UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biochimie et biologie moléculaire

Spécialité : Biologie-Santé

Ecole Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

présentée et soutenue publiquement

par

Cécile MINET

Le 27 novembre 2009

Contribution au développement d'un vaccin marqué contre la Peste des Petits Ruminants (PPR), par génétique inverse d'un virus à ARN négatif (Morbillivirus)

JURY

Docteur Emmanuel ALBINA, CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse
Professeur Bernard LEBLEU, Université de Montpellier II	Président de jury
Docteur Stéphane BERTAGNOLI, ENVT, Université de Toulouse II	Rapporteur
Docteur Gilles MEYER, ENVT, Université de Toulouse II	Rapporteur
Docteur Adama DIALLO, IAEA, Vienne, Autriche	Examinateur
Docteur Frédéric TANGY, Institut Pasteur, Paris	Examinateur
Docteur Geneviève LIBEAU, CIRAD, Montpellier	Membre invité

CIRAD
0000104149

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biochimie et biologie moléculaire

Spécialité : Biologie-Santé

Ecole Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

présentée et soutenue publiquement

par

Cécile MINET

Le 27 novembre 2009

Contribution au développement d'un vaccin marqué contre la Peste des Petits Ruminants (PPR), par génétique inverse d'un virus à ARN négatif (Morbillivirus)

JURY

Docteur Emmanuel ALBINA, CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse
Professeur Bernard LEBLEU, Université de Montpellier II	Président de jury
Docteur Stéphane BERTAGNOLI, ENVT, Université de Toulouse II	Rapporteur
Docteur Gilles MEYER, ENVT, Université de Toulouse II	Rapporteur
Docteur Adama DIALLO, IAEA, Vienne, Autriche	Examinateur
Docteur Frédéric TANGY, Institut Pasteur, Paris	Examinateur
Docteur Geneviève LIBEAU, CIRAD, Montpellier	Membre invité

Remerciements

Je voudrais exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, Madame Geneviève LIBEAU, Monsieur le Professeur Bernard LEBLEU, Messieurs Stéphane BERTAGNOLI, Gilles MEYER, Adama DIALLO, Frédéric TANGY et Emmanuel ALBINA, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier Dominique MARTINEZ, responsable de l'unité mixte de recherche UMR 15 « contrôle des maladies animales exotiques et émergentes », ainsi qu'Emmanuel ALBINA, responsable de l'équipe de virologie pour leur soutien et leurs encouragements dans mes démarches et la reprise de mes études. Merci Emmanuel d'avoir accepté d'être, aussi, mon directeur de thèse. Un grand merci à Geneviève LIBEAU pour son soutien et sa confiance. Merci Geneviève de m'avoir proposé et confié, avec Emmanuel, une partie du projet européen Markvac comme sujet de thèse.

Je voudrais remercier tout particulièrement le Docteur Adama DIALLO. Il y a un peu plus de quinze ans maintenant, vous avez su donner sa chance à la petite provinciale que j'étais. Vous m'avez transmis « le virus » de la biologie moléculaire ainsi que votre enthousiasme pour l'étude de la peste des petits ruminants. Si je peux présenter aujourd'hui ce travail, c'est bien grâce à vous. Grand merci à vous Adama.

Un grand merci à Stéphane BIACCHESI et Michel BREMONT de l'INRA de Jouy-en-Josas pour m'avoir initiée et formée aux rudiments de la génétique inverse.

Je voudrais adresser ici ma reconnaissance à Frédéric TANGY pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de génomique virale et vaccination de l'Institut Pasteur de Paris et aidée à me familiariser avec la technique de génétique inverse appliquée aux morbillivirus. Merci à toute son équipe pour son accueil chaleureux lors de mes différents séjours parisiens, et en particulier à Mireille GAU pour son aide dans les démarches administratives, Valérie NAJBURG et Chantal COMBREDET pour leur gentillesse et tous leurs conseils techniques.

Je tiens à remercier en particulier tous ceux et celles qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail :

- *Patricia*, merci pour ton aide précieuse à la préparation des plasmides de clonage et aux contrôles des séquences. J'ai apprécié ton efficacité et ta rigueur, ce fut un plaisir de travailler avec toi durant les premiers mois de la thèse.

- *Colette*, que dire si ce n'est simplement merci. Merci pour tes conseils lors de la mise au point des tests ELISA et de ton aide à la manipulation du logiciel Excel. Mais surtout, un grand merci d'être non seulement ma collègue mais aussi mon amie. Merci de ton soutien dans les bons et les moins bons moments que j'ai pu traverser durant cette période. Merci d'être là pour moi.

- *Olivier* et *Armelle*, merci à vous deux pour vos conseils précieux pour la mise au point des tests ELISA, votre constante disponibilité et votre bonne humeur.

- *Noël*, pour les soins prodigués aux animaux, les prélèvements de sang et surtout, tous ces dimanches matins où tu as mis en route pour moi l'incubateur afin de me faire gagner du temps. Merci beaucoup de ton aide, ta gentillesse et ton humour.

Renata, *Christian*, *Vincent*, *Catherine*, *Aurélie*, *Djénéba*, *Saliha*, *Carine*, *Emna*, et *Zaheer*, merci pour les discussions techniques, vos encouragements et votre soutien.

A tout le personnel de l'UMR15 et toutes les personnes travaillant au bâtiment G, merci de m'avoir supportée, au sens propre comme au figuré, tout au long de ces quatre années de thèse.

