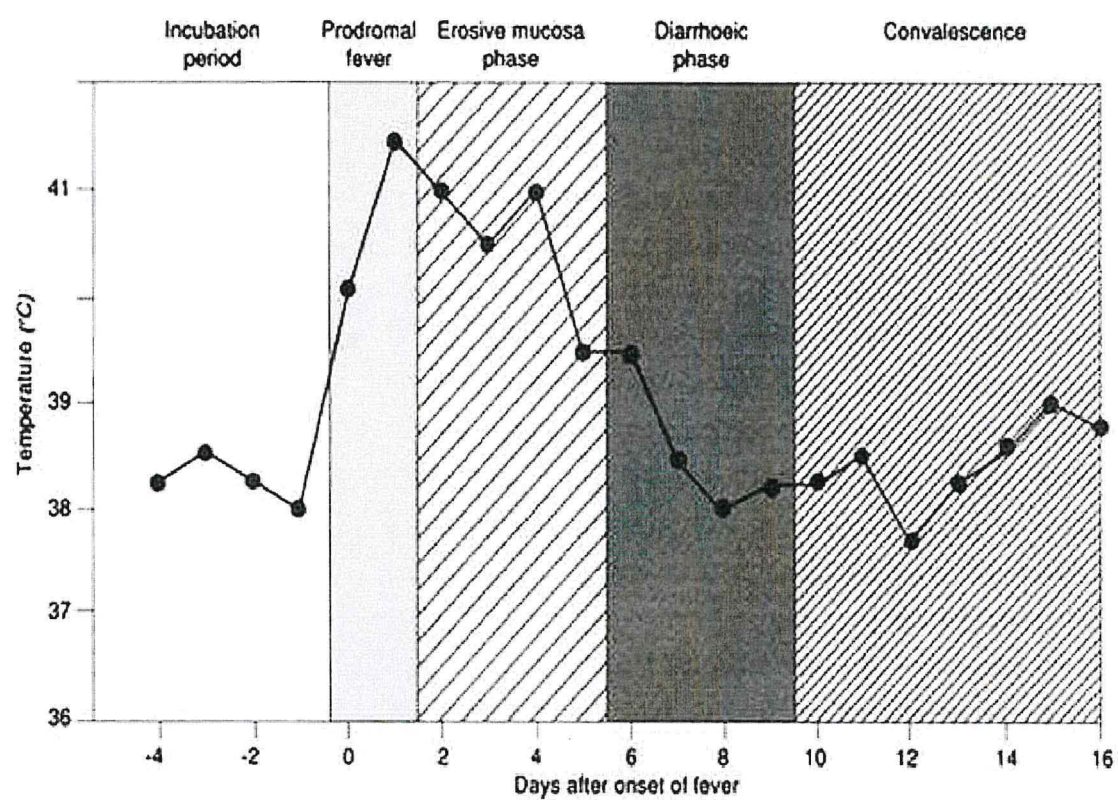


Figure 13: les phases différentes phases cliniques de la PB classique (Anderson J et al, 1996)

Quand l'animal guérit, il peut recouvrer un état général correct après une convalescence de plusieurs semaines pour la PB (Lefèvre, 2003) et plus rapidement, une semaine au plus pour la PPR (Diallo, 2003a).

Le degré de sévérité de la maladie et donc de sa forme d'expression, est fonction non seulement de la souche virale mais aussi de l'individu (race, âge, espèce) et aussi probablement des conditions climatiques en ce qui concerne la PPR.

6.5. Diagnostic

Bien que les symptômes cliniques de la PB et de la PPR permettent d'orienter le diagnostic par rapport aux autres pathologies, le diagnostic différentiel exact entre ces deux pathologies doit être réalisé au laboratoire. Différents prélèvements peuvent être réalisés soit sur l'animal vivant (écouvillons oculaire et nasal, prise de sang sur tube sec pour la collecte de sérum et sur tube avec anticoagulant pour la récolte des lymphocytes) et sur l'animal mort (ganglions lymphatiques, surtout mésentériques et bronchiques, rate, gros intestin et poumons). Les analyses de laboratoire reposent sur:

- **L'isolement viral:** il est réalisé sur des cultures primaires de cellules de rein de veau ou de mouton (Taylor et Abegunde, 1979; Plowright et Ferris, 1962) ou sur des cellules de lignée comme les cellules Vero (Hamdy et Dardiri, 1976). L'effet cytopathogène (ECP) du RPV sur les cellules est facilement reconnaissable et se présente sous forme de syncytiums au bout de 7-10 jours. L'isolement des souches PPRV est beaucoup plus difficile à réaliser. Très souvent plusieurs passages à l'aveugle sont nécessaires pour réussir l'isolement. L'ECP se manifeste par la présence de petits syncytiums sur les cellules primaires d'ovins. Avec les cellules Vero, l'ECP dû au PPRV se manifeste par la formation de petites cellules arrondies réfringentes qui se détachent du tapis cellulaire (Diallo, 2003a).

- **La détection des antigènes** viraux dans les tissus et sécrétions à partir de tests d'immunofluorescence (Sumption et al, 1998; Rossiter et Jessett, 1982), d'immunodiffusion en gélose (Scott et Brown, 1961), d'immunocapture ELISA (Singh et al, 2004b; Saliki et al, 1994, Libeau et al, 1994). Ces techniques de détection des antigènes viraux constituent une alternative à l'isolement viral. L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques des virus de la PB et de la PPR permet de faire un diagnostic différentiel.

- **La détection de l'ARN viral** soit par l'hybridation avec une sonde nucléique spécifique (Diallo et al, 1989a) soit par la réaction de transcription reverse de l'ARN en ADN suivie de l'amplification de ce dernier (RT-PCR) (Couacy-Hymann et al, 2002; Diallo et al, 1995; Forsyth et Barrett, 1995; Couacy-Hymann, 1994). Ces techniques de biologie moléculaire présentent une sensibilité et spécificité très élevées et constituent des moyens efficaces de diagnostic différentiel entre RPV et PPRV.

- **La détection des anticorps:** la mise en évidence des anticorps anti-RPV et anti-PPRV peut se réaliser avec des tests de séroneutralisation comparative PB-PPR (Rossiter et al, 1985) ou par les tests enzymatiques ELISA de compétition (cELISA) ou de blocage (bELISA) (Diallo et al, 1995). Ces tests ELISA sont basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dont l'épitope anti-protéine H (Anderson et Mc Kay 1994; Saliki et al, 1993; Anderson J. et al, 1991) ou anti-protéine N (Libeau et al, 1995; 1992).

Les tests cELISA utilisés en diagnostic PPR (Anderson et Mc Kay 1994; Libeau et al, 1995) présentent des réactions croisées avec les sérums anti-PB (Couacy-Hymann et al, 2007a; Anderson et Mc Kay 1994). Il en est de même avec le test cELISA PB avec un AcM anti-N (Libeau et al, 1992) qui présente des réactions croisées avec les anticorps anti-PPR (Diallo A., données non publiés). En revanche le test cELISA PB utilisant un AcM anti-H (Anderson J. et al, 1991) est spécifique mais a une sensibilité très limitée (Anderson J. et al, 2006). Ce test cELISA H-PB est très sensible pour la détection des anticorps anti-PB vaccinaux chez les animaux immunisés avec la souche vaccinale. Par contre, il semblerait être peu sensible pour la détection des anticorps dirigés contre certaines souches sauvages, celles dites de lignée II.

Les réactions croisées observées avec les différents tests cELISA ont beaucoup orienté le présent travail de recherche qui s'inscrit dans le cadre global d'éradication mondiale de la PB et le contrôle de la PPR.

6.6. Moyens de lutte

Comme la plupart des maladies virales, il n'existe pas de traitement spécifique contre la PB et la PPR. Seules les mesures de prophylaxie sanitaire et médicale sont appliquées.

6.6.1. Prophylaxie sanitaire.

Lorsque la peste bovine et la peste des petits ruminants apparaissent dans un pays indemne, les mesures de police sanitaire recommandées consistent à:

- L'abattage des animaux dans la zone infectée et l'élimination des cadavres suivie de la désinfection des locaux d'élevage.
- La protection des zones indemnes par la délimitation d'un périmètre de sécurité autour des zones d'infection. La mise en quarantaine et la restriction de déplacement sont également imposées.

Ces mesures de prophylaxie sanitaire sont difficilement applicables en Afrique et en Asie du fait du coût économique très élevé que ne peuvent supporter les pays concernés et aussi à cause des conditions d'élevage (élevage extensif, forte activité de transhumance et de nomadisme). En plus pour la PPR, le caractère enzootique de la maladie dans certaines régions constitue également un frein à l'application des mesures sanitaires. La vaccination reste donc le seul moyen efficace de lutte contre la PB et PPR.

6.6.2. Prophylaxie médicale

La vaccination contre la PB et la PPR était réalisée jusqu'à une date récente, avec la souche RPV Kabete "O" atténuée par passages successifs sur culture cellulaire (Plowright et Ferris, 1962). Le vaccin obtenu confère aux bovins une solide immunité pendant toute la durée de la vie économique de l'animal (Plowright, 1984). Il a montré son efficacité et son innocuité au cours des différents programmes de lutte contre la PB (PC15 et PARC). Chez les petits ruminants, le vaccin RPV Kabete "O" a aussi montré son efficacité pour la protection contre la PPR (Mariner et al, 1993; Bonniwell, 1980; Taylor W.P. 1979; Bourdin et al, 1970), ce qui a permis jusqu'à un passé récent son utilisation chez ces animaux dans les campagnes de vaccination.

Dans les années 1980, un vaccin homologue efficace contre la PPR (souche 75/1) a été développé (Diallo et al, 1989b). Ce vaccin confère aussi une immunité anti-PB qui a été démontrée chez les chèvres (Couacy-Hymann et al, 1995). La PB est actuellement en voie d'éradication dans le monde et pour faciliter une surveillance sérologique efficace, l'usage de vaccin PB est proscrit. Seul le vaccin homologue PPR est recommandé comme moyen de protection des petits ruminants. Cette approche a pour but de pouvoir identifier plus aisément une infection des animaux avec les souches sauvages de RPV.

L'inconvénient majeur des vaccins atténués PB et PPR est leur thermolabilité. Des techniques pour obtenir des vaccins thermostables ont été développées. Grâce à une meilleure maîtrise des procédures de lyophilisation, Mariner et al, (1990) ont pu obtenir un vaccin thermostable dans les conditions de terrain pendant un mois sans usage de chaîne de froid (Lefèvre, 2003;). La déshydratation dans un excipient contenant le tréhalose a permis d'augmenter la résistance du vaccin à une température de 45°C pendant 14 jours (Worrall et al, 2001). D'autre part, les techniques de génie génétique ont permis le développement de nouveaux vaccins recombinants beaucoup plus stables avec des résultats prometteurs pour la protection des animaux contre la peste bovine et la peste des petits ruminants (Berhe et al, 2003; Diallo, 2003b, Verardi et al, 2002; Ngichabe et al, 2002; Walsh et al, 2000; Romero et al, 1994; Barrett et al, 1989; Yilma, 1989; Yilma et al, 1988).

Sur le plan épidémiologique, l'usage du vaccin homologue PPR ne permet pas de différencier les anticorps post-vaccinaux de ceux induits par une infection avec le virus sauvage à cause de l'unicité de pouvoir antigénique des virus PPR. Cela pose des difficultés pour le suivi épidémiologique de la PPR dans les régions où elle sévit. Pour mieux contrôler la PPR, maladie en pleine expansion, il est essentiel de différencier les animaux vaccinés de ceux infectés avec les souches sauvages. Cela ne pourrait se faire qu'à partir d'une nouvelle souche vaccinale pour laquelle des mutations non critiques seraient apportées aux protéines virales qui induiraient chez les animaux vaccinés un profil d'anticorps différent de celui obtenu avec les souches sauvages.

Le présent travail de recherche dont l'un des volets est d'identifier des séquences non essentielles de la protéine N de l'actuelle souche vaccinale 75/1 s'inscrit dans cet objectif. Ces séquences indispensables pour la réplication virale pourront ainsi être mutées dans le génome d'une nouvelle souche vaccinale et serviront de marqueurs antigéniques.

Chapitre II: Travaux de recherche.

Objectif.

Notre travail de recherche a un double objectif, à savoir:

- **Etudier la structure antigénique de la nucléoprotéine des virus de la PB et de la PPR dans l'objectif de développer des tests ELISA spécifiques pour un diagnostic différentiel entre ces deux maladies.**

La PB est sous contrôle et tous les efforts du programme mondial pour son éradication (GREP : Global Rinderpest Eradication Programme) sont à l'heure actuelle concentrés sur l'écosystème pastoral somalien pour éliminer les derniers réservoirs du RPV. L'objectif du GREP est de pouvoir déclarer le monde libre de la PB en 2010. La PPR contrairement à la PB, est en pleine expansion en Afrique, au Moyen-Orient et en Asie.

La grande parenté antigénique entre morbillivirus est à l'origine d'importantes réactions croisées en sérologie comme cela a été indiqué dans la partie bibliographique. Aucun des tests sérologiques commercialisés actuellement ne permet un diagnostic spécifique de la PB ou de la PPR.

Nos travaux s'inscrivent dans un projet de recherche dont l'un des objectifs est de développer un nouveau test ELISA PPR sensible et beaucoup plus spécifique pour un diagnostic différentiel entre la PB et la PPR. Pour cela, la nucléoprotéine a constitué l'élément de base pour nos travaux. L'intérêt de cette protéine en diagnostic est dû au fait qu'elle est l'antigène majeur des morbillivirus. Son pouvoir immunogène très élevé induit une production importante d'anticorps anti-N (Graves et al, 1984). Ces anticorps malgré leurs caractères non neutralisants et non cytotoxiques (Bankamp et al, 1991) constituent des témoins essentiels d'une infection et de séroconversion vaccinale. De plus, la cinétique sérologique montre une précocité de la production des anticorps anti-N, entre 6 et 7 jours lors d'infection expérimentale.

Le premier volet de notre travail a consisté à comprendre pourquoi il apparaît des réactions de détection croisées des sérums anti-PPR ou anti-PB avec respectivement les tests cELISA PB et PPR basés chacun sur un AcM anti-N spécifique à chaque virus. Pour cela, nous avons cherché à caractériser les structures antigéniques de la nucléoprotéine du RPV et identifier les épitopes reconnus par chacun des AcMs utilisés dans les tests cELISA. L'étude a été étendue à d'autres AcMs anti-N de RPV et à des sérums anti-PB ou anti-PPR. Nous avons ainsi pu cartographier les épitopes reconnus par chacun des AcMs et identifier les structures antigéniques immunodominantes sur la nucléoprotéine des morbillivirus. Cela a permis de comprendre les réactions croisées observées avec chacun des tests cELISA.

- **Identifier les régions non essentielles de la nucléoprotéine de PPRV dans la réplication virale qui pourront être éliminées dans le génome d'un virus recombinant vaccinal et utilisées comme marqueurs antigéniques.**

Le suivi épidémiologique de la PPR dans les régions où elle sévit s'avère difficile à réaliser. En effet, dans ces régions des programmes de prophylaxie médicale sont appliqués avec l'usage du vaccin atténué qui est impossible de différencier sur le plan sérologique avec l'infection par les souches sauvages. Pour réaliser cette différenciation sérologique entre vaccination et infection par les souches sauvages de PPRV, il serait intéressant de modifier une ou plusieurs structures antigéniques des protéines de la souche vaccinale. Ces structures antigéniques devront être capables d'induire une réponse humorale et facilement détectable. Ainsi le profil des anticorps dirigés contre les structures antigéniques remodelées sera différent entre animaux vaccinés avec ce nouveau vaccin et ceux infectés par les souches sauvages.

Le second volet de notre travail de recherche a consisté à identifier sur la protéine N de PPRV les domaines non essentiels qui ne sont pas impliqués dans la réplication virale et qui pourraient être éliminés ou remodelés. Ces domaines s'ils sont immunogènes seront utilisés comme des marqueurs antigéniques de différenciation entre le vaccin et les virus sauvages de PPRV. Pour cela, nous avons procédé à l'étude des interactions de la protéine N de PPRV avec les différents composants viraux. Nous avons ainsi étudié les différents domaines d'interaction de la protéine N avec elle-même pour la formation de la nucléocapside (article 2) et avec la protéine de matrice (M) au cours du bourgeonnement de la particule virale (Manuscrit 1).

1. Etude de la structure antigénique de la nucléoprotéine de RPV

1.1. Article 1: Identification et analyse structurale des épitopes du domaine N-terminal de la nucléoprotéine de morbillivirus.

Sanne Charles. Bodjo, Olivier. Kwiatek, Adama. Diallo, Emmanuel. Albina et Geneviève. Libeau. *Journal of General Virology* (2007), **88**:1231-1242

Résumé:

Divers AcMs ont été produits contre la nucléoprotéine de RPV et PPRV à partir de souris immunisées avec les virus entiers (Libeau et al, 1997). La caractérisation de chacun des AcMs a permis de les classer en AcMs spécifiques pour chacun des virus ou commun à plusieurs morbillivirus. Pour le développement des tests de diagnostic spécifiques pour la PB ou la PPR, deux des AcMs spécifiques, IVB2 pour la PB et 38-4 pour la PPR ont été utilisés pour le développement des tests cELISA (Libeau et al, 1995; 1992). Malheureusement ces tests se sont révélés présenter des réactions croisées avec les sérums anti- virus hétérologue. Afin de comprendre cette réaction croisée du cELISA N RPV avec les sérums anti-PPR, l'épitope de l'AcM IVB2 sur la protéine N a été cartographié. Nous avons étendu cette étude de cartographie à d'autres AcMs anti-N. Des sérums de ruminants anti-PB ou anti-PPR ont servi également dans cette étude pour déterminer si des anticorps peuvent reconnaître les mêmes épitopes que les AcMs. Enfin les séquences en acide aminés (aa) correspondant aux différents épitopes identifiés sur la protéine N du virus vaccinal de la PB ont été comparées à celles de diverses souches de RPV et d'autres morbillivirus. Au total 5 AcMs anti-N de RPV ont été analysés dans l'étude, 3 définissent des sites antigéniques spécifiques bien distincts, 48-5 (site II), 3-1 (site III) et IVB2 (site IV) et 2 des épitopes communs aux morbillivirus, IIH2 (I) et 33-4 (VI). Partant du fait que les domaines variables de la nucléoprotéine de morbillivirus contiennent des épitopes reconnus par les anticorps (Buckland et al, 1989), deux mutants de la protéine N tronquée dans les domaines variables dans les régions N-terminale (121-145) et C-terminale (421-525) ont été générés. Ces mutants ont servi à la localisation des épitopes reconnus par les différents AcMs et anticorps de sérum. L'épitope de quatre AcMs (48-5, IVB2, IIH2 et 33-4) se trouve localisés dans le domaine N-terminal aa 121-145 et tandis que celui de l'AcM 3-1 est situé dans la région C-terminale (aa 421-525). Ces résultats pourraient indiquer un pouvoir immunogène élevé de la région en N-terminale (121-145) par rapport à la

région C-terminale, tout au moins chez la souris. Aussi il a été surprenant de constater que l'AcM 33-4 qui reconnaît différents morbillivirus a son épitope localisé dans la région variable 121-145 comme les AcMs spécifiques (IV-B2, IIH2 et 48-5). Les tests de Western Blot (WB) avec les différentes protéines dénaturées et chacun des AcMs ont montré que les AcMs 48-5 et IIH2 reconnaîtraient des structures conformationnelles et la séquence aa 121-145 semble nécessaire pour la formation de leur épitope. La réactivité des AcMs, des sérums d'animaux anti-PB et anti-PPR sur un total de 25 peptides synthétiques chevauchant, et couvrant le domaine variable 121-145 de la protéine N du RPV vaccinal RBOK a été analysée par ELISA indirect (iELISA). Les résultats obtenus ont servi à déterminer le motif majeur de l'épitope de chaque AcM. Ces motifs comparés entre eux montrent des variations même si ils ont certains aa en commun. L'alignement du motif de l'AcM 33-4 avec les aa correspondants sur les protéines N de morbillivirus montre que celui-ci est bien conservé entre les virus, ce qui expliquerait la capacité de cet AcM à reconnaître plusieurs virus de ce groupe (Libeau et al, 1997). Les différents sérums anti-RPV et anti-PPRV de ruminants domestiques et sauvages ont aussi réagi sur les peptides reconnus par les AcMs, ce qui permet de dire que les anticorps de souris comme ceux des ruminants domestiques reconnaissent des épitopes identiques sur la nucléoprotéine. En plus l'étude montre que les anticorps anti-PPR peuvent reconnaître des épitopes dans la région variable 121-145 de la nucléoprotéine de RPV. On pourrait ainsi avoir une compétition non spécifique entre l'AcM IVB2 et des anticorps anti-PPR fixés dans le même domaine. Les réactions croisées du test cELISA PB utilisant l'AcM IVB2 avec les sérums anti-PPR pourraient être dues à des encombrements stériques que pourraient générer des anticorps anti-PPR fixés dans le domaine aa 121-145 ou dans les domaines conservés proches qui empêcherait l'AcM IVB2 de se fixer sur son épitope.

Mapping and structural analysis of B-cell epitopes on the morbillivirus nucleoprotein amino terminus

S. C. Bodjo,¹ O. Kwiatak,² A. Diallo,¹ E. Albina² and G. Libeau²

Correspondence

G. Libeau

genevieve.libeau@cirad.fr

¹Animal Production Unit, FAO/AIEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, IAEA Laboratories, A-2444 Seibersdorf, Austria

²CIRAD-Département EMVT, UPR 'Contrôle des maladies animales et exotiques', TA/30G, Campus International de Baillarguet, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

By analysing the antigenic structure of the morbillivirus nucleoprotein (N) using a competitive-binding assay of monoclonal antibodies (mAbs), six different antigenic sites were identified previously. By using Pepscan methodology complemented by analysis of truncated N proteins, a better characterization of five of these antigenic sites was provided: I, II, III, IV and VI. mAbs specific to *Rinderpest virus*, defining antigenic sites II, III and IV, and those common to four morbilliviruses, delineating sites I and VI, were analysed in the present study. It was found that all but one mapped to the same region, between aa 120 and 149 of N. However, the mAb 3-1 epitope was located in the carboxy-terminal region (aa 421–525). This result may indicate the high immunogenicity of the amino-terminal variable region, at least in the mouse. It was surprising that the epitope of mAb 33-4, antigenic site VI, which recognized all morbilliviruses so far tested, was located in one of the two non-conserved regions between morbillivirus N proteins. It is shown that the conserved amino acid motif ¹²⁶EAD¹²⁸----¹³¹F-----¹⁴⁸EN¹⁴⁹ is critical for epitope constitution and recognition.

Received 28 July 2006

Accepted 6 November 2006

INTRODUCTION

Rinderpest is a highly contagious viral disease of animals belonging to the order Artiodactyla, although cattle and buffaloes are the most susceptible hosts. The disease is characterized clinically by pyrexia, erosive then necrotic stomatitis, profuse diarrhoea and death (Plowright, 1968). The causal agent, *Rinderpest virus* (RPV), belongs to the genus *Morbillivirus* within the family *Paramyxoviridae* (Bratt & Hightower, 1977). Other members of this genus are *Measles virus* (MV), *Peste-des-petits-ruminants virus* (PPRV), *Canine distemper virus* (CDV), *Phocine distemper virus* (PDV) and cetacean morbilliviruses. With the success of the Global Rinderpest Eradication Programme (GREP), the FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)-led international partnership programme, rinderpest is nearly eradicated from the world, with only an area in East Africa that needs further verification. To facilitate the implementation of that programme, two competitive ELISAs (cELISAs) were developed for both seromonitoring of the vaccination campaign and serosurveillance of the disease (Anderson *et al.*, 1990; Libeau *et al.*, 1992). These assays were designed to differentiate between the two ruminant morbillivirus diseases: rinderpest and peste des petits ruminants. They were based on the use of monoclonal antibodies (mAbs) directed against either the viral

haemagglutinin (H) or the nucleoprotein (N). H is the viral protein that binds to the cell receptor and against which most of the virus-neutralizing antibodies are directed (Choppin & Scheid, 1980; Merz *et al.*, 1981; Giraudon & Wild, 1985). N is the most abundant and immunogenic viral protein (Barrett *et al.*, 2006).

Sequence comparison of N within the genus *Morbillivirus* identified three main regions of differing similarity (Diallo *et al.*, 1994): the amino-terminal region of medium similarity, the highly conserved central region and the poorly conserved carboxy-terminal domain covering the last 105 aa. Buckland *et al.* (1989) showed that mAbs specific to the amino and carboxy termini of the N protein of MV mapped to the least conserved amino acid sequences. Paradoxically, the carboxy-terminal tail of N may be involved in the immunosuppressive effects of morbilliviruses and the host immune response regulation (ten Oever *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Laine *et al.*, 2003). The antigenic structure of N of both RPV and PPRV was studied by using the strategy of competition between mAbs. This approach has allowed the identification of six antigenic sites, of which four had epitopes that clearly distinguished between RPV and PPRV strains. Some of these mAbs have helped in the development of tests to differentiate between the two viruses (Libeau *et al.*, 1992, 1994, 1995, 1997). Experience has shown, however, that the cELISA that was developed by using one of the specific RPV N mAbs (Libeau *et al.*, 1992) for the serological diagnosis of rinderpest cross-reacts with PPRV antisera. Therefore, we

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences described in this study are EF186057–EF186059.

decided to perform a more specific analysis of the antigenic and immunogenic properties of the RPV N protein.

The objective of this study was to use a combined strategy of truncated mutants and overlapping synthetic dodecapeptides, covering aa 115–150 (amino terminus) and 415–495 (carboxy terminus) corresponding to the RBOK strain (GenBank accession no. CAA83177), to map the epitope structure of sites I–IV and VI defined by mAbs on the N protein sequence more precisely.

METHODS

Virus and cells. The different RPV strains used in this study were the attenuated vaccine RBOK strain (Plowright, 1962), RPV Saudi, RPV Egypt, RPV Kuwait and RPV RBT1 (Taylor, 1986). They were propagated in Vero cells cultivated in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 5% fetal bovine serum and 1% antimycotics and antibiotics.

mAbs and sera. Five antigenic site-specific mAbs, IIH2 (I), 48-5 (II), 3-1 (III), IVB2 (IV) and 33-4 (VI) directed against the N protein of RPV RBOK strain, were used along with the anti-PPRV N mAb 38-4 (Libeau *et al.*, 1997). The reactivity of positive RPV antisera [a rabbit rinderpest hyperimmune serum (RHS; a gift from J. Anderson, Institute for Animal Health, UK), a cattle serum against the Kudu strain (lineage II, gift from H. Wamwayi, Kenya Agricultural Research Institute, Kenya) and a naturally infected cattle serum from Chad] were analysed. Additionally, a goat serum against the vaccine strain of PPRV, Nigeria 75-1, was used in this study.

Cloning of the RPV RBOK N gene and transient expression in Vero cells. Vero cells were infected with the attenuated vaccine RBOK strain of RPV (Plowright, 1962). At 40–50% cytopathic effect, the cells were lysed and total RNA was extracted by using an RNeasy RNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Following RNA extraction, cDNA was synthesized by reverse transcription using a First Strand cDNA synthesis kit and random primers (Amersham Biosciences). This cDNA was used to amplify the full open reading frame of the N gene by using the forward and reverse primers N-PR7 (5'-GATCCTATCGACTGGAGCAAGCTTA-3') and N-PR8 (5'-GGCCTTTGTTGACATGGTAGGCT-3') with *Taq* polymerase. The PCR product was cloned into the pGEM-T plasmid (Promega) and the sequence of the insert was confirmed by sequencing. This insert was released by double digestion with restriction enzymes *DraI*/*NotI* and recloned into the eukaryotic expression vector pcDNA4/HisMax.B (Invitrogen) previously digested with *EcoRV* and *NotI*. In the resulting plasmid, pCN-RBOK, the insert encoding the full-length RPV N protein was placed under the control of the cytomegalovirus promoter. From this plasmid, two truncated mutants named pCNΔ121–146 and pCNΔ421–525 were generated by PCR mutagenesis (Ailenberg & Silverman, 1997) using phosphorylated primers. Reverse and forward primers 120 R (5'-P-ACCCCTAGAGGCAAATGTC-3') and 146 N (5'-P-TGGTTTGAGAATCGAGATA-3') led to the deletion of aa 121–145 in the amino-terminal half, whilst reverse and forward primers 420 R (5'-P-AAGGAATGAAACCTGGGCCTGTTGG-3') and RTAG (5'-P-AACTGAGTGAGTGCCCCGCA-3') led to the deletion of aa 421–525 in the carboxy-terminal half. *Escherichia coli* DH5α cells were used to propagate the various plasmids generated in this study. For downstream use, all plasmids were purified from bacteria by using a Qiagen EndoFree plasmid DNA preparation kit. For the transient expression of RPV N protein, Vero cells in 96-well plates (10 000 cells per well) were transfected with either pCN-RBOK plasmid or the truncated mutants by using Eugene 6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. After 72 h incubation at 37 °C, the transfected

cells in the 96-well plate were fixed with 80% acetone for 30 min at –20 °C and subjected to indirect immunofluorescence assay (IFA) to assess RPV N protein expression using the following antibodies: RHS, anti-RPV N mAbs IIH2, 48-5, 3-1, 33-4 and IVB2 and anti-PPRV N protein mAb 38-4 (Libeau *et al.*, 1997). mAbs and RHS were used at a dilution of 1/100. The cells were incubated with 50 µl test antibody for 30 min at 37 °C, then washed with PBS before incubation with 50 µl anti-mouse and anti-rabbit fluorescein isothiocyanate conjugates (Bio-Rad) diluted 1/80. After three washes with PBS, they were examined under a Canon inverted fluorescence microscope.

Western immunoblot. Cells transfected with the plasmid encoding the full-length RPV N protein, pCN-RBOK, or the truncated mutants pCNΔ120–146 or pCNΔ421–525 were lysed in RIPA buffer [100 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM PMSF] and analysed by SDS-PAGE. The proteins were transferred to a PVDF membrane 0.2 µm (Invitrogen) followed by immunostaining. The proteins were probed for 1 h with the primary antibody, RHS or mAb, at an appropriate dilution in PBS (pH 7.4) containing 0.5% Tween and 5% skimmed milk. Immune complexes were detected by using a secondary anti-rabbit antibody or anti-mouse immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase and subsequent detection using the ECL system (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Nucleotide sequencing of the N gene from wild-type strains of RPV. RNA was extracted from Vero cells infected with different RPV strains (Saudi, Egypt, Kuwait or RBT1). The extraction was done as indicated above. The first-strand cDNAs were synthesized using random primers. For each virus, the coding sequence of the N gene was amplified by RT-PCR using forward and reverse N-PR7 and N-PR8 primers and cloned into the pGEM-T vector. The sequence of the entire N gene was obtained by using different internal primers. Forward primers were N-PR9, 5'-CAGCATTAAATTGGTGAGGTA-3'; N-PR11, 5'-AACAAATGGTCAACTGGCTC-3'; and N-PR13, 5'-ACAGGCCAGGTTTCATTCCTGCG-3'; and reverse primers were N-PR6, 5'-GGTAGGCTTGCTCCTCTGCCAT-3'; N-PR14, 5'-ACCTCCACCAATTTAATGCGA-3'; and Nad2, 5'-GATTGAGTTCTCTAAGATCACCAT-3'. Cycle sequencing was performed by using dye-labelled terminators and *Taq* DNA polymerase followed by analysis on an ABI Prism 377 automatic sequencer (Applied Biosystems). By using the Vector NTI 9 package (Informax), amino acid changes between aa 115 and 150 of the N protein were evaluated by alignment of deduced amino acid sequences obtained for the above RPV strains with those of RPV RBOK, RPV lapinized strain, RPV Kuwait, PPRV 75-1, CDV Onderstepoort and MV Edmonston (GenBank accession numbers CAA83177, P37708, Z34262, CAA52454, P04865 and AAF85675, respectively). GenBank accession numbers for sequences obtained in this study are EF186057–EF186059 for RPV Egypt, RBT1 and Saudi, respectively.

Computer-aided analysis. The sequence–structure relationship of RPV strain RBOK N protein was built automatically by different programs that allowed the prediction of protein secondary structure according to amino acid sequence: PROFSEC (Rost, 2001), SUBSEC (Rost, 2001), GOR4 (Garnier *et al.*, 1996), PREDATOR (Frishman & Argos, 1996), PSIPRED (Jones, 1999), JNET (Cuff & Barton, 2000) and SSPRO (Baldi *et al.*, 1999). The consensus secondary structure from all of these programs was used for further analysis.

Immunoassay with cellulose-bound peptides (Pepscan). Cellulose-bound peptides were obtained by Fmoc amino acid chemistry (Synt:em). The Pepscan method used to locate the antibody-reactive peptides has been described previously (Mahé *et al.*, 2000). Synthetic dodecapeptides overlapping by one residue and covering the sequence of N of the RBOK vaccine strain of RPV at positions 115–150 (amino terminus) and 415–495 (carboxy terminus) were examined. Antibody reactivity with Pepscan peptide was measured by indirect ELISA

according to the manufacturer's instructions (SYNT:em) using mAb ascitic fluids (1:50–1:100) and sera (1:10–1:50) in blocking buffer (Genosys). Bound antibodies were detected on the membrane with an anti-mouse, anti-goat or anti-cattle alkaline phosphatase conjugate (Sigma) according to the origin of the primary antibody involved. The binding of the conjugate was further revealed by a precipitating phosphatase substrate (BCIP sodium salt, MMT and MgCl_2) that produced blue-coloured spots. A known peptide and its antiserum were used as a positive control and were subjected systematically to the different steps of the immunoassay. Reuse of the membrane was made possible by treatment with dimethylformamide, 6 M urea and 10 % acetic acid in ethanol.

RESULTS

Transient expression of deletion mutants of the N protein

We speculated that the different antigenic sites defined on the N proteins of RPV and PPRV (Libeau *et al.*, 1997) might be located within one of the two non-conserved regions of the N protein: aa 121–145 or 421–490. In order to map these antigenic sites, two plasmids able to express truncated proteins in eukaryotic cells were constructed. Vero cells were transfected with these plasmids and another expressing the full-length RPV N. Control of protein expression was assessed by indirect immunofluorescence using RHS. Each of the three transfected plasmids gave positive signals. No staining was observed with the negative serum or mAb 38-4, which is specific to the PPRV N protein. All of the other five mAbs specific to RPV N exhibited immunofluorescence staining on cells transfected with the full-length N protein plasmid pCN-RBOK and with one of the truncated mutant plasmids. Four of these mAbs (IIH2, 48-5, 33-4 and IVB2) reacted with the carboxy-terminally truncated mutant pCN Δ 421–525, whilst mAb 3-1 reacted with the amino-terminally truncated mutant pCN Δ 120–146 (Fig. 1). We confirmed the epitope localization of mAbs 33-4, 3-1 and IVB2 by Western blotting analysis of the different RPV N proteins expressed in Vero cells (Fig. 2). The antigenic characteristics of the full-length and truncated N proteins were examined on the basis of their reactivity with RHS (Fig. 2e), showing a strong cross-reaction. The reactivity pattern of the mixed mAbs was comparable to that of RHS (Fig. 2d). Neither mAb IIH2 nor mAb 48-5 bound to the N proteins in this test under denaturing conditions, an indication that they may be directed against a conformational epitope. We concluded that mAbs delineating sites I, II, IV and VI were located in the region comprising aa 121–145, whereas the mAb 3-1 epitope, defining site III, was located in aa 421–525 (see Table 1). To confirm these results, a peptide-mapping study in the amino-terminal part of the N protein was conducted.

Epitope mapping of the amino-terminal region using synthetic peptides

In order to further pinpoint the mAb-binding sites in the variable amino-terminal region, we analysed the capacity of

short peptides derived from this region to bind to the four mAbs, IVB2, IIH2, 48-5 and 33-4, known to react with the carboxy-terminally truncated N proteins. The sequence corresponding to aa 115–150 was presented as a set of 25 overlapping dodecamer peptides (one residue frameshift). As a control, overlapping peptides corresponding to the variable sequence of the carboxy-terminal region (positions 415–495) were also analysed. The binding ability of mAb IVB2 (site IV) to these peptides was analysed by indirect ELISA on the cellulose membrane, along with mAbs classified as binding to the RPV N protein antigenic sites I (mAb IIH2) and II (mAb 48-5). The broadly reactive mAb 33-4, recognizing site VI, was also analysed. ELISA successfully identified epitopes for the four mAbs. As an example, Fig. 3 shows the reactivity pattern of peptides contributing to the interaction of two of these mAbs (IIH2 and 33-4) with the sequence derived from the amino and carboxy termini of RPV N. The most prominent peptide reactivity was found in the amino-terminal region on a stretch of 25 aa (from aa 115 to 150), whilst the carboxy-terminal region was found to be completely non-reactive. They had multiple recognition profiles, suggesting that the recognized epitopes were discontinuous, requiring two to three framework peptides displaying binding activity. Although shown to belong to different competition groups (Libeau *et al.*, 1997), these results also indicated that the four mAbs had an epitope location within the same 30 aa, constituting the amino-terminal variable region of the N protein. mAb IVB2 reacted with this region; the most pronounced reactivity was against peptides 8–11, 13–17 and 22–23.

To define the epitope location precisely and identify the shared areas corresponding to peptides showing significant reactivity, the binding patterns of the different mAbs were studied (Fig. 4) by scanning the sequence of interest (aa 115–150). mAb IIH2 showed high peptide reactivity, with prominent recognition of peptides 6, 8–11, 13–17 and 23. A generally low recognition of the peptides was displayed by mAb 48-5 on peptides 8–23, but only peptides 8–11, 13–17 and 22–23 had significant reactivity. Although it recognized shared antigenic sites of the morbilliviruses, unexpectedly, mAb 33-4 (antigenic site VI) showed a strong homogeneous reactivity in this variable region with peptides 8–11, 13–17 and 22–23. From these results, we concluded that the epitopes recognized by mAbs 48-5, IVB2 and 33-4 were all located between aa 122 and 148, with the exception of mAb IIH2, whose epitope extended from aa 120 to 148. The area corresponding to epitope reactivity was delimited within peptides 6–24, corresponding to the stretch in the amino terminus that is less well conserved between members of the genus *Morbillivirus*. This sequence is GTSMDDDEADRYFTYEPPNDGEERQSYWFEN (Fig. 5a). The conserved regions flanking this variable sequence (peptides 1–5, 18–21 and 25), as well as the most variable region of the carboxy terminus, displayed no binding activity.

The previously defined epitopes could be localized more precisely by defining the reactive framework residues displaying binding activity in overlapping peptides. The

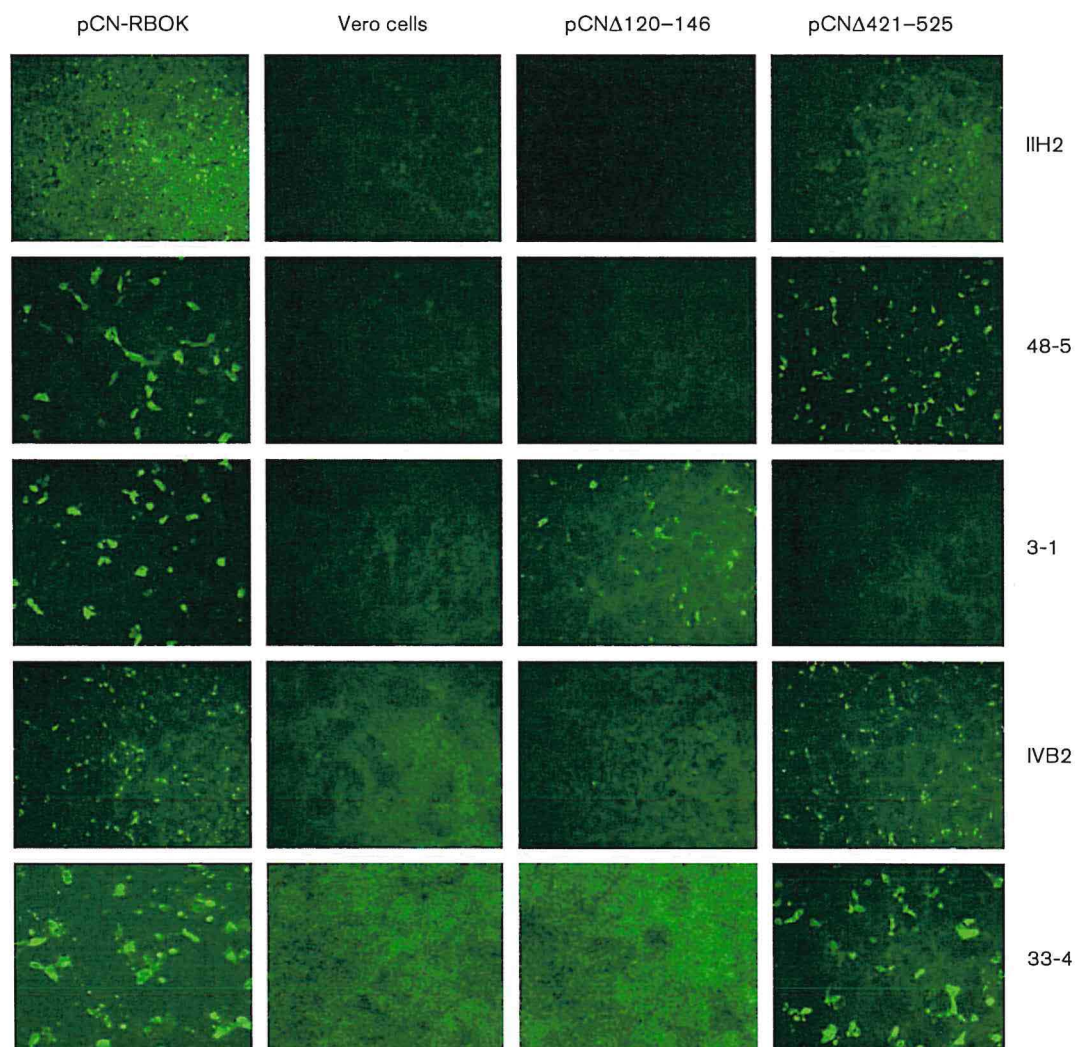


Fig. 1. Indirect immunofluorescence microscopy of Vero cells analysed for intracellular transient expression of the full-length N protein of the RBOK strain of RPV (pCN-RBOK), the amino-terminally truncated protein pCN Δ 120–146 or the carboxy-terminally truncated protein pCN Δ 421–525. Seventy-two hours after transfection, cells were permeabilized and stained with the panel of anti-RPV mAbs (IIH2, 48-5, 3-1, IVB2 and 33-4). Non-transfected Vero cells were used as a negative control.

analysis of the sequences with binding properties indicated that the possible delimitation of the binding epitope could be based on the appearance or disappearance of residues contributing to the binding activity. The study of mAb IIH2 in the recognition of its epitope is given as an example

(Fig. 4). The sequence TSMDDDEADRYFT (peptide 7) had no activity, but the following overlapping sequence SMDDEADRYFTY (peptide 8) gained activity with the adjunction of Y. In contrast, the decrease in the binding activity occurred with the disappearance of a residue from

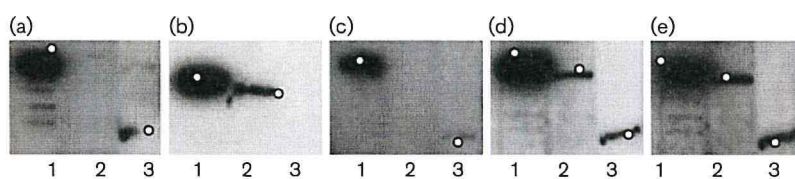


Fig. 2. Location of mAbs by Western blotting on the full-length N (lane 1) and on the deleted mutant proteins, N Δ 120–146 (lane 2) and N Δ 421–525 (lane 3), in transfected Vero cells. RBOK N proteins were separated by gel electrophoresis, blotted onto a membrane and detected by various antibodies: (a) mAb 33-4, (b) mAb 3-1, (c) mAb IVB2, (d) a mix of mAbs 3-1, 33-4 and IVB2, (e) RHS.

Table 1. Reactivity of deletion mutants of the RPV RBOK N protein in Vero cells by indirect immunofluorescence using mAbs identified as recognizing different antigenic sites on the protein and an anti-RPV rabbit hyperimmune serum (RHS)

One mAb specific for the N protein of PPRV was used as a negative control. Cells were transiently transfected with pcDNA plasmids carrying the different deletion mutants.

Plasmid	Indirect immunofluorescence using:							
	Anti-RPV RHS	Anti-RPV mAb IIH2	Anti-RPV mAb 48-5	Anti-RPV mAb 3.1	Anti-RPV mAb IVB2	Anti-RPV mAb 33-4	Anti-PPRV mAb 38-4	Negative serum
PCN-RBOK	+	+	+	+	+	+	–	–
PCNΔ120–146	+	–	–	+	–	–	–	–
PCNΔ421–525	+	+	+	–	+	+	–	–
Vero cells (negative control)	–	–	–	–	–	–	–	–

the peptide sequence: the loss of activity of peptide 12 compared with peptide 11 is attributed to the loss of the D residue. The whole motif contributing to the binding of the mAb was located in the so-defined epitope. When a unique peptide was recognized, only important residues were identified. The residues contributing to the epitope recognition were: ¹²⁵D, ¹³¹F, ¹³³Y, ¹³⁸D and ¹⁴⁸E for mAb IIH2; ¹²⁵D, ¹³¹F, ¹³³Y, ¹³⁸D for mAb 48-5; and ¹²⁵D, ¹³¹F, ¹³³Y, ¹³⁷N, ¹³⁸D and ¹⁴⁷F for mAbs IVB2 and 33-4.

The delimitation of the mAb interfaces and the residues identified above as important for the recognition of RBOK N are represented schematically in Fig. 5(b). Important residues were also located on peptide 6 (¹²⁰G) and on peptide 23 (¹³⁷N) for mAb IIH2. Therefore, two antigenic motifs were defined. The major one was delimited on peptide DEADRYFTYEENPD from ¹²⁵D to ¹³⁸D, defined as a common antigenic peptide recognized by all mAbs. In the case of mAb IIH2, it was extended to ¹²⁰G. Close to this main sequence, two residues (¹⁴⁷F and ¹⁴⁸E) contributed to the epitope recognition defined below.

Identification by sequence analysis of residues required for efficient binding of the N protein of different RPV strains

mAbs IIH2, 48-5, IVB2 and 33-4 were mapped onto the aa 120–149 sequence of N deduced from the RBOK strain. The pattern of reactivity of different strains of RPV and representatives of PPRV, CDV and MV to mAbs in the IFA was described in a previous publication (Libeau *et al.*, 1997) and is summarized in Fig. 5(b). The four mAbs reacted with the N protein of all of the RPV strains, although mAb 48-5 failed to recognize that of RBT1. Except for mAb 33-4, none of these mAbs reacted with PPRV. mAbs IIH2 and 33-4 reacted with CDV and MV. Consequently, to demonstrate whether the sequence variation among the strains was helpful to determine framework residues contributing to the difference in reactivity, the cDNA corresponding to the targeted area for the different RPV strains was amplified and sequenced. The following RPV strains were used: Saudi, Egypt, Kuwait and RBT1. The deduced amino acid sequences were aligned

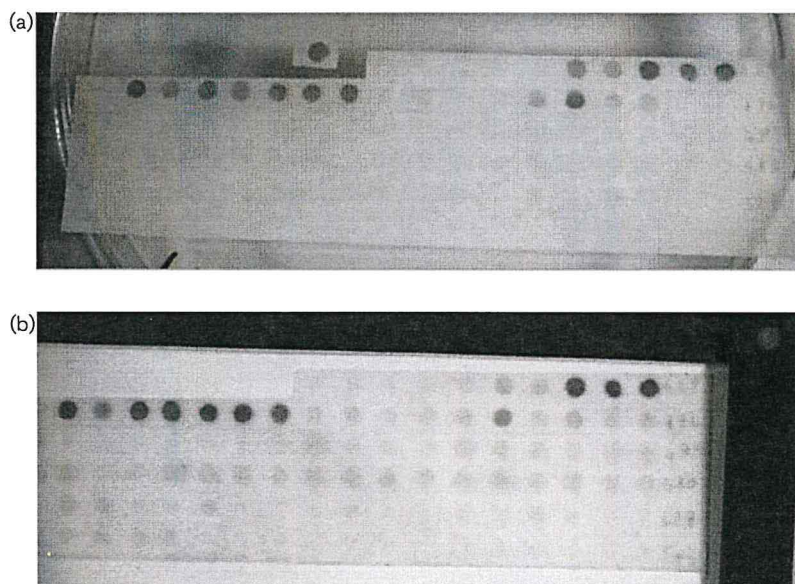


Fig. 3. Reactivity of consecutive overlapping dodecapeptides spanning aa 115–150 (amino terminus) and aa 415–495 (carboxy terminus) of the N protein of the RBOK strain of RPV with mAbs. Membranes were incubated with an RPV-specific mAb, IIH2 (a), or a broadly reactive mAb, 33-4 (b). Dark-coloured spots indicate the contribution to binding of the mAb. A positive control (isolated peptide) and its antiserum was submitted systematically to the different steps of the immunoassay.

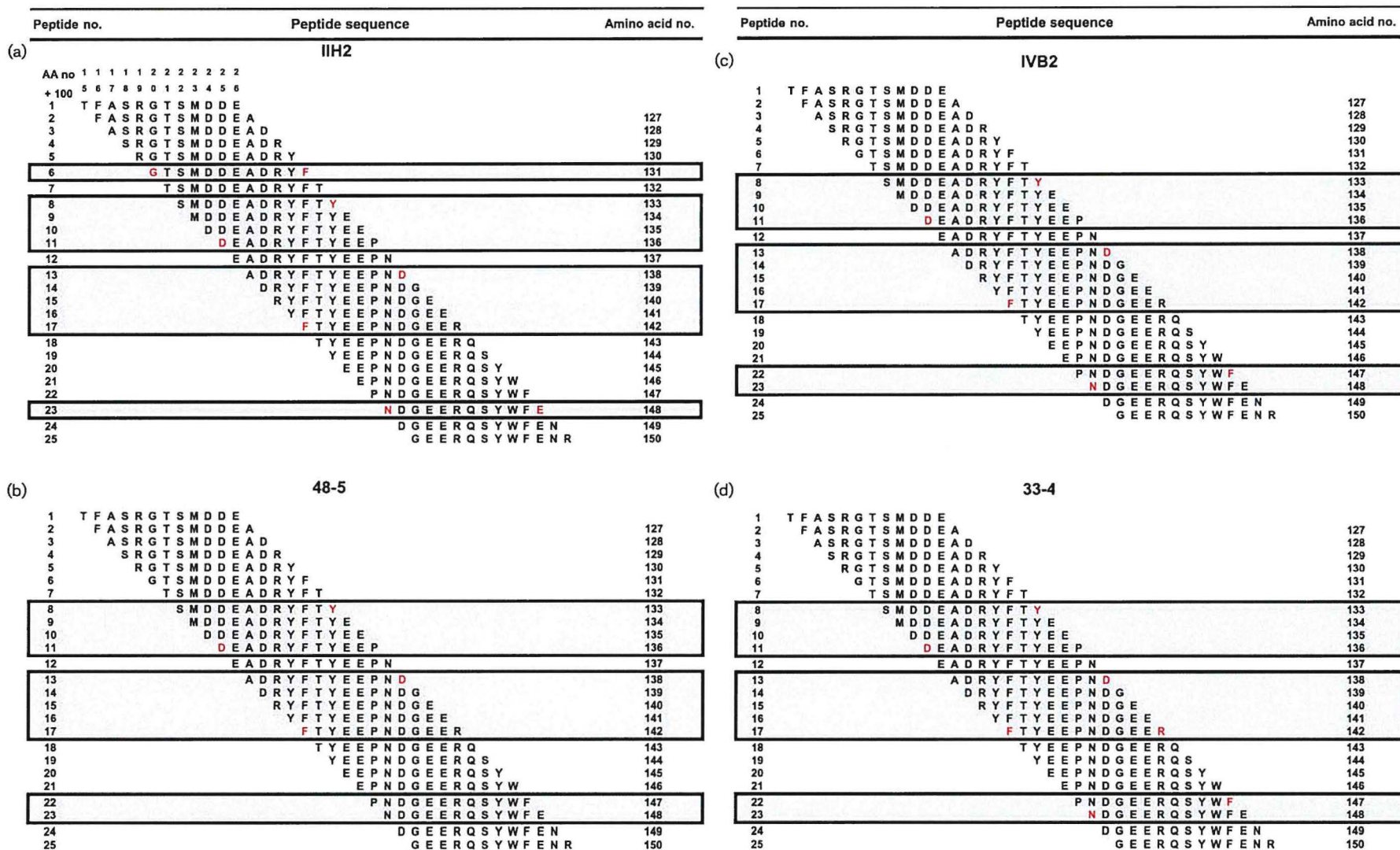


Fig. 4. Determination of the fine specificity of mAbs by indirect ELISA. Synthetic dodecapeptides (overlapping by one residue) spanning aa 115–150, corresponding to the variable amino-terminal sequence in the N protein of RPV, were tested on a derivative membrane to identify reactive peptides. Shaded areas correspond to significant binding. Residues in red delineate the recognized epitope.

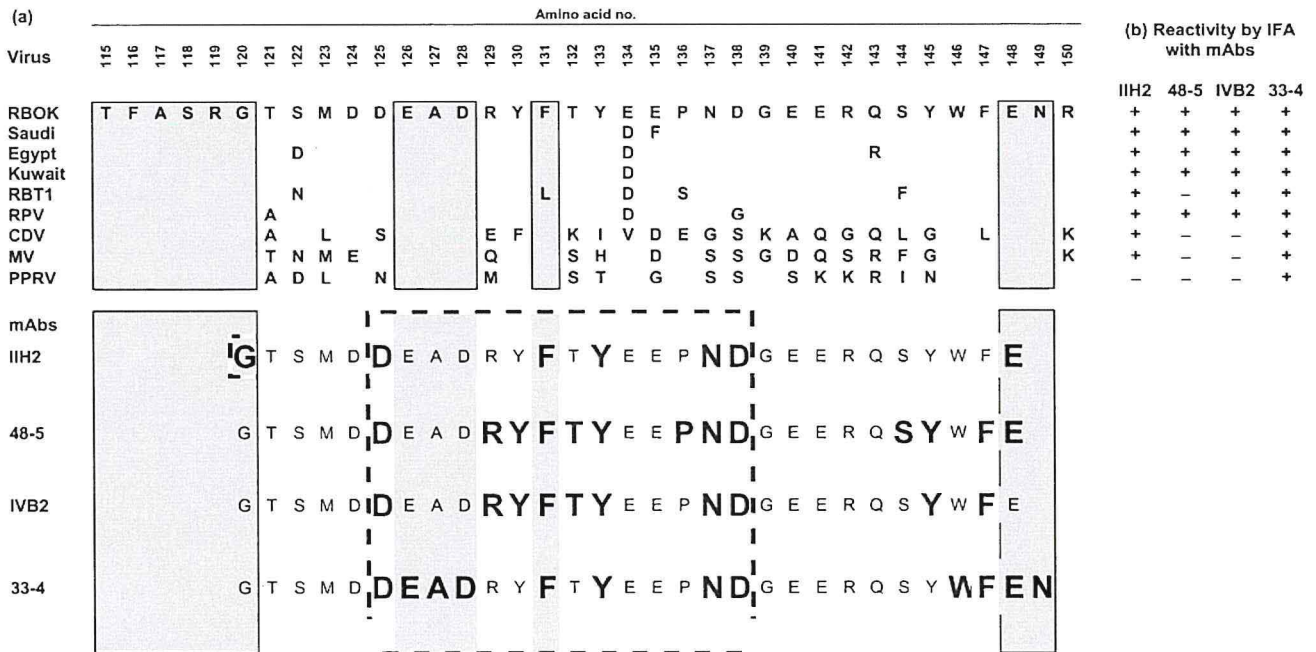


Fig. 5. Indirect immunofluorescence of RPV with mAbs (b) has been published previously (Libeau *et al.*, 1997). Alignment sequence of aa 115–150 of N proteins of different strains of RPV (a). The sequence data for RPV Egypt, RBT1 and Saudi were determined in this study (GenBank accession nos EF186057–EF186059, respectively) and those for RPV RBOK, RPV Kuwait, PPRV 75-1, CDV Onderstepoort and MV Edmonston were obtained from GenBank with accession numbers CAA83177, Z34262, CAA52454, P04865 and AAF85675, respectively. The sequence of the lapinized strain of RPV was published by Kamata *et al.* (1991) with GenBank accession no. P37708. Blocks in dotted lines delimit a common epitope and shaded areas are shared amino acid sequences.

with published data of the N protein of RPV (RBOK and lapinized strain), PPRV, CDV and MV (GenBank accession numbers CAA83177, P37708, CAA52454, P04865 and AAF85675, respectively) (Fig. 5b). Reactive amino acids that were shared between all morbilliviruses were not considered as effective when the mAb had a differential reactivity. The remaining residues were then compared to define the minimum amino acid sequence involved in the difference in reactivity among strains.

mAb IIH2 reacts with RPV, CDV and MV. It gave a negative result with PPRV 75-1, but reacted with some other PPRV strains (G. Libeau, unpublished data). Therefore, a conserved sequence could be involved in the delineated epitope with the contribution of a variable residue. ¹²⁴D and/or ¹²⁵D, which are conserved among RPV, PPRV, CDV and MV strains, could be involved. Taken together with the previously identified residues, the contributing motif for IIH2 was found to be ¹²⁰G---¹²⁵D---¹³¹F-¹³³Y---¹³⁷ND¹³⁸ and ¹⁴⁸E.

mAb 48-5 reacted with all RPV strains except RBT1. In the area of peptides recognized by this mAb, there are three main amino acid changes between RBT1 and other RPV strains: ¹³¹L, ¹³⁶S and ¹⁴⁴F in the protein sequence alignment. In the same region, four other amino acids are not conserved between different RPV strains: ¹³⁴E for RBOK,

¹³⁵F for RPV Saudi, ¹³⁸G for RPV lapinized and ¹⁴³R for RPV Egypt. In total, within the sequence between aa 131 and 144, there are seven changes. In addition to this region, the cooperation of the motif ¹⁴⁷FE¹⁴⁸ was found to be necessary for an efficient reaction with the RPV N protein. The motif recognized by mAb 48-5 was therefore determined to be ¹²⁵D---RYFTY---PND¹³⁸ ¹⁴⁴S-FE¹⁴⁸. As this does not react with RPV RBT1 strains, the three amino acid changes noted for this strain, ¹³¹L, ¹³⁶S and ¹⁴⁴F, might be critical for the formation of the epitope.

By using the same deductive method, the contributing motifs for mAb IVB2 were found to be ¹²⁵D---RYFTY---ND¹³⁸ ¹⁴⁵Y-F¹⁴⁷. mAb 33-4 is different from the preceding mAbs in that it recognizes different morbilliviruses, including MV, CDV and PPRV (DMV was not tested). Alignment analysis between the four viruses suggests that the amino acid sequence implicated in the interaction of antigen with this mAb was ¹²⁵DEAD--F-Y---ND¹³⁸ ¹⁴⁶WFEN¹⁴⁹.

Antibody-binding sequence comparison between mouse mAbs and sera from immunized or convalescent goats and cattle: correlation with the secondary structure of the epitopes

To determine whether the epitopes that we identified within the amino-terminal region of RBOK N are

Table 2. Reactivity pattern of cattle and goat antibodies to the amino terminus of the RPV RBOK N protein

An indirect ELISA spot test was performed to identify the location of the B-cell epitopes. Sera were tested when the response reached the plateau. Results were expressed as 0, $\pm$, + and ++ for low, medium and high reaction, respectively.

Peptide no.	Amino acid sequence of peptide RBOK N (aa 115–150)			Cattle and goat sera and mAbs								
	Start position	Sequence	End position	PPR 75-1 goat	RP Chad cattle	Lineage II cattle	Saudi Arabia goat	RBOK cattle	IIH2 mAb	48-5 mAb	IVB2 mAb	33-4 mAb
1	115	TFASRGTSMDDE	126	$\pm$	++	$\pm$	++	+	0	0	0	0
2	116	FASRGTSMDDEA	127	0	++	++	++	+	0	0	0	0
3	117	ASRGTSMDDEAD	128	0	+	+	+	0	0	0	0	0
4	118	SRGTSMDDEADR	129	$\pm$	+	+	+	0	0	0	0	0
5	119	RGTSMDDDEADRY	130	0	++	++	++	+	0	0	0	0
6	120	GTSMDDEADRYF	131	0	++	++	+	$\pm$	+	0	0	0
7	121	TSMDDDEADRYFT	132	0	++	++	+	+	0	0	0	0
8	122	SMDDEADRYFTY	133	0	++	$\pm$	+	$\pm$	+	+	+	+
9	123	MDDEADRYFTYE	134	0	$\pm$	+	+	$\pm$	+	+	+	+
10	124	DDEADRYFTYEE	135	0	$\pm$	$\pm$	+	0	+	+	+	+
11	125	DEADRYFTYEEP	136	0	$\pm$	$\pm$	$\pm$	0	+	+	+	+
12	126	EADRYFTYEEP	137	+	+	+	+	0	0	0	0	0
13	127	ADRYFTYEEPND	138	$\pm$	+	+	++	$\pm$	+	+	+	+
14	128	DRYFTYEEPNDG	139	$\pm$	$\pm$	$\pm$	++	+	+	+	+	+
15	129	RYFTYEEPNDGE	140	$\pm$	$\pm$	+	++	$\pm$	+	+	+	+
16	130	YFTYEEPNDGEE	141	$\pm$	$\pm$	+	++	+	+	+	+	+
17	131	FTYEEPNDGEER	142	$\pm$	++	++	++	+	+	+	+	+
18	132	TYEEPNDGEERQ	143	$\pm$	++	+	+	+	0	0	+	+
19	133	YEEPNDGEERQS	144	0	+	+	+	0	0	0	0	0
20	134	EEPNDGEERQSY	145	0	0	0	+	0	0	0	0	0
21	135	EPNDGEERQSYW	146	0	0	0	+	$\pm$	0	0	0	0
22	136	PNDGEERQSYWF	147	0	$\pm$	0	+	$\pm$	0	+	+	+
23	137	NDGEERQSYWFE	148	$\pm$	+	0	+	0	+	+	+	+
24	138	DGEERQSYWFEN	149	0	+	0	+	0	0	0	0	0
25	139	GEERQSYWFENR	150	+	++	+	++	+	0	0	0	0

immunodominant in ruminants, we compared the peptide-reactivity pattern obtained with the different mAbs studied with those with sera from immunized or convalescent goats and cattle. To this end, five different sera were analysed. The history of the sampled animals is as follows: a bovine that recovered from rinderpest during an outbreak in Chad in 1987, an RPV RBOK-vaccinated bovine, a bovine infected experimentally with an RPV strain isolated from an antelope (RPV Kudu strain; H. Wamwayi, personal communication), a goat inoculated with RPV Saudi strain and another vaccinated with the attenuated PPRV strain 75-1. Sera were analysed by indirect ELISA on the peptide-spotted membrane and the results are summarized in Table 2. The convalescent serum had a generally strong reaction, with maximum reactivity in the region encompassing residues 126–133, whereas residues 145–147 did not appear to be involved in the binding. The other sera had weak (RBOK), moderate (lineage II) or strong (Saudi) overall reactivity; they also reacted with peptides located in the region of aa ¹²⁹RYFTY¹³³, demonstrating that these amino acids were strongly immunodominant for the humoral response to RPV

infection. The similar reactivity observed for the four anti-RPV animal sera suggests that the immunogenicity of the region encompassing aa 129–133 is conserved among the virus strains and corresponds to the recognition sites of the mAbs. On the other hand, the anti-PPRV goat serum had weak or no reaction with the region encompassing these residues, confirming the difference in the amino acid sequence. The slight reactivity observed with peptides covering the variable sequence 137–143 could be explained by a similar amino acid conformation or a cross-reactivity with an unknown RBOK sequence. Overlapping synthetic peptides covering aa 415–495, corresponding to the variable sequence at the carboxy terminus of the N protein of the RPV RBOK strain, analysed with the ruminant sera also indicated that this region induced a strong immune response (data not shown). The efficiency of a mAb in cELISA to detect the humoral response to RPV is primarily due to the sharing of the same recognition epitope between mAbs and immune sera. Hypothetically, the immune response against a different and non-competitive epitope should not be taken into account.

The immunogenic properties of the N protein correlated with the secondary-structure prediction that was generated (Fig. 6). An α -helix structure from ^{124}D to ^{133}Y fitted inside the major antigenic motif delimited on peptide DEADRY-FTYEPPND. Helical configuration may lead to better fitting with immune-system molecules, rendering them more immunogenic.

RPV, as all other morbilliviruses, induces an efficient immune response, but also, paradoxically, a transient immunosuppression, in its host (Heaney *et al.*, 2002, 2005;

1239

carboxy-terminal region of RPV N in the mouse immune system. All but one mAb bound to the non-conserved amino acids at positions 115–150 within the amino-terminal domain of RPV. This short sequence of low similarity (40 %) fits into a well-conserved region among members of the genus *Morbillivirus* and has already been described by Giraudon *et al.* (1988) and Buckland *et al.* (1989) on the MV N protein. Located in a low-hydrophobicity stretch of the protein, it may be exposed to the protein surface (Karlin *et al.*, 2002). It was surprising that only one mAb, 3-1, bound to the carboxy-terminal sequence, which is known to be highly hydrophilic and also predicted to be exposed to the surface of morbillivirus N proteins (Liston *et al.*, 1997; Karlin *et al.*, 2002; Longhi *et al.*, 2003). Our results are similar to those of Choi *et al.* (2003a, b, 2004), who mapped the binding sites of the anti-N mAbs that they produced against the RPV LATC strain to the amino terminus (Choi *et al.*, 1998), but identified immunodominant linear B-cell epitopes at the carboxy terminus when using anti-RPV bovine sera. Buckland *et al.* (1989), in contrast, identified three antigenic sites on the MV N recognized by anti-N mAbs: one in the amino-terminal region and two in the carboxy terminus. If the amino as well as the carboxy termini of RPV N are exposed on the surface of the protein, the amino-terminal epitopes are certainly better recognized by the mouse immune system. The data presented here confirm that the region located between aa 115 and 150 is highly immunogenic in mice.

For all mAbs studied except one, the epitopes that they bind to are within the same area, although they defined different binding sites by absence of mutual competition. mAbs IVB2 and 33-4 were directed against linear epitopes, whereas mAbs IIH2 and 48-5 demonstrated anti-conformational reactions. These two last mAbs may therefore recognize residues distant in sequence from the short, variable amino-terminal cluster, but near their three-dimensional position. The sequential epitope defined by peptide mapping is part of a more complex conformational epitope and explains the lack of competition between these two mAbs and the anti-sequential mAb as defined in the precedent work (Libeau *et al.*, 1997). Nevertheless, we defined for these four mAbs a major antigenic motif, DEADRYFTYEENPND, from ¹²⁵D to ¹³⁸D. To confirm the prominent immunogenic role of this short sequence in the amino-terminal part of RPV N, *in silico* sequence–structure analysis was performed and this identified an α -helical configuration between ¹²⁴D and ¹³³Y, thus defining overlapping residues as essential for mAb recognition. The presence of structures such as short α -helices or β -turns seems to be critical for increased flexibility and enhanced immunogenic properties of epitopes, due to a better activation of the immune system. Indeed, Alba *et al.* (2003) demonstrated for *Plasmodium falciparum* that peptides presenting an α -helical fragment between residues 5 and 10 maintained greater flexibility in the rest of the molecule and were immunogenic and

protective. Although the region comprising aa 115–150 of N has low similarity between morbilliviruses, we mapped the epitope recognized by mAb 33-4 (site VI) in that region. This antibody is the only mAb to recognize all morbilliviruses and its binding site is composed of residues that are, in fact, well conserved within the genus: ¹²⁶EAD¹²⁸-----¹³¹F-----¹⁴⁸EN¹⁴⁹.

Among our mAbs, those determining sites II, III and IV were the most interesting for use in a cELISA for differential serodiagnosis between rinderpest and peste des petits ruminants. Indeed, mAb IVB2, belonging to the group directed against site IV, has already been used in such a test (Libeau *et al.*, 1992). However, whilst unable to react with PPRV strains in an immunofluorescence test, mAb IVB2 showed a cross-reaction of approximately 10 % with anti-PPRV sera in the cELISA format (data not shown). Cross-reactivity among morbilliviruses is known to be important and has hampered the development of highly sensitive and specific serological tests to differentiate between RPV and PPRV infections, two serologically related infectious agents of ruminants that also give rise to similar clinical symptoms. When we developed cELISA tests for the detection of the humoral response to RPV or PPRV, high sensitivity and specificity depended primarily on the correspondence of recognition sites of the specific mAb and antibody from natural immunity response to the virus. In this study, sharing of the recognition epitope between mAb IVB2 and anti-RPV sera from ruminants was demonstrated, whereas it was shown not to be the case with PPRV antisera. Indeed, looking at the 10 aa that are critical for the antigenic site recognized by mAb IVB2, only three residues, ¹³⁰Y, ¹³¹F and ¹⁴⁷F, are conserved between RPV and PPRV and are insufficient to create an antigenic epitope for cross-reactivity. Thus, in the absence of sequence identity between PPRV and RPV in the so-defined immunodominant region of the amino-terminal variable region of N, the serological cross-reactivity observed between RPV and PPRV with the IVB2 mAb-based cELISA could be explained by steric hindrance for the recognized epitope, due to the proximity of an epitope common to both RPV and PPRV in the conserved regions upstream of aa 120 and downstream of aa 145. In an attempt to alleviate the steric hindrance, three histidine residues were inserted between aa 120 and 121, and three others between aa 145 and 146. The N mutant that was obtained was not recognized by mAb IVB2 (S. C. Bodjo, unpublished data). The insertion of the six histidine residues has probably introduced a dramatic change in the conformation of the epitope. The major antigenic motif delimited on peptide DEADRYFTYEENPND bearing the α -helix structure is therefore a promising candidate for consideration as an antigen for peptide-based ELISA diagnostic tools. Practically, the diagnostic capacity of small polypeptides or synthetic peptides composed of this antigenic motif remains to be validated in the indirect ELISA format by using extended RPV and PPRV sera.

REFERENCES

- Ailenberg, M. & Silverman, M. (1997). Site-directed mutagenesis using a PCR-based staggered re-annealing method without restriction enzymes. *Biotechniques* 22, 624–630.
- Alba, M. P., Salazar, L. M., Puentes, A., Pinto, M., Torres, E. & Patarroyo, M. E. (2003). 6746 SERA peptide analogues immunogenicity and protective efficacy against malaria is associated with short alpha helix formation: malaria protection associated with peptides alpha helix shortening. *Peptides* 24, 999–1006.
- Anderson, J., McKay, J. A. & Butcher, R. N. (1990). The use of monoclonal antibodies in the competitive ELISA for the detection of antibodies to rinderpest and peste des petits ruminants viruses. In *The Seromonitoring of Rinderpest throughout Africa – Phase One* (Proceedings of the Final Research Coordination Meeting of the FAO/IAEA/SIDA/OUA/IBAR/ PARC Coordinated Research programme). IAEA-TECDOC vol. 623, pp. 43–45. Edited by M. H. Jeggo. Vienna: Joint FAO/IAEA Division.
- Baldi, P., Brunak, S., Frasconi, P., Soda, G. & Pollastri, G. (1999). Exploiting the past and the future in protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 15, 937–946.
- Barrett, T., Banyard, A. & Diallo, A. (2006). Molecular biology of the morbilliviruses. In *Rinderpest and Peste des Petits Ruminants*, pp. 31–67. Edited by T. Barrett, P.-P. Pastoret & W. Taylor. London: Elsevier Academic Press.
- Bratt, M. A. & Hightower, L. E. (1977). Genetics and paragenetic phenomena of paramyxoviruses. In *Comprehensive Virology*, vol. 9, pp. 457–533. Edited by H. Frankel-Conrat & R. R. Wagner. New York: Plenum.
- Buckland, R., Giraudon, P. & Wild, F. (1989). Expression of measles virus nucleoprotein in *Escherichia coli*: use of deletion mutants to locate the antigenic sites. *J Gen Virol* 70, 435–441.
- Choi, K. S., Kwon, C. H., Choi, C. U., Lee, J. G. & Kang, Y. B. (1998). Biological properties of attenuated rinderpest virus (LATC strain) adapted in Vero cell. *RDA J Vet Sci* 40, 61–70.
- Choi, K. S., Nah, J. J., Ko, Y. J., Choi, C. U., Kim, J. H., Kang, S. Y. & Joo, Y. S. (2003a). Characterization of antigenic sites on the rinderpest virus N protein using monoclonal antibodies. *J Vet Sci* 4, 57–65.
- Choi, K. S., Nah, J. J., Ko, Y. J., Kang, S. Y. & Joo, Y. S. (2003b). Localization of antigenic sites at the amino-terminus of rinderpest virus N protein using deleted N mutants and monoclonal antibody. *J Vet Sci* 4, 167–173.
- Choi, K. S., Nah, J. J., Ko, Y. J., Kang, S. Y., Yoon, K. J. & Joo, Y. S. (2004). Characterization of immunodominant linear B-cell epitopes on the carboxy terminus of the rinderpest virus nucleocapsid protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 658–664.
- Choppin, P. W. & Scheid, A. (1980). The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev Infect Dis* 2, 40–61.
- Cuff, J. A. & Barton, G. J. (2000). Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins* 40, 502–511.
- Diallo, A., Barrett, T., Barbron, M., Meyer, G. & Lefevre, P. C. (1994). Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. *J Gen Virol* 75, 233–237.
- Frishman, D. & Argos, P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng* 9, 133–142.
- Garnier, J., Giblat, J.-F. & Robson, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* 266, 540–553.
- Giraudon, P. & Wild, T. F. (1985). Correlation between epitopes on haemagglutinin of measles virus and biological activities: passive protection by monoclonal antibodies is related to their haemagglutination inhibiting activity. *Virology* 144, 46–58.
- Giraudon, P., Jacquier, M. F. & Wild, T. F. (1988). Antigenic analysis of African measles virus field isolates: identification and localisation of one conserved and two variable epitope sites on the NP protein. *Virus Res* 10, 137–152.
- Heaney, J., Barrett, T. & Cosby, S. L. (2002). Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J Virol* 76, 3579–3584.
- Heaney, J., Cosby, S. L. & Barrett, T. (2005). Inhibition of host peripheral blood mononuclear cell proliferation *ex vivo* by Rinderpest virus. *J Gen Virol* 86, 3349–3355.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292, 195–202.
- Kamata, H., Tsukiyama, K., Sugiyama, M., Kamata, Y., Yoshikawa, Y. & Yamanouchi, K. (1991). Nucleotide sequence of cDNA to the rinderpest virus mRNA encoding the nucleocapsid protein. *Virus Genes* 5, 5–15.
- Karlin, D., Longhi, S. & Canard, B. (2002). Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *Virology* 302, 420–432.
- Kerdiles, Y. M., Cherif, B., Marie, J. C., Tremillon, N., Blanquier, B., Libeau, G., Diallo, A., Wild, T. F., Villiers, M. B. & Horvat, B. (2006). Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral Immunol* 19, 324–334.
- Laine, D., Trescol-Biemont, M. C., Longhi, S., Libeau, G., Marie, J. C., Vidalain, P. O., Azocar, O., Diallo, A., Canard, B. & other authors (2003). Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J Virol* 77, 11332–11346.
- Libeau, G., Diallo, A., Calvez, D. & Lefevre, P. C. (1992). A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest antibodies in cattle and small ruminants. *Vet Microbiol* 31, 147–160.
- Libeau, G., Diallo, A., Colas, F. & Guerre, L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet Rec* 134, 300–304.
- Libeau, G., Prehaud, C., Lancelot, R., Colas, F., Guerre, L., Bishop, D. H. & Diallo, A. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res Vet Sci* 58, 50–55.
- Libeau, G., Saliki, J. T. & Diallo, A. (1997). Caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants: identification d'épitopes conservés ou de spécificité stricte sur la nucléoprotéine. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 50, 181–190 (in French).
- Liston, P., Batal, R., DiFlumeri, C. & Briedis, D. J. (1997). Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Arch Virol* 142, 305–321.
- Longhi, S., Receveur-Brechot, V., Karlin, D., Johansson, K., Darbon, H., Bhella, D., Yeo, R., Finet, S. & Canard, B. (2003). The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J Biol Chem* 278, 18638–18648.
- Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E. & Jestin, A. (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81, 1815–1824.
- Merz, D. C., Scheid, A. & Choppin, P. W. (1981). Immunological studies of the functions of paramyxovirus glycoproteins. *Virology* 109, 94–105.
- Plowright, W. (1962). Rinderpest virus. *Ann N Y Acad Sci* 101, 548–573.

- Plowright, W. (1968).** Rinderpest virus. In *Virology Monographs* vol. 3, pp. 26–110. Edited by S. Gard, C. Hallauer & K. F. Meyer. New York: Springer-Verlag.
- Rost, B. (2001).** Protein secondary structure prediction continues to rise. *J Struct Biol* 134, 204–218.
- Taylor, W. P. (1986).** Epidemiology and control of rinderpest. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 5, 407–410.
- tenOever, B. R., Servant, M. J., Grandvaux, N., Lin, R. & Hiscott, J. (2002).** Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* 76, 3659–3669.
- Zhang, X., Glendening, C., Linke, H., Parks, C. L., Brooks, C., Udem, S. A. & Oglesbee, M. (2002).** Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol* 76, 8737–8746.

1.2. Résultats complémentaires.

1.2.1. Production d'AcMs contre la région variable aa 421-490 C-terminale et analyse de ces AcMs en cELISA.

La cartographie de l'épitope de l'AcM 38-4 (utilisé dans le test cELISA PPR) a été réalisée et celui-ci est localisé dans la région N-terminale de la protéine N PPRV (Choi et al, 2005b). Au cours de nos travaux nous avons montré que cet épitope est de structure conformationnelle et le domaine 121-145 de la région N-terminale de la protéine N PPRV est essentiel pour sa formation (**article 2**). Ainsi comme pour l'AcM IVB2, la localisation de l'épitope de l'AcM 38-4 expliquerait son déplacement par les anticorps anti-N RPV. Il nous a semblé nécessaire de produire de nouveaux AcMs anti-N spécifiques pour chaque virus, de la région hypervariable C-terminale, longue de 70 aa. Nous avons pensé que des AcMs dirigés contre cette région seraient moins sujet à un déplacement par les anticorps anti-morbillivirus hétérologues et permettraient d'éviter les réactions de détections croisées observées avec les tests cELISA N PB et N PPR actuels. Ainsi, dans un premier temps des AcMs dirigés contre la séquence aa 421-490 de la protéine N de PPRV ont été produits et testés en cELISA. Pour cela le domaine aa 421-490 a été exprimé et a servi à l'immunisation de souris pour la production d'AcMs.

1.2.1.1. Expression des aa 421-490 de la protéine N PPRV *in vitro* et immunisation de souris Balb/c pour la production d'anticorps.

Le cDNA correspondant au gène de la protéine N de PPRV cloné dans le plasmide pT7T3D (Diallo et al, 1994) a été amplifié par PCR avec l'enzyme *Pfu* DNA polymérase (Stratagene®) et les amorces Np62 (5'atggctactctccttaaag3') et T3 (5'aattaaccctcactaaaggg3'). Après digestion par l'enzyme de restriction Not I, le produit amplifié a été cloné dans le plasmide pFastBac HTb (Invitrogen) entre les sites des enzymes de restrictions Stu I et Not I pour générer le plasmide pFastBacN. A partir de ce plasmide une PCR a été réalisée avec les amorces PPR421N (5'cagcataaaacagatgagggagagtc3') et Bac2 (5'acaacgcacagaatctagcg3') et l'enzyme *Pfu* DNA polymérase (Stratagene®) pour récupérer le fragment nucléotidique correspondant à la séquence aa 420-525 de la protéine N. Ce fragment digéré par l'enzyme de restriction Xho I a été à son tour inséré dans le plasmide pIVEX-MBP (Roche®) entre les sites Stu I et Xho I pour donner le plasmide pIVEX-MBPN420-525. A

partir de ce plasmide, une délétion de la séquence nucléotidique des aa 491 à 525 a été réalisée selon la stratégie de mutagenèse par PCR (Ailenberg and Silverman, 1997) avec les amorces 490R (5'ptctttgagcctcacgagggttttgac3') et pTAG (5'ptgagcagacgcaccctccgtccaaatc3') phosphorylés en leur extrémité 5'. La ligation des bouts 5'avec les bouts 3'des produits de PCR de délétion a généré un nouveau plasmide, le pIVEX-MBPN421-490. Les différents plasmides obtenus au cours des différentes étapes ont été propagés avec les bactéries DH5 α (Invitrogen) et purifiés avec le kit Qiagen DNA plasmid purification (Qiagen). Le plasmide pIVEX-MBPN421-490 purifié a servi pour l'expression *in vitro* avec le système Rapid Translation System (Roche®) du fragment aa 421-490 en fusion avec la protéine MBP. La protéine correspondante a été analysée par SDS-PAGE (Figure 1) et purifiée selon le protocole du kit MagneHisTM Protein Purification System (Promega) et servi à l'immunisation de souris Balb/c pour la production d'anticorps monoclonaux.

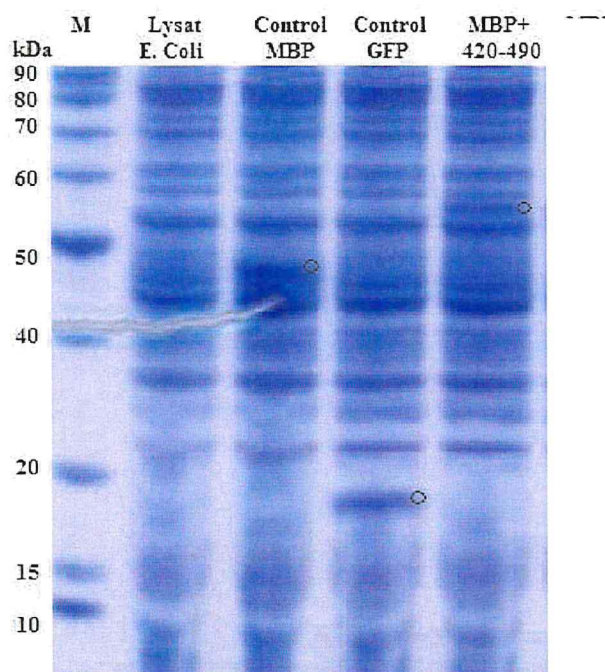


Figure 14: Expression de la séquence variable aa 421-490 de la protéine N en fusion avec la protéine MBP. Ligne 1: M marquer Benchmark (Invitrogen), ligne 2: lysat E.Coli (Mix de réaction RTS), ligne 3: control MBP (RTS pIVEX-MBP), ligne 4: control GFP (RTS GFP), ligne 5: RTS Séquence 421-490 in pIVEX-MBP tube 1, ligne 5: RTS Séquence 421-490 in pIVEX-MBP tube 2. ° Bandes correspondant aux protéines d'intérêt exprimées.

Trois AcMs (P4G5, P4A3 et P2A9) anti-N de PPRV et dirigés contre le domaine variable aa 421-490 ont été obtenus. L'épitope reconnu par chacun des AcMs (Figure 2) a été identifié à l'aide de peptides de synthèse (Tableau 4).