Un grand merci aussi à Sylvie VAGO et Marc MALMEJEAN pour leur gentillesse et pour m'avoir permis de m'isoler dans l'espace formation de la bibliothèque du site de Baillarguet, le temps de la rédaction de ce mémoire.

J'adresse également mes remerciements à mes amis pour leur soutien, leurs encouragements et leur disponibilité.

- *Veronica*, merci de ton amitié et de ton soutien quel que soit le moment. Tu as toujours su trouver du temps à m'accorder pour m'encourager malgré ta vie professionnelle et familiale bien remplie.

- *Anne*, malgré les milliers de kilomètres qui nous ont séparées pendant plusieurs années, tu as toujours su m'encourager et me soutenir dans cette aventure. Merci à toi.

- *Alain*, merci de ton soutien, de tes conseils et des bons moments passés lors de tes rares séjours en France.

- *Chantal*, tu as toujours su trouver le moyen de me faire « changer d'air » quand j'en avais besoin. Tu as su m'encourager et me soutenir pendant toutes ces années. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Enfin, je voudrais remercier de tout cœur ma famille, et plus particulièrement mes parents qui, malgré la distance, ont toujours été là pour moi. Ils ont su m'épauler et m'encourager tout au long de ce parcours parfois difficile. Papa, maman, merci pour tout ce que vous faites et avez fait pour moi.

Merci aussi à mes sœurs, *Corinne*, *Béatrice* et *Anne* et leur mari *Pascal*, *Gilles* et *Jean* pour leur soutien, leurs encouragements et les longues discussions au téléphone qui réchauffent le cœur et réconfortent, sans oublier mes neveux, *Thomas*, *Rémi*, *Guillaume* et *Mathieu*, ce «tourbillon» revivifiant lors de mes séjours dans mon Poitou natal.

A tous, merci.

Table des matières

REMERCIEMENTS ..... - 2 -

TABLE DES MATIERES ..... - 5 -

ABREVIATIONS ..... - 7 -

LISTE DES FIGURES ..... - 9 -

LISTE DES TABLEAUX ..... - 10 -

1. INTRODUCTION ..... - 11 -

1.1. LA PESTE DES PETITS RUMINANTS ..... - 12 -

1.1.1. Classification ..... - 12 -

1.1.2. Répartition géographique ..... - 13 -

1.1.3. Le virus de la peste des petits ruminants ..... - 15 -

1.1.4. Symptômes ..... - 21 -

1.1.5. Diagnostic ..... - 22 -

1.1.6. Les vaccins ..... - 24 -

1.2. LA GENETIQUE INVERSE ..... - 28 -

1.2.1 Récupération de virus à partir de l'ADNc ..... - 30 -

1.2.2. Applications de la génétique inverse ..... - 34 -

1.3. OBJECTIFS DE CETTE ETUDE ..... - 39 -

2. MATERIELS ET METHODES ..... - 40 -

2.1. ETUDE DE LA SEQUENCE DE LA POLYMERASE L-PPRV 75/1 ..... - 40 -

2.2. MISE EN EVIDENCE DE LA FONCTIONNALITE DE L-PPRV ET VALIDATION DU SYSTEME DE GENETIQUE INVERSE A L'AIDE DU MINIGENOME EGFP ..... - 43 -

2.2.1. Expression de la polymérase L-PPRV 75/1 ..... - 43 -

2.2.2. Mise en évidence de la fonctionnalité de L-PPRV et validation d'un système de génétique inverse à l'aide du minigénome eGFP et du Fowlpox-T7 ..... - 43 -