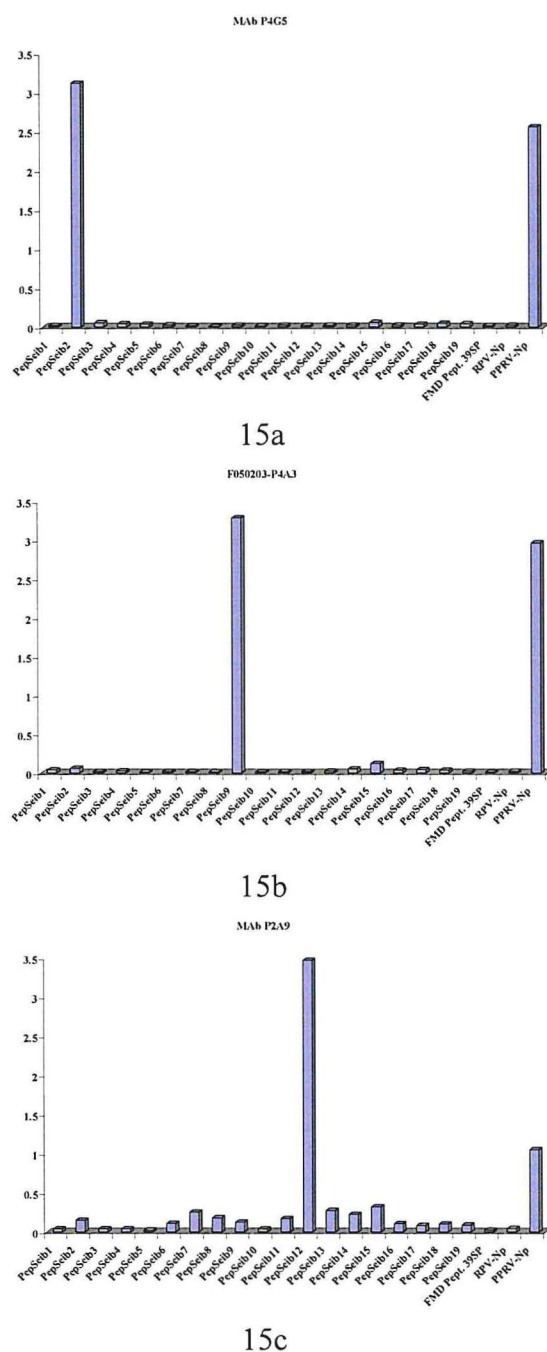


Figure 15: Détermination des épitopes des AcMs P4G5, P4A3 et P2A9 en iELISA avec à partir de peptides de la protéine N (Tableau 4). **15a:** épitope AcM P4G5 (PepSeib2: EGESPTPATREEVK), **15b:** épitope AcM P4A3 (PepSeib9 GETPGQLLPEIMQE) et **15c:** épitope AcM P2A9 (PepSeib12 ELSRESSQNPREAQ).

Peptides	Séquence aminoacide
PepSeib1: [aa] 421-434	QHKTDEGESPTPAT
PepSeib2: [aa] 426-439	EGESPTPATREEVK
PepSeib3: [aa] 431-444	TPATREEVKAAIPN
PepSeib4: [aa] 436-449	EEVKAAIPNGSEGR
PepSeib5: [aa] 441-454	AIPNGSEGRDTRKT
PepSeib6: [aa] 446-459	SEGRDTRKTRSGKP
PepSeib7: [aa] 451-464	TKRTRSGKPRGETP
PepSeib8: [aa] 456-469	SGKPRGETPGQLLP
PepSeib9: [aa] 461-474	GETPGQLLPEIMQE
PepSeib10: [aa] 466-479	QLLPEIMQEDELRS
PepSeib11: [aa] 471-484	IMQEDELSSRESSQN
PepSeib12: [aa] 476-489	ELSSRESSQNPRAEQ
PepSeib13: [aa] 481-494	SSQNPRAEQRSAEA
PepSeib14: [aa] 486-499	RAEQRSAEALFRLQ
PepSeib15: [aa] 491-504	SAEALFRLQAMAKI
PepSeib16: [aa] 496-509	FRLQAMAKILEDQE
PepSeib17: [aa] 501-514	MAKILEDQEEGEDN
PepSeib18: [aa] 506-519	EDQEEGEDNSQIYN
PepSeib19: [aa] 511-525	GEDNSQIYNDKDLLS

Tableau 4: Peptides de synthèse de la région C-terminale

1.2.1.2. Analyse des AcMs en cELISA.

Les trois AcMs P4G5, P4A3 et P2A9 ont été testés en cELISA et seul l'AcM P4G5 a donné des résultats intéressants en test de compétition avec des sérums anti-PPR. La compétition entre les sérums anti-PPR et le P4G5 a été comparé à celle des mêmes sérums avec l'AcM 38-4 utilisé en cELISA (Libeau et al, 1995) et dont l'épitope est localisé dans un domaine immunodominant. Chacun des AcMs P4G5 et 38-4 a été mis en compétition avec une série de dilutions d'un sérum de chèvre anti-PPR. Le pourcentage d'inhibition (PI) de la fixation de chacun des AcMs par chaque dilution de sérum a été calculé. Les résultats présentés à la Figure 16 montrent une parfaite similitude de compétition entre ces AcMs et les différentes dilutions du sérum anti-PPR.

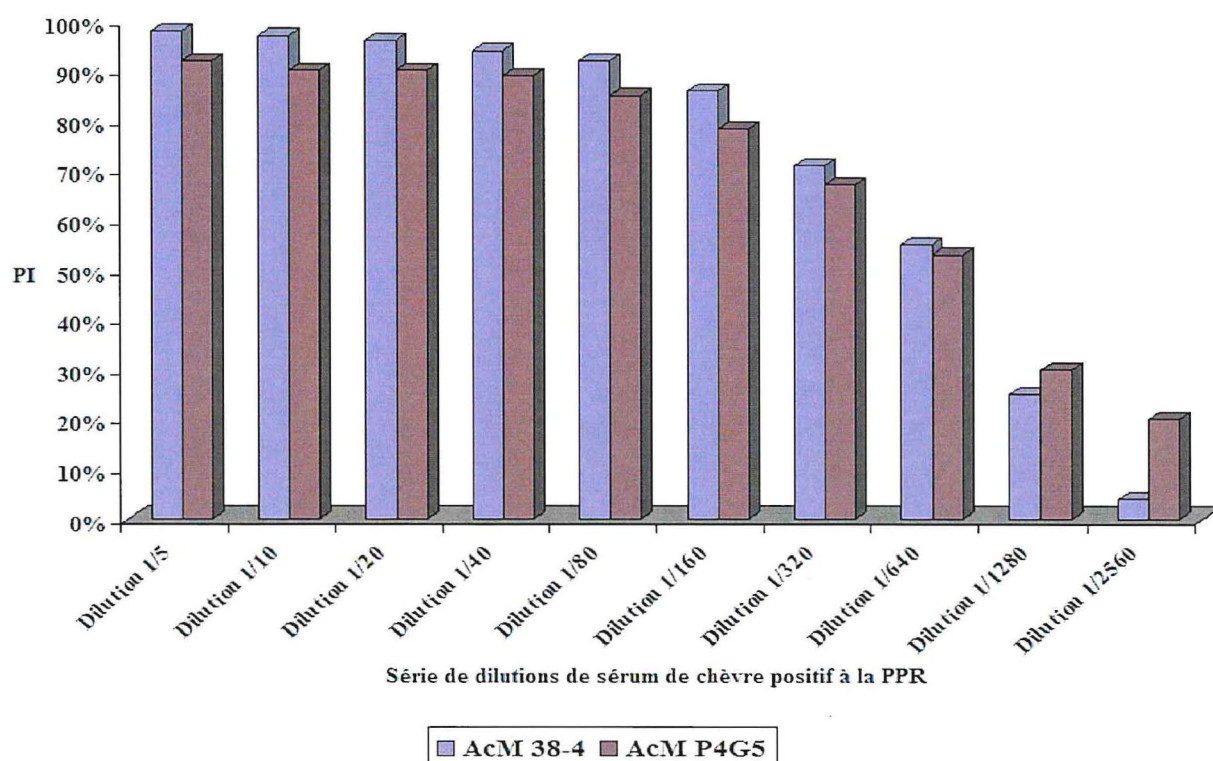


Figure 16: Comparaison des AcMs 38-4 et P4G5 en test cELISA. Une série de dilutions de sérum anti-PPR a été incubée avec une quantité fixe des AcMs 38-4 et P4G5. Le PI de chaque dilution de sérum avec l'AcM a été calculé. Toutes les dilutions de sérums avec des PI > 50% sont considérées positives. Les AcMs 38-4 et P4G5 présentent une parfaite similitude en réaction cELISA.

Nous avons par la suite cherché à déterminer si l'AcM P4G5 utilisé en cELISA pourrait permettre d'avoir un test spécifique pour le diagnostic sérologique de la PPR. Des sérums de bovins anti-PB ont ainsi été utilisés en cELISA avec l'AcM P4G5. Les résultats obtenus montrent que le test présente des réaction de détections croisées des sérums anti-PB, identiques à ceux du test basé sur l'AcM 38-4 (Tableau 5).

Sérum Anti- RPV	Nppr AcM P4G5	Nppr AcM 38-4
UC 82-D14	56.47	68.66
UC 82-D24	56.08	70.02
UC 82-D28	55.63	63.85
UC 82-D40	49.50	56.25
UC 82-D60	47.75	62.37
MZ 98-D14	63.37	68.83
MZ 98-D24	74.26	75.89
MZ 98D28	71.17	75.89
MZ 98-D40	59.22	67.76
MZ 98-D60	60.97	70.24
1978-D24	60.65	71.62
1978-D28	60.77	70.33
1978-D40	58.24	61.45
1978-D60	53.08	61.13
1946-D14	70.14	75.87
1946-D24	67.29	64.36
1946-D28	70.40	70.87
1946-D40	57.33	53.53
1946-D60	63.64	63.34
1977-D14	77.08	83.66
1977-D24	62.22	73.54
TE 40	81.52	92.11
TE 37	71.35	79.17
UG 63	54.89	54.87
UB 86	49.29	58.73
VF 97	47.98	56.03

Tableau 5: Pourcentage d'inhibition (PI) de sérums PB+ avec les tests cELISA utilisant respectivement les AcMs P4G5 et 38-4. Les sérums avec des PI > 50% sont considérés positifs.

1.2.2. Analyse de la capacité de la région variable en C-terminale à induire la production d'anticorps chez les animaux.

Pour comprendre le déplacement de l'AcM P4G5 par les anticorps anti-N de RPV en test cELISA, nous avons cherché à caractériser les différentes structures antigéniques localisées dans la séquence aa 421-490 de la protéine N de PPRV. Pour cela un gène synthétique (SynthN421-490) correspondant aux nucléotides de la séquence variable, aa 421-490, de la protéine N de PPRV dont les codons ont été optimisés pour une bonne expression dans les cellules eucaryotes a été produit à partir d'une série de PCR avec des amorces et la polymérase *Pfu* (Stratagene®).

Les amorces suivantes ont servi pour la synthèse du gène synthétique par PCR:

- Synt1:5'gggaagcttgccaccatggagcaccaccaccaccaccagcacagaccgacgagggcgagtcgcccacccc3'
- Synt2:5'agtcgccccccccgccacgcgcgaggaggtgaaggccgcatcccaacggctccgagggccgcgacaccaagc3'.
- Synt3:5'gccgcgacaccaagcgcacccgctccggcaagccccgcggcgagacccccggccagctgctgcccagatcatgc3'.
- Synt4:5'cccgatctactgggctcccgggggtctgggaggactcgcgggacagctcgtcctcctgcatgatctcgggca3'.

Chaque PCR a consisté à associer bout à bout les fragments de ce gène. Au total 3 séries de réaction PCR ont été réalisées pour la synthèse de l'ADN correspondant au gène:

- La première réaction de PCR a été réalisée sans matrice d'ADN avec les amorces 4 et 3 qui possèdent chacune une séquence complémentaire;
- Le produit de la PCR 1 a servi de matrice pour la deuxième réaction réalisée avec les amorces 4 et 2.
- Enfin les amorces 4 et 1 et le produit de la PCR 2 (utilisé comme matrice ADN) ont servi dans une troisième réaction de PCR.

Le programme d'amplification suivant a été utilisé pour chaque réaction de PCR:

- 1 cycle de 95°C/5min;
- 10 cycles de 95°C/30 sec, 45°C/30 sec (+0,5°C au cycle suivant), 72°C/2min ;
- 20 cycles 95°C/30 sec, 50°C/30 sec, 72°C/2min

Après synthèse, le gène synthétique a été digéré par l'enzyme de restriction Hind III dont le site de reconnaissance a été inséré en amont du codon d'initiation ATG sur l'amorce Synth1. Le produit digéré obtenu a été inséré dans le plasmide pcDNA4/Myc-His B (Invitrogen®) préalablement digéré avec les enzymes de restriction Hind III et EcoRV. Le couple d'amorces Gene Synth.Start (5'atggagcaccaccaccaccaccagc 3') et BGH reverse (5'tagaaggcacagtcgagg 3') a servi à amplifier de nouveau le gène SynthN421-490 inséré dans le plasmide pcDNA4/Myc-His B avec la polymérase *Pfu* (Stratagene®). Le produit de PCR a été digéré par l'enzyme de restriction Not I et cloné par la suite dans le plasmide pENTR.11 (Invitrogen®) préalablement digéré par les enzymes Xmn I et Not I. Le plasmide résultant (pENTR.11/SynthN421-490) a ensuite servi à la recombinaison avec le plasmide pDEST8 selon le protocole du kit GATEWAY Cloning (Invitrogen®) pour générer un nouveau plasmide pDEST8/N Synth421-490. Ce dernier a servi à son tour à générer grâce au kit Bacto-Bac (Invitrogen®), des baculovirus recombinants exprimant la protéine recombinante SynthN421-490.

La protéine N PPR recombinante (Article 2) et le polypeptide issu du gène SynthN421-490 produites dans des cellules SF21 ont été utilisés comme antigènes dans des tests iELISA avec des sérums de petits ruminants anti-PPR. Les résultats (Figure 17) indiquent que la protéine SynthN421-490 n'est pas reconnue par les sérums anti-PPR. Cela pourrait signifier que cette région de la nucléoprotéine de PPRV semble ne pas contenir de déterminants antigéniques capables d'induire la production d'anticorps chez les petits ruminants (ovins et caprins).

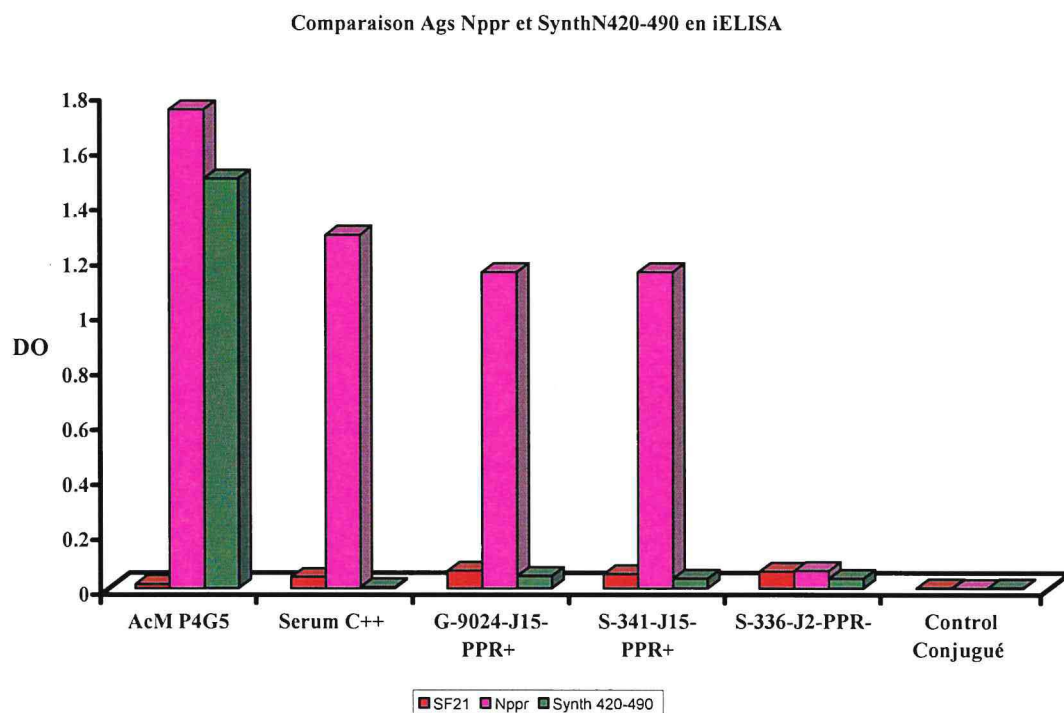


Figure 17: Résultats de réactions iELISA avec les protéines N et SynthN421-490 de PPRV comme antigènes. Trois sérums anti-PPR (C++, G-9024-J15 et S-341-J15) et un sérum négatif (S-336-J2) ont été utilisés dans cette étude. Les cellules SF21 non infectées ont servi de control antigène négatif. L'AcM P4G5 a permis de vérifier la sensibilisation des plaques avec les protéines.

2. Etude des sites d'interactions N-N et N-M de la nucléoprotéine.

2.1. . Sites d'interaction N-N.

2.1.1. Article 2. Sites d'interaction de la nucléoprotéine du virus de la peste des petits ruminants: Identification de deux domaines impliqués dans l'auto-assemblage.

Sanne Charles Bodjo, Mamadou Lelenta, Emmanuel Couacy-Hymann, Geneviève Libeau, Daniel Gargani, Emmanuel Albina et Adama Diallo. (Manuscrit accepté).

Résumé:

La nucléoprotéine s'auto-assemble autour de l'ARN génomique viral au cours de la réplication pour former la nucléocapside qui est utilisée comme matrice par la polymérase (Moyer et al, 1990; Egelman et al, 1989). L'ARN viral encapsidé est protégé contre les attaques de ribonucléases cellulaires. Exprimée seule, la nucléoprotéine des virus à ARN négatif a la capacité de s'auto-assembler sur les ARN cellulaires pour former des structures similaires à la nucléocapside virale. Le ou les domaines de la protéine N essentiels à son auto-assemblage (interactions N-N) pour la formation de la nucléocapside ont été étudiés dans cette partie de nos travaux. Des constructions de mutants de la protéine N tronquée ont été réalisées et exprimées. La protéine N entière et sept mutants tronqués soit en région N-terminale ou en région C-terminale ont été exprimés avec le système baculovirus. Chacun des mutants a été co-exprimé avec la protéine entière et les interactions entre protéines ont été analysées par immunoprécipitation. Les résultats obtenus montrent deux domaines d'interaction N-N, séquences aa 1 à 120 et 146 à 241, tous situés dans la région N-terminale. Le fragment aa 121 à 145, est lui important pour la formation et à la stabilité de la structure hélicoïdale de la nucléocapside. L'observation au microscope électronique des structures formées par la protéine entière et les mutants indique que la région N-terminale de la nucléoprotéine a un rôle capital dans la formation de la nucléocapside. En effet, la protéine entière et le mutant C-terminal (NΔ421-525) forment des structures type nucléocapsidique, tandis que les mutants tronqués dans la région N-terminale (NΔ1-145, NΔ121-145, NΔ121-241 et NΔ121-277) forment des structures cristallines. Ces résultats montrent l'absence de rôle majeur de la région C-terminale 420-525 dans l'interaction N-N pour la formation de la nucléocapside. A l'inverse la moindre délétion partielle dans la région allant des acides aminés 1 à 241 abolit la capacité de la nucléoprotéine de s'auto-assembler en une structure type nucléocapsidique.



Mapping the Peste des Petits Ruminants virus nucleoprotein: Identification of two domains involved in protein self-association

S.C. Bodjo^a, M. Lelenta^a, E. Couacy-Hymann^b, O. Kwiatak^c,
E. Albina^c, D. Gargani^d, G. Libeau^c, A. Diallo^{a,*}

^a Animal Production Unit, FAO/AIEA Agriculture & Biotechnology Laboratory, IAEA Laboratories,
Wagramerstrasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienna, Austria

^b Laboratoire Central de Pathologie Animale, B.P. 206 Bingerville, Cote d'Ivoire

^c Biological Systems Department-CIRAD, Control of Exotic and Emerging Animal Diseases (UPR15),
TA A-15/G Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^d Biological Systems Department-CIRAD, UMR BGPI, TA A-54/K Campus International de Baillarguet,
34398 Montpellier Cedex 5, France

Received 14 June 2007; received in revised form 6 August 2007; accepted 7 August 2007

Abstract

For *Mononegavirales*, the template for transcription and replication is not the naked RNA but the nucleoprotein (N) encapsidated genomic and anti-genomic RNA. Because of this central role in the replication of these viruses, N has been the subject of numerous structural and functional mapping studies. Here, we report on the cloning of the Peste des Petits Ruminants virus (PPRV) N gene into the baculovirus vector and the expression of the protein in insect cells. By electron microscopy observation, we have shown that this recombinant PPRV N forms nucleocapsid-like particles in insect cells in the absence of other PPRV proteins, as reported for other paramyxoviruses. As it is known that the formation of these particles is first linked to the self-assembly of N, we have made several deletions in the PPRV N gene and expressed these mutants in insect cells. Analysis of these proteins by immunoprecipitation and electron microscopy observation enabled us to map the N–N interaction domains into two regions of PPRV N: aa 1–120 and 146–241. The fragment aa 121–145, which is not conserved within the morbillivirus group, is also required for the formation/stability of the nucleocapsid helical structure.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: *Morbillivirus*; Peste des petits ruminants; Nucleocapsid; Mapping; Self-association

1. Introduction

Peste des Petits Ruminants (PPR) are an acute and highly contagious disease of small ruminants. It is endemic in many countries in Africa, the Middle East, the Near East and South Asia where it causes high mortality with significant economic losses. Clinical characteristics include pyrexia, ocular and nasal discharges, erosive stomatitis and diarrhoea. The causal agent is a virus, the peste des petits ruminants virus (PPRV), which belongs to the genus *Morbillivirus* in the family *Paramyxoviridae* (Gibbs et al., 1979). Other members of the genus include rinderpest virus (RPV), canine distemper virus (CDV),

measles virus (MV), phocine distemper virus (PDV) and dolphin *Morbillivirus* (DMV) (Barrett et al., 1993; Diallo, 1990). Morbillivirus particles are composed of many helical ribonucleocapsid copies packed inside a “bag” formed by the envelope which derives from the host plasma membrane and into which are inserted three proteins: the matrix protein (M) covering the internal face of the envelope and the two external glycoproteins, the fusion (F) and the hemagglutinin (H) proteins (Diallo, 1990; Rager et al., 2002). Each copy of the ribonucleocapsid consists of a single-stranded RNA of negative sense entirely wrapped by the nucleoprotein (N), which has two associated minor viral proteins, the phosphoprotein (P) and the large protein (L), the viral RNA dependent RNA polymerase (RdRp). For all negative sense single-stranded RNA viruses, the order *Mononegavirales*, genomic or anti-genomic RNA is never naked in the host cell but is always encapsidated by N.

* Corresponding author. Tel.: +43 1 2600 28 355; fax: +43 1 2600 28 222.
E-mail address: Adama.diallo@iaea.org (A. Diallo).

Only this ribonucleocapsid structure is used as a template by the RdRp for both transcription and replication (Egelman et al., 1989; Moyer et al., 1990). Thus, N plays a central role in virus replication and has been the focus of many studies to unravel its structural and functional information along with its interactions and with other viral components. Apart from the Ebola virus, whose N protein needs the collaboration of two other viral proteins, it has been shown that the sole expression of the *Mononegavirales* N protein results in the formation of nucleocapsid-like structures by the non-specific association of the recombinant N to the RNA of the expression cell (Bhella et al., 2002; Buchholz et al., 1993; Errington and Emmerson, 1997; Fooks et al., 1993; Huang et al., 2002; Karlin et al., 2002; Sphener et al., 1991, 1997). However, in the presence of the viral P protein, this non-specific RNA binding by N is inhibited. The co-expression of both N and P results in the formation of a soluble complex named N⁰P which promotes specific binding to the genomic or anti-genomic RNA if it is present (Curran et al., 1995; Sphener et al., 1991, 1997). The viral genomic assembly is initiated by the specific binding of N⁰P to the viral leader or trailer RNA and this is followed by a cooperative assembly of N on the growing chain through N–N and N–RNA interactions (Lamb and Kolakofsky, 2001). In the case of MV, it has been shown that N undergoes a conformation change into a highly folded form, probably through self-association, before its association into the pre-initiated ribonucleocapsid (Gombart et al., 1993). Amino acids which are involved in this maturation of MV N protein have been mapped to two-thirds of the N-terminus of the protein, as is the case for the Sendai virus, another paramyxovirus (Bankamp et al., 1996; Buchholz et al., 1993; Liston et al., 1997; Myers et al., 1999). So far MV is the only morbillivirus for which the nucleoprotein self-association has been studied to identify the protein domains involved. In this paper, we report the results of a study on the N–N interactions of a second morbillivirus, PPRV. By a deletion of mutagenesis study, we demonstrate that two zones of the PPRV N, aa 1–120 in the N-terminus and aa 146–241 in the central conserved region, are required for the formation of nucleocapsid-like particles that were formed by PPRV N produced in insect cells by recombinant baculoviruses. The small fragment aa 121–145, which is not conserved within the morbillivirus group (Diallo et al., 1994), is also required for the formation/stability of the nucleocapsid structure.

2. Materials and methods

2.1. Generation of PPRV N protein deletion mutants

The cDNA corresponding to the PPRV N protein gene cloned into the pT7T3D plasmid (Diallo et al., 1994) was amplified by PCR using *Pfu* DNA polymerase (stratagene) and the following primers: the PPRV N gene specific primer Np62 and the T3 primer (see Table 1) binding to the plasmid backbone downstream to the 3' end of the PPRV N gene. After digestion by the restriction enzyme NotI, the amplified product was subcloned into the plasmid pENTR 11 (invitrogen) between the Xmn I and NotI sites to yield pENTR/N. From this new plasmid, PPRV N cDNA was transferred into the pDEST8 plasmid by using the gateway cloning kit (invitrogen) to obtain pDestN. From this, seven deletion mutants (Fig. 1) were generated by PCR mutagenesis strategy (Ailenberg and Silverman, 1997) using phosphorylated primers (Table 1). These mutants were named as follows: pDestNΔ1–145; pDestNΔ1–241; pDestNΔ121–145; pDestNΔ121–241; pDestNΔ121–277; pDestNΔ421–490; pDestNΔ421–525. *Escherichia coli* DH5α cells were used for the propagation of plasmids obtained in the different steps of this study. The plasmids were purified with the Qiagen DNA plasmid purification kit (Qiagen).

Before their use to generate recombinant baculoviruses through a bacmid (gateway cloning kit, invitrogen), inserts in the plasmid pDestN and its derivate deletion mutants were sequenced on an ABI prism 3130 xl genetic analyzer (applied biosystem) to confirm the sequence of the desired protein. The insect cells *Spodoptera frugiperda* SF21 were used to propagate the recombinant viruses. The cells were cultured at 27 °C in Grace's insect medium supplemented with 10% of foetal calf serum. The expression of the recombinant proteins was analyzed by gel electrophoresis and Western blot. For this, 96-well microplates were seeded with 20 000 cells/well and infected with the recombinant virus at the dose of 10× of infection (MOI). At 72 h of post-infection, the supernatant was removed and the cells were lysed in 500 μl of SDS-PAGE sample loading buffer. After heating the sample at 70 °C for 10 min, 10 μl was submitted to SDS-PAGE (NUPAGE gel, invitrogen). Proteins from the gel were then electro-transferred to 0.2 μm PVDF membrane (invitrogen). The proteins that were fixed onto the membrane were then probed for 1 h at room temperature with a mixture of the monoclonal antibodies (mAbs) 38-4 and P4G5 diluted

Table 1
List of the deletions and the primers used in the amplification of the PPRV nucleoprotein gene for the construction of the different recombinants

Plasmids	Amino acid deleted	Primers used for deletion
pDestNΔ1–145	1–145	ATTL1R: aaagcctgctttttgtacaa; PPR146N: gttgatccttttttacttccactc
pDestNΔ1–241	1–241	ATTL1R: aaagcctgctttttgtacaa; PPR242N: aggacccccggcaacaagccaagg
pDestNΔ121–145	121–145	PPR120R: accacgtgatgcaaaaggtcaaccc; PPR146N: gttgatccttttttacttccactc
pDestNΔ121–241	121–241	PPR120R: accacgtgatgcaaaaggtcaaccc; PPR242N: aggacccccggcaacaagccaagg
pDestNΔ121–277	121–277	PPR120R: accacgtgatgcaaaaggtcaaccc; PPR278N: gaaccatgtatcctgcattagcc
pDestNΔ421–490	421–490	PPR420R: gaggaaggagacactgcgcctgtcgagg; PPR491N: tcgctgaggcactcttcaggctgc
pDestNΔ421–525	421–525	PPR420R: gaggaaggagacactgcgcctgtcgagg; pTAG: ptgagcagacgcacccctcgtccaaatc
pEntR/N and pDest/N	0	Np62: atggctactctccttaaaag; T3 primer: aattaacctcactaaaggg

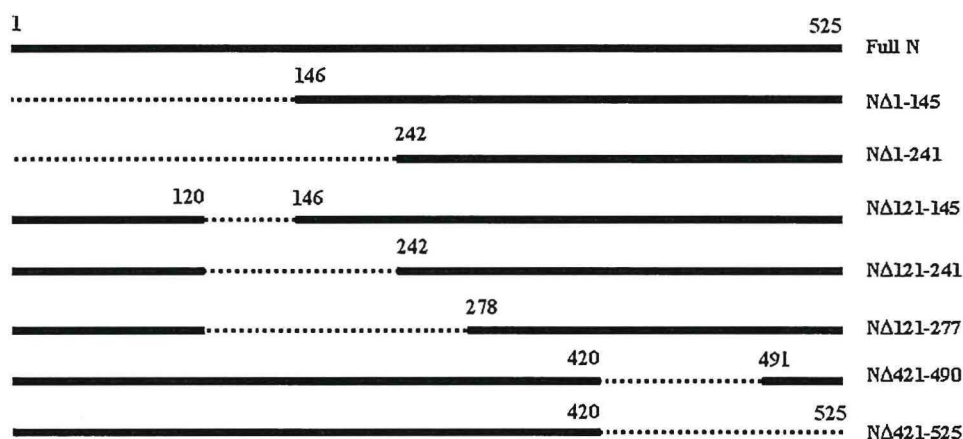


Fig. 1. Schematic representation of the deletion mutants of PPRV N protein. Deletions are made in the PPRV N gene by PCR as indicated in Section 2 and using the primers presented in Table 1. The name of each protein mutant corresponds to the amino acid sequence that has been deleted. The deletion is represented by the dots.

into phosphate-buffered saline (PBS [pH 7.4]) containing 0.5% tween and 5% powder milk. After washing the membrane twice with PBS, the immune complexes were detected using goat anti-mouse immunoglobulin antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRPO), with subsequent detection of signal using the ECL system (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

2.2. Mapping the epitope of PPRV N protein mAbs

Two anti-PPRV N protein mAbs were used in the study: mAb 38-4 produced against the full N protein (Libeau et al., 1997) and mAb P4G5 that was produced against PPRV N C-terminus (Lelenta et al., unpublished data). The areas recognized on the PPRV N protein by these mAbs were identified by analysing their reaction by Western blot against the recombinant PPRV full N protein and the deletion mutants that were produced in insect cells. The Western blot study was performed by using the mAbs 38-4 and P4G5 individually on the blot which was obtained in 2.1 above but after stripping the membrane by submerging it in stripping buffer (100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl and pH 6.7) for 15 min at 65 °C with occasional agitation. Then, it was washed in PBS-tween twice for 10 min and incubated in blocking buffer for at least 1 h before performing detection. The epitope structure recognized by mAbs 38-4 and P4G5 was also analyzed by indirect ELISA (iELISA). For that, the insect cells-expressed recombinant PPRV full-length N protein was denatured in 4.5 M urea solution at 65 °C for 10 min. This N solution was used as antigen to coat the 96-well plate (MaxiSorb microplate, Nunc) for the iELISA. The native recombinant PPRV N protein and the non-infected SF21 cell lysate were used as controls.

2.3. Identification of N–N interactions domains

To map the N–N interaction domains, insect cells were co-infected with the recombinant baculovirus expressing the full-length N protein and each of the N deletion mutant recombinant baculovirus at the dose of 10 m.o.i. for each virus. At 72 h of post-infection, the cells were harvested and centrifuged at

2000 rpm for 10 min. The cell pellets were washed with NTE buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM and EDTA 5 mM) and then centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The pellets were re-suspended in lysis buffer, which was prepared by supplementing NTE buffer with 1% triton 100×, iodoacetamide 5 mM, PMSF 1 mM and the Roche protease inhibitors cocktail at the dose recommended by the supplier (Roche). The lysate was clarified by centrifugation at 2000 rpm for 10 min. To observe the interaction between the full-length and the deleted N mutants, the lysates were incubated for 2 h at +4 °C either with mAb P4G5 when the mix contained C-deleted mutants (NΔ421–490 and NΔ421–525) or with mAb 38-4 when it contained N-deleted mutants (NΔ1–145, NΔ1–241, NΔ121–145, NΔ121–241 and NΔ121–277). Then, protein A-sepharose in NTE (50 µl of 50%) was added to the mix and the incubation was continued for another 2 h at +4 °C. Immune complexes were washed for five times with lysis buffer and twice with PBS-T, then analyzed by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western blot analysis as indicated above, but using a mixture of 38-4 and P4G5 mAbs as primary antibodies.

2.4. Production and purification of N protein and deletion mutants

Insect cells in 150 cm² flasks were infected with either the recombinant baculovirus expressing PPRV full-length N protein or the mutants at an m.o.i. of 10. A total of 10 flasks corresponding to about 3 × 10⁸ cells were used for the production of each type of protein. At 3 days of post-infection, cells were harvested and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The cell pellets were washed with approximately 50 ml of NTE buffer and then re-suspended in 3 ml of lysis buffer. The lysates were treated with RNase A (200 µg/ml, Sigma) and DNase I (5 units/ml, Sigma) on ice for about 4 h. They were then layered on top of a preformed linear 10–60% (w/w) sucrose gradient (3.8 ml of 10% and 6.2 ml of 60%) prepared in NTE buffer and were submitted to centrifugation in a SW40 rotor (Beckmann) at 110,000 g for 30 min at +4 °C. Following centrifugation, samples were collected top down in 0.5 ml fractions and analyzed by iELISA using a mixture of the mAbs P4G5 and 38-4. Positive fractions were pooled

and dialyzed in a D-tube dialyzer (Novagen) against NTE buffer and then centrifuged on a continuous linear 20–40% (w/w) caesium chloride (CsCl) gradient in a SW40 rotor at 250,000 g for 18 h at +16 °C. Samples were collected in 0.5 ml fractions from the top and analyzed by iELISA as described above. The positive fractions of each protein sample were pooled and concentrated by dialysis against NTE buffer in a D-tube dialyzer. The RNA content in the different purified N proteins was established after reading the absorbance at 280 and 260 nm and determination of the 260/280 ratios.

2.5. Electron microscopy (EM) analysis of purified PPRV N

In order to observe whether the amino acid sequence change had an impact on the arrangement of the nucleocapsid structure, the different PPRV N proteins that were purified above were examined by electron microscopy. A drop of the purified sample was applied to a carbon-coated grid. When the suspension had partly dried, the grid was washed by touching it three times to the surface of a drop of distilled water. After removing excess water by touching the grid onto a filter paper, a small drop of 2% ammonium molybdate was applied to the grid for 1 min to negatively stain the sample. The grid was dried with filter paper from the edge. Visualization up to 25 000× was made via a JEOL 100CX II.

The samples were also examined by EM after immunogold labeling. Grids previously coated with purified PPRV N proteins were floated for 30 min on PBS containing either the mAb P4G5 or the mAb 38-4 diluted at 1% in 0.1 M phosphate buffer containing 0.1% tween 20. The grids were then washed with phosphate/tween buffer and floated on a buffer containing goat anti-mouse antibodies coupled to 10 nm colloidal gold particles diluted at 1/25. After 30 min incubation, the grids were washed and prepared for electron microscopy observation.

3. Results

3.1. Generation of deletion mutants of the PPRV N protein

In order to map the domain involved in the PPRV N self-interaction, seven deletions were introduced in the PPRV N gene either at 5'end, the 3'end or at internal position. The schematic representation of the deletions is shown in Fig. 1. The full-length PPRV N and the truncated proteins were all well expressed in insect cells by the corresponding recombinant baculoviruses. As shown in Fig. 2a, protein bands corresponding to the expected molecular weights of the different recombinant N proteins (Table 2) were found in the SDS-PAGE and Western blot analysis. However, breakdown products were detected in the lines of the full-length N and of some N mutants (NΔ1–145,

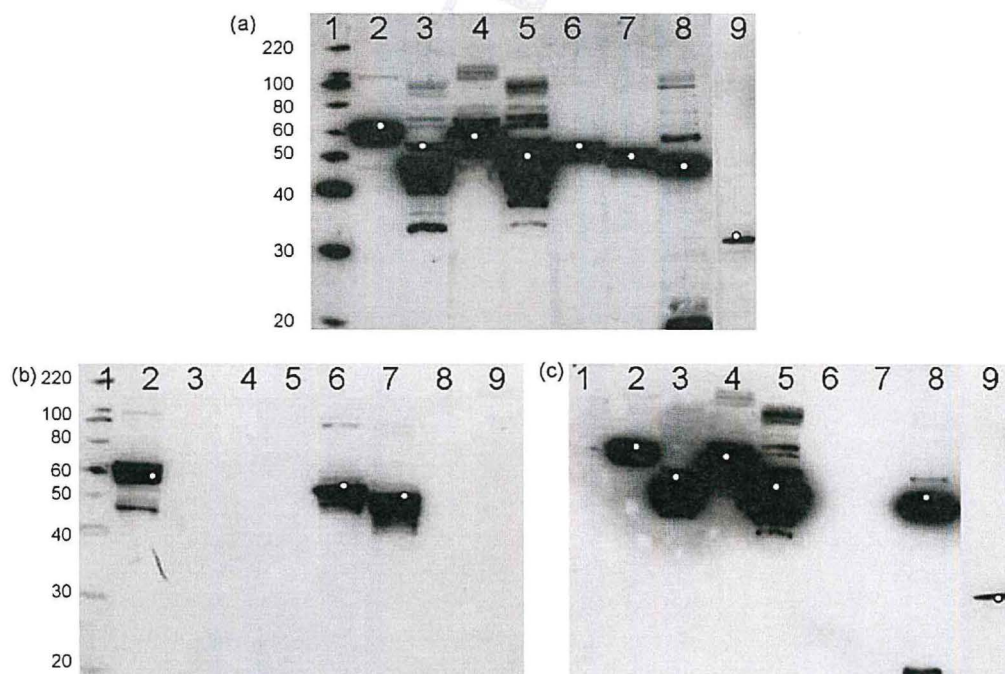


Fig. 2. Identification of recombinant PPRV N produced in insect cells and mapping the epitopes recognized by the mAbs 38 and P4G5 on N by Western blot analysis. Total proteins of insect cells infected with the different baculoviruses carrying the PPRV N gene, full-length and deleted mutants are separated on SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane. The PPRV N protein is detected on the membrane by using the ECL kit and according to the manufacturer's instructions. Primary antibodies are specific PPRV N monoclonal antibodies mAb 38-4 and P4G5. For (a), a mix of the two mAbs was used. mAb 38-4 and P4G5 were individually used for b and c, respectively. Lane 1: Protein Molecular Weight Markers MagicMark xp (invitrogen); lane 2: full N; lane 3: NΔ1–145; lane 4: NΔ121–145; lane 5: NΔ121–241; lane 6: NΔ421–490; lane 7: NΔ421–525; lane 8: NΔ121–277; lane 9: NΔ1–241. The same blot was used for the three Western blot tests. After one completion of Western blot, and before performing another one, the membrane was submitted for stripping to remove the bound antibodies as indicated in Section 2. This process also partially removes proteins directly bound to the membrane. Because of that, the molecular weight markers bands become weaker after each stripping and are not visible on the last Western blot (c). Note: The MW markers 100 and 120 kd are too close (the upper band is the 120 kd protein).

Table 2
Summary of the characteristics of the PPRV N proteins (full-length and mutants) used in the study

Proteins	Molecular weight (kDa)	Protein concentration (ng/μl)	Absorbance ration 260/280	mAb 38-4 reactivity	mAb P4G5 reactivity	Co-immunoprecipitation with full-length N	Nucleocapsid observed in EM
Full-length N	62	450.85	1.54	+	+	+	+
NΔ1–145	45	249.4	1.23	–	+	+	–
NΔ1–241	33	ND	ND	–	+	–	–
NΔ121–145	59	195.29	1.42	–	+	+	–
NΔ121–241	48	95.99	1.62	–	+	+	–
NΔ121–277	43	214.95	1.41	–	+	+	–
NΔ421–490	53	877.58	1.28	+	–	+	+
NΔ421–525	50	905.63	1.29	+	–	+	+

The different PPRV N proteins were produced in insect cells and purified as indicated in Section 2. For the evaluation of the RNA content in the different protein preparations, their optical density was determined at absorbance of 280 and 260 nm with the Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer. The concentration of the protein was determined according to the OD value at 280 nm. Results of Figs. 2–5 are included in this table.

NΔ121–145, NΔ121–241 and NΔ121–277). In some cases, bands of proteins migrating with molecular weights higher than the expected size were also found. Since those bands are recognized by the mAbs 38-4 and P4G5, they are certainly oligomers of recombinant PPRV N that are not dissociated into monomers in the protein denaturation conditions used before loading the samples into the gel.