2.3. VALIDATION D'UN SYSTEME DE GENETIQUE INVERSE DE PPRV 293-T7 ..... - 44 -

2.3.1. Constructions des plasmides N, P et L sous promoteur pT7 ..... - 45 -

2.3.1.1. Construction du plasmide de clonage pBKS-IRESRT7 ..... - 45 -

2.3.1.2. Insertion du gène N et construction de pN-BKS-IREST7 ..... - 46 -

2.3.1.3. Insertion du gène P et construction de pP-BKS-IREST7 ..... - 46 -

2.3.1.4. Insertion du gène L et construction de pL-BKS-IREST7 ..... - 48 -

2.3.2. Vérification de l'expression de N, P et L sous promoteur T7 ..... - 48 -

2.3.3. Comparaison des techniques de transfection des cellules 293-T7 et Vero ..... - 48 -

2.3.4. Validation du système génétique inverse sur cellules 293-T7 ..... - 49 -

2.4. ASSEMBLAGE DU GENOME ENTIER DE PPRV 75/1 ..... - 50 -

2.4.1. Obtention du plasmide pPMintpCRII ..... - 51 -

2.4.2. Mutagenèse du plasmide p17ML ..... - 52 -

2.4.3. Stratégie d'assemblage du génome entier de PPRV 75/1 ..... - 53 -

2.4.3.1. Obtention du plasmide de clonage pBKSmutMCS ..... - 54 -

2.4.3.2. Première stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1 ..... - 55 -

2.4.3.3. Deuxième stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1 ..... - 58 -

2.4.3.4. Troisième stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1 ..... - 61 -

2.4.3.5. Stabilisation du clone contenant le génome entier PPRV 75/1 ..... - 63 -

2.5. RECONSTITUTION DU VIRUS VACCINAL PPRV 75/1 ..... - 64 -

2.5.1. Reconstitution par transfection des cellules 293-T7 ..... - 64 -
2.5.2. Reconstitution par transfection des cellules Vero ..... - 64 -
2.5.3. Reconstitution par transfection des cellules Vero.DogSLAMtag ..... - 65 -
2.6. MARQUAGE DU GENOME DU VIRUS VACCINAL PPRV 75/1 ..... - 66 -
2.6.1. Stratégie de marquage par insertion d'une cassette d'expression ..... - 66 -
2.6.1.1. Aménagement du site de restriction unique sur pPMintPCRII ..... - 67 -
2.6.1.2. Insertion de l'eGFP dans pPMintAscI ..... - 68 -
2.6.2. Marquage par délétion ..... - 69 -
2.6.3. Marquage par substitution ..... - 69 -
2.6.3.1. Peptides Tag ..... - 70 -
2.6.3.2. Peptides Morbillivirus ..... - 71 -
2.6.3.3. Screening des sérums de chèvres disponibles au laboratoire de virologie. - 72 -

3. RESULTATS ..... - 73 -

3.1. ETUDE DE LA L-PPRV 75/1 ..... - 73 -
3.2. VALIDATION SUR CELLULES VERO DU SYSTEME REPLICATIF DE PPR A L'AIDE DU MINIGENOME EGFP ..... - 76 -
3.2.1. Expression de L-PPRV 75/1 sous pCMV ..... - 76 -
3.2.2. Fonctionnalité de L-PPRV 75/1 et validation du système de génétique inverse .... - 77 -
3.3. VALIDATION SUR CELLULES 293-T7 DU SYSTEME REPLICATIF DE PPR A L'AIDE DU MINIGENOME EGFP ..... - 79 -
3.3.1. Comparaison de l'efficacité des techniques de transfection ..... - 80 -
3.3.2. Expression de N, P et L sous promoteur pT7 ..... - 80 -
3.3.3. Validation du système réplicatif sur 293-T7 à l'aide du minigénome eGFP. - 81 -
3.4. ASSEMBLAGE DU GENOME ENTIER DE LA SOUCHE VACCINALE PPRV 75/1 ..... - 83 -
3.5. RECONSTITUTION D'UN VIRUS PPRV 75/1 INFECTIEUX ..... - 86 -
3.6. MARQUAGE DU GENOME DE LA SOUCHE VACCINALE PPRV 75/1 ..... - 89 -
3.6.1. Marquage par insertion d'une cassette d'expression eGFP ..... - 89 -
3.6.2. Marquage par délétion ..... - 91 -
3.6.3. Marquage par substitution ..... - 92 -
3.6.3.1. Substitution par un Tag ..... - 92 -
3.6.3.2. Substitution par une séquence homologue d'un autre Morbillivirus ..... - 94 -
3.6.3.3. Criblage des sérums de chèvres et moutons ..... - 95 -

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES ..... - 97 -

5. CONCLUSION GENERALE ..... - 109 -

6. REFERENCES ..... - 110 -

7. PUBLICATIONS ..... - 121 -

Abréviations

aa : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

BET : bromure d'éthidium

BHK : cellules de rein de bébé hamster (Baby Hamster Kidney)

BPIV : virus parainfluenza bovin

CDV : Canine Distemper virus (virus de la maladie de Carré)

CEF : Chicken embryo fibroblasts (fibroblastes d'embryon de poulet)

c-ELISA : ELISA de compétition

CIP : Calf Intestine Phosphatase

CMV : Cetecean morbillivirus (Morbillivirus des cétacés)

DIVA : differenciation of infected and vaccinated animals

ecp : effet cythopathique

EDTA

eGFP : enhanced green Fluorescent Protein

ELISA : Enzyme Link Immuno Sorbent Assay

F : protéine de fusion

FITC : fluorescein isothiocyanate

FP-T7 : virus recombinant Fowlpox-T7

H : protéine de l'hémagglutinine

HIV : human immunodeficent virus (virus immunodéficience humaine)

HPIV : virus parainfluenza humain

IFI : immunofluorescence indirecte

IHVN : infectious hematopietic necrosis virus

kb : kilobase

kDa : kilo Dalton

L : polymérase

LB : Luria broth, milieu de culture pour les bactéries

M : protéine de la matrice

MCS : multiple cloning site ou site de clonage multiple

MEM : milieu essentiel minimum d'Eagles

MOI : multiplicity of infection (multiplicité d'infection)

MV : Measles virus (virus de la rougeole)

MVA : virus de la vaccine, souche Ankara

N : nucléoprotéine

NDV : virus de la maladie de Newcastle

o/n : overnight ou sur la nuit

OIE : organisation mondiale des épizooties

P : phosphoprotéine

pb : paire base

PBS : Phosphate buffered saline ou tampon phosphate salin

pCMV : promoteur cytomégalovirus

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérase en chaîne)

PDV : Phocine Distemper virus (morbillivirus des phoques)

PFA : paraformaldéhyde

PPR : Peste des Petits ruminants

QPCR : quantitative PCR (PCR quantitative ou PCR en temps réel)

RNP : ribonucléoprotéine

rpm : rotation par minute

RPV : Rinderpest virus (virus de la peste bovine)

RT : reverse transcription ou transcription inverse

SLAM : Signalling Lymphocyte Activation Molecule

SVCV : spring viremia of carp virus

SVF : sérum de veau fétal

TAE : Tris Acétate EDTA

TBE : Tris Borate EDTA

VHSV : viral hemorragic septicemia virus

VSV : virus de la stomatite vésiculeuse

vTF7-3 : virus de la vaccine exprimant l'ARN T7 polymérase

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Arbre phylogénétique des différents morbillivirus basé sur le gène P	13
2	Répartition géographique de la peste des petits ruminants en 2008	14
3	Arbre phylogénétique des différentes souches de PPRV basé sur le gène N	14
4	Structure de morbillivirus	15
5	Signes cliniques des animaux atteints de la peste des petits ruminants	21
6	Principe de la génétique inverse	29
7	Représentation du génome entier de la souche vaccinale PPRV 75/1	50
8	Obtention du plasmide de clonage pBKSmutMCS	54
9	Stratégie d'assemblage du génome entier	56-57
10	Deuxième stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1	59-60
11	Dernière étape de la troisième stratégie d'assemblage	61
12	Aménagement du site AscI entre les gènes P et M	67
13	Insertion de l'eGFP pour marquer le génome PPRV 75/1	68
14	Alignement des séquences protéiques de morbillivirus entre 480 et 520 aa	70
15	Arbre phylogénétique des paramyxovirus basé sur le gène L	74
16	Alignement multiple de séquences L des différents morbillivirus	75-76
17	Expression de L-PPRV 75/1 détectée par immunofluorescence	77
18	Fonctionnalité de L-PPRV 75/1 et validation du système de génétique inverse	78
19	Validation par PCR eGFP de la fonctionnalité de L-PPRV 75/1	79
20	Comparaison de l'efficacité des techniques de transfection sur 293-T7 et Vero	80
21	Mise en évidence par IF de l'expression de N, P et L placé sous pT7	81
22	Validation du système réplicatif sur cellules 293-T7 avec le minigénome eGFP	82
23	Validation par PCR eGFP du minigénome par génétique inverse sur 293-T7	82
24	Représentation de PPRV 75/1cloné entre T7p et RiboT7	84
25	Essai de reconstitution de PPRV 75/1 sur cellules Vero.DogSLAMtag	87
26	PCR sur les surnageants des différents passages sur Vero.DogSLAMtag	88
27	Stratégie d'insertion de la cassette eGFP dans le génome de PPRV 75/1	90
28	Contrôle de la fonctionnalité en génétique inverse de N-PPRV 75/1 délétée	92
29	Résultats des tests ELISA peptides avec les Tag	93
30	Résultats des tests ELISA avec les peptides morbillivirus	95

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Les différentes protéines du virus de la peste des petits ruminants et leurs fonctions	18
2	Lésions macroscopiques et microscopiques de la peste des petits ruminants	22
3	Diagnostic différentiel de la peste des petits ruminants	23
4	Récapitulatif des *Mononegavirales* obtenus en génétique inverse	31
5	Liste des logiciels utilisés pour l'analyse de la séquence L-PPRV 75/1	41
6	Liste des séquences utilisées dans l'alignement et la comparaison de séquences	42
7	Liste des amorces utilisées en PCR et conditions de PCR	47
8	Liste des amorces utilisées pour les mutagénèses dirigées	53
9	Liste des amorces utilisées pour le criblage des clones pAssemblage4term	62
10	Séquences des Tag identifiés comme marqueurs potentiels du génome	69
11	Séquences des peptides morbillivirus pour el marquage du génome	70
12	Protocole des ELISA peptides	71
13	Liste des amorces utilisées pour corriger la séquence L-PPRV 75/1	85

1. INTRODUCTION

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie virale, contagieuse, très grave sur le plan clinique, listée dans les maladies à déclaration obligatoire à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). Les conséquences de la maladie sont directes avec des pertes importantes pouvant hypothéquer le maintien de l'activité d'élevage, ou indirectes par l'application locale de mesures de contrôle ou de barrières sanitaires à l'échange d'animaux. Les impacts socio-économiques sont dramatiques pour les éleveurs de chèvres et moutons. La PPR est due à un virus du genre *Morbillivirus* de la famille des *Paramyxoviridae*. Les taux de morbidité et mortalité peuvent atteindre respectivement 80% et 90-100%. La PPR, sévissant jusque-là en Afrique, au Moyen Orient et en Asie, est en expansion et constitue une menace pour l'Europe car elle se trouve maintenant à ses frontières : à l'est avec la Turquie depuis 2004 et plus au sud, avec le Maroc depuis l'été 2008.

Il existe un vaccin pour lutter contre la peste des petits ruminants. Développé en 1989 [1] par atténuation de la souche virulente Nigéria 75/1 par passages successifs sur des cellules, ce vaccin actuel offre une bonne protection aux animaux durant leur vie économique, soit environ trois ans. Les tests de diagnostic sérologique (tests ELISA) disponibles actuellement ne permettent pas de faire la distinction entre animaux vaccinés et animaux naturellement infectés. Le développement d'un vaccin PPR marqué rendrait possible cette distinction et permettrait d'améliorer l'efficacité des mesures de contrôle tout en allégeant leurs contraintes sur les échanges puisqu'en théorie des animaux vaccinés et non infectés provenant d'une zone où l'infection a été contrôlée, pourraient continuer à être échangés. Depuis une douzaine d'années, les progrès réalisés dans l'étude des virus à ARN négatifs ouvrent de nouvelles perspectives pour atteindre un tel objectif. En effet, le développement de la technique de génétique inverse permet la manipulation des génomes des *Mononegavirales* et de recréer *in vitro* des particules virales infectieuses incorporant des marques.

L'objectif principal de ce travail de recherche est de développer, par génétique inverse, un vaccin PPR marqué et d'y associer les outils de diagnostic différentiel.