3.2. Mapping epitope of mAbs 38-4 and P4G5 on PPRV nucleoprotein

The results presented in Fig. 2b and c shows the individual reactivity of mAbs 38-4 and P4G5 with PPRV full-length and the different N protein mutants by Western blot analysis. The mAb 38-4 reacted only with the full-length N protein and the C-terminus truncated mutants NΔ421–490 and NΔ421–525. In contrast, and as expected, mAb P4G5 produced against the PPRV N protein C-terminus, reacted with all proteins except these two C-terminus mutant proteins. These results, summarized in Table 2, indicate that the epitopes recognized by the mAbs 38-4 and P4G5 are located at the N- and C-terminus region, respectively. The deletion of amino acids (aa) no. 121–145 was enough to eliminate the epitope recognized by the mAb 38-4. The second mAb, P4G5, which recognizes the C-terminus of PPRV N, has a site located between aa 421 and 490 since the mutant lacking this fragment is not recognized by this mAb. In the iELISA, while the mAb 38-4 failed to recognize denatured PPRV N protein, mAb P4G5 reacted with both denatured and non-denatured antigens (data not shown). Those results indicate that the epitope recognized by the mAb 38-4 might be conformational.

3.3. Identification of N–N interactions domains

To map the regions of PPRV N protein involved in self-interactions, the strategy that was adopted was to use the immunoprecipitation technique to analyze the interactions between the PPRV N molecules synthesized in cells co-infected with the baculovirus expressing the full-length (N) and each of the N deletion mutants (NΔ). In that case, only N–N molecules

will be produced if the deletion has eliminated all potential interaction sites. But in the case of the existence of at least one of these sites despite the mutation, then three types of N will be produced in the co-infected cells: N–N, NΔ–NΔ and N–NΔ. By using a mAb is able to bind only to N in an immunoprecipitation test, N–N and N–NΔ complexes will be precipitated in the latter case but only N–N in the former. The separation of the immunoprecipitate on SDS-PAGE would reveal both N and NΔ bands if NΔ has still an N–N interaction domain. However, if NΔ does not have the N–N interaction site, then only N will be seen on the gel. By adopting this strategy, the mAb P4G5 was used to immunoprecipitate the protein mixture with C-terminus truncated mutants (NΔ421–490 and NΔ421–525) while the mAb 38-4 was used for the other mutants (NΔ1–145; NΔ1–241;

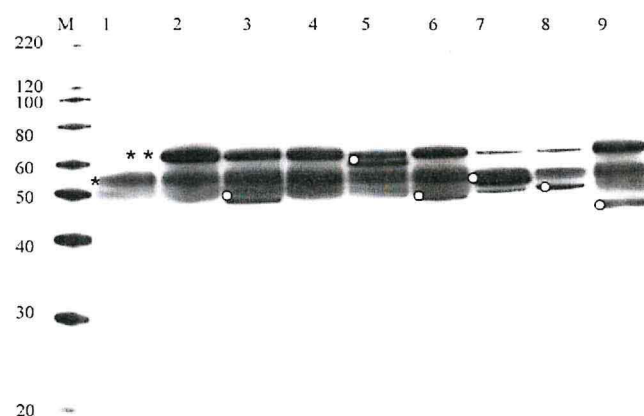


Fig. 3. Analysis of the interaction between the PPRV wild type N protein and various N deleted mutants. Insect cells were co-infected with recombinant baculovirus expressing full N and another baculovirus expressing each of the mutants. The cells were lysed in lysis buffer as indicated in Section 2. The PPRV N proteins were immunoprecipitated from the lysate by either the mAb 38-4 or mAb P4G5. The immune complex was separated by SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. The PPRV N proteins were detected by using the ECL kit and a mix of mAb P4G5 and mAb 38-4 as primary antibodies. Lane M: Protein Molecular Weight Markers MagicMark xp (Invitrogen); lane 1: control non-infected insect cells; lane 2: full N; lane 3: N + NΔ1–145; lane 4: N + NΔ1–241; lane 5: N + NΔ121–145; lane 6: N + NΔ121–241; lane 7: N + NΔ121–277; lane 8: N + NΔ421–490; lane 9: N + NΔ421–525. Note: *, immunoglobulin heavy chain; **, full-length N; ○, NΔ deleted mutants.

NΔ121-145; NΔ121-241; NΔ121-277). The results of the PAGE analysis of the different immune complexes are shown in Fig. 3. All mutants co-precipitated with N except NΔ1-241 (Fig. 3 and Table 2). These data indicate that all domains involved in the N self-association are located in the first 241 aa of the protein sequence.

3.4. Purification of the full-length and truncated N proteins

The sedimentation profiles of N and the different deletion mutants NΔ detected by iELISA with PPRV N specific mAbs are presented in Fig. 4. All proteins, except the deletion mutant NΔ1-241, were purified by ultracentrifugation.

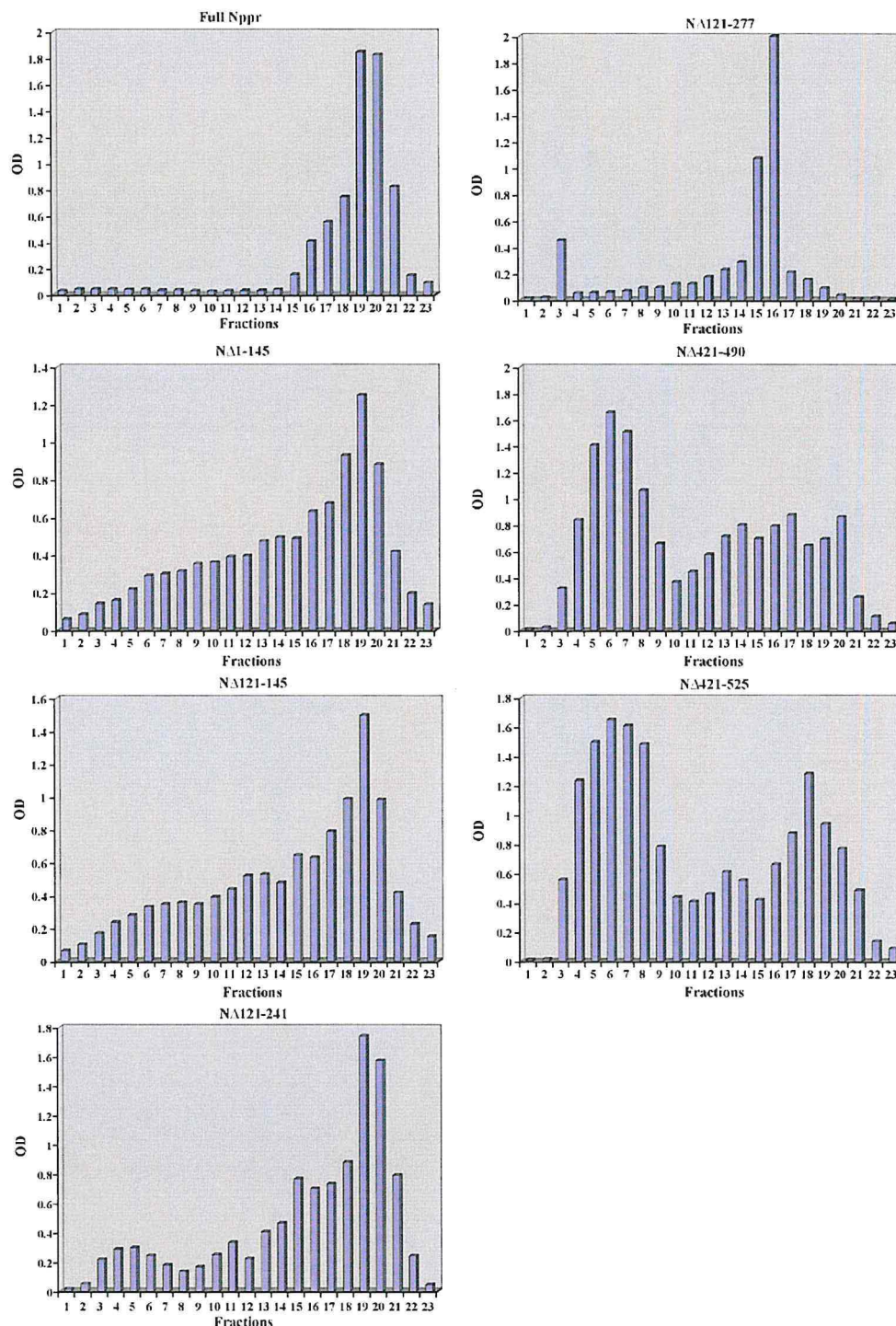


Fig. 4. Histogram of the distribution of the full-length N and mutants in a continuous linear 20–40% (w/w) CsCl gradient. Insect cells SF21 were infected with baculovirus expressing full-length N or deleted mutants at 10 m.o.i./cell for 72 h. The cells were then harvested and lysed. The lysate was overlaid onto a continuous linear 20–40% (w/w) CsCl gradient and submitted to ultracentrifugation overnight as indicated in Section 2. After the centrifugation, the gradient was collected by fraction of 0.5 ml volume and the presence of the PPRV N is detected by iELISA with specific PPRV N protein mAb.

No band was obtained with this mutant. Most of the full-length N protein was present in a peak distributed among fractions 16–21 of the gradient that corresponded to 30% CsCl. This value is identical for MV ribonucleocapsids (Bankamp et al., 1996). The N-terminus deletion mutants were distributed throughout the gradient, except mutant NΔ121–277,

which gave a main peak at fractions 15 and 16. The C-terminus deletion mutants NΔ421–490 and NΔ421–525 were also distributed throughout all fractions but gave two peaks: at fractions 3–9 (20–25% CsCl) and fractions 16–20 (30% CsCl). The data indicate that the N truncated proteins NΔ1–145, NΔ121–145, NΔ121–241, NΔ421–490 and NΔ421–525 can

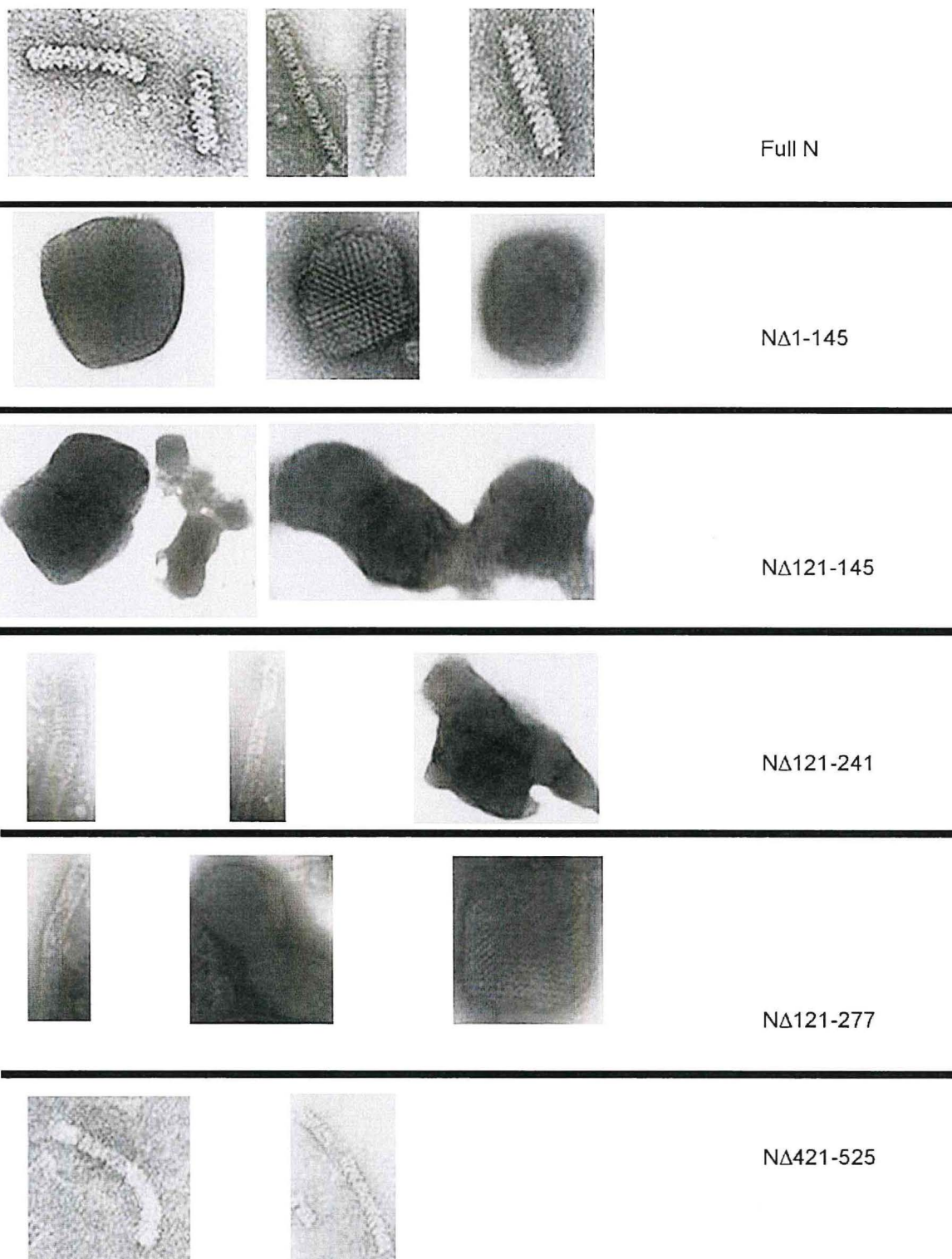


Fig. 5. Electron microscopic observation of purified PPRV N protein. Purified proteins were re-suspended in PBS and coated onto grids for electron microscopy (EM) observation in a JEOL 100CX II electron microscope at 80 kV at 70 000 $\times$.

generate structures which are different from those formed by full N.

According to Mavrikakis et al. (2002), structures formed by the Marburg virus N protein which contain RNA have 260/280 absorbance ratio values between 1.19 and 1.76. Schoehn et al. (2004) has reported a similar result for N of Measles virus expressed in insect cells. In the present study, PPRV N and mutants had values between 1.23 and 1.62 (see Table 2). If the observations made by Mavrikakis et al. (2002) and Schoehn et al. (2004) are valid for all negative-stranded RNA viruses, then our results might indicate the presence of RNA in the structures formed by the different PPRV N proteins.

3.5. Electron microscopy analysis of PPRV N mutants for their capability to form the nucleocapsid structures

The electron microscopy observation results for PPRV N proteins purified by ultracentrifugation on a CsCl gradient are shown in Fig. 5. The full-length N protein showed herringbone-like structures resembling the nucleocapsids described for other paramyxoviruses (Bhella et al., 2002; Fooks et al., 1993). The C-terminus deletion mutants (N Δ 421–525 and N Δ 421–490) gave similar nucleocapsid structures as for the full-length N (data not shown for the mutant N Δ 421–490). Deletion mutants N Δ 1–145, N Δ 121–145, N Δ 121–241 and N Δ 121–277 formed aggregate crystalline structures. In addition to those aggregates, preparations of mutants N Δ 121–241 and N Δ 121–277 contained also helical structures which looked different from those of the full N. Immunogold labelling followed by electron microscopy observation showed that the crystalline structures were formed by N protein molecules like the helical structures (Fig. 6).

4. Discussion and conclusions

This study shows that N protein of PPRV is able to self-assemble into nucleocapsid-like particles in the absence of viral genomic RNA and other viral proteins, as previously shown with other negative single-stranded RNA viruses (Bhella et al., 2002; Errington and Emmerson, 1997; Fooks et al., 1993; Hummel et al., 1992; Karlin et al., 2002; Kho et al., 2003; Murphy et al., 2003; Samuel et al., 2002; Schoehn et al., 2004; Sphener et al., 1991; Warnes et al., 1995). Indeed the electron microscopy examination of purified N and also the C-terminus-deleted mutant N Δ 421–525 shows helical nucleocapsid-like structures similar to virus nucleocapsid. This indicates that the C-terminus (N-tail) is dispensable for nucleocapsid assembly, as previously reported for other paramyxoviruses (Kho et al., 2003; Kingston et al., 2004; Schoehn et al., 2004). However, we cannot exclude a contribution of this fragment in the final structure of the nucleocapsid. Indeed, although the N-tail deleted mutants form nucleocapsid helical structures similar to those of the full-length N, their centrifugation profiles through the CsCl gradient are not identical (see Figs. 4 and 5). It has been shown for the MV N protein that removal of the C-terminal, an intrinsically disordered fragment, results in a profound conformation change of the helical nucleocapsid which becomes more rigid than the full-length N nucleocapsid (Bhella et al., 2004; Longhi et al., 2003; Schoehn et al., 2004). The preparations of the mutants deleted in the N-terminus, aa 1–145, and in the central region produced aggregated structures. However, in the purified products of the central deletions mutants N Δ 121–241 and N Δ 121–277 helical structures are also found sometimes although they look different from those obtained with the full-

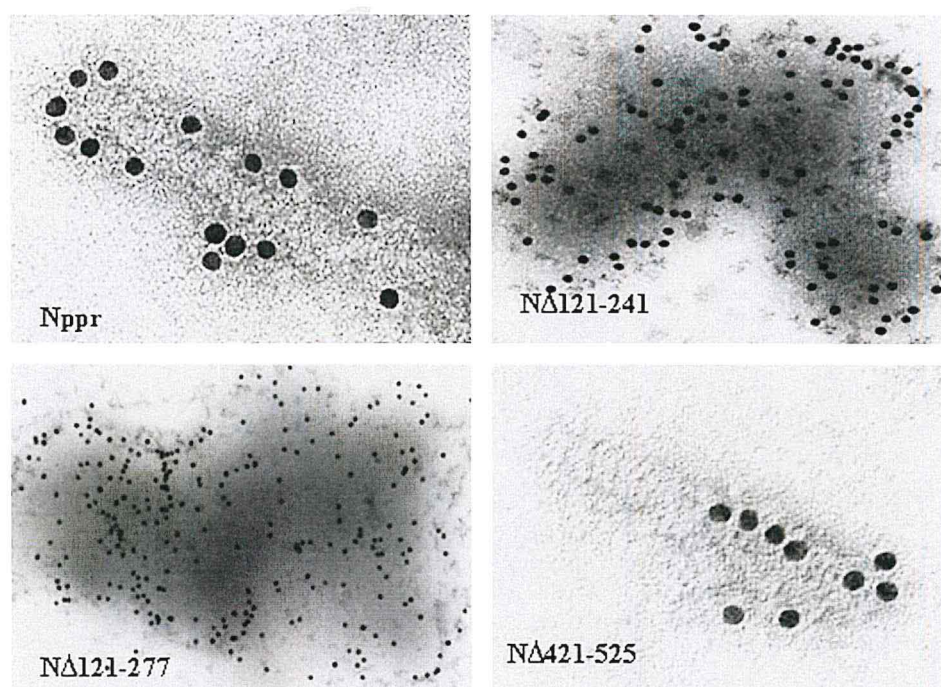


Fig. 6. Immunogold electron microscopy observation of PPRV N proteins. The purified full-length N or deleted mutants were coated on grids and detected using a PPRV specific mAb, 38-4 or P4G5. The fixation of the mAbs was revealed with goat anti-mouse antibodies coupled to 10 nm colloidal gold particles and observed by electron microscopy at 70 000 $\times$.

length N. Analysis by gel electrophoresis of the deleted PPRV N mutants produced during the study demonstrates the presence of protein bands at the expected sizes, but some others at lower apparent molecular weight were observed, probably due to breakdown products formed by cellular proteases, as reported for other paramyxoviruses. In particular, it was shown that the C-terminus region of paramyxoviruses N proteins is highly sensitive to proteolysis and is easily removed (Karlin et al., 2002; Murphy et al., 2003; Schoehn et al., 2004). The protein band migrating at the size of 20–25 kDa with the mutant NΔ121–277, recognized by the mAb P4G5 but not 38-4, is certainly the C-terminus of the PPRV N protein. The iELISA results obtained by testing the reactivity of the mAb 38-4 and P4G5 on denatured and non-denatured N indicate that mAb 38-4 might recognize a conformational epitope on N that is destroyed by the denaturation process used before coating the ELISA plate. Despite this characteristic, mAb 38-4 reacts very well in Western blot analysis with the full N and the two C-terminal deleted mutants, proteins which have conserved the normal nucleocapsid structure. However, the other mutants that have lost this structure, as well as those that have aggregated particles when observed in the electron microscope are not recognized by mAb 38-4. From these data we conclude that our SDS-PAGE conditions do not destroy all the nucleocapsid structure although partial reconstitution of this structure during the transfer of the protein onto the membrane cannot be excluded. However, apart from deletion mutant NΔ1–241, all other mutants showed additional protein bands with sizes greater than those expected, results indicating the presence of oligomeric structures which were not dissociated in the sample gel loading buffer during the protein denaturation step before the gel electrophoresis. A similar result was obtained with truncated N protein of respiratory syncytial virus (RSV) (Murphy et al., 2003).

Previous studies on N of different paramyxoviruses concluded that the N-terminus region was responsible for the N protein self-assembly (Bankamp et al., 1996; Buchholz et al., 1993; Kho et al., 2003; Kingston et al., 2004; Liston et al., 1997; Murphy et al., 2003; Nishio et al., 1999; Schoehn et al., 2004). Similar results were found during this study on N of PPRV. Here, however, all the data indicate that at least two domains are required for the formation of the nucleocapsid structure and they are localized in the first 241 aa of N. Indeed only mutant NΔ1–241 with a deletion covering all this region is incapable of N–N interaction as demonstrated by immunoprecipitation analysis of PPRV N protein from lysates of cells which were co-infected with N wild type and each of the truncated proteins. This result is supported by the inability of this mutant to form any structure that could sediment through the CsCl gradient. The mutant NΔ1–145 forms aggregates, an indication of the existence of the N–N interaction domain(s) between aa 145 and 241. Since the mutant NΔ121–241 also gives aggregates, we deduce that the N-terminus aa 1–120 has also at least one N–N interaction site. The amino acids which are involved in that interaction might be important for the formation of the helical structures since such elements are found, although in low amounts, in both purified NΔ121–241 and NΔ121–277 mutant along with the aggregates. Murphy et al. (2003) found similar

results for the nucleoprotein of respiratory syncytial virus where the aa sequence fragment 1–92 was sufficient to form a helical structure. The individual deletion of fragment aa 121–241 or aa 1–145 is not enough to completely abolish all N–N interactions. The mutant NΔ121–145 also forms aggregated structures which would suggest that the deleted fragment of this mutant, which is one of the two N variable long sequences within the morbillivirus group (Diallo et al., 1994), is important for the formation or stability of the nucleocapsid helical structure. For MV, it was demonstrated that aa 228–229 are critical for the formation of the nucleocapsid structure (Karlin et al., 2002). This might be the case also for PPRV N protein since those critical amino acids are in the region aa 121–241 which is identified in this study as one of the N–N interaction domains. This has still to be confirmed with amino acid point mutations studies (work in progress).

Acknowledgements

We thank Dr. John Crowther (Animal Production and Health Section of the Joint FAO/IAEA Programme) and Dr. Andrew Cannavan (Agrochemicals Unit, IAEA's Laboratories), for editing and commenting on the manuscript. This work was supported by the EC (contract INCO no. 003670) and the Wellcome Trust (contract GR/07578/MA) grants.

References

- Ailenberg, M., Silverman, M., 1997. Site-directed mutagenesis using a PCR-based staggered re-annealing method without restriction enzymes. *Biotechniques* 22, 624–630.
- Bankamp, B., Horikami, S.M., Thompson, P.D., Huber, M., Billeter, M., Moyer, S.A., 1996. Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology* 216, 272–277.
- Barrett, T., Visser, I.K., Mamaev, L., Goatley, L., van Bresse, M.F., Osterhaus, A.D., 1993. Dolphin and porpoise morbillivirus are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193, 1010–1012.
- Bhella, D., Ralph, A., Murphy, L.B., Yeo, R.P., 2002. Significant differences in nucleocapsid morphology within the *Paramyxoviridae*. *J. Gen. Virol.* 83, 1831–1839.
- Bhella, D., Ralph, A., Yeo, R.P., 2004. Conformational flexibility in recombinant measles virus nucleocapsids visualized by cryo-negative stain electron microscopy and real-space helical reconstruction. *J. Mol. Biol.* 340, 319–331.
- Buchholz, C.J., Spehner, D., Drillien, R., Neubert, W.J., Homann, H.E., 1993. The conserved N-terminus region of Sendai virus nucleocapsid protein N is required for nucleocapsid assembly. *J. Virol.* 67, 5803–5812.
- Curran, J., Marq, J.B., Kolakofsky, D., 1995. An N-terminal domain of the Sendai Paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J. Virol.* 69, 849–855.
- Diallo, A., 1990. Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Vet. Microbiol.* 23, 155–163.
- Diallo, A., Barret, T., Barbron, M., Meyer, G., Lefevre, P.C., 1994. Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste des petits ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. *J. Gen. Virol.* 75, 233–237.
- Egelman, E.H., Wu, S.-S., Amrein, M., Portner, A., Murti, G., 1989. The SV nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J. Virol.* 63, 2233–2243.
- Errington, W., Emmerson, P.T., 1997. Assembly of recombinant newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structure is inhibited by the phosphoprotein. *J. Virol.* 78, 2335–2339.
- Fooks, A.R., Stephenson, J.R., Warnes, A., Dowsett, A.B., Rima, B.K., Wilkinson, G.W., 1993. Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structure. *J. Gen. Virol.* 74, 1439–1444.

- Gibbs, E.P.J., Taylor, W.P., Lawman, M.J.P., Bryant, J., 1979. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus *Morbilivirus*. *Intervirology* 11, 268–274.
- Gombart, A.F., Hirano, A., Wong, T.C., 1993. Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67, 4133–4141.
- Huang, Y., Xu, L., Sun, Y., Nabel, G.J., 2002. The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol. Cell* 10, 307–316.
- Hummel, K.B., Erdman, D.D., Heath, J., Bellini, W.J., 1992. Baculovirus expression of the nucleoprotein gene of measles virus and utility of the recombinant protein in diagnostic enzyme immunoassays. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2874–2880.
- Karlin, D., Longhi, S., Canard, B., 2002. Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein result in an impaired self-association. *Virology* 302, 420–432.
- Kho, C.L., Tan, W.S., Tey, B.T., Yusoff, K., 2003. Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self-assembly and length-determination domains. *J. Gen. Virol.* 84, 2163–2168.
- Kingston, R.L., Baase, W.A., Gay, L.S., 2004. Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. *J. Virol.* 78, 8630–8640.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D., 2001. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Paramyxoviridae: The Viruses and their Replication in Fields Virology*, 4th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Libeau, G., Saliki, J.T., Diallo, A., 1997. Caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants: identification d'épitopes conservés ou de spécificité stricte sur la nucléoprotéine. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 50, 81–190.
- Liston, P., Batal, R., DiFlumeri, C., Briedis, D.J., 1997. Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Arch. Virol.* 142, 305–321.
- Longhi, S., Receveur-Brechot, V., Karlin, D., Johansson, K., Darbon, H., Bhella, D., Yeo, R.P., Finet, S., Canard, B., 2003. The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 18638–18648.
- Mavrakis, M., Kolesnikova, L., Schoehn, G., Becker, S., Ruigrok, R.W.H., 2002. Morphology of Marburg virus N-RNA. *Virology* 296, 300–307.
- Moyer, S.A., Baker, S.C., Horikami, S.M., 1990. Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J. Gen. Virol.* 71, 775–783.
- Murphy, L.B., Loney, C., Murray, J., Bhella, D., Ashton, P., Yeo, R.P., 2003. Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein. *Virology* 307, 143–153.
- Myers, T.M., Smallwood, S., Moyer, S.A., 1999. Identification of nucleocapsid protein residues required for Sendai virus nucleocapsid formation and genome replication. *J. Gen. Virol.* 80, 1383–1391.
- Nishio, M., Tsurudome, M., Ito, M., Kawano, M., Kusagawa, S., Komada, H., Ito, Y., 1999. Mapping of domains on the human parainfluenza virus type 2 nucleocapsid protein (NP) required for NP-phosphoprotein or NP-NP interaction. *J. Gen. Virol.* 80, 2017–2022.
- Rager, M., Vongpunsawad, S., Duprex, W.P., Cattaneo, R., 2002. Polyploid measles virus with hexameric genome length. *EMBO* 21, 2364–2372.
- Samuel, D., Sasnauskas, K., Jin, L., Beard, S., Zvirbliene, A., Gedvilaite, A., Cohen, B., 2002. High level expression of recombinant mumps nucleoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and its evaluation in mumps IgM serology. *J. Med. Virol.* 66, 123–130.
- Schoehn, G., Mavrakis, M., Albertini, A., Wade, R., Hoenger, A., Ruigrok, R.W.H., 2004. The 12 A structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J. Mol. Biol.* 339, 301–312.
- Sphener, D., Kirm, A., Drillien, R., 1991. Assembly nucleocapsid-like structure in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J. Virol.* 65, 6296–6300.
- Sphener, D., Drillien, R., Howley, P.M., 1997. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology* 232, 260–268.
- Warnes, A., Fooks, A.R., Dowsett, A.B., Wilkinson, G.W., Stephenson, J.R., 1995. Expression of the measles virus nucleoprotein gene in *Escherichia coli* and assembly of nucleocapsid-like structures. *Gene* 160, 173–178.

2.1.2. Résultats complémentaires: mutation des aa 228 à 229 (SL) de la protéine N.

Des mutations ciblées des aa serine (S) et leucine (L) respectivement aux positions 228 et 229 de la protéine N du virus de la rougeole ont montré que la protéine résultante perd la capacité de former des structures nucleocapsidiques (Karlin et al, 2002). Pour confirmer cela avec la protéine N de PPRV et montrer l'importance de la région N-terminale pour la formation de la nucléocapside, des mutations similaires ont été réalisées. Les codons TCC et TTA sur le gène de la nucléoprotéine de PPRV correspondant aux aa 228 (S) et 229 (L) hydrophobes ont été remplacés par les codons AAC et GAG codant respectivement pour les aa hydrophiles asparagine (N) et glutamate (E). La protéine recombinante NpNE résultante de cette mutation a été exprimée dans les cellules d'insectes (SF 21) avec le système baculovirus comme décrit dans l'article 2. Les AcM 38-4 et 33-4 et P4G5 ont servi à caractériser la structure formée par la protéine NpNE. Ces AcMs ayant un épitope conformationnel pour le 38-4 et linéaire pour les AcM 33-4 et P4G5.

Des tests de WB ont ainsi été réalisés avec les AcMs 38-4 et 33-4. Le résultat (Figures 18) montre que l'AcM 33-4 reconnaît les différentes formes exprimées de la protéine N, sauvage et mutée. A l'inverse l'AcM 38-4 ne détecte que la forme sauvage de la protéine N et non la forme mutée à cause probablement de la modification de l'épitope reconnu.

Des tests iELISA ont été également réalisés avec les protéines N normale, dénaturées (dans une solution d'urée 6M) et mutées NpNE pour confirmer les résultats de WB. Ces protéines ont été utilisées comme antigènes pour la sensibilisation des plaques de 96 puits pour étudier la réactivité des AcMs 38-4 et P4G5. Les résultats présentés à la Figure 18 indiquent que l'AcM 38-4 ne reconnaît que la structure normale de la protéine N PPRV et non celle dénaturée ou mutée confirmant ainsi le résultat de WB et par la même occasion la structure conformationnelle de l'épitope du 38-4. L'AcM P4G5 dont l'épitope est linéaire reconnaît toutes les différentes formes de la protéine N testées.

Cette étude indique que la mutation des aa hydrophobes S (228) et L (229) sur la protéine N par respectivement les aa N et E hydrophiles génère une importante modification structurale. La forme mutée semble incapable de former des structures de types nucléocapsidique, identiques à celles correspondant à la protéine N normale reconnues par l'AcM 38-4.

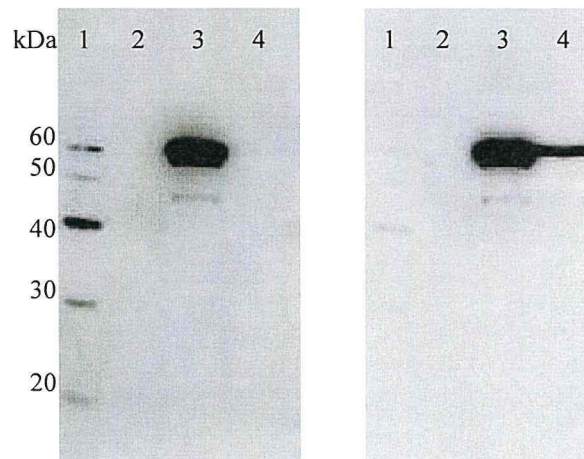


Fig. 17a: AcM 38-4

Fig. 17b: AcM 33-4

Figure 18: Analyse structurale des protéines native N PPRV et mutée NpNE avec les AcMs par WB. Les protéines sont transférées sur une membrane après un gel SDS-PAGE et détectées avec les AcMs AcM 38-4 (Figure 17a) et 33-4 (Figure 17b). 1: Marker MagicMark Xp (Invitrogen); 2: Lysat de cellules SF21; 3 : N PPRV; 4: NpNE.

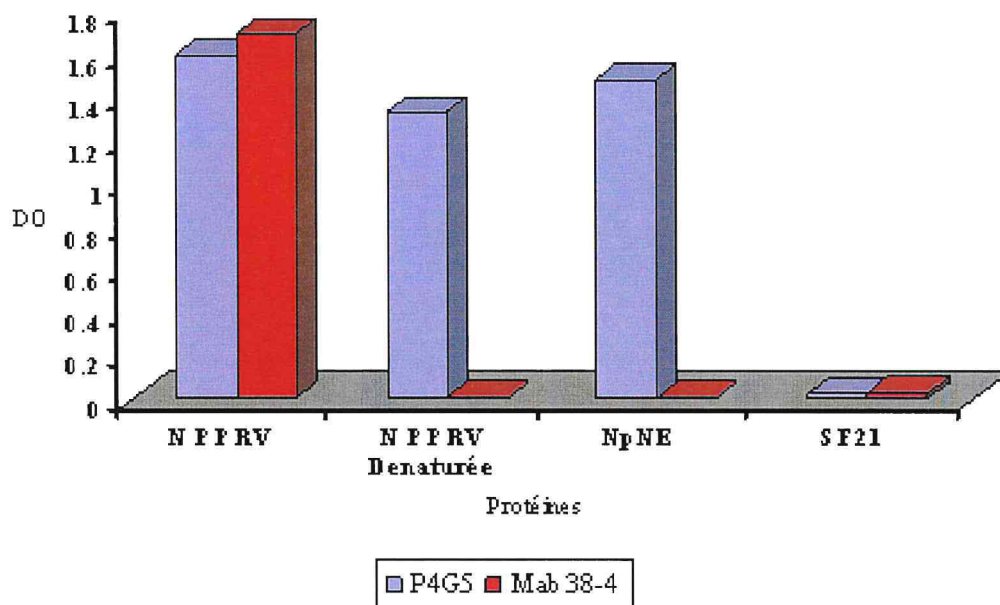


Figure 19: Réactivité des AcM 38-4 et P4G5 avec les protéines N PPRV native ou dénaturé et mutée NpNE préalablement fixées sur des plaques de 96 puits. Le lysat de cellules SF21 non infectées a servi de contrôle négatif antigène. L'AcM 38-4 réagit seulement avec la forme native de la protéine N PPRV. L'AcM P4G5 lui par détecte toutes les formes protéiques.

2.2. . Etude des sites d'interaction N-M sur la protéine N (manuscrit 3).

Les domaines conservés de la nucléoprotéine des morbillivirus contiennent des sites qui interagissent avec la protéine de matrice.

Sanne Charles. Bodjo, Mamadou Lelenta, Emmanuel Couacy-Hymann, Geneviève. Libeau, Emmanuel Albina et Adama Diallo. (En cours de rédaction).

Résumé:

La réplication des virus à ARN négatif commence par les étapes de transcription et de traduction des ARNm correspondant aux différentes protéines virales et la réplication du génome. Les différents composants viraux sont par suite assemblés et la particule virale bourgeonne à partir de la membrane plasmique cellulaire. Au cours de ces étapes, diverses interactions sont nécessaires. Ainsi la nucléocapside formée par l'auto-assemblage de la nucléoprotéine autour de l'ARN génomique (article 2) est compactée par la protéine M (Jayakar et al, 2004, Flood et al, 1999 ; Garoff et al, 1998 ; Newcomb et al, 1982). Diverses études ont montré que la protéine N interagit avec la protéine M (Coronel et al, 2001; Haffar, 1999), interaction N-M essentielle pour l'étape de bourgeonnement viral. Par différentes méthodes, nous avons analysé les interactions entre les protéines N et M de PPRV. Quatre sites sur la protéine N ont été détectés comme étant impliqués dans l'interaction avec la protéine M. Ces sites sont représentés par les séquences aa ¹⁷⁰ILAQVWILLAKAVTA¹⁸⁴, ²³⁰RRFMVSLILDIK RTP²⁴⁴, ³³⁸GGLNFGRSYFDPAYF³⁵², ⁴⁹¹SAEALFRLQAMAKI⁵⁰⁴. Trois sont localisés dans la région N-terminale et un dans la région C-terminale. Ces sites sont localisés dans les zones bien conservées de la nucléoprotéine de morbillivirus. Nous avons également montré que la protéine M a une forte localisation membranaire où elle forme une couche dense étroitement liée à la surface intérieure de la couche lipidique (Chong and Rose, 1994; 1993; Lenard et al, 1990). La protéine M une fois liée à la protéine N modifie considérablement la distribution de cette dernière dans la cellule. En effet la protéine N exprimée seule est intra cytoplasmique tandis que le complexe N-M est trouvé essentiellement localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules, lorsque ces deux protéines sont co-exprimées.

The Morbillivirus nucleoprotein conserved regions contain the matrix protein binding sites.

S. C. Bodjo^a, A. Haffar, M. Lelenta^a, E. Couacy-Hymann^b, G. Libeau^c, E. Albina^c and A. Diallo*^a

^aAnimal Production Unit, FAO/AIEA Agriculture & Biotechnology Laboratory, IAEA Laboratories, Wagramerstrasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienna, Austria.

^bLaboratoire Central de Pathologie Animale, B.P. 206, Bingerville (Côte d'Ivoire).

^cBiological Systems Department – CIRAD, Control of Exotic and Emerging Animal Diseases (UPR15) , TA A-15/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, Cedex 5, France;

*To whom correspondence should be addressed: Adama.diallo@iaea.org

tel (+43 1) 2600 28 355; fax (+ 43 1) 2600 28 222

Abstract:

1. Introduction.

Peste des petits ruminant (PPR) is a highly contagious disease that affects sheep, goats and small wildlife ruminants with significant economic losses. The disease is endemic in many countries in Africa South of Sahara, the Middle East and South Asia ((Abraham et al., 2005; Wamwayi et al., 1995; Lefèvre and Diallo, 1990; Lefèvre et al., 1991; Ozkul et al., 2002; Taylor et al., 1990; Taylor, 1984; Shaila et al., 1989; Amjad et al., 1996; Nanda et al., 1996). The causal agent is the PPR virus (PPRV), an enveloped RNA virus which belongs to the *Morbillivirus* genus of the *Family Paramyxoviridae* (Gibb et al., 1979). Other members of the genus include Rinderpest virus (RPV), Canine Distemper Virus (CDV), Measles Virus (MV), Phocine Distemper Virus (PDV) and Dolphin *Morbillivirus* (DMV) (Banyard et al., 2006; Barrett et al., 1993; Diallo et al., 1990). Morbilliviruses are pleiomorphic particles which are composed of a non-segmented single-stranded negative sense RNA genome and six structural proteins: the nucleoprotein (N), the phosphoprotein (P), the large protein (L), the matrix protein (M), the fusion (F) and the hemagglutinin (H). These later two protein are external glycoproteins that inserted into the membrane envelope which derives from the host cell during at the time of the budding and release of the virus particle. The viral genome is tightly associated with the N to form the RNase-resistant helical nucleocapsid structure (Moyer et al., 1990; Egelman et al., 1989). N protein of negative single-stranded RNA viruses, when expressed alone, is capable of self-assembly to form nucleocapsid-like particles which apparently are similar to the virus nucleocapsid (Bodjo et al., 2007; Bhella et al., 2002; Karlin et al., 2002; Errington et al., 1997; Fooks et al., 1993; Spehner et al., 1991; 1997). Studies using deletion mutants on *Paramyxoviridae* N proteins show that the well conserved amino-terminal moiety (N_{core}) is involved in the self-assembly and the encapsidation of RNA to form the helical nucleocapsid structure (Bodjo et al., 2007; Murphy et al., 2003, Nishio et al., 1999, Liston et al., 1997, Bankamp et al., 1996). The carboxy-terminal of N (N_{tail}) which protrudes from the surface of nucleocapsids is dispensable for nucleocapsid assembly but it contains the regions to bind P (Longhi et al., 2003; Bodjo et al., 2007; Schoehn et al., 2004; Karlin et al., 2002; Liston et al., 1997; Bankamp et al., 1996; Harty and Palese, 1995). N interacts with another viral protein, the matrix protein. This interaction is essential for the virus particle assembly and budding (Coronel et al., 2001; 1999; Markwell et al., 1980; Coronel et al., 2001; Mebatsion et al., 1999; Teng et Collins, 1998). Indeed, M protein is positioned at the inner surface of plasma membrane and forms an electron-dense layer which is responsible for the condensation of the nucleocapsid (Flood et al., 1999; Garoff et al., 1998; Newcomb et al., 1982). By this position, it acts as a bridge between the nucleocapsid and the viral envelope

with external glycoproteins and thereby it seems to play the role of the main organizer of the virus particle formation and release by budding (Rodriguez et al., 2004; Coronel et al., 2001; 1999; Chong et Rose., 1994; Peeples, 1991). The absence or a defect of M alters dramatically the assembly and budding of the virions (Mebatsion et al., 1999; Cathomen et al., 1998). It is well documented that such a defect is one of the causes of the persistence of MV in the brain of people suffering from the fatal chronic disease named Subacute Sclerosing Pan Encephalitis (SSPE) (Baczko, K et al., 1986; Hall et al., 1979; Wechsler, S.L. and Fields, B.N., 1978); Cathomen et al., 1998; Cattaneo et al., 1989; Hirano et al., 1993; 1992). Different studies have shown that M protein of many negative-stranded viruses, expressed alone in cells are able to induce the formation and release vesicles from the cell the plasma membrane to the extracellular (Gomez-Puertas et al., 2000; Coronel et al., 1999; Li et al., 1993; Timmins et al., 2001; Sakaguchi, et al., 1999; Justice et al., 1995; Pantua et al., 2006). Coronel et al., 1999 have shown that the co-expression of M and N of human Parainfluenza virus type 1 (hPIV1) results in the release of virus-like particles (VLP), vesicles containing nucleocapsid structures. A similar result was found also A. Haffar (1999) by expressing the N and M of PPRV. Here we report on further studies of the N-M interactions. By peptide mapping, we were able to identify four domains on N able to bind the PPRV M protein.