1.1. La peste des petits ruminants

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie animale infectieuse, contagieuse, spécifique des petits ruminants. Avec des taux de mortalité et de morbidité élevés, cette maladie a un impact économique important dans les pays où elle sévit. Affectant le plus souvent les petits ruminants domestiques (chèvres et moutons), la faune sauvage est également sensible à cette infection.

La peste des petits ruminants, souvent confondue avec d'autres maladies telles que la pasteurellose ou la peste bovine (elle aussi due à un morbillivirus), a été décrite pour la première fois en tant que telle en 1942 en Côte d'Ivoire par Gardennec [2]. Cette maladie est enzootique dans les pays de l'Afrique sub-sahalienne, du Moyen-Orient et de l'Asie du sud ouest. Malheureusement, contrairement à la peste bovine, cette maladie n'a pas bénéficié de programmes de surveillance et de contrôle, et continue de progresser à partir des zones classiquement connues comme enzootiques. Elle est même devenue une menace pour l'Europe. En effet, des foyers ont été déclarés à ses portes en octobre 2004, dans la province d'Edirne, dans la région de la Thrace en Turquie [3, 4]. Plus récemment encore, à l'été 2008, des foyers ont été observés et déclarés au Maroc et jusqu'aux frontières avec l'Algérie [5]. Il est donc important de savoir dépister précocement cette maladie qui peut devenir un risque dans un avenir plus ou moins proche. Une bonne sensibilisation à la reconnaissance des signes cliniques est essentielle pour un diagnostic rapide et une réaction adaptée.

1.1.1. Classification

La peste des petits ruminants est due au virus de la Peste des Petits Ruminants (PPRV) appartenant au genre *Morbillivirus*, famille des *Paramyxoviridae*. Les Morbillivirus ont une grande spécificité d'hôtes (Figure 1). Le virus de la peste des petits ruminants affecte principalement les ovins, caprins domestiques et les petits ruminants de la faune sauvage. Celui de la peste bovine (RPV pour Rinderpest virus) atteint les artiodactyles, plus particulièrement les bovins et les buffles. Le virus de la rougeole (MV pour Measles virus) atteint l'Homme et celui de la maladie de Carré (CDV pour Canine Distemper virus), les canidés. D'autres morbillivirus affectent plus particulièrement les mammifères marins : les phoques sont touchés par le Phocine Distemper virus (PDV) et les cétacés par le morbillivirus des cétacés (CMV pour Cetacean Morbillivirus).

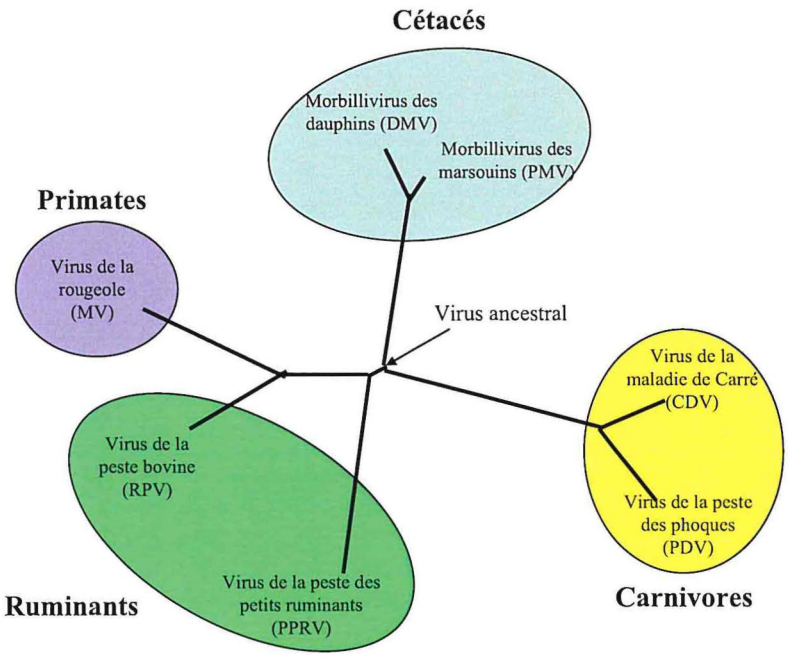


Figure 1 : arbre phylogénétique des différents morbillivirus basé sur la séquence du gène de la phosphoprotéine P, d'après Barrett [6]

1.1.2. Répartition géographique

La peste des petits ruminants est une maladie enzootique en Afrique sub-saharienne. Elle est présente au Moyen-Orient, en Asie du sud ouest (Figure 2) et maintenant aux portes de l'Europe, en Turquie et au Maroc. Cette maladie a des conséquences économiques importantes dans les pays où elle est déclarée. Les taux de mortalité (de 90 à 100%) et de morbidité (jusqu'à 80%) de cette pathologie sont très élevés. Les troupeaux domestiques se trouvent alors rapidement décimés par ce virus et les échanges commerciaux sont interdits dans les pays où la maladie est déclarée présente.

L'alignement phylogénétique (Figure 3), basé sur le gène de la nucléoprotéine N, des différentes souches de PPR [7] met en évidence quatre lignée différentes : trois sont réparties sur le continent africain (lignées I, II et III) et une sur le continent asiatique (lignée IV).

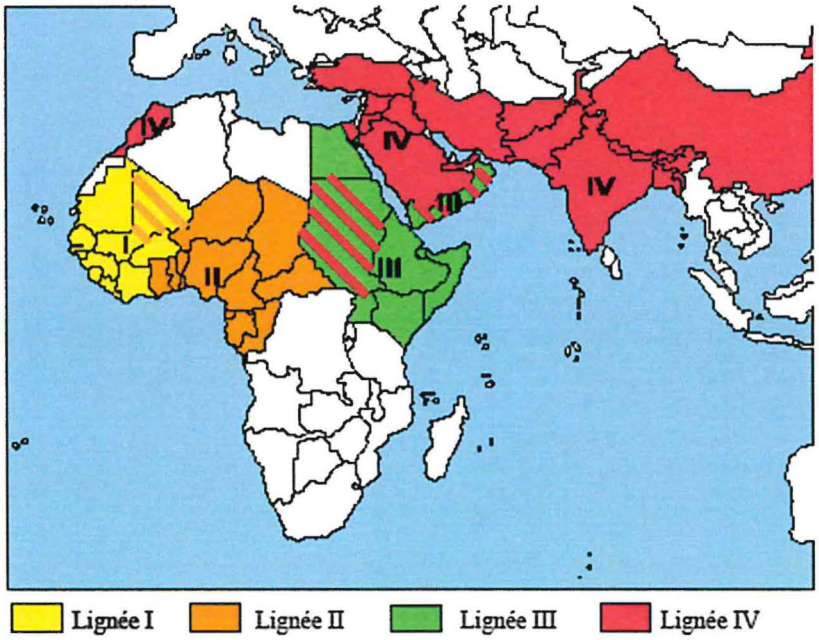


Figure 2 : répartition géographique de la PPR en 2008 (Minet *et al.*[8])

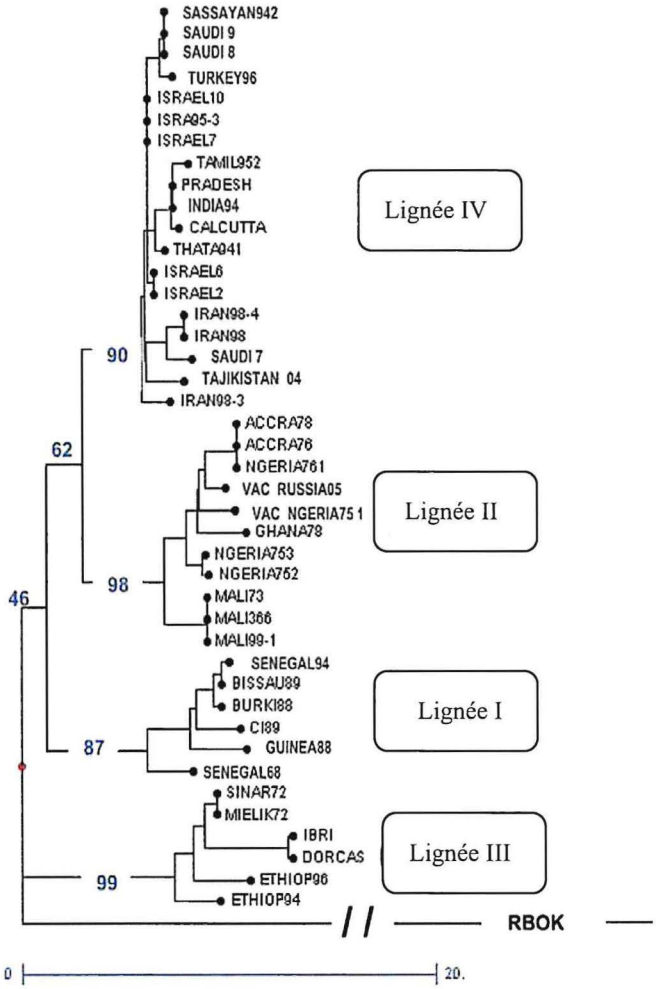


Figure 3 : arbre phylogénétique des différentes souches de PPRV basé sur le gène N, d'après Kwiatek et al [7]

1.1.3. Le virus de la peste des petits ruminants

Le virus de la peste des petits ruminants est un virus enveloppé, pléomorphe dont la taille varie de 400-500 nm. Son génome a une taille d'environ 16 kilobases (kb) et respecte la « règle de six », qui s'applique à tous les virus de la sous-famille des *Paramyxovirinae*. Cette règle est la conséquence de l'association de chaque sous-unité de la nucléoprotéine N à exactement six nucléotides. Quand le génome est un multiple de six, l'efficacité de réplication est meilleure. En effet, la réplication de ces virus peut entraîner des erreurs : la « règle de six » laisse l'avantage aux génomes corrects [9]. Ce génome est constitué d'un ARN monocaténaire négatif non segmenté codant pour six protéines structurales (N, P, M, F, H, L) et deux protéines non structurales (C et V) (Figure 4).