2. Materials and methods

2.1 Recombinant baculovirus expressing Mppr, Nppr and the N deleted mutants.

The different cDNA corresponding to the PPRV N and the deleted mutants genes were expressed in recombinant baculovirus (Bodjo et al., 2007). Construction of the the recombinant baculovirus expressing M of PPRV was already described (A. Haffar 1999). These different recombinant baculovirus were propagated in insect cells (*Spodoptera frugiperda*, SF21) and the cells were analysed for efficient protein expression on SDS-PAGE followed by Western Blot.

2.2 Serum and monoclonal antibodies (Mabs).

The polyclonal anti-Rinderpest virus (RPV) hyperimmune serum made in rabbit was obtained from J. Anderson (IAH, UK). Two monoclonal antibodies (Mab) against N protein of PPRV were used: the Mab 38-4 with his epitope in amino-terminal and the P4G5 produced against the amino acid 420 to 490 in carboxyl-terminal hypervariable (Bodjo et al, 2007; Libeau et

al., 1997; Lelenta et al., unpublished data). The monoclonal antibody anti PPRV M, mAb 19-6 was described (Libeau et al., 1997; A. Haffar, 1999).

2.3 Immunoprecipitation study of N protein domains responsible for the PPR N and M interaction.

In order to analyse the regions of N which interact with M during virus assembly and budding, we co-expressed in insect cells the PPRV M protein with either the PPRV full N protein or its deleted mutants by co-infecting the cells with the corresponding recombinant baculoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 10. At 72 hr post-infection, the cells were harvested and centrifuged at 2000 rpm for 10 min and the pellets were washed with NTE buffer (Tris-HCl, 50 mM, pH 7.4; NaCl, 150 mM; EDTA, 5 mM) and centrifuged again at 2000 rpm for 10 min. The pellets were re-suspended in NTE buffer containing 1% Triton 100, protease cocktail inhibitors at the dose that was recommended by the supplier (Roche), iodoacetamide 5 mM and containing PMSF 1mM. To determine efficient production of each protein, the different cells lysates were analysed by SDS-PAGE followed by Western Blot. The clarified cells lysates were also used for immunoprecipitation tests. First they were incubated with Mab 19-6 for 2 hr at +4°C. The 50 µl of protein A-Sepharose (Amersham) in in NTE (50% P/V) was then added and the incubation continued for another 2 hr at +4°C. Immune complexes were centrifuged and washed 5 times with lysis buffer and twice with PBS-T. The immune complexes were analysed by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane for Western blot.

2.5. Western blot.

Following the SDS-PAGE electrophoresis, the proteins were transferred to 0.2 µm PVDF membrane (Invitrogen) and were incubated for 1 hr in blocking buffer (BB: Phosphate-buffered saline [PBS] + 0.5% Tween + 5% skimmed milk). The proteins on the membrane were then probed with the hyperimmune rabbit anti-RPV serum (Anti-RPV HIR) in appropriate dilution during 1 hr incubation. The membrane was washed and the immune complexes were detected with a secondary anti-rabbit antibody immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase (HRPO) and a subsequent detection was carried out using ECL system (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Protein-protein ELISA.

We used a modified method from protein capture assay that was previously described (Randall et Bermingham, 1996) to study the interaction between M and N and its mutants. The different N proteins were coated at saturation level in 96 wells microplates (NUNC Immobilizer amino) for 1 hr at 37°C. Unbound material in the plate was removed by washing three times with PBS-tween (0.05 %) and the plates were incubated with blocking buffer (PBS+ 0.5% Tween + 10% skimmed milk), for 1 hour at 37°C. The blocking buffer was removed and M protein was added at appropriate dilution in the plates and incubated overnight at 4°C with continuous agitation. The plates were washed to remove unbound M protein and then incubated with anti-M monoclonal antibody (19-6) for 1 hr at 37°C with agitation. Unbound 19-6 was removed by washing three times with PBS-tween (0.05 %) and anti-mouse immunoglobulin conjugated to horseradish peroxidase (from DAKO) diluted in BB at 1:1000 was added in the plate and incubated for 1 hr at 37°C under shaking. The plates were washed and 100 µl of SureBlue TMB microwell peroxydase substrate (from KPL) was added in the plates and colour reaction was developed for 5 min at 37°C. The reaction was stopped with 100 µl of 1M H₂SO₄. The optical density (OD) readings were taken at 490 nm by a computer-interfaced ELISA plate reader.

2.7. Peptides-protein ELISA.

Sixty two overlapping synthetic peptides covering the Nppr (table 1) were used to specify the amino acids of N which react with M protein. The 96-wells microtitre plates (NUNC Immobilizer amino) were coated with 500 ng of each peptide for 4 hr at 37°C. The procedure was carried according to the protein interaction analysis by ELISA described above.

2.8. Monoclonal antibody labelling

Two Mabs against N protein; 38-4 (Libeau et al., 1995; 1997) and P4G5 (Lelenta et al. unpublished data) with epitope localised to N-terminal and C-terminal respectively (Bodjo et al., 2007) and the anti-M protein Mab 19-6 (Libeau et al., 1997; A. Haffar, 1999) were purified with Melon Gel Monoclonal IgG purification kit according to the manufacturer's instructions (Pierce). These monoclonal were then labelled with different dye. The EZ-Label Fluorescein Protein Labeling Kit was used to label anti-N Mabs and the EZ-Label Rhodamine Protein Labeling Kit was used for anti-M Mab according to the manufacturer's instructions (Pierce).

2.9. Immunofluorescence staining for confocal microscopy.

Insect cells SF21 cultured on glass coverslips were used to express M, full N and its mutant protein with the recombinant baculoviruses. The insect cells on glass coverslips were also used to co-express M protein with all N proteins. At 72 h post infection, the infected cells were washed with PBS and fixed with 3.7% formaldehyde in PBS 15 min at room temperature. The cells were permeabilised with 0.2% Triton X-100 in PBS for another 15 minutes. The cells were then washed three times in PBS before incubation for 1 hr for double staining with appropriate dilution of the specific Mabs anti-M (19-6) and anti-N (38-4 and P4G5) conjugated with rhodamine and fluoresceine respectively. The excessive Mabs were washed off three times with PBS-tween (0.05 %). The distribution of M and N in the cells were then observed by double-excitation (rhodamine and fluoresceine) in confocal microscopy. The imaging system consisted of LEICA SP2 inverted microscope.

2.10. Electron microscopy.

Negative staining and electron microscopy were performed by infecting SF21 cells infected with recombinant baculovirus expressing M protein. The cells were grown on 0.4- μ m-pore-size polycarbonate Transwell R chambers (Corning) in at 27°C in Grace's insect medium supplemented with 10% of foetal calf serum. 3 day after infection the cells were washed with PBS and the cells were fixed with 2% paraformaldehyde. Ultrathin sections were cut on a Sorvall MT 6000 ultramicrotome, stained with 2% ammonium molybdate, and examined in a JEOL 100CX.

3. Results

3.1. Localisation of M protein to cellular membrane and induction of vesicles formation.

Previous studies have shown that the M proteins of negative strand RNA viruses alone are able to induce the formation of empty vesicles and their release into the cell medium. (Pantua et al., 2006; Takimoto T. and A. Portner, 2004 ; Timmins et al., 2001; Gomez-Puertas et al., 2000; Coronel et al., 2001; Coronel et al., 1999; Li et al., 1993; Sakaguchi, et al., 1999; Justice et al., 1995 ;). We carried out a similar with M of PPRV by inserting its corresponding cDNA into the baculovirus and expressing it in insect cells. The expressed recombinant protein was detected by the mAb anti PPRV previously labelled with fluorescein dye. The result, shown in figure 7a, indicates that M protein is exclusively associated with the cell

membrane. From place to place, it can be seen parts of the cell membrane under the budding process. The electron microscopy observation was carried out on some cell preparations after the immunogold reaction using the mAb anti-M. The result, presented in figure fig 7b, shows the presence empty vesicles. Thus, M of PPRV alone is able to induce the budding process and the formation of vesicles as demonstrated with some other enveloped viruses.

3.2 Coexpression of M with full N or mutants.

In this study, we investigated the interaction between PPRV N and M protein co-expressed in insect cells. The efficient production of both M and N proteins in co-infected cells were analyzed by western blot. The results presented in Fig. 1 shows that all proteins are correctly expressed. To study the interaction between M and N proteins, we proceeded in two ways: immunoprecipitation of co-expressed N-M products, and by ELISA quantification of M binding to different N previously adsorbed onto plate. The results of immunoprecipitation with the anti M mAb (Fig. 2) and protein ELISA (Fig. 2; 3) indicate that M interacts with all N deleted mutants as with the full N. These data suggest that N protein could have several domains which interact with M protein. These domains are localised in both the N-terminal and C-terminal regions. However, the main sites might be located between aa 121-277 on the N protein sequence since the immunoprecipitation result shows that N mutant N Δ 121-277 is poorly co-precipitated with M.

3.3. Peptide mapping of M binding sites on N.

To specify the domain of N which interacts with M, we used 62 overlapping peptides of N in a protein-ELISA assay. The result presented in Fig. 5 shows that five peptides interact with M. These peptides correspond to four discontinuous sites on N which can bind M protein. Among these and when referring to the optical density values that were obtained in the ELISA, two peptides, peptide n° 24 (RRFMVSLILDIK RTP) and 36 (GGLNFGRSYFDPAYF) seem to be the most reacting with M and therefore probably the main binding sites for M on N. The alignment of N amino acid sequence of *Morbillivirus* presented in Fig.6 (Diallo et al., 1994) shows that the different domains of N which interact with M are well conserved in the Morbillivirus. Three of them are localised in the Ncore region and one in the N-tail.

3.4. Analysis of the distribution pattern of N protein and its mutants deleted coexpressed with M in the cells.

A study was conducted to compare the localization of full N and its deleted mutants when they are expressed alone with their localization when they are co-expressed with M. This was analysed by confocal microscopy observation. The result which is presented in Fig. 7 shows that all N proteins are distributed through the cytoplasm. However, when they are co-expressed with M, they are co-localized with that latter protein on the cell membrane. This confirms the capacity of N protein to interact with M and also the several M binding sites on N.

4. Discussion

Morbilliviruses are enveloped RNA viruses which particles are assembled on and released from the membrane of the host cell by budding. For all viruses which particle formation follows the same process, it is suggested the viral matrix plays the central role in the assembled virus (Jayakar et al., 2004; Takimoto T. and A. Portner, 2004; Lenard J., 1996; Peeples M.E., 1991;). M forms a dense layer tightly associated with the inner surface of the lipid bilayer envelope (Chong and Rose, 1994; 1993; Lenard et al., 1990; McCreedy et al., 1989; Faaberg and Peeples 1988; Ohno et al., 1987; Buechi et al., 1982; Gregoriades., 1980). By this position it acts as a bridge between the nucleocapsid and the viral envelope glycoproteins H and F. During this process, M is tightly associated with the nucleocapsid (Jayakar et al., 2004, Flood et al., 1999; Garoff et al., 1998; Gaudin et al., 1997; 1995; Newcomb et al., 1982). However the process which leads to the induction of virus particle assembly and release from the cell membrane by budding is not yet well understood. For many paramyxoviruses such as human parainfluenza type 1, Sendai and Newcastle disease viruses, the matrix protein alone is able to form and release VLP as it was demonstrated for the rabies and the vesicular stomatitis viruses, two Rhabdoviruses (Pantua et al., 2006; Jayakar et al., 2004; Takimoto T. and A. Portner, 2004 ; Timmins et al., 2001; Gomez-Puertas et al., 2000; Coronel et al., 1999; Mebatsion et al., 1999; Sakaguchi, et al., 1999; Justice et al., 1995; Li et al., 1993). However, for another paramyxovirus, the Simian virus 5, SV5, M protein, when expressed alone in mammalian cells, is not able to induce the vesicle formation. It does it only when it is co-expressed with F and HN proteins (Schmitt et al., 2002). In order to contribute in unravelling the budding process of virus of the *Family Paramyxoviridae*, we cloned the PPRV M protein into the baculovirus vector and express the protein in insect cells. This study showed that recombinant PPRV M protein alone is able to induce the budding

process and to release vesicles resembling to paramyxovirus particles as do M proteins of human parainfluenza type 1, Sendai virus and Newcastle disease virus. We demonstrated that co-expression of M with N protein results in the attraction of this protein from cytoplasm to the cell membrane probably as a start of the virus particle assembly.

In this study, we analysed the PPRV N and M interaction by use of both deleted N mutant and N peptides in order to identify the M binding site (s) on N. We showed that M binds to N on 4 sites distributed along the protein but their sequences are well conserved within the Morbillivirus genus. Their sequences are aa ¹⁷⁰ILAQVWILLAKAVTA¹⁸⁴, aa ²³⁰RRFMVSLILDIKRTP²⁴⁴, aa ³³⁸GGLNFGRSYFDPAYFRLGQEMVRRS³⁶² and aa ⁴⁹¹SAEALFRLQAMAKI⁵⁰⁴. This result is different from that of Coronel et al., (2001) who have identified that M protein of human parainfluenza virus type 1 interacts with N only through the hypervariable N-tail. Conservation of the interaction sequences of PPRV M on PPRV N protein explains why coexpression of PPRV M and RPV N in insect cells releases VLP containing the nucleocapsid formed by this RPV N protein as PPRV N, however the rabies virus N doesn't enter into the vesicles formed by PPRV M when these proteins are coexpressed in the same cells (A. Haffar, 1999).

Référence

- Baczko, K., Liebert, U.G., Billeter, M., Cattaneo, R., Budka, H., ter Meulen, V., 1986. Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Virol.* 59, 472–478
- Hall, W.W., Lamb, R.A., Choppin, P.W., 1979. Measles and subacute sclerosing panencephalitis virus proteins: lack of antibodies to the M protein in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2047–2051.
- Wechsler, S.L., Fields, B.N., 1978. Differences between the intracellular polypeptides of measles and subacute sclerosing panencephalitis virus. *Nature* 272, 458–460
- Sakaguchi, T., T. Uchiyama, Y. Fujii, K. Kiyotani, A. Kato, Y. Nagai, A. Kawai, and T. Yoshida. 1999. Double-layered membrane vesicles released from mammalian cells infected with Sendai virus expressing the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Virology* 263:230–243.
- Pantua H. D., Lori W. McGinnes, Mark E. Peeples, and Trudy G. Morrison. Requirements for the Assembly and Release of Newcastle Disease Virus-Like Particles. *J. Virol.* 2006 80: 11062-11073
- Schmitt, A.P., Leser, G.P., Waning, D.L., Lamb, R.A., 2002. Requirements for budding of paramyxovirus simian virus 5 virus-like particles. *J. Virol.* 76, 3952–3964
- Abraham G., Sintayehu, A., Libeau, G., Albina, E., Roger, F., Laekemariam, Y., Abayneh, D. and K.M Awoke. (2005). Antibody seroprevalences against peste des petits ruminants (PPR) virus in camels, cattle, goats and sheep in Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 70, 51-57.
- Amjad H., Qamar-ul-Islam Forsyth M., Barrett T. P.B. and Rossiter (1996). Peste des petits ruminants in goats. *Pakistan Veterinary Record*, 139:118-119.
- Avalos R.T., Yu Z. and D.P. Nayak. (1997). Association of Influenza Virus NP and M1 Proteins with Cellular Cytoskeletal Elements in Influenza Virus-Infected Cells. *J. Virol*, 71: 2947–2958.
- Bankamp B., Horikami S.M, Thompson P.D, Huber M., Billeter M. and S.A Moyer., (1996). Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology*. 216: 272-277
- Banyard A.C., Rima B.K. and T. Barrett. (2006). The morbilliviruses. *In: Rinderpest and Peste des petits ruminants, Virus Plagues of large and Small Ruminants.* Barrett T., Pastoret P-P and W.P. Taylor, (Eds). Academic Press: 13-30.
- Barrett T., Visser I.K., Mamaev L., Goatley L., van Bresse M.F. and A.D Osterhaust. (1993). Dolphin and porpoise morbillivirus are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193: 1010-1012
- Bhella D., Ralph A., Murphy L.B. and R.P. Yeo. (2002). Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.*, 83:1831–1839.
- Bodjo S.C., Lelenta M., Couacy-Hymann E., Kwiatak O., Albina E., Gargani D., Libeau G. and A. Diallo. (2007). Mapping the Peste des Petits Ruminants virus nucleoprotein:

Identification of two domains involved in protein self-association. *Virus Res.*, doi:10.1016/j.virusres.2007.08.005

Bucher D., Popple S., Baer M., Mikhail A., Gong Y-F., Whitaker C., Paoletti E. and A. Judd. (1989). M protein (M1) of influenza virus: antigenic analysis and intracellular localization with monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 63:3622–3633.

Buechi M. and T. Bächli. (1982). Microscopy of internal structures of Sendai virus associated with the cytoplasmic surface of host membranes. *Virology*, 120:349–359.

Chong L.D. and J.K. Rose. (1994). Interactions of Normal and Mutant Vesicular Stomatitis Virus Matrix Proteins with the Plasma Membrane and Nucleocapsids. *J. Virol.*, 68:441–447.

Chong, L. D., and J. K. Rose. (1993). Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *J. Virol.* 67:407–414.

Cathomen T., Mrkic B., Spehner D., Drillien R., Naef R., Pavlovic J., Aguzzi A., Billeter M.A. and R. Cattaneo. (1998). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J.* 17:3899–3908.

Cattaneo R., Kaelin K., Bacsko K., and M.A. Billeter. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*, 56:759–764.

Coronel E.C, Takimoto T., Murti G.K., Verich N. and A. Portner. (2001). Nucleocapsid Incorporation into Parainfluenza Virus Is Regulated by Specific Interaction with Matrix Protein. *J. Virol.*, 75:1117–1123.

Coronel E.C., Murti K.G., Takimoto T. and A. Portner. (1999). Human parainfluenza type I matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of viruslike particles containing nucleocapsid-like structures. *J. Virol.*, 73:7035–7038.

Diallo A., Barret T., Barbon M., Meyer G. and P.C. Leferve (1994). Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. *J.Gen. Virol.*, 75:233–237.

Diallo A. (1990). Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Vet. Microbiol.*, 23:155–163.

Egelman E.H., Wu S-S., Amrein M., Portner A. and G. Murti. (1989). The SV nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J. Virol.*, 63:2233–2243

Errington W., and P.T. Emmerson. (1997). Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structure is inhibited by the phosphoprotein. *J. Virol.*, 78:2335–2339.

Faaberg K.S. and M.E. Peebles. (1988). Association of soluble matrix protein of Newcastle disease virus with liposomes is independent of ionic conditions. *Virology*, 166:123–132.

Flood E.A and D.S. Lyles. (1999). Assembly of nucleocapsids with cytosolic and membrane-derived matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *Virology*, 261:295–308.

Fooks A.R., Stephenson J.R., Warnes A., Dowsett A.B., Rima B.K. and G.W. Wilkinson (1993). Measle virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structure. *J. Gen. Virol.*, 74:1439–1444.

Garoff H., Hewson R., and D-J.E. Opstelten. (1998). Virus Maturation by Budding. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 1171–1190.

- Gaudin Y., Sturgis J., Doumith M., Barge A., Robert B. and R.W.H. Ruigrok. (1997). Conformational flexibility and polymerization of vesicular stomatitis virus matrix protein. *J. Mol. Biol.* 274:816–825.
- Gaudin Y., Barge A., Ebel C. J. and R. W. H. Ruigrok. (1995). Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: implication for viral assembly. *Virology*, 206: 28-37.
- Gibbs E.P.J., Taylor W.P., Lawman M.P.J. and J. Bryant. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as a fourth member of the Genus Morbillivirus. *Intervirology*, 11:268–274.
- Gomez-Puertas P., Albo C., Perez-Pastrana E., Vivo A. and A Portela. (2000). Influenza virus matrix is the major driving force in virus budding. *J. Virol.*, 74:11538–11547.
- Gregoriades A. (1980). Interaction of influenza M protein with viral lipids and phosphatidylcholine vesicles. *J. Virol.*, 36:470–479.
- Haffar A. (1999). Etude de la protéine de matrice M du virus de peste des petits ruminants: clonage, séquençage et expression dans le système baculovirus. Thèse de doctorat d'université Paris IV.
- Harty R.N. and P. Palese. (1995). Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH₂- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself. *J. Gen. Virol.*, 76:2863–2867.
- Hirano A., Ayata M., Wang A.H. and T.C. Wong. (1993). Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding. *J. Virol.*, 67:1848-1853.
- Hirano A., Wang A.H., Gombart A.F. and T.C. Wong. (1992). The matrix proteins of neurovirulent subacute sclerosing panencephalitis virus and its acute measles virus progenitor are functionally different. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 89:8745-8749.
- Jayakar H.R., Jeetendra E. and M.A. Whitt. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res.*, 106:117-132.
- Justice, P.A., Sun W., Li Y., Ye Z., Grigera P.R. and R.R. Wagner. (1995). Membrane vesiculation function and exocytosis of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *J. Virol*, 69:3156–3160.
- Karlin D., Longhi S. and B Canard. (2002). Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein result in an impaired self-association. *Virology*, 302 (2), 420-432.
- Lefèvre P.C., Diallo, A., Schenkel, F., Hussein, S. and G. Staak. (1991). Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan. *Vet. Record.*, 128:110.
- Lefèvre P.C. and A. Diallo. (1990). Peste des petits ruminants. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 9: 935-981.
- Lenard J. (1996). Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in family? *Virology* 216:289-298.
- Lenard J., and R. Vanderoef. (1990). Localization of the membrane-associated region of vesicular stomatitis virus M protein at the N terminus, using the hydrophobic, photoreactive probe 125I-TID. *J. Virol.*, 64:3486–3491.

Li Y., Luo L., Shubert M., Wagner R.R. and C. Y Kang. (1993). Viral liposomes released from insect cells infected with the recombinant baculovirus expressing the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol*, 67:4415–4420.

Libeau G., Saliki J.T. et A. Diallo. (1997). Caracterisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les virus de la peste bovine et de la peste des mpetits ruminants : identificationnd'épitopes conservés ou de spécificité stricte sur la ncléoprotéine. . *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop*. 50: 181-190.

Libeau G., Prehaud C., Lancelot R., Colas F., Guerre L., Bishop D.H. et A. Diallo. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res Vet Sci*. 58: 50-55.

Liston P., Batal R., DiFlumeri C., and Briedis D. J. (1997). Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Arch. Virol.*, **142**:305–321

Longhi S., Receveur-Brechot V., Karlin D., Johansson K., Darbon H., D. Bhella.(2003). The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J. Biol. Chem.*, **278**:18638-18648.

Markwell M.A.K. and C.F. Fox. (1980). Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking. *J. Virol.*, **33**:152–166.

McCreedy B.J. and D.S. Lyles. (1989). Distribution of M protein and nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus in infected cell plasma membranes. *Virus Res.*, **14**:189-206.

Mebatsion T., Weiland F. and K.K. Conzelmann. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.*, **73**:242–250.

Moyer S.A., Baker S.C. and S.M. Horikami. (1990). Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J. Gen. Virol.*, **71**:775-783

Murphy L.B., Loney C., Murray J., Bhella D., Ashton P. and R.P. Yeo. (2003). Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid formation and interacton with the phosphoprotein. *Virology*, **307**:143-153.

Nanda Y.P., Chatterjee A., Purohit A.K., Diallo A., Innui K., Sharma R.N., Libeau G., Thevasagayam J.A, Bruning A., Kitching R.P., Anderson J., Barrett T. and W.P. Taylor. (1996). The isolation of peste des petits ruminants virus from Northern India. *Vet. Microbiol.*, **51**: 207–216.

Newcomb W.W., Tobin G.J., McGowan J.J., and J.C. Brown. (1982). In vitro reassembly of vesicular stomatitis virus skeletons. *J. Virol.*, **41**:1055–1062.

Nishio M, Tsurudome M., Ito M., Kwano M., Kusagawa S., Komada H. and Y. Ito. (1999). Mapping od domains on the human parainfluenza virus type 2 nucleocapsid protein (NP) required for NP-phosphoprotein or NP-NP interaction. *J. Gen. Virol.*, **80**: 2017-2022.

Ohno S. and N. Ohtake. (1987). Immunocytochemical study of theintracellular localization of M protein of vesicular stomatitis virus. *Histochem. J.*, **19**:297-306.

Ozkul A., Akca Y., Alkan F., Barrett T., Karaoglu T., Dagalp S.B., Anderson J., Yesilbag K., Cokcaliskan C., Gencay A. and I. Burgu. (2002). Prevalence, distribution, and host range of peste des petits ruminants virus, Turkey. *Emerging Infectious Disease*, **8**:708-712.

Peebles M.E. (1991). Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and taking it on the road. In *The Paramyxoviruses*, pp. 427–456. D. W. Kinsbury, Ed. New York: Plenum.

Rodriguez L., Cuesta I., Asenjo A. and N. Villanueva. (2004). Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues. *J. Gen. Virol.*, **85**:709–719

Schoehn G., Mavrakakis M., Albertini A., Wade R., Hoenger A. and R.W.H. Rugrok. (2004). The 12 Å Structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J. Mol. Biol.*, **339**: 301-312.

Shaila M.S., Purushothaman V., Bhavasar D., Venugopal K. and R.A. Venkatesan. (1989). Peste des petits ruminants in India. *Vet. Record*, **125**, 602.

Spehner D., Drillien R. and P.M. Howley. (1997). The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology* **232**:260–268.

Spehner D., Kim A. and R. Drillien. (1991). Assembly nucleocapsidlike structure in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J. Virol.*, **65**:6296-6300.

Takimoto T. and A. Portner (2004). Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Research*, 106: 133–145

Taylor W.P., al Busaidy S. and Barrett, T. (1990). The epidemiology of peste des petits ruminants in the Sultanate of Oman. *Vet. Microbiol.*, **22**:341-352.

Taylor W.P. (1984). The distribution and epidemiology of peste des petits ruminants. *Prev. Vet. Med.*, **2**:157–166.

Teng M.N. and P.L. Collins. (1998). Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for the formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol*, **72**:5707–5716.

Timmins J., Scianimanico S., Schoehn G. and W. Weissenhorn. (2001). Vesicular release of Ebola virus matrix protein VP40. *Virology* **283**:1–6.

Wamwayi H.M., Rossiter P.B., Kariuki D.P., Wafula J.S., Barrett T. and J. Anderson. (1995). Peste des petits ruminants antibodies in East Africa. *Vet. Rec.*, **136**:199-200.

FIGURES

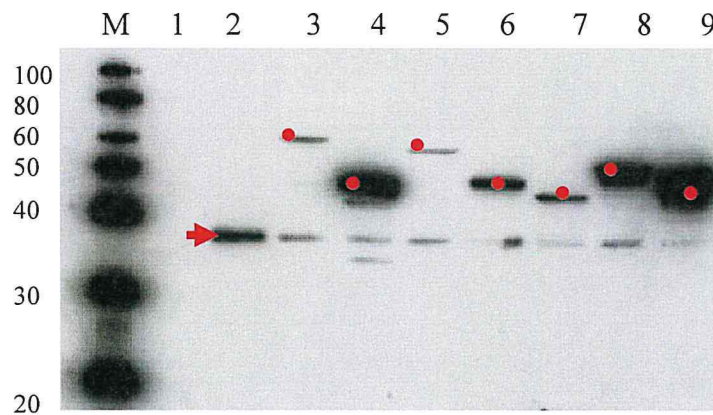


Fig. 1. Total cells Lysat from co-expression of M and N proteins analysed by Western blot. The cells lysat were separated by SDS-PAGE and blotted onto a membrane and the M ant N proteins were detected by the rabbit rinderpest hyperimmune serum (gift from J. Anderson, IAH, UK). Lines M: Marker MagicMark xp (Invitrogen) line 1: SF21 cells, 2: M, 3: N+M, 4: NΔ1-145+M, 5: NΔ121-145+M, 6: NΔ121-241+M, 7: NΔ121-277+, 8: NΔ421-490+M, 9: NΔ421-525+M.

Note: ➡ band of protein M, ● band of full N and mutant proteins; ○NΔ deleted mutants

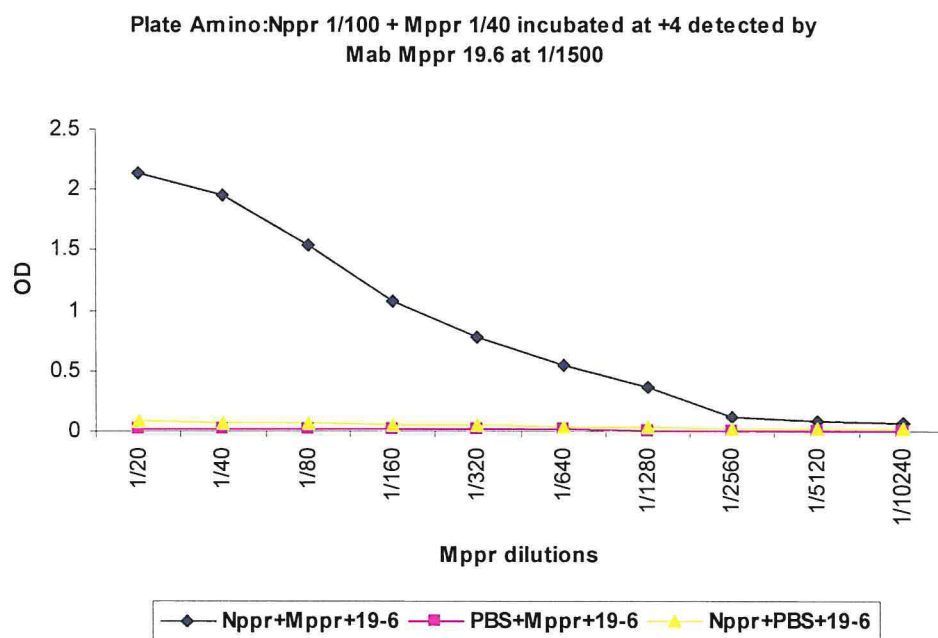


Fig. 2. Analysis of N-M proteins interaction by ELISA. 96 microwells plates were coated with N protein at saturation and blocked with milk. Different of M protein were added in each well to determine it capacity to bind to N protein. The wells coated with PBS and blocked with milk were used as control to determine the non-specific binding of M protein to the wells. After washing M protein binding to N is detected with mAb anti-M.

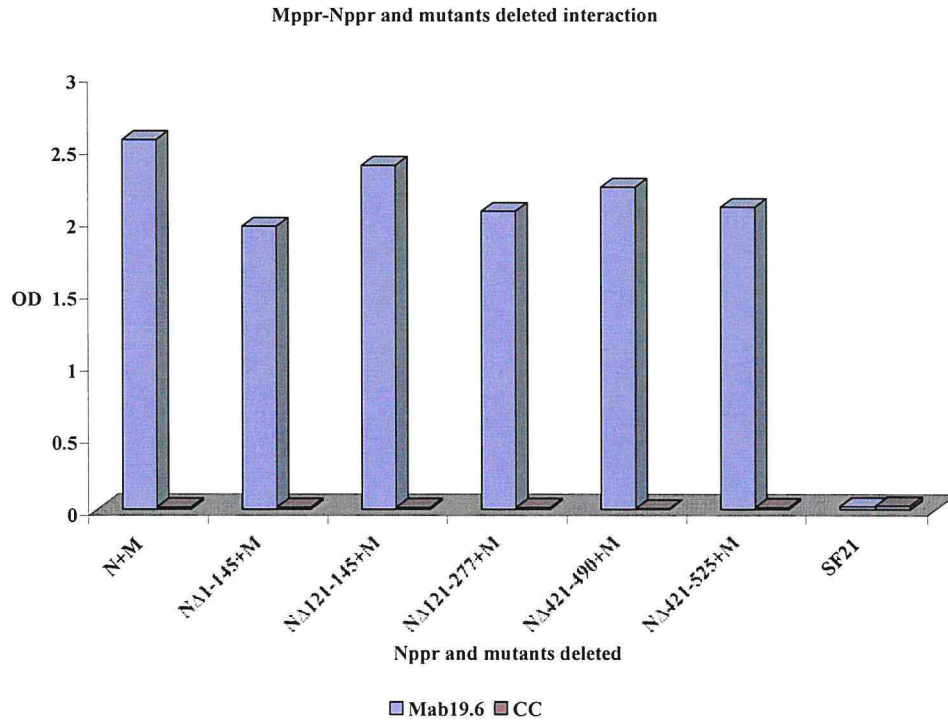


Fig. 3. The N and mutants were used to coat the 96-wells plates to analyse their interaction with M protein by protein ELISA. The insect cells non infected lyate was used as control. The binding of M with each mutant was revealed by the mab anti-M, 19-6.

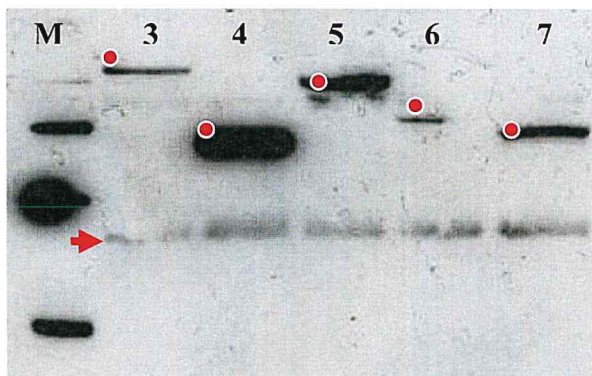


Fig 4a

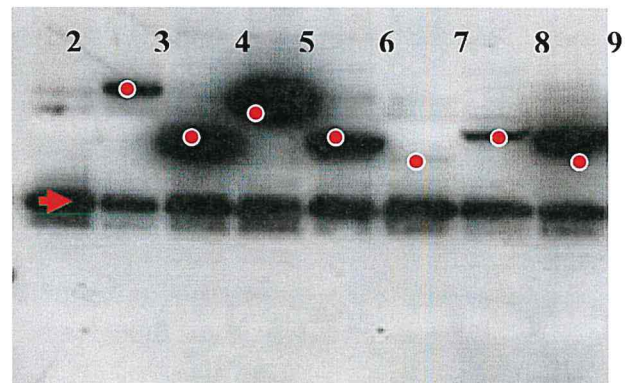


Fig 4b.

Fig 4: Analysis of interaction between the PPRV M protein and full N protein and various N deleted mutants. The cells lysate of coexpression of M with N or each mutant deleted were immunoprecipitated with the mab anti-M. The immune complexe were separated by SDS-PAGE followed of proteins transfer on PVDF membrane. The proteins were then revealed by western blot using RP hyperimmune serum from Rabbit. Lines: 2: M protein, 3: N+M, 4: NA1-145+M, 5: NA121-145+M, 6: NA121-241+M, 7: NA121-277+, 8: NA421-490+M, NA421-525+M.

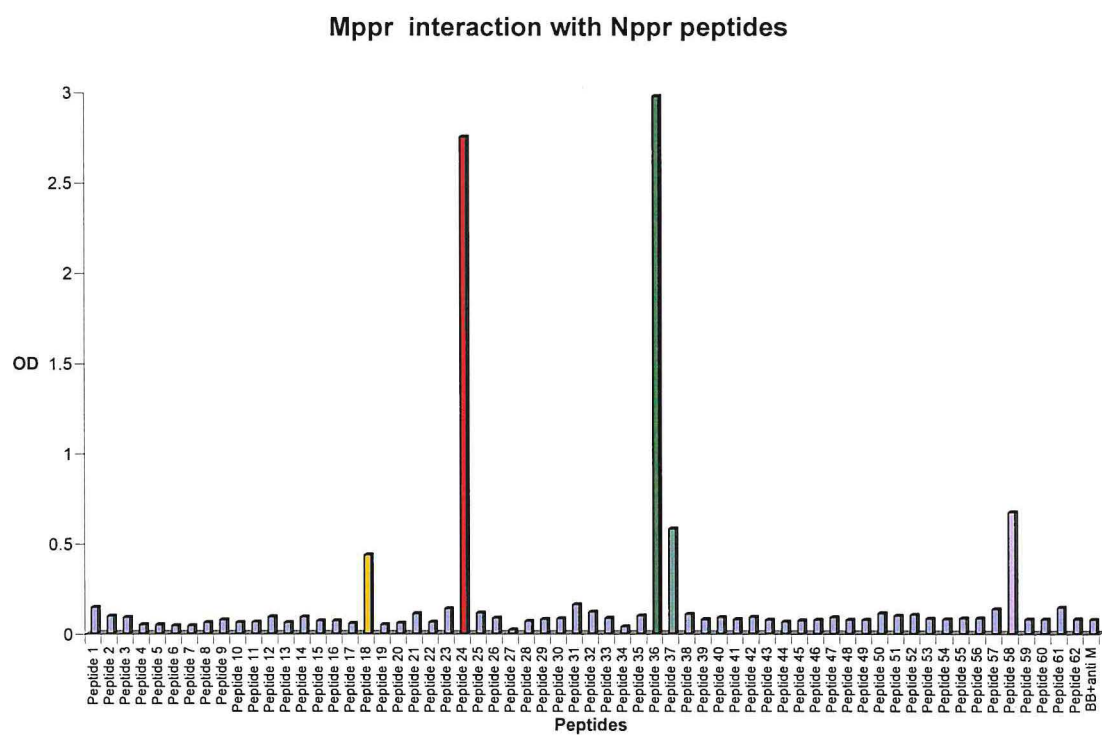


Fig. 5. N peptides were used for coating in microplates and the binding of M protein was detected by mab 19-6. Petides 18, 24, 36, 37 and 58 interact with M.