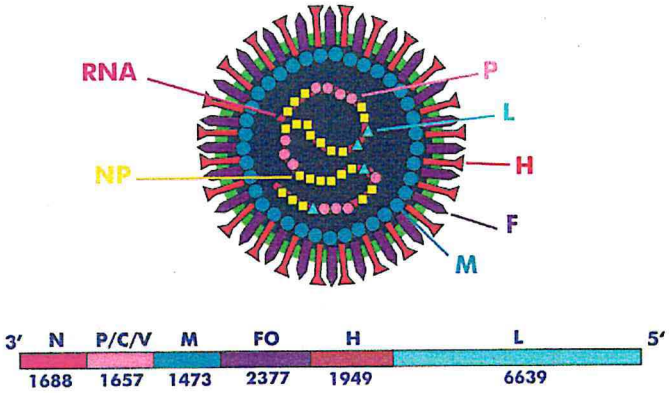


Figure 4a : schéma de la structure de morbillivirus (d'après Diallo)

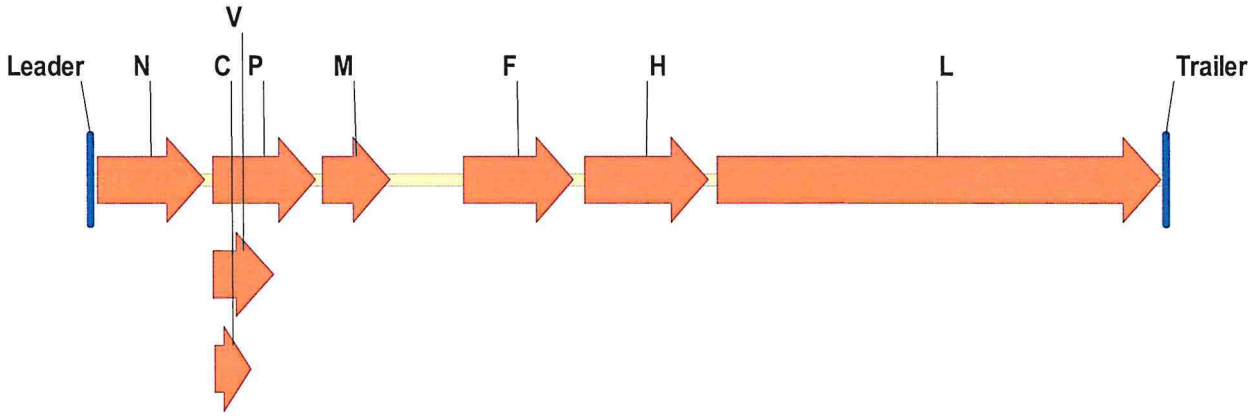


Figure 4b : représentation du génome de la peste des petits ruminants (Minet *et al*, [8])

Figure 4 : structure des *Morbillivirus*

L'ARN négatif ne peut pas être directement traduit en protéines. Il doit d'abord être transcrit en ARN messagers (ARNm) par la polymérase virale. Ces ARNm sont ensuite traduits en protéines par la machinerie enzymatique de la cellule infectée. Le virion est composé de 6 protéines : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et l'ARN polymérase ARN dépendante (L). Le génome du virus PPR comprend 15948 bases. Il est associé à trois protéines virales pour former la ribonucléoprotéine (RNP) : N, P et L, protéines composées respectivement de 525, 509 et 2183 acides aminés (aa). La ribonucléoprotéine (RNP) constitue la structure minimale essentielle pour la transcription et la réplication du génome viral dans le cytoplasme cellulaire. La nucléoprotéine N est la protéine la plus abondante dans le virus et donc la cible préférentielle des anticorps. Les antigènes N sont largement utilisés dans les tests de diagnostic. En revanche, les anticorps produits ne sont pas neutralisants *in vitro*. Cette nucléoprotéine N forme un manchon protecteur autour de l'ARN génomique et est responsable de la structure hélicoïdale de la nucléocapside. La région centrale de la protéine est engagée dans le processus d'auto-assemblage et d'encapsidation de l'ARN génomique. La phosphoprotéine P interagit avec la protéine N et favorise l'encapsidation des ARN viraux néo-synthétisés. Elle interagit aussi avec L pour former le complexe de polymérisation de l'ARN dépendant de l'ARN, responsable de la synthèse des ARNm et de la réplication de l'ARN viral génomique. La polymérase L possède toutes les activités enzymatiques nécessaires à la polymérisation de l'ARN, initiation, élongation, terminaison, coiffage, méthylation et polyadénylation [10]. Lors de sa libération, le virus emprunte son enveloppe à celle de la cellule hôte dans laquelle s'insèrent trois autres protéines virales : M, F et H. La protéine M, la plus petite des protéines virales (335 aa) recouvre la face intérieure de l'enveloppe virale et sert de lien entre la nucléocapside [11] et les deux glycoprotéines de surface F et H. La protéine d'hémagglutinine, longue de 609 aa, est une protéine glycosylée qui permet la fixation du virus au récepteur de la cellule hôte. La seconde protéine glycosylée est la protéine de fusion F. Composée de 546 aa, elle est responsable de la fusion entre les membranes du virus et de la cellule hôte. Cette activité n'est acquise qu'à la suite d'un processus de maturation qui aboutit au clivage de F en deux sous-unités F1 et F2. Ce clivage, effectué par une protéase cellulaire, permet de libérer à l'extrémité de F1 un peptide très hydrophobe dit peptide de fusion. De plus, les deux protéines glycosylées F et H sont la cible d'anticorps neutralisants *in vitro* et sont utilisés dans les tests de diagnostic.