PPRV	MATLLKSLAL	FKRNKDKAPT	ASGSGGAIRG	IKNVIIIVPIP	GDSSIITRSR	LLDRLVRLAG
CDV	MASLLKSLTL	FKRTRDQPPL	ASGSGGAIRG	IKHVIIIVLIP	GDSSIVTRSR	LLDRLVRLVG
MV	MATLLRSLAL	FKRNKDKPPI	TSGSGGAIRG	IKHIIIVPIP	GDSSITTRSR	LLDRLVRLIG
PDV	MASLLKSLSL	FKKTREQPPL	ASGSGGAIRG	IKHVIIIVLIP	GDSSIVTRSR	LLDRLVRMVG
RPV	MASLLKSLAL	FKRAKDKPPL	AAGSGGAIRG	IKHVIVVPIP	GDSSITTRSR	LLDRLVKMVG
120						
PPRV	DPDINGSKLT	GVMISMLSFL	VESPGQLIQR	ITDDPDVSIR	LVEVVQSTRS	QSGLTFAARG
CDV	DPEINGPKLT	GILISILSLF	VESPGQLIQR	IIDDPDISIK	LVEVIPSINS	VCGLTFAARG
MV	NPDVSGPKLT	GALIGILSLF	VESPGQLIQR	ITDDPDVSIR	LLEVVSQDQS	QSGLTFAARG
PDV	DPEVSGPKLT	GVLISILSLF	VESPGQLIQR	IIDDPDISIK	LVEVIPSINS	TCGLTFAARG
RPV	DPDISGPKLT	GALISILSLF	VESPGQLIQR	ITDDPDISIK	LVEVVQSDKT	QSGLTFAARG
180						
PPRV	ADLDNEADMY	FSTEGPSSGS	KKRINWFENR	EIIDIEVQDA	EEFNMLLAST	LAQVWILLAK
CDV	ASLDSEAEDEF	FKIVDEGSKA	QGQLGWLENK	DIVDIEVDAA	EQFNILLAST	LAQIWWILLAK
MV	TNMEDEADKY	FSHDDPISSD	QSRFGWFENK	EISDIEVQDP	EGFNMLIGTI	LAQIWWILLAK
PDV	ASLDAEAEDEF	FGTMDEGSKD	HNQMGWLENK	DIIDIEVNDA	EQFNILLAST	LAQIWWILLAK
RPV	TSMDEADRY	FTYEENPDGE	ERQSYWFENR	DIQDIEIQDP	EGFNMLLATI	LAQIWWILLAK
240						
PPRV	AVTAPDTAAD	SELRRWVKYT	QQRVIGEFR	LDKGWLDVAVR	NRIAEDLSLR	REMVSLILDI
CDV	AVTAPDTAAD	SEMRRWIKYT	QQRVVGEFR	MNKIWLDIR	NRIAEDLSLR	REMVVALILDI
MV	AVTAPDTAAD	SELRRWIKYT	QQRVVGEFR	LERKWLDVVR	NRIAEDLSLR	REMVVALILDI
PDV	AVTAPDTAAD	SEMRRWIKYT	QQRVIGEFR	MNKIWLDIR	NRIAEDLSLR	REMVVALILDI
RPV	AVTAPDTAAE	SELRRWVKYT	QQRVIGEFR	LDKGWLDTVR	NRVAEDLSLR	REMVVALILDI
300						
PPRV	KRTPGNKPRI	AEMICDIDNY	IVEAGLASFI	LTIKFGIETM	YPALGLHEFA	GELSTIESLM
CDV	KRSPGNKPRI	AEMICDIDNY	IVEAGLASFI	LTIKFGIETM	YPALGLHEFS	GELTTIESLM
MV	KRTPGNKPRI	AEMICDIDTY	IVEAGLASFI	LTIKFGIETM	YPALGLHEFA	GELSTIESLM
PDV	KRSPGNKPRI	AEMICDIDNY	IVEAGLASFI	LTIKFGIETM	YPALGLHEFS	GELTTIESLM
RPV	KRTPGNKPRI	AEMICDIDTY	IVEAGLASFI	LTIKFGIETM	YPALGLHEFA	GELSTIESLM
360						
PPRV	NLYQQLGEVA	PYMVILENSI	QNKFSAGAYP	LLWSYAMGVG	VELENSMGGL	NFGRSYFDPA
CDV	MLYQQMGETA	PYMVILENSV	QNKFSAGSYP	LLWSYAMGVG	VELENSMGGL	NFGRSYFDPA
MV	NLYQQMGETA	PYMVNLENSI	QNKFSAGSYP	LLWSYAMGVG	VELENSMGGL	NFGRSYFDPA
PDV	VLYQQMGETA	PYMVILENSV	QNKFSAGSYP	LLWSYAMGVG	VELENSMGGL	NFGRSYFDPA
RPV	NLYQQMGELA	PYMVILENSI	QNKFSAGAYP	LLWSYAMGIG	VELENSMGGL	NFGRSYFDPA
420						
PPRV	YFRLGQEMVR	RSAGKVSSVI	AAELGITAE	AKLVSEIASQ	TGDERTVRGT	GPRQAQVSFL
CDV	YFRLGQEMVR	RSAGKVSSAL	AAELGITKEE	AQLVSEIASK	TTEDRTIRAA	GPKQSQITFL
MV	YFRLGQEMVR	RSAGKVSSTL	ASELGITAE	ARLVSEIAMH	TTEDKISRAT	GPRQAQVSFL
PDV	YFRLGQEMVR	RSAGKVSSTF	AAEFGITKEE	AQLVSEIVSR	TTEDRTTRAT	GPKQSQITFL
RPV	YFRLGQEMVR	RSAGKVSSNL	ASELGITEEE	ARLVSEIAAY	TSDDRNMRTS	GPKQAQVSFL
480						
PPRV	QHKTDEGES	TPATREEVKA	AIPNGSEGRD	TKRTRSGKPR	GETPGQLLPE	IMQEDELRE
CDV	HSESEVTNQ	QPPTINKRSE	NQGGDKYPIH	FSDERFPGYT	PDVNSSEWSE	SRYDTQTIQD
MV	HGDQSENELP	RLGGKEDRRV	KQSRGEARES	YRETGPSRAS	DARAAHLPTG	TPLDIDTASE
PDV	HSENEAPNQ	RLPITMKSE	FQGGDKYSNQ	LIDDRLSGYT	SDVQSSEWDE	SRQITQLTQE
RPV	RTDQGSQAQH	SASKKDEARA	PQVKKETRTS	SKSDKHKEGT	DKEPVSSSAM	TLIDVDTTLE
525						
PPRV	SSQNPRAQR	SAEALFRLQA	MAKILEDQEE	GEDNSQIYND	KDLS	
CDV	DGND--DDRK	SMEALAKMRM	LTMLSQPGT	SEESSPVYND	RELLN	
MV	SSQDPQDSRR	SADALLRLQA	MAGISEEQGS	DTDTPIVYND	RNLLD	
PDV	GDHD--NDQQ	SMDGLAKMRQ	LTILNQSDT	NGEVSPAHD	RDLS	
RPV	ADTDPLESKK	SAEALLRLQA	MAGILGDSTL	GNDSLRAYND	KDILN	

Fig. 6. Alignment of N amino acid sequence of *Morbillivirus* (Diallo et al., 1994). Red color indicates the variable region and the blue the different aa sequence which interact with M protein

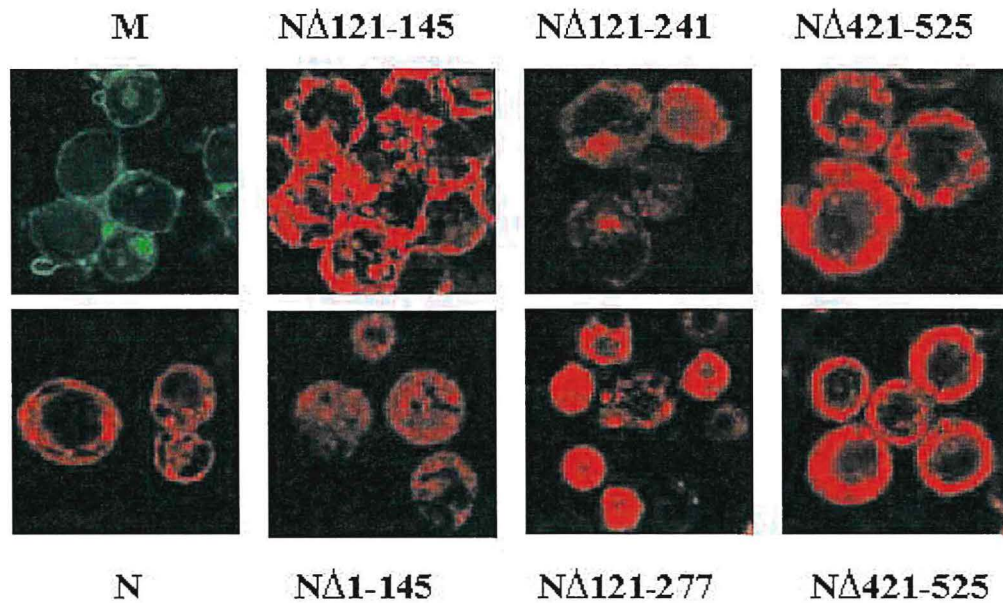


Fig. 7a. Individual expression of M and N or mutants deleted. Localisation of the proteins in the cells was determined by immunofluorescence with specific mabs: anti-M 19-6 labelled fluoresceine; anti-N (P4G5 and 38-4) labelled rhodamine: P4G5 for mutants NΔ1-145, NΔ121-145, NΔ121-241, NΔ121-277 and 38-4 NΔ421-490 and NΔ421-525. At 72 hours post infection the cells were fixed, permeabilized for specific immunofluorescence staining. The confocal images show membrane localisation of M protein which promotes budding and vesicles formation. The N or the mutants deleted are intra cytoplasm.

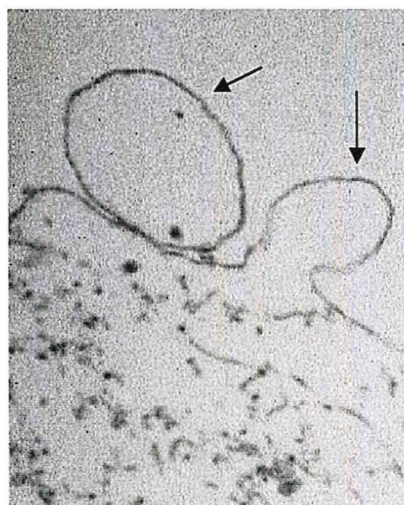


Fig. 7b. Electron microscopy observation of insect cells infected with recombinant baculovirus expressing PPRV M protein. The arrows show the budding and the vesicle due of M protein

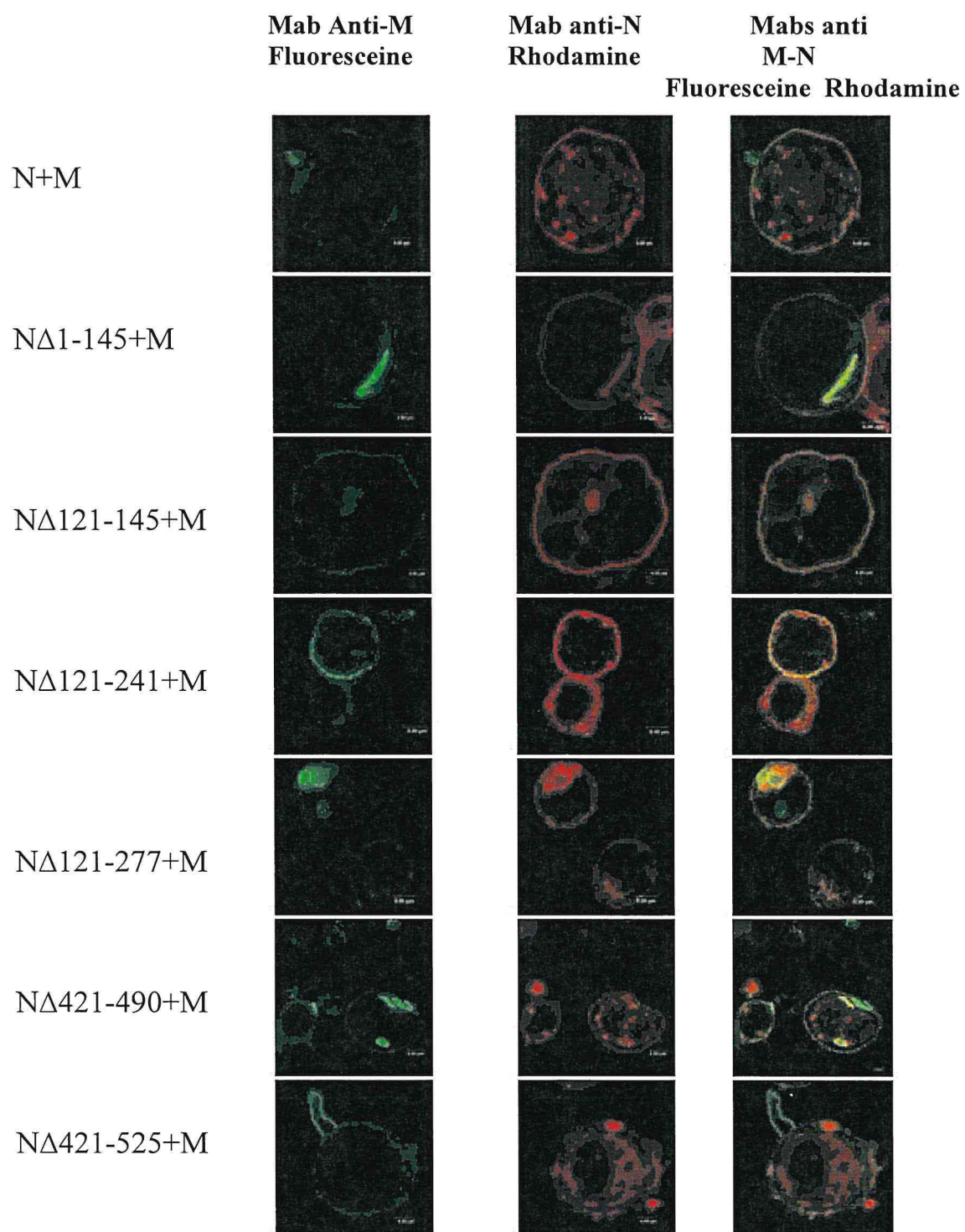


Fig. 8. Localisation of M and N or mutants coexpressed in the cells by immunofluorescence with specific mabs: anti-M and anti-N (P4G5 and 38-4) labelled respectively by fluoresceine and rhodamine: At 72 hours post infection the cells were fixed, permeabilized for double immunofluorescence staining. In each coexpression protein N or mutants and M are co-localised at the membrane compared to the individual expression

Peptide 1	MATLLKSLALFKRNK	Peptide 22	RLDKGWLDVVRNRIA	Peptide 43	SFLQHKTDEGESP
Peptide 2	FKRNKDKAPTASGSG	Peptide 23	RNRIAEDLSLRRFMV	Peptide 44	QHKTDEGESPTPAT
Peptide 3	ASGSGGAIRGIKNVI	Peptide 24	RRFMVSLILDIK RTP	Peptide 45	EGESPTPATREEVK
Peptide 4	IKNVIIVIPGDSSI	Peptide 25	IKRTPGNKPRIAEMI	Peptide 46	TPATREEVKAAIPN
Peptide 5	GDSSIITRSRLLDRL	Peptide 26	IAEMICDIDNYIVEA	Peptide 47	EEVKAAIPNGSEGR
Peptide 6	LLDRLVRLAGDPDIN	Peptide 27	YIVEAGLASFILTIK	Peptide 48	AIPNGSEGRDTKRT
Peptide 7	DPDINGSKLTGVMIS	Peptide 28	ILTIKFGIETMYPAL	Peptide 49	SEGRDTKRTRSGKP
Peptide 8	GVMISMLSL FVESPG	Peptide 29	MYPALGLHEFAGELS	Peptide 50	TKRTRSGKPRGETP
Peptide 9	VESPGQLIQRITDDP	Peptide 30	AGELSTIESLMNLYQ	Peptide 51	SGKPRGETPGQLLP
Peptide 10	RITDDPDVSIRLVEV	Peptide 31	MNLYQQLG EVAPY MV	Peptide 52	GETPGQLLPEIMQE
Peptide 11	RLVEVVQSTRSQSGL	Peptide 32	EVAPYMVILENSIQN	Peptide 53	QLLPEIMQEDEL SR
Peptide 12	SQSGLTFASRGADLD	Peptide 33	NSIQNKFSAGAYPLL	Peptide 54	IMQEDEL SRESSQN
Peptide 13	GADLDNEADMYFSTE	Peptide 34	AYPLLWSYAMGVGVE	Peptide 55	EL SRESSQNPREAQ
Peptide 14	YFSTEGPSSGSKKRI	Peptide 35	GVGVELENSMGGLNF	Peptide 56	SSQNPREAQ R SAEA
Peptide 15	SKKRINWFENREIID	Peptide 36	GGLNFGRSYFDPAYF	Peptide 57	REAQ R SAEALFRLQ
Peptide 16	REIIDIEVQDAEEFN	Peptide 37	DPAYFRLGQEMVRRS	Peptide 58	SAEALFRLQAMAKI
Peptide 17	AEEFNMLLASILAQV	Peptide 38	MVRRSAGKVSSVIAA	Peptide 59	FRLQAMAKILEDQE
Peptide 18	ILAQVWILLAKAVTA	Peptide 39	SVIAAELGITAEAAK	Peptide 60	MAKILEDQEEGEDN
Peptide 19	KAVTAPDTAADSELR	Peptide 40	AEEAKLVSEIASQTG	Peptide 61	EDQEEGEDNSQIYN
Peptide 20	DSELRRWVKYTQRR	Peptide 41	ASQTGDERTVRGTGP	Peptide 62	GEDNSQIYN DKDLLS
Peptide 21	TQQRRVIGEFRLDKG	Peptide 42	RGTGPRQAQVSFLQH		

Table 1: 62 synthetic overlapping peptides covering the Nppr sequence overlapping by five residues (peptides 1 to 43) or 9 residues (peptides 44 to 62).

Chapitre III: Discussion & Perspectives.

L'étude bibliographique nous a permis de faire le point sur l'épidémiologie de la PB et de la PPR, deux maladies animales de grande importance en médecine vétérinaire. La distribution géographique de ces maladies a connu d'importantes évolutions au cours de ces dernières années. La PB qui a constitué au cours des 19ème et 20ème siècles un fléau majeur pour l'élevage du bétail tant en Afrique qu'en Asie est actuellement en voie d'éradication. A l'inverse la PPR a vu son aire de répartition s'agrandir grâce à une meilleure connaissance de la maladie et aussi à cause de l'évolution des techniques de diagnostic.

Le programme mondial d'éradication de la PB, GREP initié par la FAO prévoit l'élimination totale de cette maladie du monde d'ici 2010, ce qui constituerait la deuxième maladie éradiquée du globe après la variole humaine. Pour déclarer les différents pays concernés indemnes d'infection PB, la procédure OIE (annexe) prévoit une vérification efficace de l'absence de circulation du RPV. En raison de la similarité des symptômes entre PB et PPR, de la très forte parenté antigénique entre les virus en cause et du chevauchement du spectre des animaux sensibles, le suivi épidémiologique de ces maladies nécessite la mise en œuvre de tests de diagnostic spécifique. Les tests cELISA PB et PPR actuels basés chacun sur un AcM anti-N, bien que très efficace pour la détection des anticorps dirigés contre la protéine N de chaque virus, présentent d'importantes réactions croisées avec les sérums d'animaux infectés avec le virus hétérologue (Couacy-Hymann et al, 2007; Anderson et al, 2006). Ainsi l'un des volets de nos travaux a concerné l'étude des structures antigéniques de la protéine N de RPV et PPRV dans le but de comprendre les réactions sérologiques croisées observées avec les tests N cELISA. Nous avons pour cela réalisé la cartographie des épitopes reconnues par les AcMs et les sérums d'animaux infectés avec l'un ou l'autre virus. Le second volet de notre travail est relatif à une cartographie fonctionnelle de la protéine N de PPRV, à savoir, la détermination des différents domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine lors de la réplication virale. L'objectif étant d'identifier des séquences aa sur cette protéine qui pourraient être éliminées sans affecter la survie du virus et qui serviront de marqueurs antigéniques négatifs dans un nouveau vaccin PPR permettant de différencier les animaux vaccinés de ceux infectés par une souche sauvage (en anglais vaccin DIVA). Les travaux ont donc porté sur l'analyse des sites d'interaction de la protéine N avec elle-même (pour former la nucléocapside) et avec la protéine M lors du bourgeonnement viral ont ainsi été étudiées.

Les sites d'interaction de la protéine N avec la protéine P devront aussi dans le futur être étudiés afin de pouvoir déterminer les domaines non essentiels de la protéine N.

1. Etude des structures antigéniques des nucléoprotéines de RPV et PPRV

1.1. Analyse des réactions croisées

Les épitopes des AcMs anti-N, IVB2 pour le cELISA PB et 38-4 pour le cELISA PPR dont la spécificité stricte pour chacun des virus a été prouvée (Libeau et al, 1997; 1995; 1992) ont été cartographiés. L'étude a été élargie à d'autres AcMs anti-N RPV, ainsi qu'à des sérums anti-RPV et anti-PPR de ruminants domestiques. Les sites immunodominants sur les protéines N de RPV et de PPRV ont ainsi pu être identifiés.

Au total six AcMs anti-N ont été analysés. Quatre définissent des sites antigéniques spécifiques, trois pour le RPV (48-5, 3-1 et IVB2) et un pour le PPRV (38-4). Deux sont communs aux morbillivirus (IIH2 et 33-4). La localisation de l'épitope de chaque AcM sur la nucléoprotéine a été réalisée à partir d'une série de protéines N RPV et PPRV tronquées. L'épitope de chacun des AcMs à l'exception de celui de l'AcM 3-1 a été localisé dans la région N-terminale et la séquence variable 121-145 des protéines N constitue un élément essentiel. L'AcM 3.1 anti-RPV a lui son l'épitope situé dans la région C-terminale de la nucléoprotéine. Ces résultats pourraient indiquer une immunodominance de la région N-terminale de la protéine N de RPV chez la souris comme cela a été aussi indiqué par Choi et al, (2004). Ces mêmes auteurs ont également montré que la région N-terminale de la protéine N de PPRV présente des motifs antigéniques immunodominants chez la souris (Choi et al, 2005b). Ainsi l'AcM 38-4 de PPRV aurait aussi son épitope localisé dans un domaine immunodominant. A l'analyse de la cartographie des épitopes reconnus par les AcMs, il a été surprenant de constater que les aa 121 à 145 du domaine variable N-terminal des protéines N participent à la fois à la formation des épitopes des AcMs communs aux morbillivirus (33-4 et IIH2) et ceux spécifiques pour le RPV (48-5 et IVB2) et le PPRV (38-4). Ces séquences semblent ainsi constituer un déterminant antigénique majeur. L'identification beaucoup plus précise des épitopes des AcMs 48-5, IVB2, IIH2 et 33-4 a mis en évidence les motifs critiques pour l'épitope de chacun des AcMs. Les AcMs 48-5 et IVB2 qui reconnaissent des sites

antigéniques spécifiques mais différents sur la N de RPV, site II pour 48-5 et site IV pour le IVB2 (Libeau et al, 1997) ont quasiment les mêmes motifs critiques pour leur épitope. Ces motifs sont conservés au sein des souches de RPV mais différents avec les autres morbillivirus. Ce qui expliquerait leur spécificité stricte pour le RPV. Le motif critique de l'épitope de l'AcM IVB2 diffère par rapport à celui du 48-5 de trois aa, proline (P), serine (S) et glutamate (E) supplémentaires, aux positions respectives 136, 144 et 148 sur la protéine N RPV. Ces trois aa constituent les éléments qui différencient l'épitope IVB2 de celui du 48-5, ce qui pourrait expliquer l'absence de compétition entre ces deux AcMs. L'analyse du motif critique de l'AcM 33-4 montre qu'il est bien conservé au sein des morbillivirus, ce qui expliquerait la capacité de cet AcM à reconnaître les différentes protéines N des morbillivirus. Malgré la localisation des épitopes des AcMs dans une même zone, les études antérieures ont montré l'absence de compétition réciproque entre les AcMs 33-4 et IIH2, 48-5, IVB2 d'une part pour le RPV et entre 33-4 et 38-4 d'autre part pour le PPRV (Libeau et al, 1997).

Une étude de corrélation entre les épitopes reconnus par les AcMs anti-protéine N de RPV et les structures antigéniques reconnues par les anticorps des sérums anti-PB ou anti-PPR de ruminants domestiques a été réalisée. Les résultats obtenus indiquent que les différents épitopes des AcMs sont aussi reconnus par les anticorps des différents sérums utilisés. Ainsi certains de ces épitopes communs aux morbillivirus seraient reconnus par des anticorps anti-N des sérums anti-PPR qui encombreraient le site de fixation de l'AcM IVB2 pour l'empêcher de se fixer sur son épitope. Cela pourrait aussi en être le cas avec l'AcM 38-4 qui est déplacé par des sérums anti-PB au cours du test cELISA N PPR. La séquence aa 121 à 145 de la protéine N PPRV étant elle aussi essentielle pour la formation de l'épitope du 38-4. Les travaux ont en plus montré que l'épitope de l'AcM IVB2 a son motif critique qui contient deux résidus phénylalanine (F), ¹³¹F et ¹⁴⁷F bien conservés entre RPV et PPRV qui pourraient éventuellement permettre à des anticorps anti-N de PPRV de se fixer sur la protéine N RPV au site de l'épitope de l'AcM IVB2. La conséquence d'une telle possibilité expliquerait aussi les réactions de détections des sérums anti-PPR avec le test cELISA N PB. Une autre hypothèse pour l'explication des détections croisées des sérums anti-PB et anti-PPR par les tests cELISA N PB et PPR serait la possibilité que des anticorps anti-N de virus hétérologue des régions conservées en amont et en aval des domaines aa 121-145 pourraient générer des encombrements stériques qui empêcheraient la fixation des AcMs IVB2 et 38-4

sur chacun de leur épitope au niveau des protéines respectives. Enfin les travaux ont aussi montré que les épitopes reconnus par les AcMs IVB2 et 38-4 sont de structure conformationnelle. Ainsi l'éventualité d'une similitude de structure entre la nucléoprotéine de RPV et PPRV, virus très proches, renforce l'hypothèse des encombrements stériques des sites des épitopes des AcMs IVB2 et 38-4 par les anticorps anti-N de virus hétérologue. La protéine N de virus hétérologue serait capable de générer des anticorps dont la structure des épitopes pourrait ressembler à celle des AcMs IVB2 et 38-4.

1.2. La nucléoprotéine et la différenciation sérologique entre la PB et la PPR.

La région N-terminale des protéines N de morbillivirus semble immunodominante et le domaine aa 121-145 qui présente des variations entre les virus de ce groupe contient des épitopes qui sont reconnus par des anticorps de sérum positif pour le virus hétérologue. Comme nous venons de l'indiquer plus haut ces anticorps sont capables d'entrer en compétition avec des AcMs spécifiques qui reconnaissent des épitopes dans ce domaine. De plus l'encadrement de ce domaine par des domaines conservés semblent aussi jouer un rôle dans les différentes réactions de détection croisées observées avec les tests cELISA N-PB et N-PPR. A l'analyse de ces résultats, il semble difficile d'obtenir des tests de diagnostic cELISA spécifiques pour la PB et la PPR à partir d'AcM anti-N dont l'épitope serait localisé en région N-terminale. Cela est aussi confirmé par les travaux de Choi et al, (2005). En effet ces auteurs ont développé un test cELISA avec un AcM anti-N PPR (P-3H12) dont l'épitope est situé dans le même domaine que celui de l'AcM 38-4 en région N-terminale. Les tests de spécificité de ce cELISA PPR (AcM P-3H12) avec des sérums anti-PB donne des réactions positives croisées comme c'est le cas avec le test cELISA utilisant l'AcM 38-4. Pour contourner la problématique des AcMs de la région N-terminale des protéines N de RPV et PPRV pour leur manque de spécificité dans les tests cELISA, une série d'AcMs contre le domaine variable C-terminale de la protéine N de PPRV a été produit. Cette région C-terminale est exposée à la surface de la nucléocapside (Bourhis et al, 2007; 2006; 2005; 2004) et est donc plus facilement accessible aux anticorps. Elle possède une séquence, aa 421 à 490, très variable d'un morbillivirus à l'autre. Les épitopes d'éventuel AcM à l'intérieur de cette séquence longue de 70 aa seraient moins encombrés que ceux de la région variable N-terminale 121-145. Trois AcMs spécifiques au PPRV et dirigés contre le domaine aa 421 à

490 ont été obtenus. Ils ont tous un épitope linéaire qui a été déterminé à partir de peptides de synthèse et l'un de ces AcMs, le P4G5 dont l'épitope est sur le peptide ⁴²⁶EGESPTPATREEVK⁴³⁹ a donné en compétition cELISA des résultats intéressants avec les sérums anti-PPR mais donne des réactions croisées avec des sérums anti-PB. La compétition entre le P4G5 et les anticorps anti-PB ne peut s'expliquer que par un phénomène d'encombrement stérique de ces derniers sur le site de fixation de l'AcM. On peut ainsi penser que la région C-terminale bien que exposée à la surface de la nucléocapside, serait très proche de la région N-terminale conservée qui est en plus immunodominant.

Pour éviter les phénomènes d'encombrement stérique sur les sites de fixation des AcMs, nous pensons qu'il serait donc plus judicieux de chercher à élaborer des tests ELISA indirect (iELISA) spécifiques à partir de peptides spécifiques qui doivent être désignés dans les domaines variables aa 121-145 ou aa 421-490 des protéines N. Ces peptides devront permettre de faire la différenciation entre la PB et la PPR dans des tests iELISA. Ils doivent à cet effet posséder des épitopes spécifiques reconnus soit par les anticorps anti-RPV ou par anti-PPRV.

Dans un premier temps, une analyse de la capacité des domaines variables des protéines N à induire chez les ruminants domestiques la production d'anticorps a été menée. Les résultats obtenus indiquent que le domaine 121-145 en N-terminale de la protéine N de RPV et PPRV génère chez la souris comme chez les ruminants des anticorps. Des résultats similaires ont aussi été obtenus par d'autres auteurs qui ont montré que la région N-terminale de la protéine N de morbillivirus contient des épitopes immunodominants pour la souris et les ruminants (Dechamma et al, 2006; Choi et al, 2005b; 2004; Buckland et al, 1989). A l'inverse, le caractère immunodominant de la région C-terminale de la protéine N varierait selon les virus et aussi selon les espèces animales. L'expression de la séquence aa variable 421-490 de PPRV que nous avons réalisée au cours de nos travaux, et utilisée comme antigène en iELISA n'a pas permis de détecter des sérums anti-PPR provenant de caprins, ovins et bovins, cela pourrait indiquer que cette région C-terminale de la protéine N de PPRV serait moins immunogène pour induire la production d'anticorps chez les ruminants domestiques. Ces anticorps s'ils existent, seraient en faible quantité et n'ont pu être mis en évidence avec la technique que nous avons utilisée. Un résultat similaire a été obtenu avec le MV par Zvirbliene et al, (2007). Ces auteurs indiquent que les anticorps à épitope linéaire de

la région C-terminale de la nucléoprotéine sont en très faible proportion dans les sérums de patients humains séropositifs au MV pour être mis en évidence dans des tests iELISA. Ces sérums ne présentaient qu'un bruit de fond important dans les tests iELISA avec les peptides de la région C-terminale de la protéine N. Ils concluent que cela pourrait indiquer un faible pouvoir immunogène de la région C-terminale et les anticorps à épitope linéaire seraient en très faible proportion pour être mise en évidence. En revanche, chez la souris, ils soulignent que le domaine variable C-terminale de la protéine N de MV est immunodominant et présente des épitopes reconnus par plusieurs AcMs. Ainsi, il semble que les régions C-terminale des virus PPRV et MV ne soient pas très immunogènes chez les ruminants domestiques et chez l'Homme respectivement. Pour le RPV, divers travaux ont montré que la région C-terminale de la protéine N possède des épitopes linéaires immunodominants chez les ruminants (Parida et al, 2007; Choi et al, 2004). L'un de ces épitopes est représenté par le peptide ⁴⁷⁹PEADTDPL⁴⁸⁶ (Choi et al, 2004).

Les anticorps dirigés contre la région C-terminale de la protéine N PPRV étant en faible proportion, leur détection dépendra de la sensibilité des tests qui seront utilisés. La quantité de peptides utilisée pour chaque test semble être déterminant pour la mise en évidence de ces anticorps. En effet, au cours de nos travaux nous avons utilisé 500 ng de peptides pour la sensibilisation des microplaques de 96 puits (Nunc-Immobilizer) et cela n'a pas permis la mise en évidence des anticorps anti-PPR à partir de sérums anti-PPR. Par contre avec 2 mg de peptide fixés sur des billes de résines utilisés dans un test d'iELISA, Dechamma et al, (2006) ont pu révéler la présence d'épitopes linéaires en C-terminale de la protéine N de PPRV et identifier des épitopes de spécificité stricte PPRV.

Enfin, l'étude comparative des motifs immunodominants linéaires de la protéine N de RPV en régions N-terminale et C-terminale qui sont représentés respectivement par les peptides ¹²⁵DEADRYFTYEENPND¹³⁸ et ⁴⁷⁹PEADTDPL⁴⁸⁶ fait apparaître la présence des résidus «EAD» dans la séquence de chaque peptides. Ces résidus «EAD» sont bien conservés dans la séquence aa ¹²⁵-EAD-----¹³⁸ en région N-terminale de la protéine N des morbillivirus à partir de la comparaison des séquences réalisée par Diallo et al, (1994). En revanche ils sont absents dans la séquence aa 479 à 486 dans le domaine C-terminale de la protéine N de PPRV. Ces résidus «EAD» pourraient éventuellement jouer un rôle dans la formation des structures antigéniques immunodominantes pour la production d'anticorps.

L'absence des résidus «EAD» en région C-terminale de la protéine N de PPRV expliquerait peut-être la très faible proportion ou l'absence d'anticorps produits par les petits ruminants contre le polypeptide aa 421-490 de la N PPRV.

Pour des tests iELISA PB et PPR spécifiques, des peptides pourraient être désignés dans les domaines variables des aa 121 à 145 (pour le RPV et PPRV) et les aa 421 à 490 (pour le RPV) des différentes protéines N en y incluant les résidus «EAD». Pour le RPV, le peptide ⁴⁷⁹PEADTDPL⁴⁸⁶ ou toute la séquence aa du domaine variable 421 à 490 C-terminal de la protéine N exprimée dans le système *E. coli* et été utilisés comme antigène en iELISA semblent être promoteurs pour un test de diagnostic sérologique spécifique pour la PB (Parida et al, 2007; Choi et al, 2004).

2. Analyse des interactions de la nucléoprotéine au cours de la réplication virale.

La nucléoprotéine des virus à ARN négatif comme décrite dans la partie bibliographique participe à différents types d'interactions qui sont essentielles pour la réplication virale. Ainsi les interactions entre les monomères de N sont à l'origine de leur auto-assemblage et de l'encapsidation de l'ARN viral. Au cours de la réplication du génome viral, le complexe polymérase (L-P) se fixe sur ce complexe ARN-N par l'intermédiaire de l'interaction entre les protéines P et N. Enfin pendant le processus de bourgeonnement de la particule virale la nucléocapside via la protéine N est étroitement associée à la protéine M pour être condensée (Lenard, 1996).

Une partie de nos travaux a été consacrée à l'étude de certaines de ces interactions. Nous avons ainsi pu identifier les sites des interactions N-N pour l'auto-assemblage de ses monomères (**article 2**) et N-M (**Manuscrit 3**).

2.1. Interaction N-N pour la formation de la nucléocapside (article 2).

Les résultats de cette étude ont montré la capacité de la nucléoprotéine de PPRV à s'auto-assembler pour former des structures nucléocapsidiques en l'absence de l'ARN génomique et des autres protéines de PPRV comme cela a été montré pour d'autres virus à ARN- (Schoehn et al, 2004; Kho et al, 2003; Murphy et al, 2003; Bhella et al, 2002; Karlin et al, 2002; Samuel et al, 2002; Errington et Emmerson, 1997; Warnes et al, 1995; Spehner et al, 1991). Pour l'étude des sites d'auto-assemblage de la protéine N, des mutants tronqués dans les régions N-terminale et C-terminale ont été produits. Le résultat de la détection par WB montre, à l'exception du mutant NΔ1-241, la présence de bandes supplémentaires dont certaines sont de tailles beaucoup plus élevées que celles attendues. Ces bandes correspondent certainement à des oligomères des protéines exprimées qui n'ont pu être dissociées malgré la dénaturation des échantillons avant l'électrophorèse en gel SDS-PAGE. Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec des protéines tronquées de la nucléoprotéine du virus syncytial respiratoire (en anglais Respiratory Syncytial Virus : RSV) (Murphy et al, 2003). Ces auteurs indiquent que des mutants tronqués de la nucléoprotéine de RSV peuvent former des oligomères et ainsi posséder des sites d'interaction pour l'auto-assemblage de ces protéines. Cela pourrait suggérer dans notre cas que tous les mutants à l'exception du mutant NΔ1-241 possèdent encore des sites d'interaction N-N. Pour mieux préciser les différents sites d'interaction N-N de la nucléoprotéine de PPRV, des immunoprécipitations ont été réalisées sur les différents lysats cellulaires des co-expressions de la protéine N avec chaque mutant. Toutes les protéines mutantes à l'exception du mutant NΔ1-241 ont pu être co-précipitées avec la nucléoprotéine entière. Ces résultats montrent que les sites d'interaction N-N sont essentiellement localisés dans le domaine N-terminal, aa 1 à 241. Ces sites seraient bipartites, aa 1-120 et aa 146-241 puisque les mutants NΔ1-145 et NΔ121-241 dans lesquels l'un ou l'autre de ces sites a été éliminés possèdent la capacité de s'auto assembler. Pour le MV, il a été montré que les aa aux positions 228 et 229, bien conservés entre morbillivirus, sont critiques pour la formation de la structure nucléocapsidique (Karlin et al, 2002). Ceci semble être aussi le cas pour la nucléoprotéine de PPRV. Les mutations des aa S (n°228) et L (n°229) sur cette protéine modifient considérablement la structure de l'épitope conformationnelle de l'AcM 38-4. En effet l'AcM 38-4 ne reconnaît que les structures de type nucléocapsidique comme cela a été montré. La localisation précise des sites d'interaction N-N

permet de comprendre l'incapacité du mutant N Δ 1-242 à former des oligomères observables en WB. Ce mutant est aussi incapable de former des particules structurées identifiables sur un gradient de CsCl. En effet les différents essais de purification de la mutation N Δ 1-241 pour l'observation à la microscopie électronique sont restés infructueux. La protéine N et les autres mutants ont pu être purifiés sur gradient de CsCl et leur observation en microscopie électronique a permis d'identifier les structures formées par l'auto-assemblage de chaque protéine. Le résultat de cette observation montre que seule la protéine entière N et le mutant tronqué dans la région C-terminale (N Δ 421-525) forment des particules qui ressemblent à la nucléocapside virale, tandis que les autres mutants tronqués en N-terminale présentent des structures cristallines en agrégat. Cela confirme une fois de plus l'importance de la région N-terminale de la nucléoprotéine dans la formation de la nucléocapside de PPRV comme pour d'autre Paramyxovirus (Schoehn et al, 2004; Kingston et al, 2004; Kho et al, 2003; Murphy et al, 2003; Liston et al, 1997; Bankamp et al, 1996; Buchholz et al, 1993). Cependant, la longueur de la zone impliquée dans la formation de la nucléocapside que nous avons identifiée sur la nucléoprotéine PPRV N est plus courte (aa 1 à 241) par rapport à celle des virus de Sendai (aa 1 à 399) et de la rougeole (aa 1 à 375/398) (Kingston et al, 2004; Bankamp et al, 1996; Buchholz et al, 1993). L'analyse des résultats de la ME indique que les aa 1 à 120 impliqués dans l'interaction N-N pourraient être importants pour la formation des structures hélicoïdales puisque de tels éléments bien qu'en faible quantité, sont également trouvés dans les préparations des mutants N Δ 121-241 et N Δ 121-277. Des résultats semblables avec le RSV ont été obtenus par Murphy et al, (2003) qui indiquent que le fragment correspondant aux aa 1 à 92 de la nucléoprotéine semble suffisant pour former des structures hélicoïdales.

En conclusion à cette étude, nous pouvons affirmer que la région N-terminale de la nucléoprotéine de PPRV est essentielle pour les interactions N-N impliquées dans la formation de la nucléocapside. Ainsi malgré la présence de sites antigéniques immunodominants dans cette région qui pourraient constituer d'excellents marqueurs, il est impossible d'éliminer la moindre séquence aa sans affecter la formation de la nucléocapside.

2.2. Interaction au cours de l'assemblage et du bourgeonnement du virion : Interaction N-M.

L'interaction de la protéine N avec la protéine de matrice est essentielle pour la formation du virion lors du processus de bourgeonnement de la particule virale à partir de la membrane cellulaire. La protéine M agit comme un pont entre la nucléocapside et l'enveloppe virale. Son absence ou des mutations modifiant sa structure seraient responsables de l'altération de l'assemblage et du bourgeonnement viral. Chez les *Rhabdoviridae*, la protéine M interagit avec la ribonucléoprotéine virale en la compactant avant l'étape de bourgeonnement (Jayakar et al, 2004; Flood et Lyles, 1999; Garoff et al, 1998; Gaudin et al, 1997; 1995; Newcomb et al, 1982). Pour les virus Parainfluenza humain type 1 (hP1V1) et PPRV l'interaction M-N a été mise en évidence (Coronel et al, 2001; 1999; Haffar, 1999). Chez le hP1V1 cette interaction semble être un processus spécifique porté par le domaine variable C-terminale de la protéine N (Coronel et al, 2001). Ce caractère spécifique de l'interaction des protéines M et N est aussi le cas avec chez les morbillivirus. En effet, Haffar (1999) a montré que la protéine M de PPRV pouvait interagir avec les protéines N des virus RPV et PPRV qui présentent une grande homologie de séquence, en revanche aucune interaction n'est observée avec la nucléoprotéine du virus de la rage. Cela pourrait indiquer que les sites d'interaction de la protéine M sur la protéine N des virus RPV et PPRV seraient conservés entre ces virus mais absent sur la protéine N du virus rabique. Les résultats de nos travaux confirment cette hypothèse. Ils ont permis d'identifier sur la protéine N de PPRV quatre sites d'interaction avec la protéine M:

- Site 1: aa ¹⁷⁰ILAQVWILLAKAVTA¹⁸⁴,
- Site 2: aa ²³⁰RRFMVSLILDIK RTP²⁴⁴,
- Site 3: aa ³³⁸GGLNFGRSYFDPAYF³⁵²,
- Site 4: aa ⁴⁹¹SAEALFRLQAMAKI⁵⁰⁴.

Tous ces sites sont localisés dans des zones bien conservées de la protéine N au sein du groupe morbillivirus selon l'alignement des séquences réalisé par Diallo et al, (1994). Ils sont repartis sur toute la séquence de la protéine N: site 1 en N-terminale, sites 2 et 3 dans la partie centrale et le site 4 en C-terminale.

Nos travaux ont aussi montré que la co-expression de la protéine N avec la protéine M modifie considérablement la répartition de la protéine N dans la cellule. Alors que la protéine N exprimée seule est essentiellement intra cytoplasmique, sa co-expression avec la protéine M l'entraîne vers la membrane. Cette localisation membranaire de la protéine N et donc de la nucléocapside virale est certainement précurseur de l'étape du bourgeonnement virale dont la protéine M est responsable.

La capacité de la protéine M à induire le bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire pour former des vésicules à la surface cellulaire a été confirmée avec l'expression seule de la celle-ci dans les cellules.

2.3. Modification génétique du virus vaccinal PPR à partir du gène de la nucléoprotéine: Délétion ou mutation des domaines non-essentiels de la nucléoprotéine

Depuis quelques années il est possible de générer des virus à ARN négatif à partir de leur génome (Peeters et al, 1999; Baron et Barrett, 1997 ; Conzelmann, K.-K. 1996). Cela a permis le remodelage du génome viral de certains virus par génie génétique pour produire des vecteurs viraux de gènes étrangers dont les protéines correspondantes sont utilisées pour des traitements thérapeutiques et la vaccination. Dans le cas du MV, un virus génétiquement modifié par élimination du fragment de 504 nucléotides non codant du gène de la protéine F a pu être produit (Radecke et Billeter, 1997, Radecke et al, 1995). La modification du génome de MV par insertion de gènes étrangers pour générer des MV recombinant (MVr) ont également été produits (Lorin et al, 2004; Wang et al, 2001; Singh et al, 1999a; 1999b). L'injection du MVr exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du HIV (virus de l'immunodéficience humaine) chez la souris a généré une réponse humorale et cellulaire contre toutes les protéines du MV et cette protéine de HIV (Lorin et al, 2004).

Pour le développement d'un vaccin qui puisse permettre de faire une différenciation sérologique entre les animaux vaccinés et infectés avec les virus PPRV sauvages, le projet de recherche dans lequel s'inscrivent nos travaux a opté pour la modification génétique de la souche vaccinale PPRV à partir du remodelage de la nucléoprotéine et donc de son gène. Le

choix de la protéine N pour la détermination du marqueur dans un vaccin DIVA, est dû au pouvoir d'induction de cette protéine pour une production élevée d'anticorps spécifiques cours des infections à morbillivirus. Le remodelage de cette protéine par élimination de séquence aa permettrait de différencier les anticorps anti-protéine N produits chez les animaux vaccinés et à ceux des animaux infectés par les souches sauvages de PPRV. Avant de pouvoir passer au stade du remodelage du gène de nucléoprotéine par délétion ou mutation, nous avons identifié les déterminants antigéniques majeurs et les zones non-essentiels de cette protéine. Les résultats montrent que la région N-terminale semble être plus immunogène que la région C-terminale et chacune de ces régions joue un rôle dans la réplication virale. La région N-terminale est indispensable pour la formation de la nucléocapside. D'autre part, différents sites sur la protéine N interagissent avec la protéine M et ceux-ci sont repartis sur tout le long de la nucléoprotéine. Enfin il a été montré chez le MV que la phosphoprotéine virale interagit avec le domaine variable C-terminal de la protéine N (Bourhis et al, 2006, 2005, 2004; Kingston et al, 2004; Johansson et al, 2003; Liston et al, 1997)

L'implication de chacune des régions N-terminale et C-terminale de la protéine N dans la formation du virus semblent rendre difficile le remodelage du gène N par délétion pour la production de virus vaccinal recombinant modifié. Néanmoins pour le MV, la séquence aa 505 à 525 de la nucléocapside ne serait pas indispensable à la réplication virale (Zhang et al, 2002) et donc pas impliquée dans les interactions de la protéine N. Il serait intéressant de confirmer ce résultat avec le PPRV en recherchant les sites d'interaction de la protéine P sur la protéine N. Ensuite il faudra déterminer si la séquence aa 505-525 de la protéine N est immunogène et capable d'induire la production d'anticorps chez les animaux. On pourra ainsi dans des travaux futurs envisager des mutations dans cette séquence pour éliminer d'éventuels épitopes reconnus par des anticorps dirigés contre ce domaine. Si par contre la séquence aa 505 à 525 n'est pas immunogène, on pourrait envisager sa délétion et exprimer une protéine N en fusion avec un peptide étranger immunogène inséré à la place de cette séquence, cela, sans affecter ses interactions et fonctions. Ainsi les animaux vaccinés avec un virus vaccinal PPR dont la séquence aminoacides 505-525 du gène N aura été remodelée auront un profil des anticorps différent par rapport à l'infection avec le virus sauvage. La différenciation entre animaux vaccinés et infectés serait ainsi facilitée à partir de tests de diagnostic sérologique.

Références bibliographiques

Abu Elzein E.M.E., Housawi F.M.T., Bashareek Y., Gameel A.A., Al- Afaleq A.I. and E.C. Anderson. (2004). Severe PPR infection in Gazelles kept under semi-free range conditions in Saudi Arabia. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, 51: 68-71.

Abu Elzein E.M.E., Hassanien M.M., Alfaleg A.I.A, Abd Elhadi M.A. and F.M.T Housawi. (1990). Isolation of PPR virus from goats in Saudi Arabia. *Vet. Rec.*, 127: 309-310.

Ailenberg M. and M. Silverman (1997). Site-directed mutagenesis using a PCR-based staggered re-annealing method without restriction enzymes. *Biotechniques* 22, 624-630.

Albertini A.A.V., Wernimont A.K., Muziol T., Ravelli R.B.G., Clapier C.R., Schoehn G., Weissenhorn W. and R.W.H. Ruigrok. (2006). Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*, 313: 360-3

Albertini A.A.V., Schoehn G. et R.W.H. Ruigrok. (2005). Structures impliquées dans la replication et la transcription des virus à ARN non-segmenté de sens négatif. *Virologie*, 9: 83-92.

Alkhatib G., Roder J., Richardson C., Briedis D., Weinberg R., Smith D., Taylor J., Paoletti E. and S.H. Shen. (1994a). Characterization of a cleavage mutant of the measles virus fusion protein defective in syncytium formation. *J. Virol.*, 68: 6770-6774.

Alkhatib G., Shen S.H., Briedis D., Richardson C., Massie B., Weinberg R., Smith D., Taylor J., Paoletti E. and J. Roder. (1994b). Functional analysis of N-linked glycosylation mutants of the measles virus fusion protein synthesized by recombinant vaccinia virus vectors. *J. Virol.*, 68: 1522-1531.

Alkhatib G. and D.J. Briedis. (1986). The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin. *Virology*, 150: 479-490.

al-Naeem A, Abu Elzein EM and A.I. al-Afaleq. (2000). Epizootiological aspects of peste des petits ruminants and rinderpest in sheep and goats in Saudi Arabia. *Rev Sci Tech.*, 19: 855-858.

Amjad H., Ul-Islam Q, Forsyth M., Barrett T. and P. Rossiter. (1996). Peste des Petits Ruminants in Pakistan. *Vet. Rec.*, 139: 118-119.

Anderson E.C., Hassan A., Barrett T. and J. Anderson. (1990). Observation of the pathogenicity for sheep and goats and the transmissibility of the strain of virus isolated during the rinderpest outbreak in Sri Lanka in 1987. *Vet. Microbiol.*, 21: 309-318.

Anderson E.C. (1995). Morbillivirus infection in wildlife in relation to their population biology and disease control in domestic animals. *Vet. Microbiol.*, 44: 319-332.

Anderson J., Corteyn M. and G. Libeau. (2006). Diagnosis of rinderpest virus and peste des petits ruminants virus-*In: Rinderpest and peste des petits ruminants*. Barrett T., Pastoret P-P. and W.P Taylor (eds). Academic Press: 163-184.

Références bibliographiques

- Anderson J., Barrett T. and G.R. Scott. (1996). Manual of the Diagnosis of Rinderpest, 2nd Edition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Animal Health Manual 1, 143 pp. Rome, Italy.
- Anderson J. and J.A Mc Kay. (1994). The detection of antibodies against peste des petits ruminants in cattle, sheep and goats and possible implications to rinderpest control programmes. *Epidemiol. and infect.*, 112: 225-234.
- Anderson J., Mc Kay J.A. and R.N. Butcher. (1991). The use of monoclonal antibodies in competitive ELISA for detection of antibodies to rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *In: The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa. Phase one.* Jeggo, M.H (ed). The proceedings of a final research Programm. Bingerville, Côte d'Ivoire, 19-23 novembre 1991, 43-53.
- Appel M.J., Shek W.R., Shesberadaran H. and E. Norrby. (1984). Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch. Virol.*, 82:73-82.
- Arneborn P. and G.Biberfeld. (1983). T-lymphocyte subpopulation in relation to immunosuppression in measles and varicella. *Infect. Immun.*, 39: 29-37.
- Auwaerter P.G., Rota P.A., Elkins W.R., Adams R.J., DeLozier T., Shi Y., Bellini W.J., Murphy B.R. and D.E. Griffin. (1999). Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J. Infect. Dis.*, 180: 950-958.
- Awa D.N., Ngangnou A., Tefiang F., Yaya D. and A. Njoya. (2002). Post vaccination and colostral peste des petits ruminants antibody dynamics in research flocks of Kirdi goats and Foulbe sheep of north Cameroon. *Prev. Vet. Med.*, 55: 265-271.
- Bailey D., Banyard A., Dash P., Ozkul A. and T. Barrett. (2005). Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the *Morbillivirus* genus. *Virus. Res.*, 110: 119-124.
- Bankamp B., Horikami S.M., Thompson P.D., Huber M., Billeter M. and S.A. Moyer (1996). Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology*, 216: 272-277.
- Bankamp B., Brinckmann U.M., Reich A., Niewiesk S., TerMeulen V. and U.G. Liebert. (1991). Measles virus nucleocapsid protein protects rats from encephalitis. *J. Virol.*, 65: 165-1700.
- Banyard A.C., Rima B.K. and T. Barrett. (2006). The morbilliviruses. *In: Rinderpest and Peste des petits ruminants, Virus Plagues of large and Small Ruminants.* Barrett T., Pastoret P-P and W.P. Taylor (eds). Academic Press: 13-30.
- Baron, M. D. and T. Barrett. (1997). Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *J. Virol.*, 71:1265-1271.

Références bibliographiques

- Baron M.D. and T. Barrett. (1995). Sequencing and analysis of the nucleocapsid (N) and polymerase (L) gene and the extragenic domains of the of the vaccine strain of rinderpest virus. *J. Gen. Virol.*, 76: 596-603.
- Barrett T., Banyard A.C. and A. Diallo. (2006). The molecular biology of the morbilliviruses- *In*: Rinderpest and peste des petits ruminants, Virus Plagues of large and Small Ruminants. Barrett T., Pastoret P-P. and W.P Taylor (eds). Academic Press: 31-67.
- Barrett T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet. Microbiol.*, 69: 3-13.
- Barrett T. and P.B. Rossiter. (1999). Rinderpest: the disease and its impact on humans and animals. *Adv. Virus Res.*, 53:89-110.
- Barrett T, Amarel-Doel L., Kitching R.P. and A. Gusev. (1993). Use a polymerase chain reaction in differentiating rinderpest field virus and vaccine in the same animal. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 12: 865-872.
- Barrett T., Belsham G.J., Subbarao S.M. and S.A Evans. (1989). Immunization with a vaccine recombinant expressing the F protein protects rabbits from challenge with a lethal dose of Rinderpest virus. *Virology*, 170: 11-18.
- Beauverger P., Cardoso A.I., Daviet L., Buckland R. and T.F. Wild. (1996). Analysis of the contribution of CTL epitopes in the immunobiology of morbillivirus infection. *Virology*, 219: 133-139
- Bellini W.J., Englund G., Rozenblatt S., Arnheiter H. and C.D Richardson. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *J. Virol.*, 53: 908-919.
- Berhe G., Minet C., Le Goff C., Barrett T., Ngangnou A., Grillet C., Libeau G., Fleming M., Black D.N. and A. Diallo. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J Virol.*, 77: 1571-1577.
- Bhella D., Ralph A. and R.P.Yeo (2004). Conformational flexibility in recombinant measles virus nucleocapsids visualised by cryo-negative stain electron microscopy and real-space helical reconstruction. *J. Mol. Biol.*, 34: 319-331.
- Bhella D., Ralph A., Murphy L.B. and R.P.Yeo. (2002). Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.*, 83: 1831-1839.
- Blancou J. (2000). Peste bovine. *In* : Histoire de la surveillance et du contrôle des maladies animales transmissibles. Blancou J. (ed). *Off. Int. Epiz. (OIE)*. Paris: 167-198.

Références bibliographiques

- Bleharski J.R., Niazi K.R., Sieling P.A., Cheng G. and R.L. Modlin. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J. Immunol.*, 167: 3174-3181.
- Blumberg B.M., Crowley J.C., Silverman J.I., Mennona J., Cook S.D. and P.C. Dowling. (1988). Measles virus L protein evidences element of ancestral RNA polymerase. *Virology* 164: 487-497.
- Bidjeh K., Ouagal M., Diallo A. et P. Bornarel. (1997). Transmission des souches du virus bovinepestique de virulence variable aux chèvres tchadienne. *Ann. Méd. Vét.*, 141: 65-69.
- Bodjo S.C., Couacy-Hymann E., Koffi M.Y and T.Danho. (2006). Assessment of the duration of maternal antibodies specific to the homologous *peste des petits ruminant* vaccine "Nigeria 75/1" in *Djallonké* lambs. *Biokemistri*, 18: 99-103.
- Bonniwell M.A. (1980). The use of tissue culture rinderpest vaccine (TCRV) to protect sheep and goat against peste des petits ruminants in the Ashanti region of Ghana. *Bull. Off. Int. Epi.*, 92: 1233-1238.
- Bourdin P., Rioche M. et A. Laurent. (1970). Emploi d'un vaccin antibovinepestique produit sur cultures cellulaires dans la prophylaxie de la peste des petits ruminants au Dahomey. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 23: 295-300.
- Bourdin P. et A. Laurent-Vautier. (1967). Note sur la structure du virus de la peste des petits ruminants. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 20: 383-386.
- Bourhis J-M., Liquière E., Costanzo S. et S. Longhi. (2007). Désordre Structural chez les virus: Rôle fonctionnel du désordre structural au sein du complexe réplcatif du virus de la rougeole. <http://www.afmb.univ-mrs.fr/Desordre-Structural-chez-les-virus>.
- Bourhis J-M., Canard B. and S. Longhi. (2006). Structural disorder within the replicative complex of measles virus: Funtional implications. *Virology*, 344: 94-110.
- Bourhis J-M., Canard B. et S. Longhi. (2005). Désordre structural au sein du complexe réplcatif du virus du virus de la rougeole: implications fonctionnelles. *Virologie*, 9: 367-383.
- Bourhis J-M., Johansson K., Receveur-Bréchet V., Oldfield C. J., Dunker K. A., Canard B. and S. Longhi. (2004). The C-terminal domain of measles virus nucleoprotein belongs to the class of intrinsically disordered proteins that fold upon binding to their physiological partner. *Virus Res.*, 99: 157-167.
- Brown R.D. (1958). Rinderpest immunity in calves-A review. *Bull. Epiz. Dis. Afr.*, 6: 127-133.
- Buchholz C.J., Spehner D., Drillien R., Neubert W. J and H.E. Homann. (1993). The conserved N-terminus region of Sendai virus nucleocapsid protein N is required for nucleocapsid assembly. *J. Virol.*, 67: 5803-5812.

Références bibliographiques

- Buckland R., Malvoisin E., Beauverger P. and F. Wild. (1992). A leucine zipper structure present in the measles virus fusion protein is not required for its tetramerization but is essential for fusion. *J. Gen. Virol.*, 73: 1703-1707.
- Buckland R., Giraudon P. and F. Wild. (1989). Expression of measles virus nucleoprotein in *Escherichia coli*: use of deletion mutants to locate the antigenic sites. *J. Gen. Virol.*, 70: 435-441.
- Canter D.M., Jackson R.L. and J. Perrault. (1993). Faithful and efficient in vitro reconstitution of vesicular stomatitis virus transcription using plasmid-encoded L and P protein. *Virology*, 194: 518-529.
- Cam Y., Gencay A., Beyaz L., Atalay O., Atasever A., Ozkul A. and M Kibar. (2005). Peste des petits ruminants in a sheep and goat flock in Kayseri province, Turkey. *Vet Rec.*, 157: 523-524.
- Cardoso A.I., Sixt N., Vallier A., Fayolle J., Buckland R. and T.F. Wild. (1998). Measles Virus DNA Vaccination: Antibody isotype is determined by the method of immunization and by the nature of both the antigen and the coimmunized antigen. *J. Virol.*, 72: 2516-2518.
- Cardoso A.I., Gerlier D., Wild T.F. and C. Rabourdin-Combe. (1996a). The ectodomain of measles virus envelope glycoprotein does not gain access to the cytosol and MHC class I presentation pathway following virus-cell fusion. *J. Gen. Virol.*, 77: 2695-2699.
- Cardoso A.I., Blixenkrone-Moller M., Fayolle J., Liu M., Buckland R. and T. F Wild. (1996b). Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. *Virology*, 225: 293-299.
- Carmichael A.G. (1997). Measles: the red menace. In: Plaque, Pox, and Pestilence. Kipple K.F. (ed). Widenfeld and Nicholson, London: 80-85.
- Cartee T.L., Megaw A.G., Oomens A.G.P. and G.W. Wertz. (2003). Identification of a Single Amino Acid Change in the Human Respiratory Syncytial Virus L Protein That Affects Transcriptional Termination. *J. Virol.*, 77: 7352-7360.
- Cattaneo R., Kaelin K., Baczko K. and M.A. Billeter. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*, 56: 759-764.
- Cathomen T., Mrkic B., Spehner D., Drillien R., Naef R., Pavlovic J., Aguzzi A., Billeter M.A. and R. Cattaneo. (1998). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J.*, 17: 3899-3908.
- Choi K.S., Nah J.J., Ko Y.J., Kang S.Y. and N.I. Jo. (2005a). Rapid Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Peste des Petits Ruminants Virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12: 542-547.

Références bibliographiques

- Choi K.S., Nah J.J., Ko K.Y., Kang S.Y., Yoon K. and N.I. Jo. (2005b). Antigenic and immunogenic investigation of B-cell epitopes in the nucleocapsid protein of peste des petits ruminants virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12: 114-121.
- Choi K.S., Nah J.J., Ko Y.J., Kang S.Y., Yoon K.J. and Y.S. Joo. (2004). Characterization of immunodominant linear B-cell epitopes on the carboxy terminus of the rinderpest virus nucleocapsid protein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11: 658-664.
- Choi K.S., Nah J.J., Choi C.U., Ko Y.J., Sohn H.J., Libeau G., Kang S.Y. and Y.S. Joo. (2003). Monoclonal antibody-based competitive ELISA for simultaneous detection of rinderpest virus and peste des petits ruminants virus antibodies. *Vet. Microbiol.*, 96: 1-16
- Chong L.D. and J.K. Rose. (1994). Interactions of Normal and Mutant Vesicular Stomatitis Virus Matrix Proteins with the Plasma Membrane and Nucleocapsids. *J. Virol.*, 68:441-447.
- Chong, L. D., and J. K. Rose. (1993). Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *J. Virol.* 67:407-414.
- Choppin P.W. and A. Scheid. (1980). The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev Infect Dis.*, 2: 40-61.
- Cocks B.G., Chang C.C., Carballido J.M., Yssel H., de Vries J.E and G. Aversa. (1995). A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*, 376: 260-263.
- Conzelmann, K.-K. (1996). Genetic manipulation of non-segmented negativestrand RNA viruses. *J. Gen. Virol.*, 77: 381-389.
- Coronel E.C., Takimoto T., Murti K.G., Verich N. and A. Portner. (2001). Nucleocapsid incorporation into parainfluenza virus is regulated by specific interaction with matrix protein. *J Virol.*, 75: 1117-1123.
- Coronel E.C., Murti K.G., Takimoto T. and A. Portner. (1999). Human parainfluenza type I matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of viruslike particles containing nucleocapsid-like structures. *J. Virol.*, 73: 7035-7038.
- Couacy-Hymann E., Bodjo S.C., Tounkara K., Koffi M.Y., Ohui A.Y., Danho T. and B.M.D. Bronsvoort. (2007a). Comparison of two competitive ELISAs for the detection of specific Peste-Des-Petits-Ruminants antibodies in sheep and cattle populations. *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 732-736.
- Couacy-Hymann E., Bodjo S.C., Danho T., Koffi M.Y., Libeau G. and A. Diallo. (2007b). Early detection of viral excretion from experimentally infected goats with peste-des-petits ruminants virus. *Prev. Vet. Med.*, 78: 85-88.
- Couacy-Hymann E., Bodjo C., Danho T., Libeau G. and A. Diallo. (2007c). Evaluation of the virulence of some strains of peste-des-petits-ruminants virus (PPRV) in experimentally infected West African dwarf goats. *Vet. Journal.*, 173: 178-183.

Références bibliographiques

Couacy-Hymann E., Bodjo S.C. and T. Danho. (2006). Interference in the vaccination of cattle against rinderpest virus by antibodies against peste des petits ruminants (PPR) virus. *Vaccine*, 24: 5679-5683.

Couacy-Hymann E, Bodjo S.C., Danho T., Libeau G. and A. Diallo. (2005). Surveillance of wildlife as a tool for monitoring rinderpest and peste des petits ruminants in West Africa. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24: 869-877.

Couacy-Hymann E., Roger F., Hurard C., Guillou J.P., Libeau G. and A Diallo (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J. Virol Methods.*, 100: 17-25.

Couacy-Hymann E., Bidjeh K., Angba A., Domenech J. and A. Diallo (1995). Protection of goats against rinderpest by vaccination with attenuated peste des petits ruminants virus. *Res Vet Sci.*, 59: 106-109.

Couacy-Hymann E. (1994). La lutte contre la peste bovine en Côte d'Ivoire: coûts et bénéfices des campagnes de prophylaxie, problèmes posés pour son éradication. *Thèse doctorat de l'Université de Paris XII*.

Cosby S.L, McQuaid S., Duffy N., Lyons C., Rima B.K., Allan G.M., McCullough S.J., Kennedy S., Smyth J.A.; McNeilly. F.; Orwell C. and al, (1988). Characterization of a seal morbillivirus. *Nature*, 336: 115-116.

Curasson G. (1942). Maladie à ultra-virus. *In: Traité de Pathologie Exotique Vétérinaire et Comparée*, Volume I, 2^{ème} Edition. Vigot Frère (ed). Paris.

Curasson G. (1932). La peste bovine. Vigot Frère (ed). Paris.

Curran J. (1996). Reexamination of the Sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein. *Virology*, 221: 130-140.

Curran J., Marq J.B. and D. Kolakofsky. (1995). An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J. Virol.*, 69: 849-855.

Curran J., Homann H., Buchholz C., Rochat S., Neubert W. and D. Kolakofsky. (1993). The hypervariable C-terminal tail of the Sendai paramyxovirus nucleocapsid protein is required for template function but not for RNA encapsidation. *J. Virol.*, 67: 4358-4364.

Dechamma H.J., Dighe V., Kumar C.A., Singh R.P., Jagadish M. and S. Kumar. (2006). Identification of T-helper and linear B epitope in the hypervariable region of nucleocapsid protein of PPRV and its use in the development of specific antibodies to detect viral antigen. *Vet. Microbiol.*, 118: 201-211.

Références bibliographiques

Diallo A. (2003a). Peste des petits ruminants. In Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes, Volume 1. Lefèvre P.C., Blancou J. et R. Chermette (eds). Editions TEC & DOC, Paris: 307-322.

Diallo A. (2003b). Control of peste des petits ruminants: classical and new generation vaccines. *Dev. Biol.*, 114: 113-119.

Diallo A. (1999). Rapport final contrat de recherche TS3-CT93-204 : Epidémiologie de la peste bovine et de la Peste des Petits Ruminants à partir des données de biologie moléculaire. Summary reports of European Commission supported STD-3 projects (1992-1995), CTA, p 212-215.

Diallo A., Libeau G., Couacy-Hymann E., Barbron M.. (1995). Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. *Vet. Microbiol.*, 44: 307-317.

Diallo A., Barrett T., Barbon M., Meyer G. and P.C Lefèvre. (1994). Cloning of nucleocapsid protein gene of the peste des petits ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. *J. Gen. Virol.*, 75: 233-237.

Diallo A. (1990). Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Vet. Microbiol.*, 23: 155-163.

Diallo A., Barrett T., Barbron M., Subbarao S.M. and W.P. Taylor. (1989a). Differentiation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using specific cDNA clones. *J. Virol. Methods.*, 23: 127-136.

Diallo A., Taylor W.P., Lefèvre P.C. et A. Provost. (1989b). Atténuation d'une souche du virus de la PPR. Candidat pour un vaccin homologue vivant. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 42: 311-319.

Diallo A., Barrett T., Lefèvre P.C. and W.P. Taylor. (1987). Comparaison of proteins induced in cells with Rinderpest virus and Peste des Petits Ruminants virus. *J. Gen. Virol.*, 68: 2033-2038.

Diop M., Sarr J. and G. Libeau. (2005). Evaluation of novel diagnostic tools for peste des petits ruminants virus in naturally infected goat herds. *Epidemiol. Infect.*, 133: 4: 711-717.

Domingo M., Ferrer. L., Pumarola. M., Marco. A., Plana J., Kennedy S., Mc Aliskey. M. and B.K Rima. (1990). Morbillivirus in dolphins. *Nature*, 348: 21.

Dorig R.E., Marcil A., Chopra A. and C. D. Richardson. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*, 75: 295-305.

Drillien R., Spehner D., Kirn A., Giraudon P., Buckland R., Wild F. and J.P. Lecocq. (1988). Protection of mice from fatal measles encephalitis by vaccination with vaccinia virus recombinant encoding either the hemagglutinin or fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 85: 1252-1256.

Références bibliographiques

Dunker A.K., Lawson J.D., Brown C.J., Williams R.M., Romero P., Oh J.S., Oldfield C.J., Campen A.M., Ratliff C.M., Hipps K.W., Ausio J., Nissen M.S., Reeves R., Kang C., Kissinger C.R., Bailey R.W., Griswold M.D., Chiu W., Garner E.C. and Z. Obradovic. (2001). Intrinsically disordered protein. *J. Mol Graph Model*, 19: 26-59.

Egelman E. H., S. Wu L S., Amrein M., Portner A. and G. Murti. (1989). The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical States. *J. Virol.*, 63: 2233-2243.

El Hag Ali B. and W. P. Taylor. (1988). An investigation on rinderpest virus transmission and maintenance by sheep, goat and cattle. *Bull. An. Hlth. Prod. Afr.*, 36: 290-294.

Errington W. and P.T. Emmerson. (1997). Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structure is inhibited by the phosphoprotein. *J. Virol.*, 78: 2335-2339.

Escoffier C., Manie S., Vincent S., Muller C. P., Billeter M. and D. Gerlier. (1999). Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J. Virol.*, 73: 1695-1698.

Etchart N., Desmoulins P-O., Chemin K., Maliszewski C., Buboia B., Wild F. and D Kaiserlian (2001). Dendritic cells recruitment and in vivo priming of CD8+ CTL induced by a single topical or transepithelial immunization via the buccal mucosa with Measles virus nucleoprotein. *J. Immunol.*, 167: 384-391.

Etchart N., Buckland R., Liu M.A., Wild T.F. and D. Kaiserlian (1997). Class I-restricted CTL induction by mucosal immunization with naked DNA encoding measles virus haemagglutinin. *J. Gen. Virol.*, 78: 1577-1580.

Evans S.A., Belsham G.J. and T. Barrett. (1990). The role of the 5' nontranslated regions of the fusion protein mRNAs of canine distemper virus and rinderpest virus. *Virology*, 177: 317-323.

FAO (2004). Rinderpest. EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin. No. 26. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5754e/y5754e00.pdf>

FAO. (2003). La peste bovine en état de siège. <http://www.fao.org/ag/fr/magazine/0302sp1.htm>

FAO (2000). Recognizing peste des petits ruminants. A field manual. FAO animal health manual 5. Food and Agriculture organization, Rome, Italy.

Flamand A., Raux H., Gaudin Y. and R.W.H. Ruigrok. (1993). Mechanism of rabies virus neutralisation. *Virology*, 194: 302-313.

Flood E.A and D.S. Lyles. (1999). Assembly of nucleocapsids with cytosolic and membrane-derived matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *Virology*, 261: 295-308.

Références bibliographiques

- Forsyth M. and T Barrett. (1995). Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.*, 39: 151-163.
- Fraser K.B. and S.J. Martin. (1978). Measle virus and its biology. In: *Experimental Virology Series*. Tinsley T.W. and F. Brown (eds). Academic Press.
- Fugier-Vivier I., Servet-Delprat C., Rivaille P., Rissoan M.C., Liu Y.J. and C. Rabourdin-Combe. (1997). Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med.*, 186: 813-823.
- Furley C. W., Taylor W. P. and T. U. Obi. (1987). An outbreak of peste des petits ruminants in zoological collection. *Vet. Rec.* 121: 443-447.
- Galbraith S.E., Tiwari A., Baron M.D., Lund B.T., Barrett T. and S.L. Cosby (1998). Morbillivirus downregulation of CD46. *J.Virol.*; 72: 10292-10297.
- Gargadennec L. et A. Lalanne. (1942). La peste des petite ruminants. *Bull. Serv. Zoot. Epizoot. AOF*, 5: 16-21.
- Garoff H., Hewson R. and D-J.E Opstelten. (1998). Virus maturation by budding. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:1171-1190.
- Gaudin Y. (2006). Structure du complexe nucléoprotéine-ARN de deux rhabdovirus. *Virologie*, 10: 315.
- Gaudin, Y., J. Sturgis, M. Doumith, A. Barge, B. Robert and R.W.H. Ruigrok. (1997). Conformational flexibility and polymerization of vesicular stomatitis virus matrix protein. *J. Mol. Biol.* 274:816–825.
- Gaudin Y., Barge A., J. Ebel C. and R.W.H. Ruigrok. (1995). Aggregation of VSV M protein is reversible and mediated by nucleation sites: implication for viral assembly. *Virology*, 206: 28-37.
- Gibbs E.PJ., Taylor W.P., Lawman M.J.P. and J. Bryant. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the Genus *Morbillivirus*. *Intervirology*, 11: 268-274.
- Gilbert Y. et J. Monnier. (1962). Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires. *Rev. Elev. M'ed. Vét. Pays trop.*, 15: 321-335.
- Giraudon P. and T.F. Wild. (1981). Monoclonal antibodies against measles virus. *J. Gen. Virol.* 54: 325-332.
- Govindarajan R., Koteeswaran A., Venugopalan A.T., Shyam G. Shouna S., Shaila M.S. and S. Ramachandran. (1997). Isolation of peste des petits ruminants from an outbreak in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) *Vet. Rec.*, 141: 573-574.

Références bibliographiques

- Govindarajan R., Muralimanohar B., Koteeswaran A., Venugopalan A.T., Varalakshmi P., Shaila M.S. and S. Ramachandran. (1996). Occurrence of rinderpest in European pigs in India. *Vet. Rec.*, 139: 473.
- Graves M., Griffin D.E., Johnson R.T., Hirsch R.L., de Soriano I.L., Roedenbeck S and Vaisberg. (1984). Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections. *J. Virol.*; 49: 409-412.
- Graves M.C., Silver S.M. and P.W. Choppin. (1978). Measles virus polypeptide synthesis in infected cells. *Virology*, 86: 254-263.
- Green T.J., Zhang X., Wertz G.W. and M. Luo. (2006). Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*, 313: 357-60.
- Green T.J., Macpherson S., Qiu S., Lebowitz J., Wertz G.W. et M. Luo. (2000). Study of the Assembly of Vesicular Stomatitis Virus N Protein: Role of the P Protein. *J. Virol.*, 74: 9515-9524.
- Griffin, D.E. (2001). Measles virus. In Fieds Virology, 4th ed., vol. 1. knipe D.M., Howley M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B. and S.E. Straus (eds). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, P: 1401-1441.
- Griffin, D. E. (1995). Immune responses during measles virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 191: 117-134.
- Haas L., Hofer H., East M., Wohlsein P., Liess B. and T Barrett. (1996). Canine distemper virus infection in Serengeti spotted hyenas. *Vet Microbiol.*, 49: 147-152.
- Haffar A., Minet C., Barbon M., Grillet C., Libeau G. et A. Diallo. (1999). Aspects biologiques et moléculaires de la peste des petits ruminants. *Ann. Méd. Vét.*, 143: 395-402.
- Haffar A., Libeau G., Moussa A., Cécile M. And A. Diallo. (1999). The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Res.*, 64: 69-75.
- Haffar. (1999). Etude de la protéine de matrice M du virus de peste des petits ruminants: clonage, séquençage et expression dans le système baculovirus. *Thèse de doctorat d'universté Paris IV*.
- Hamdy F.M. and A.H. Dardiri. (1976). Response of white tailed deer to infection with peste des petits ruminants virus. *J. Wildlife Dis.*, 12: 516-522.
- Harder T.C., Kenter M., Appel M.J. G., Roelke-Parker M.E., Barrett T. and A.D.M.E. Osterhaus (1995). Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. *Vaccine*, 13: 521-523.

Références bibliographiques

Harder T.C., Moening V., Greiser-Wilke I., Barrett T. and B. Liess (1991). Analysis of antigenic differences between sixteen phocine distemper viruses and other morbilliviruses. *Arch. Virol.*, 118: 261-268.

Harty R.N. and P. Palese. (1995). Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH₂- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself. *J. Gen. Virol.*, 76: 2863-2867.

Heaney J., Barrett T. and S. L. Cosby. (2002). Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J. Virol.*, 76: 3579-3584.

Hirano A., Ayata M., Wang A.H. and T.C. Wong. (1993). Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding. *J. Virol.*, 67: 1848-1853.

Hirano A., Wang A.H., Gombart A.F. and T.C. Wong. (1992). The matrix proteins of neurovirulent subacute sclerosing panencephalitis virus and its acute measles virus progenitor are functionally different. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 8745-8749.

Hirsch R.L., Griffin D.E., Johnson R.T., Cooper S.J., Lindo de Soriano I., Roedenbeck S. and A. Vaisberg. (1984). Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 31: 1-12.

Homann H.E., Willenbrink W., Buchholz C.J. and W.J. Neubert. (1991). Sendai virus protein-protein interactions studied by a protein-blotting protein-overlay technique: mapping of domains on NP protein required for binding to P protein. *J. Virol.*, 65: 1304-1309.

Howie D., Okamoto S., Rietdijk S., Clarke K., Wang N., Gullo C., Bruggeman J.P., Manning S., Coyle A.J., Greenfield E., Kuchroo V. and C. Terhorst. (2002). The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood*, 100: 2899-2907.

Hu A., Kovamees J. and E. Norrby. (1994). Intracellular processing and antigenic maturation of measles virus hemagglutinin protein. *Arch. Virol.*, 136: 239-253.

Huber M., Cattaneo R., Spielhofer P., Orvell C., Norrby E., Messerli M., Perriard J.C. and M.A. Billeter. (1991). Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology*, 185: 299-308.

Hutcheon D. (1902). Rinderpest in south africa. *J. Comp. Path.*, 15: 300-324.

Iseni F., Baudin F., Garcin D., Marq J-B., Ruigrok R.W.H. and D. Kolakofsky. (2002). Chemical modification of nucleotide bases and mRNA editing depend on hexamer or nucleoprotein phase in Sendai virus nucleocapsids. *RNA*, 8: 1056-1067.

Références bibliographiques

- Iseni F., Baudin F., Blondel D. and R.W.H. Ruigrok. (2000). Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid. *RNA*, 6: 270-281.
- Ismail T.M., Hassas H.B., Nawal M.A., Rakha G.M., Abd El-Halim M.M. and M.M. Fatebia. (1992). Studies on prevalence of rinderpest and peste des petits ruminants antibodies in camel sera in Egypt. *Vet. Med. J.Giza*, 10: 49-53.
- Jayakar H.R., Jeetendra E. and M.A. Whitt. (2004). Rhabdovirus assembly and budding. *Virus Res.*, 106: 117-132.
- Jaye A., Magnusen A.F., Sadiq A.D, Corrah T. and H.C. Whittle. (1998). Ex vivo analysis of cytotoxic T lymphocytes to measles antigens during infection and after vaccination in Gambian children. *J. Clin. Invest.*, 102:1969-1977.
- Jeggo M.H., Wardley R.C. and A.H. Corteyn. (1987). A reassessment of the dual vaccine against rinderpest and contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, 120: 131-135.
- Johansson K., Bourhis J-M., Campanacci V., Cambillau C., Canard B. and S. Longhi. (2003). Crystal structure of the measles virus phosphoprotein domain responsible for the induced folding of the C-terminal Domain of the nucleoprotein. *J. Biol. Chem.*, 278: 44567-44573.
- Johnstone R.W., Russell S.M., Loveland B.E. and I.F. McKenzie. (1993). Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing. *Mol. Immunol.*, 30: 1231-1241.
- Kaptur P.E., Rhodes R.B. and Lyles D.S. (1991). Sequences of the vesicular stomatitis virus matrix protein involved in binding to nucleocapsids. *J. Virol.*, 65: 1057-1065.
- Karlin D., Longhi S. and B. Canard. (2002). Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *Virology*, 302: 420-432.
- Karp C.L., Wysocka M., Wahl L.M., Ahearn J.M., Cuomo P.J., Sherry B., Trinchieri G. and D.E. Griffin. (1996). Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science*, 273: 228-231.
- Kennedy S., Smyth J.A., Cush. P.F., McCullough S.J., Allam G.A. and S. McQuaid. (1988). Viral distemper now found in porpoises. *Nature*, 336: 21.
- Kerdiles Y.M., Cherif B., Marie J.C., Tremillon N., Blanquier B., Libeau G., Diallo A., Wild T.F., Villiers M.B. and B. Horvat. (2006). Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral Immunol.*, 19: 324-334.
- Kho C.L., Tan W.S., Tey, B.T. and K. Yusoff. (2003). Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self-assembly and length-determination domains. *J. Gen. Virol.*, 84: 2163-2168.
- Kingston R.L., Baase W.A. and S. G.Leslie. (2004). Characterization of Nucleocapsid Binding by the Measles Virus and Mumps Virus Phosphoproteins. *J. Virol.*, 78: 8630-8640.

Références bibliographiques

Kitching, R.P. (1988). The economic significance and control of small ruminant viruses in North Africa and West Asia. *In: Increasing Small Ruminant Productivity in Semi-arid Areas*. Thompson F.S. (ed.). ICARDA. 225-236.

Kwiatek O., Minet C., Grillet C., Hurardy C., Carlsson E., Karimovz B., Albina E., Diallo A. and G. Libeau. (2007). Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan. *J. Comp. Path.*, 136: 111-119.

Kruse M., Meinl E., Henning G., Kuhnt C., Berchtold S., Berger T., Schuler G. and A. Steinkasserer. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J. Immunol.*, 167: 1989-1995.

Lamb R.A. and D. Kolakofsky. (2001). *Paramyxoviridae* : The viruses and their replication. *In* "Fields Virology" B.N. Fields 4th edition. Knipe D.M. and P.M. Howley (eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.:1305-1340.

Laine D., Bourhis J.M., Longhi S., Flacher M., Cassard L., Canard B., Sautès-Fridman C., Rabourdin-Combe C. and H. Valentin. (2005). Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through Ntail-NR and Ncore-FcγRIIB1 interactions, respectively. *J. Gen. Virol.*, 86: 1771-1784.

Laine D., Trescol-Biemont M.C., Longhi S., Libeau G., Marie J.C., Vidalain P.O., Azocar O., Diallo A., Canard B., Rabourdin-Combe C. and H. Valentin. (2003). Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J. Virol.*, 77: 11332-11346.

Lefèvre P.C. (2003). La peste bovine. *In Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes*. Volume 1. Lefèvre P.C., Blancou J. et R. Chermette (eds) TEC & DOC, Paris: 285-305.

Lefèvre P.C., Diallo A., Schenke F., Hussein S. and G. Staak. (1991). Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan. *Vet. Rec.*, 128: 110.

Lefèvre P.C. et A. Diallo. (1990). La peste des petits ruminants. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 9: 935-981.

Lefèvre P.C. (1987). Peste des petits ruminants et infection bovine des ovins et caprins. *Etudes et synthèse de l'IEMVT* n° 5 (2e édition), 99 p.

Lenard J. (1996). Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in family? *Virology* 216: 289-298.

Libeau G. (1998). Le diagnostic différentiel expérimental de la peste des petits ruminants et la peste bovine. *Thèse de Doctorat d'Université, Paris VI*.

Références bibliographiques

- Libeau G., Saliki J.T. et A. Diallo. (1997). Caracterisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les virus de la peste bovine et de la peste des mpetits ruminants: identification d'épitopes conservés ou de spécificité stricte sur la ncléoprotéine. . *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.* 50: 181-190.
- Libeau G., Prehaud C., Lancelot R., Colas F., Guerre L., Bishop D.H. and A. Diallo. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res Vet Sci.* 58: 50-55.
- Libeau G., Diallo A., Colas F. and L. Guerre. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, 134: 300-304.
- Libeau G., Diallo A., Calvez D. and P.C. Lefèvre. (1992). A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest antibodies in cattle and small ruminants. *Vet Microbiol.* 31: 147-160.
- Libeau G. and P.C. Lefèvre. (1990). Comparison of rinderpest and peste des petits ruminants viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.*, 25: 1-16.
- Lies B. and W. Plowright. (1964). Studies on the pathogenesis of rinderpest in experimental cattle. I. Correlation of clinical signs, viraemia and virus excretion by various routes. *J. Hyg. Camb.*, 62: 81-100.
- Liston P., Batal R., DiFlumeri C. and D.J. Briedis. (1997). Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Arch. Virol.*, 142: 305-321.
- Liston P. and D. J. Briedis. (1995). Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J. Virol.*, 69: 6742-6750.
- Liston P., DiFlumeri C. and D.J. Briedis. (1995). Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus Res.*, 38: 241-259.
- Liston P. and D. J. Briedis. (1994). Measles virus V protein binds zinc. *Virology*, 198: 399-404.
- Liszewski M.K., Post T.W. and J.P. Atkinson. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol.*, 9: 431-455.
- Longhi S., Receveur-Brechot V., Karlin D., Johansson K., Darbon H. and D. Bhella. (2003). The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J. Biol. Chem.*, 278: 18638-18648.
- Lorin C., Mollet L., Delebecque F., Combredet C., Hurtrel B., Charneau P., Brahic M. and F. Tangy. (2004). A Single Injection of Recombinant Measles Virus Vaccines Expressing Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Clade B Envelope Glycoproteins Induces Neutralizing Antibodies and Cellular Immune Responses to HIV. *J. Virol.*, 78: 146-57.

Références bibliographiques

- Lund B.T., Tiwari A., Galbraith S., Baron M.D., Morrison W.I. and T Barrett. (2000). Vaccination of cattle with attenuated rinderpest virus stimulates CD4(+) T cell responses with broad viral antigen specificity. *J Gen Virol.*, 81: 2137-2146.
- Lund G.A., Tyrrell D.L., Bradley R.D. and D.G. Scraba. (1984). The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J. Gen. Virol.*, 65: 1535-1542.
- Macadam I. (1968). Transmission of rinderpest from goats to cattle in Tanzania. *Bull. Epiz.Dis. Afr.*, 16: 53-60.
- Mahy B.W.J., Barrett T., Evans S., Anderson E.C. and C.J. Bostock. (1988). Characterization of the seal Morbillivirus. *Nature*, 336: 115.
- Malur A.G., Choudhary S.K., De B.P. and A.K. Banerjee. (2002). Role of a Highly Conserved NH2-Terminal Domain of the Human Parainfluenza Virus Type 3 RNA Polymerase. *J. Virol.*, 76: 8101-8109
- Malvoisin E. and T.F. Wild. (1993). Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *J. Gen. Virol.*, 74: 2365-2372.
- Mammerickx M. (2003). La peste bovine, Jules Bordet et le Centre Sérologique de Cureghem. *Ann. Méd. Vét.*, 147: 197-205.
- Manchester M., Naniche D. and T. Stehle. (2000). CD46 as a Measles Receptor: Form Follows Function. *Virology*, 274: 5-10
- Marie J.C., Kehren J., Trescol-Biemont M.C., Evlashev A., Valentin H., Walzer T., Tedone R., Loveland B., Nicolas J.F., Rabourdin-Combe C. and B. Horvat. (2001). Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity*, 14: 69-79.
- Mariner J.C., House J.A., Mebus C.A. and M.C.van den Ende. (1993). The use of thermostable Vero cell-adapted rinderpest vaccine as a heterologous vaccine against peste des petits ruminants. *Res. Vet. Sci.*, 54: 212-216.
- Mariner J.C., House J.A., Sollod A.E, Stem C., Van den Ende M. and C.A. Mebus. (1990). Comparison of the effect of various chemical stabilisers and lyophilisation cycles on thermostability of vero cell adapted Rinderpest vaccine. *Vet Microbiol*, 21: 195-209.
- Massé N. (2004). Étude moléculaire de la glycoprotéine d'attachement du virus de la rougeole : identification et caractérisation des domaines d'interaction avec les récepteurs CD46 et SLAM. *Thèse de Doctorat d'Université*. Claude Bernard - LYON 1.
- Mavrakis M., Kolesnikova L., Schoehn G., Becker S. and R.W.H Ruigrok. (2002). Morphology of Marburg virus NP-RNA. *Virology*, 296: 300-307.

Références bibliographiques

- McChesney M.B., Altman A. and M.B. Oldstone. (1988). Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1. *J Immunol.*, 140: 1269-1273
- McChesney M.B., Kehrl J.H., Valsamakis A., Fauci A.S. and M.B. Oldstone. (1987). Measles virus infection of B lymphocytes permits cellular activation but blocks progression through the cell cycle. *J. Virol.*, 61: 3441-3447.
- McCullough K.C., Obi T.U. and H. Sheshberadaran. (1991). Identification of epitope(s) on the internal virion proteins of rinderpest virus which are absent from peste des petits ruminants. *Vet. Microbiol.*, 26: 313-321.
- McCullough, K.C., H. Sheshberadaran, E. Norrby, T.U. Obi and J.R. Crowther (1986) Monoclonal antibodies against morbilliviruses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 5: 411-427.
- McIlhatton M.A., Curran M.D and B.K. Rima. (1997). Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence). *J. Gen. Virol.*, 78: 571-576
- Mebatsion, T., Weiland F. and K.K. Conzelmann. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol.*, 73: 242-250.
- Meuleman E. (1907). Peste bovine. In: Rapport sur les maladies tropicales des animaux domestiques: piroplasmoses, trypanosomiasés et peste bovine. Meuleman E. (ed.). A. Breur, Bruxelles: 106-118.
- Meyer G. and A. Diallo (1995). The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus: the long untranslated region in the 5'-end of the F-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virus Res.*, 37: 23-35.
- Mondal B., Sreenivasa B.P., Dhar P., Singh R.P. and S.K. Bandyopadhyay. (2001). Apoptosis induced by peste des petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells. *Virus*, 73: 113-119.
- Mornet P., Orue J., Gilbert Y., Thiery G. and M. Sow. (1956). La peste des petits ruminants en Afrique occidentale française: ses rapports avec la peste bovine. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop.*, 9: 313-342.
- Moyer S.A., Baker S.C. and S.M. Horikami. (1990). Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J. Gen. Virol.*, 71: 775-783
- Murphy L.B., Loney C., Murray J., Bhella D., Ashton P. and R.P. Yeo. (2003). Investigations into the amino-terminal domain of the respiratory syncytial virus nucleocapsid formation and interaction with the phosphoprotein. *Virology*, 307: 143-153.

Références bibliographiques

Nakamura K., Ohishi K., Ohkubo S., Kamata H., Yamanouchi K., Fujiwara K. and C. Kai. (1998). Immunizing effect of vaccinia virus expressing the nucleoprotein of rinderpest virus on systemic rinderpest virus infection in rabbits. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21: 91-99.

Nanda Y.P., Chatterjee A., Diallo A., Libeau G., Andersson J., Barrett T. and W.P. Taylor. (1996). The isolation of Peste des Petits Ruminants virus from Northern India. *Vet. Microbiology*, 51: 207-216.

Nanan R., Rauch A., Kampgen E., Niewiesk S. and H.W. Kreth. (2000). A novel sensitive approach for frequency analysis of measles virus-specific memory T-lymphocytes in healthy adults with a childhood history of natural measles. *J. Gen. Virol.*, 81: 1313-1319.

Naniche D., Reed S.I. and M.B. Oldstone. (1999). Cell cycle arrest during measles virus infection: a G0-like block leads to suppression of retinoblastoma protein expression. *J. Virol.*, 73: 1894-1901.

Naniche D., Varior-Krishnan G., Cervoni F., Wild T.F., Rossi B., Rabourdin-Combe C. and D. Gerlier. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.*, 67: 6025-6032.

Nawathe D.R. and A.G. Lamorde. (1984). Socio-economic impact of rinderpest in Nigeria. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 3: 575-581.

Nawathe D.R., Lamorde A.G. and S. Kumar. (1983). Recrudescence of rinderpest in Nigeria. *Vet. Rec.*, 113: 156-157.

Newcomb W.W., Tobin G.J., McGowan J.J. and J.C. Brown. (1982). In vitro reassembly of vesicular stomatitis virus skeletons. *J. Virol.*, 41: 1055-1062.

Ngichabe C.K., Wamwayi H.M., Ndungu E.K., Mirangi P.K., Bostock C.J., Black D.N. and T. Barrett. (2002). Long term immunity in African cattle vaccinated with a recombinant capripox-rinderpest virus vaccine. *Epidemiol Infect.*, 128: 343-349.

Nishio M., Tsurudome M., Kawano M., Watanabe N., Ohgimoto S., Ito M., Komada H. and Y. Ito. (1996). Interaction between nucleocapsid protein (NP) and phosphoprotein (P) of human parainfluenza virus type 2: one of the two NP binding site on P is essential for granule formation. *J. Gen. Virol.*, 77: 2457-2463.

Norby E., Sheshberadaran H., McCullough K.C., Carpenter W.C. and C. Orvell (1985). Is rinderpest virus the archvirus of the morbillivirus genus? *Intervirology*, 23: 228-232.

Office International des Epizooties (OIE). (2007). Informations sanitaires. <http://www.oie.int/wahid-prod/public.php>

Références bibliographiques

Office International des Epizooties (OIE). (2006). Code zoosanitaire international, Annexe 3.8.2: Système de surveillance de la peste bovine. Paris: http://www.oie.int/fr/normes/mcode/fr_chapitre_3.8.2.htm

Office International des Epizooties (OIE). (2004). Peste des petits ruminants. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00028.htm

Office International des Epizooties (OIE). (2002a). Recueil des données maladie: La peste bovine. http://www.oie.int/fr/maladies/fiches/f_A040.htm

Office International des Epizooties (OIE). (2002b). Recueil des données maladie: La peste des petits ruminants. http://www.oie.int/fr/maladies/fiches/f_A050.htm

Ogura H., Sato H., Kamiya S. and S. Nakamura. (1991). Glycosylation of measles virus haemagglutinin protein in infected cells. *J. Gen. Virol.*, 72: 2679-2684.

Oshishi K., Inui K., Yamanouchi K. and T. Barrett. (1999). Cell-mediated immune responses in cattle vaccinated with a vaccinia virus recombinant expressing the nucleocapsid protein of rinderpest virus. *J. Gen. Virol.*, 80: 1627-1634.

Osterhaus A.D.M.E., Groen J., Uytdehaag F., Visser I.K.G., Van De Bildt M.W.G., Bergman A. and B Klingeborn. (1989). Distemper virus in Baikal seals. *Nature*, 338: 209-210.

Osterhaus A.D.M.E., Groen J., De Vries P., Uytdehaag F., Klingeborn B. and R. Zarnke. (1988). Canine distemper virus in seals. *Nature*, 335: 403.

Ozkul A., Akca Y., Alkan F., Barrett T., Karaoglu T., Daglap S.B., Anderson J., Yesilbag K., Cokcaliskan C., Genacy A. and I. Burgu. (2002). Prevalence, distribution and host range of peste des petits ruminants virus, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 708-12.

Parida S., Mahapatra M., Kumar S., Das S.C., Baron M.D., Anderson J. and T. Barrett. (2007). Rescue of a chimeric rinderpest virus with the nucleocapsid protein derived from peste-des-petits-ruminants virus: use as a marker vaccine *J. Gen. Virol.*, 88: 2019-2027

Pastoret P.P., Van Bressen M.F., Diallo A., Barrett T., Tille A., Thiry E., Lefèvre P.C., Bostoch C. Idriss A.F. et K. Bidjeh. (1991). La biologie des infection par *Morbillivirus*. *Ann. Méd. Vét.*, 135: 77-89.

Patterson J.B., Thomas D., Lewicki H., Billeter M.A. and M.B. Oldstone. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology*, 267: 80-89.

Peebles M.E. (1991). Paramyxovirus M proteins: pulling it all together and taking it on the road, In *The paramyxoviruses*. Kingsbury D.W (ed.). Plenum, New York : 427-456.

Références bibliographiques

- Peeters B.P.H., De Leeuw O.S., Koch G. and A.L.J. Gielkens. (1999). Rescue of Newcastle Disease Virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.*, 73: 5001-5009.
- Plempner R.K., Hammond A.L., Gerlier D., Fielding A.K. and R. Cattaneo. (2002). Strength of Envelope Protein Interaction Modulates Cytopathicity of Measles Virus. *J. Virol.* 76: 5051-5061
- Plempner R.K., Hammond A.L. and R. Cattaneo (2000). Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization. *J. Virol.*, 74: 6485-6493.
- Plowright W. (1984). The duration of immunity in cattle following inoculation of rinderpest cell culture vaccine. *J. Hyg. Camb.*, 92: 285-296.
- Plowright W. (1982). The effect of rinderpest and rinderpest control on wildlife in Africa. In: Animal disease in relation to animal conservation. Edwards M.A and U. McDonnell (eds). Academic Press, London: 1-28.
- Plowright W., Rampton C.S., Taylor W.P. and K.A.J. Herniman. (1970). Studies on rinderpest culture vaccine. III. Stability of the lyophilised product. *Res. Vet. Sci.*, 11: 71-81.
- Plowright W. (1968). Rinderpest virus. In: Virology Monographs 3. Gard S., Hallauer C. and K.F. Meyer (eds). Springer-Verlag, Wien, New-York.: 25-110.
- Plowright W. (1963). Some properties of strains of rinderpest virus recently isolated in East African. *Res. Vet. Sci.*, 4: 96-108.
- Plowright W. and R.D. Ferris. (1962). Studies with rinderpest virus in tissue culture. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. *Rev. Vet. Sci.*, 3: 172-182.
- Provost A. (1982). Scientific and technical bases for the eradication of rinderpest in intertropical Africa. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1: 619-641.
- Provost A. (1979). La pérennité de la peste bovine en Afrique intertropicale. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 91: 761-765.
- Provost A. et G. Borredon. (1963). Les différents aspects du diagnostic clinique et expérimental de la peste bovine. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 16: 445-526.
- Radecke F. and M.A. Billeter. (1997). Reverse Genetics Meets the Nonsegmented Negative-Strand RNA Viruses. *Rev. Med. Virol.*, 7: 49-63.
- Radecke F., Spielhofer P., Schneider H., Kaelin K., Huber M., Dotsch C., Christiansen G. and M.A. Billeter. (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *Embo. J.*, 14: 5773-5784.

Références bibliographiques

Ravanel K., Castelle C., Defrance T., Wild T.F., Charron D., Lotteau V. and Rabourdin-Combe. (1997). Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med.*, 186: 269-278.

Richardson C.D., Hull D., Green P., Hasel K., Berkovich A., Englund G., Bellini W.J. and B.K. Rima. (1986). The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion protein from several different paramyxoviruses. *Virology*, 155: 508-523.

Rima B.K. (1983). The protein of Morbillivirus. *J. Gen. Virol.*, 64: 1205-1219.

Robson J., Arnold R.M., Plowright W. and G.R. Scott. (1959). The isolation from an eland of strain of rinderpest virus attenuated for cattle. *Bull. Epiz. Dis. Afr.*, 7: 97-102.

Rodriguez L., Cuesta I., Asenjo A and N. Villanueva. (2004). Human respiratory syncytial virus matrix protein is an RNA-binding protein: binding properties, location and identity of the RNA contact residues. *J. Gen. Virol.*, 85: 709-719.

Roeder P.L., Abraham G., Kenfe G. and T. Barrett. (1994). Peste des petits ruminants in Ethiopian goats. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 26: 69-73.

Roger F., Guerre Jesus M., Libeau G., Diallo A., Yigezu L.M. and T. Yilma. (2001). Detection of antibodies of rinderpest and peste des petits ruminants viruses (*Paramyxoviridae*, *Morbillivirus*) during a new epizootic disease in Ethiopian camels (*Camelus dromedarius*). *Rev. Med. Vet.*, 152: 265-268.

Roger F., Yigezu L.M., Hurard C., Libeau G., Mebratu G.Y., Diallo A. and B Faye. (2000). Investigations on a new pathological condition of camels in Ethiopia. *J. Camel. Pract. Res.*, 7: 163-165.

Romero C.H., Barrett T., Chamberlain R., Kitching R.P., Fleming M. and D. Black. (1994). A recombinant capripoxvirus expressing the haemagglutinin protein gene of rinderpest virus: Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology*, 204: 425-429.

Rossiter P.B, Hussain M., Raja R.H., Moghul W., Khan Z. and D.W Broadbent. (1998). Cattle plague in Shangri-La: observations on a severe outbreak of rinderpest in northern Pakistan 1994-1995. *Vet. Rec.*, 143: 39-42.

Rossiter P.B and W.P. Taylor. (1994). Peste des petits ruminants. In: Infectious diseases of Livestock. Coetzer J.A.W., Thomson G.R. and R.C. Tustin (eds). Oxford University press, Cape Town/RSA.

Rossiter P.B., Herniman K.A.J., Gumm I.D. and W.I Morrison. (1993). The growth of cell culture-attenuated rinderpest virus in bovine lymphoblasts with B cell, CD4+ and CD8+ alpha/beta T cell and gamma/delta T cell phenotypes. *J. Gen. Virol.*, 74: 305-309.

Références bibliographiques

- Rossiter P.B., Wafula J.S., Gumm I.D., Stagg D.A., Morzaria S.P. and M. Shaw. (1988). Growth of rinderpest and BVD viruses in *Theileria parva* infected lymphoblastoid cell lines. *Vet. Rec.*, 122: 491-492.
- Rossiter P.B. and D.M. Jessett. (1982). Detection of rinderpest virus antigens *in vitro* and *in vivo* by direct immunofluorescence, *Res. Vet. Sci.*, 33:198-204.
- Rowland A.C., Scott G.R., Ramacfhandran S. and H.D.A. Hill. (1971). Comparative study of peste des petits ruminants and kata in West African dwarf goat. *Trop. Anim. Health Prod.*, 3: 241-247.
- Rowland A.C. and P. Bourdin (1970). The histological relationship between peste des petits ruminants and kata in West Africa. *Rev. Elév. Med. Vét. Pays trop.*, 21: 301-307.
- Rweyemamu M.M. (1996). The global rinderpest status in 1996. *In: The word without rinderpest*. Food and Agriculture Organization (FAO), Animal Production and Health Paper n° 129. Rome, Italy. <http://www.fao.org/docrep/003/w3246e/W3246E06.htm#ch3.4.1>
- Saliki J.T., House J.A., Mebus C.A. and E.J. Dubovi.(1994).Comparison of Monoclonal Antibody-Based Sandwich Enzyme- Linked Immunosorbent Assay and Virus Isolation for Detection of Peste des Petits Ruminants Virus in Goat Tissues and Secretions. *J Clin. Microbiol.*, 32: 1349-1353.
- Saliki J.T., Libeau G., House J.A., Mebus C.A. and E.J. Dubovi. (1993). Monoclonal antibody-based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste-des-petits-ruminants virus antibody in caprine and ovine sera. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1075-1082.
- Samuel D., Sasnauskas K., Jin L., Beard S., Zvirbliene A., Gedvilaite A. and B. Cohen. (2002). High level expression of recombinant mumps nucleoprotein in *Saccharomyces cerevisiae* and its evaluation in mumps IgM serology. *J. Med. Virol.*, 66: 123-130.
- Samuel O. and Y. Shai. (2001). Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry*, 40: 1340-1349. .
- Schneider-Schaulies S., Niewiesk S., Schneider-Schaulies J. and V. ter Meulen. (2001). Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med.*, 1: 163-181.
- Schnorr J.J., Xanthakos S., Keikavoussi P., Kampgen E., ter Meulen V. and S. Schneider-Schaulies. (1997). Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 5326-5331.
- Schoehn G., Mavrakakis M., Albertini A., Wade R., Hoenger A. and R.W.H. Rugrok. (2004). The 12 A Structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J. Mol. Biol.*, 339: 301-312.

Références bibliographiques

Scott G.R., (1990a). Rinderpest virus. *In: Virus infections in Vertebrates*. Dinter Z. and B. Morein (eds). Amsterdam: Elsevier, pp: 341-354.

Scott G.R., (1990b). Peste-des-petits-ruminants virus. *In: Virus infections in Vertebrates*. Dinter Z. and B. Morein (eds). Amsterdam: Elsevier, pp: 355-361.

Scott G.R., Taylor W.P. et P.B. Rossiter. (1986). Manual de Diagnosis de la peste bovine. Food and Agriculture Organization (FAO). Collection FAO. Production et Santé Animales 23, 216 p. Rome, Italy.

Scott G.R., (1981). Rinderpest and peste des petits ruminants. *In: Virus Diseases of Food Animals Vol. II*. Gibbs E.P.J., Ed. Academic Press, NewYork, London.

Scott G.R. and R.D. Brown. (1961). Rinderpest diagnosis with special reference to agar double diffusion test. *Bull. Epiz. Dis. Afr.*, 9: 83-125.

Sergieiev P., Ryazantseva N. and I. Shroit. (1960). The dynamics of pathological processes in experimental measles in monkeys. *Acta Virol.*, 4: 265-273.

Shaji D. and M.S. Shaila (1999). Domains of rinderpest virus phosphoprotein involved in interaction with itself and the nucleocapsid protein. *Virology*, 258: 415-424.

Shaila M.S., Purushothaman V., Bhavasar D., Venugopal K. and R.A. Venkatesan. (1989). Peste des petits ruminants of sheep in India. *Vet. Rec.*, 125: 602.

Shal M. (1992). Bericht über die Rinderpest in der Türkei 1991/1992. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 99: 349-350.

Sheshberadaran H., Norrby E., McCullough K.C., Carpenter W.C. and C. Orvell. (1986). The Antigenic Relationship between Measles, Canine Distemper and Rinderpest Viruses Studied with Monoclonal Antibodies. *J. gen. Virol.*, 67: 1381-1392.

Schoehn G., Mavrakis M., Albertini A., Wade R., Hoenger A. and R.W.H Ruigrok. (2004). The 12 A Structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J. Mol. Biol.*, 339: 301-312.

Sidorenko S.P. and E.A. Clark. (1993). Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J. Immunol.*, 151: 4614-4624.

Singh M., Cattaneo R. and M. A. Billeter. (1999a). A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. *J. Virol.*, 73:4823-4828.

Singh M., Cattaneo R. and M.A. Billeter (1999b). A Recombinant Measles Virus Expressing Hepatitis B Virus Surface Antigen Induces Humoral Immune Responses in Genetically Modified Mice. *J. Virol.*, 73: 4823-4828.

Références bibliographiques

- Singh R.P., Saravanan P., Sreenivasa B.P., Singh R.K. and S.K. Bandyopadhyay. (2004a). Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants in India. *Rev Sci Tech.* 23: 807-819.
- Singh R. P., Sreenivasa B. P., Dhar P. and S. K. Bandyopadhyay. (2004b). A sandwich-ELISA for the diagnosis of Peste des petits ruminants (PPR) infection in small ruminants using anti-nucleocapsid protein monoclonal antibody. *Arch. Virol.*, 149: 2155-2170
- Sinnathamby G, Naik S., Renukaradhya G.J., Rajasekhar M., Nayak R. and M.S. Shaila. (2001). Recombinant hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in insect cells induces humoral and mediated immune responses in cattle. *Vaccine*, 19: 3870-3876.
- Smallwood S., Ryan K.W. and S.A. Moyer. (1994). Deletion analysis defines a carboxyl-proximal region of Sendai virus P protein that binds to the polymerase L protein. *Virology*, 202: 154-163.
- Spehner D., Drillien R. and P.M. Howley. (1997). The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology*, 232: 260-268.
- Spehner D., Kim A. and R. Drillien. (1991). Assembly nucleocapsidlike structure in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J. Virol.*, 65: 6296-6300.
- Stevenson P., Rossiter P.B., Munga L., Ndungu E.K. and R.B. Dolan. (1999). Rinderpest vaccination and the incidence and development of trypanosomosis in cattle. *Trop Anim Health Prod.*, 31: 65-73
- Sugiyama M., Minamoto N., Kinjo T.H., Hirayama N., Asano K., Tsukiyama-Kohara K., Yoshikawa K. and K. Yamanouchi (1991). Antigenic and functional characterization of rinderpest virus envelope proteins using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 72: 1863-1869.
- Sugiyama M., Minamoto N., Kinjo T., Hirayama N., Sasaki H., Yoshikawa Y., k. Yamanouchi. (1987). Characterization of monoclonal antibodies against four structural proteins of rinderpest virus. *J. Gen Virol.*, 70: 2605-2613.
- Sumption K.J., Aradom G., Libeau G. and A.J. Wilsmore. (1998). Detection of peste des petits ruminants virus antigen in conjunctival smears of goats by indirect immunofluorescence. *Vet. Rec.*, 142: 421-424
- Sutterwala F.S., Noel G.J., Clynes R. and D.M. Mosser. (1997). Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J. Exp. Med.*, 185: 1977-1985.
- Takimoto T. and A. Portner. (2004). Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res.*, 106: 133-145.

Références bibliographiques

Takimoto T., Murti G.K., Bousse T., Scroggs R.A. and A. Portner. (2001). Role of Matrix and Fusion Proteins in Budding of Sendai Virus. *J. Virol.*, 75: 11384-11391.

Tamashiro V.G., Perez, H.H. and D.E. Griffin. (1987). Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediatr.Infect.Dis J.*, 6: 451-454.

Tatsuo H. et Y. Yanagi. (2002). The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol. Immunol.*, 46: 135-142.

Tatsuo H., Ono N., Tanaka K. and Y. Yanagi. (2001). The morbillivirus use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptor. *J. Virol.*, 75: 5842-5850.

Tatsuo H., Ono N., Tanaka K. and Y. Yanagi. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, 406: 893-897.

Taylor W.P., al Busaidy S. and T Barrett. (1990). The epidemiology of peste des petits ruminants in the Sultanate of Oman. *Vet. Microbiol.*, 22: 341-352.

Taylor W.P. (1986). Epidemiology and control of rinderpest. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 5: 407-410.

Taylor W.P. (1979). Protection of goats against peste-des-petits-ruminants with attenuated rinderpest virus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 27: 321-324.

Taylor W.P. and Abegunde. (1979). The isolation of peste des petits ruminants virus from nigerian sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 26: 94-96.

Taylor W.P. (1968). The susceptibility of the one humped camel (*Camelus dromedarius*) to infection with rinderpest virus. *Bull Epiz. Dis. In Africa*, 16: 403-410.

Teng, M.N. and P.L. Collins. (1998). Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for the formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol*, 72: 5707-5716.

tenOever B.R., Servant M.J., Grandvaux N., Lin R. and J. Hiscott. (2002). Recognition of measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J. Virol.*, 76: 3659-3669.

Tobback L. (1951). Maladies à virus filtrables, peste bovin. *In: Les maladies du bétail au Congo belge*, 2^e Ed. Ministère des colonies. Tobback L. (ed). Bruxelles.

Tober C., Seufert M., Schneider H., Billeter M.A., Johnston I.C., Niewiesk S., ter Meulen V. and S. Schneider-Schaulies. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J. Virol.*, 72: 8124-8132.

Références bibliographiques

- Tyrell D. and A. Ehrnst. (1979). Transmembrane communication in cells chronically infected with measles virus. *J. Cell. Biol.*, 81: 396-402.
- Valsamakis A., Schneider H., Auwaerter P.G., Kaneshima H., Billeter M.A. and D.E.Griffin. (1998). Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J. Virol.*, 72: 7754-7761.
- Van Bressen M.F., Visser I.K.G., De Swart R.L., Orvell C., Stanzani L., Androukaki E., Siakavara K. and A.D.M.E Osterhaus. (1992). Dolphin morbillivirus infection in different parts of the mediterranean sea. *Arch. Virol.*, 129: 235-242.
- Varsanyi M.T., Morein B., Love A. and E. Norrbyl. (1987). Protection against lethal measles virus infection in mice by immune stimulating complexes containing the hemagglutinin or the fusion protein. *J. Virol.*, 61: 3896-3901.
- Venkataramanan R., Bandyopadhyay S.K. and M.S. Oberoi. (2005). Present status and strategies for the control of transboundary and other economically important animal diseases in India: Ab review. *Ind. J. Anim. Sci.*, 75: 456-64.
- Verardi P.H., Aziz F.H., Ahmad S., Jones L.A., Beyene B., Ngotho R.N., Wamwayi H.M., Yesus M.G., Egziabher B.G. and TD Yilma. (2002). Long-term sterilizing immunity to rinderpest in cattle vaccinated with a recombinant vaccinia virus expressing high levels of the fusion and hemagglutinin glycoproteins. *J Virol.*, 76: 484-491.
- Visser I.K., Van Bresse M.F., Barrett T. and A.D. Osterhaus (1993). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Vet. Res.*, 24: 169-178.
- Visser I.K., Kumarev V.P., Orvell C., de Vries P. and H.W.J. Broeders. (1990) Comparison of two morbilliviruses isolated from the seals during outbreaks of distemper in North West Europe and Siberia. *Arch. Virol.*, 111: 149-164.
- Walsh E.P., Baron M.D., Rennie L.F., Monaghan P., Anderson J. and T. Barrett. (2000). Recombinant Rinderpest Vaccines Expressing Membrane-Anchored Proteins as Genetic Markers: Evidence of Exclusion of Marker Protein from the Virus Envelope. *J Virol.*, 74: 10165-10175.
- Wang Z., Hangartner T., Cornu L., Martin A., Zuniga M., Billeter M. and H. Naim. (2001). Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses. *Vaccine*, 19: 2329-2336.
- Whitney J.C., Scott G.R. and D.H. Hill. (1967). Preliminary observations on a stomatitis and enteritis of goats in southern Nigeria. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, 15: 31-41.
- Wild T.F. and R. Buckland. (1995). Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 191: 51-64.

Références bibliographiques

- Wild T.F., Fayolle J., Beauverger P. and R. Buckland. (1994). Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J. Virol.*, 68: 7546-7548.
- Wild T.F., Malvoisin E. and R. Buckland. (1991). Measles virus: Both the haemagglutinin and fusion glycoprotein are required for fusion. *J. Gen. Virol.*, 72: 439-442.
- Warnes A., Fooks A.R., Dowsett A.B., Wilkinson G.W. and J.R. Stephenson. (1995). Expression of the measles virus nucleoprotein gene in *Escherichia coli* and assembly of nucleocapsid-like structures. *Gene*, 160: 173-178.
- Wohlsein P., Trautwein G., Harder T. C., Liess B. and T. Barrett. (1993). Viral antigen distribution in organs of cattle experimentally infected with rinderpest virus. *Vet. Pathol.*, 30: 544-554.
- Wohlsein P., Wamwayi H. M., Trautwein G., Pohlenz J., Liess B. and T. Barrett, (1995). Pathomorphological and immunohistological findings in cattle experimentally infected with rinderpest virus isolates of different pathogenicity. *Vet. Microbiol.*, 44: 141-149.
- Worrall E.E., Litamoi J.K., Seck B.M. and G. Ayelet. (2001). *Xerovac*: an ultra rapid method for the dehydration and preservation of live attenuated Rinderpest and peste des petits ruminants vaccines. *Vaccine*, 19: 834-839.
- Yesilbag K., Yilmaz Z., Golcu E. and A. Ozkul.(2005). Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey. *Vet Rec.*, 157:260-261.
- Yilma TD. (1989). Prospects for the total eradication of rinderpest. *Vaccine*, 7: 484-485.
- Yilma T., Hsu D., Jones L., Owens S., Grubman M., Mebus C., Yamanaka M. and B. Dale (1988). Protection of cattle against rinderpest with vaccinia virus recombinants expressing the HA or F gene. *Science*.242:1058–1061.
- Zhang X., Glendening C., Linke H., Parks C.L., Brooks C., Udem S.A. and Oglesbee. (2002). Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J. Virol.*, 76: 8737-8746.
- Zvirbliene A., Kucinskaite I., Sezaite I., Samuel D. and K. Sasnauskas. (2007). Mapping of B cell epitopes in measles virus nucleocapsid protein. *Arch Virol.*, 152: 25-39

Normes recommandées pour les systèmes de surveillance épidémiologique de la peste bovine/Procédure OIE

Titre précédent: Rapport de la consultation d'experts sur les systèmes de surveillance de la peste bovine (Paris, 16 - 18 août 1989). Ce document est aujourd'hui largement connu, de manière informelle, sous le nom de Procédure OIE. Il a été approuvé par le Comité international de l'OIE en mai 1998.

Objectifs du document:

- a. prouver qu'un pays ou une zone est indemne de peste bovine,
- b. déclarer un pays ou une zone indemne de peste bovine.

Définition et objectifs de la surveillance

Pour prouver qu'un pays ou une zone est indemne d'une maladie ou d'une infection, il est indispensable d'assurer la surveillance de cette maladie en faisant appel:

a. à un système de déclaration des signes de la maladie, relevés par les services vétérinaires ou les propriétaires d'animaux,

b. à un programme intensif d'examen d'un échantillonnage représentatif des populations hôtes, afin de déceler les signes cliniques ou tout autre indice de maladie ou de transmission de l'infection. Dans les deux cas, toute suspicion de la maladie entraînera une mise en quarantaine, des examens de confirmation diagnostique et les mesures de prophylaxie nécessaires. La surveillance implique, par conséquent, l'application de mesures officielles dès l'observation d'indices de maladie ou d'infection. Cette approche s'oppose au simple suivi, qui comporte également le recueil des données sur le terrain, mais n'implique aucune mesure officielle au vu des résultats.

Étapes à suivre pour déclarer un pays indemne de peste bovine:

Conformément aux principes généraux élaborés à l'OIE pour l'évaluation des situations sanitaires, un processus en trois étapes est envisagé pour atteindre ou démontrer le statut de pays indemne de peste bovine. Une fois qu'un pays est indemne et que la réintroduction de la maladie est improbable, ce pays peut se déclarer lui-même provisoirement indemne de peste bovine, sous réserve de satisfaire aux critères énumérés ci-après.

Les étapes ultérieures font l'objet d'un contrôle international, sous les auspices de l'OIE. Un pays déclaré provisoirement indemne de peste bovine depuis au moins 3 ans et répondant aux critères ci-dessous peut être déclaré indemne de peste bovine par l'OIE. Après un nouveau délai d'au moins un an, un pays qui respecte des critères plus rigoureux en matière de peste bovine peut être déclaré indemne d'infection de peste bovine.

Les critères spécifiques proposés pour chaque étape du processus sont les suivants:

Pays déclaré provisoirement indemne de peste bovine

Pour qu'un pays, ou une zone d'un pays, puisse se déclarer provisoirement indemne de peste bovine, il doit remplir les conditions suivantes (voir tableau)

- i. absence de maladie cliniquement décelable depuis au moins 2 ans;
- ii. existence d'un service vétérinaire capable de surveiller l'évolution de la situation zoosanitaire dans le pays;
- iii. réalisation d'enquêtes par ce service en présence de tout signe clinique évocateur de peste bovine;
- iv. présence d'un système de déclaration efficace, à la fois du terrain vers l'administration vétérinaire centrale et de cette dernière vers l'OIE;
- v. existence d'un système fiable permettant de prévenir l'introduction de l'infection par des contrôles adaptés aux frontières, des mesures de quarantaine, etc.;
- vi. arrêt total des vaccinations contre la peste bovine à la date de la déclaration, cette décision devant être notifiée par écrit à l'OIE et aux pays limitrophes, avec mention de la date d'arrêt des vaccinations.

Pays déclaré indemne de peste bovine.

Un pays ou une zone dans lequel (ou dans laquelle) aucune vaccination contre la peste bovine n'est intervenue depuis au moins 5 ans et dans lequel (ou dans laquelle) aucun signe de la maladie n'a été observé au cours de cette période peut être déclaré(e) indemne de peste bovine par l'OIE, sous réserve des conclusions de la Commission pour la fièvre aphteuse et autres épizooties, et à condition que le pays concerné ait appliqué un système correct de déclaration des maladies pendant toute cette période et continue d'appliquer ce système.

Ou

Un pays, ou une zone d'un pays, qui s'est déclaré provisoirement indemne de peste bovine peut être déclaré par l'OIE indemne de peste bovine, sous réserve de répondre aux critères suivants (voir tableau I):

- i. absence de manifestation clinique de peste bovine depuis au moins 5 ans;
- ii. absence d'utilisation de vaccins de la peste bovine depuis au moins 3 ans chez toutes les espèces sensibles à la maladie, et absence d'utilisation de vaccins hétérologues contre la peste bovine depuis au moins 3 ans chez les bovins, les buffles et les yaks;

iii. existence d'un système de surveillance clinique et d'un système de déclaration appliquée à la peste bovine, aptes à déceler les cas cliniques éventuels;

iv. réalisation d'examens sur le terrain et en laboratoire (incluant une évaluation sérologique) en présence de tout signe clinique évocateur de peste bovine, afin d'en réfuter le diagnostic éventuel;

v. Pour conserver ce statut, le pays doit continuer à remplir ces conditions jusqu'à ce qu'il soit déclaré indemne d'infection de peste bovine et doit présenter annuellement à l'OIE une synthèse de la situation.

S'il est difficile pour un pays d'être déclaré indemne de peste bovine à l'échelle nationale et en une seule étape, il peut demander à l'OIE que cette déclaration ne s'applique qu'à certaines de ses zones, sous réserve:

i. que chaque zone proposée ait des frontières bien délimitées;

ii. que la zone indemne de peste bovine soit séparée du reste du pays et des pays infectés adjacents par une zone de surveillance ou des barrières physiques ou géographiques, et que des mesures zoosanitaires empêchent effectivement l'introduction de l'infection;

iii. qu'aucune manifestation clinique de peste bovine n'ait été constatée dans la zone depuis au moins 5 ans;

iv. qu'aucun vaccin contre la peste bovine n'a été utilisé chez toutes les espèces sensibles à la maladie depuis au moins 3 ans, et qu'aucun vaccin hétérologue contre la peste bovine n'a été utilisé chez les bovins, les buffles et les yaks depuis au moins 3 ans;

v. que le pays utilise dans cette zone à la fois un système de surveillance clinique et un système de déclaration des maladies applicable à la peste bovine et permettant de déceler toute forme clinique susceptible d'être présente;

vi. que tous les signes cliniques évocateurs de peste bovine dans ces zones fassent l'objet d'examens sur le terrain et en laboratoire (incluant une évaluation sérologique), afin de réfuter l'éventualité d'un diagnostic de peste bovine;

vii. qu'existent des mesures efficaces permettant de prévenir la réintroduction de la maladie dans ces zones, en provenance d'autres zones ou d'autres pays.

Si certaines zones sont déclarées indemnes de peste bovine, le pays n'est pas pour autant dispensé de respecter les critères requis pour être déclaré indemne de peste bovine à l'échelle nationale; pour prétendre obtenir ce statut, il doit satisfaire à toutes les exigences susmentionnées.

En cas de foyer localisé temporaire de peste bovine, résultant de la réintroduction de la maladie dans un pays qui est à moins de 2 ans de remplir les conditions nécessaires pour être déclaré indemne de maladie, des mesures spéciales peuvent être prises (y compris une

vaccination limitée autour du foyer) pour l'éradiquer. Le pays ne pourra alors prétendre être déclaré indemne de maladie qu'un an après la date de la dernière observation ou de la dernière vaccination (si celle-ci est ultérieure).

Dans de telles circonstances, le pays doit montrer à la Commission pour la fièvre aphteuse et autres épizooties qu'il ne s'agissait pas d'une infection endémique et que les mesures prises ont permis d'éradiquer la maladie.

Pays déclaré indemne d'infection de peste bovine.

Lorsqu'aucune vaccination contre la peste bovine n'a été effectuée depuis au moins 10 ans et qu'aucune preuve de la maladie ou d'une infection par le virus de la peste bovine n'a été rapportée pendant cette même période, un pays peut être déclaré par l'OIE indemne d'infection de peste bovine, sur la base des conclusions de la Commission pour la fièvre aphteuse et autres épizooties chargée de vérifier les situations sanitaires, sous réserve qu'un système de déclaration approprié des maladies soit en place de façon permanente et qu'il l'ait été pendant la totalité de cette période.

Ou

L'OIE peut déclarer indemne d'infection un pays dans lequel des vaccinations ont été effectuées au cours des 10 dernières années ou dans lequel des manifestations cliniques de peste bovine ont été observées, si les critères suivants sont remplis:

- i. pays déclaré indemne de peste bovine au moins un an auparavant et continuant à satisfaire aux exigences nécessaires pour obtenir ce statut;
- ii. existence d'un système efficace de surveillance sérologique depuis au moins 2 ans, donnant des résultats qui démontrent l'absence d'infection ; cette surveillance doit aussi s'appliquer aux autres animaux domestiques sensibles ainsi qu'aux bovins;
- iii. réalisation de recherches sur l'infection dans les espèces sauvages sensibles, lorsque celles-ci représentent des populations importantes. Des échantillonnages doivent être effectués dans tous les cas possibles. Des échantillonnages stratégiques doivent aussi être réalisés chez les animaux domestiques des zones adjacentes à celles hébergeant de fortes populations de gibier afin de faciliter la détection du virus dans ces populations. Les résultats doivent montrer l'absence d'infection.

Un pays respectant ces critères peut demander à être déclaré indemne d'infection de peste bovine par l'OIE.

Seul un pays peut être déclaré indemne d'infection de peste bovine, cette déclaration ne pouvant pas s'appliquer à une zone à l'intérieur du pays.

En cas de foyer temporaire localisé de peste bovine, résultant de la réintroduction de la maladie dans un pays qui est à moins d'un an de remplir les conditions nécessaires pour être déclaré indemne d'infection, des mesures spéciales peuvent être prises pour éliminer le foyer

(exception faite des vaccinations). Le pays concerné ne pourra alors prétendre être déclaré indemne d'infection de peste bovine qu'un an après la date à laquelle le dernier cas a été observé. Un système efficace de sérosurveillance devra être appliqué au cours de cette année afin de confirmer que le virus n'a pas été disséminé.

Dans de telles circonstances, le pays doit montrer à la Commission pour la fièvre aphteuse et autres épizooties qu'il ne s'agissait pas d'une infection endémique et que les mesures prises ont permis d'éradiquer la maladie.

Pour conserver ce statut, le pays doit continuer à appliquer un système efficace de déclaration des maladies, apte à déceler les cas éventuels de peste bovine

TITRE en anglais:

Study of the nucleoprotein of the viruses of Rinderpest and Peste des Petits Ruminants:
Molecular characterization of the interactions domains and the antigenic structures.

RESUME en anglais

The study of the antigenic structures of the nucleoproteins of the viruses of Rinderpest and Peste des Petits ruminants showed that the N-terminal region of this protein is immunodominant. The studies of cartography of anti-N monoclonal antibody show that it possible to locate in this region common epitopes and also specific epitopes for each of these two viruses. The tests competition ELISA (cELISA), developed with some of these specific monoclonal to each virus detect unfortunately as well anti-PPR and bovine anti-RP serums. This crossing would be probably the steric resultant of obstruction generated by antibodies fixed on the épitopes common to the both viruses but close to the specific sites. Part of our work concerned the analysis of the protein-protein interactions from PPRV. The results show that the N protein region at N-terminal, amino acids 1 to 240, covers the domain of the N-N interaction. Four sites on N protein are able to bind to the protein M were identified. These sites are preserved in the Morbillivirus groups.

RESUME en français

L'étude des structures antigéniques des nucléoprotéines (N) des virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants a montré que la région N-terminale est immunodominante. Les études de cartographie d'anticorps monoclonaux anti-N ont permis de localiser dans cette région des épitopes communs mais aussi des épitopes spécifiques à chacun des deux virus. Les tests de compétition ELISA (cELISA), développés avec certains de ces monoclonaux spécifiques à chaque virus détectent aussi bien des sérums anti-PPR et qu'anti-peste bovine. Ce croisement serait probablement la résultante d'encombrement stérique engendré par des anticorps fixés sur les épitopes communs aux deux virus mais proches des sites spécifiques.

Une partie de nos travaux a porté sur l'analyse des interactions protéine-protéine du virus PPR. Ils ont permis de localiser le domaine d'interaction N-N dans la zone couverte par les 240 premiers aminoacides de N. Quatre régions capables de se lier à la protéine M ont été identifiées sur la protéine N. Les séquences de ces zones d'interaction N-M sont conservées au sein groupe Morbillivirus.

DISCIPLINE: Biologie santé, Virologie

MOTS-CLES

Morbillivirus/ Peste bovine/ Peste des petits ruminants/ Nucléoprotéine (N)/ interaction/ structure antigénique/ protéine de matrice.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Biological Systems Department – CIRAD, Control of Exotic and Emerging Animal Diseases (UPR15), TA A-15/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, Cedex 5, France.

Animal Production Unit, FAO/AIEA Agriculture & Biotechnology Laboratory, IAEA Laboratories, Wagramerstrasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienna, Austria.