Le génome viral code également deux protéines non structurales C et V qui ne sont retrouvées que dans les cellules infectées. Leur synthèse est dirigée par le gène de la protéine P. Au cours de la multiplication virale, le gène correspondant à cette protéine est transcrit en deux ARNm. Le premier est une copie exacte du gène. Il est traduit en P (507 aa) à partir du premier codon d'initiation AUG rencontré par les ribosomes de la cellule infectée. Cependant il existe un deuxième codon AUG en aval du premier, en position 23 sur l'ARN, et qui se trouve dans des conditions favorables pour jouer une fonction de codon d'initiation. Il permet la synthèse d'une deuxième protéine C (177 aa) plus petite que P. Le second ARNm du gène P n'est pas une copie exacte du gène car il comporte une base G supplémentaire insérée dans l'ARN au cours de sa synthèse par un mécanisme de bégaiement de la polymérase connu sous le terme « editing ». L'addition de cette base supplémentaire est faite à un point précis de l'ARNm, en position 693. La conséquence de cette insertion est le changement du cadre de lecture de l'ARNm à partir de cette position, générant un nouveau codon stop à la position 894 : ce processus entraîne la synthèse d'une protéine plus courte, la protéine V (298 aa). La protéine C a un rôle dans la transcription et la V, dans la réplication du génome viral. Ces deux protéines interfèrent également avec l'immunité innée en bloquant la réponse interféron [12, 13] (Tableau 1).

La transcription et la réplication du virus sont contrôlées par deux régions non codantes situées aux extrémités 3' et 5' du génome, le *leader* et le *trailer*. Le *leader* (positions 1 – 54) et la partie 3' non codante de la N (positions 55 – 107) constituent le promoteur génomique (107 bases), utilisé par la polymérase virale pour la synthèse des ARNm. La partie 5' non codante de la polymérase L (positions 15840 – 15908) et le *trailer* (15909 – 15948) constituent le promoteur antigénomique (109 bases), utilisé par la polymérase pour la synthèse de l'ARN (+), intermédiaire de réplication du génome viral. Le *leader* et le *trailer* ont des séquences inversées complémentaires sur leurs 16 premières bases qui constituent probablement le signal de reconnaissance pour la polymérase virale.

Protéine	Taille aa	Fonctions	Références
N	525	Interactions avec ARN et ARN Polymérase lors de la transcription et la réplication Interactions N-N pour auto-assemblage autour de l'ARN génomique lors de la réplication et la formation de la nucléocapside Interactions avec P et le complexe P-L Interactions avec M lors du bourgeonnement qui suit l'assemblage des éléments de la ribonucléoprotéine Rôle dans la régulation cellulaire de la protéine du choc thermique Hsp72 et du facteur 3 de l'interféron Rôle dans régulation du récepteur de la nucléoprotéine	Diallo *et a.l*, 1994 ; Libeau *et a.l* 1998, Bodjo *et a.l* 2007 et 2008, Barrett *et a.l* 2006 ; Haffar *et a.l* 1999, Banyard *et a.l* 2008
P	507	Rôle dans la transcription (partie C term) et la réplication (partie N term) Positionne la protéine L sur la matrice N-ARN Chaperonne la nouvelle protéine N et oriente la nucléoprotéine N libre dans la formation de RNP	Barrett *et a.l*, 2006
C	177	Rôle dans la virulence Implication dans le contrôle de la réponse innée de l'hôte par le blocage de la synthèse des interleukines interférons	Barrett *et a.l*, 2006, Boxer *et a.l* 2009,
V	298	Implication dans la régulation de la synthèse de l'ARN viral Facteur de virulence important interférant avec l'immunité antivirale de l'hôte en inactivant l'interféron de type I et II	Barrett *et a.l*, 2006
M	335	Permet le contact entre les glycoprotéines F et H et la RNP Rôle dans la morphologie du virion Rôle primordial dans incorporation nucléocapside dans le virion après initiation du bourgeonnement de la membrane cellulaire	Haffar *et a.l*, 1999 ; Bailey *et a.l*, 2005
F	546	Responsable de la fusion de la membrane virale avec celle de l'hôte pour libérer la RNP dans le cytoplasme Région C term, rôle dans l'ancrage de la protéine à la membrane	Meyer 1995 ; Barrett 2006
H	609	Permet attachement du virus aux récepteurs membranaires cellulaires Région N term, sert d'ancrage transmembranaire par son domaine hydrophobe ; a une fonction signal peptidique ; participe aux échanges cytoplasmiques Possède une activité neuraminidasique et hémagglutinante	Barrett *et a.l* 2006 ; Libeau *et a.l* 1998 ; Seth et Shaila 2001
L	2183	Rôle dans la fixation de l'ARN viral Activité polymérase Activité enzymatique kinase et ATPase	Bailey *et a.l*, 2005

Tableau 1 : les différentes protéines du virus de la peste des petits ruminants et leurs fonctions

- Interactions virus et cellules

L'infection de la cellule cible commence par l'interaction des spicules de la glycoprotéine H avec son ligand cellulaire [14]. Deux protéines cellulaires ont été identifiées comme récepteur permettant la fixation du virus de la rougeole (MV). Comme pour le virus de la rougeole ou de la peste bovine, le ligand naturel du virus PPR est probablement le CD150 (surface leukocyte adhesion molecule) ou SLAM (Signalling Lymphocyte Activation Molecule). Ce premier récepteur cellulaire utilisé par les morbillivirus est exprimé à la surface des lymphocytes activés, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques matures [15, 16]. Le second récepteur est le récepteur CD46, initialement décrit comme un composant du système de régulation de l'activité du complément [17]. Ce récepteur est utilisé par les souches vaccinales du virus de la rougeole, adaptées à la culture cellulaire [18, 19].

Une fois le virus lié à la cellule par le pont H-CD150, la protéine virale de fusion F intervient pour permettre la fusion des deux membranes virale et cellulaire. A la suite de ce processus de fusion, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte. Grâce au complexe RNP, la transcription du génome viral est initiée. La polymérase ARN dépendante de l'ARN s'accroche au promoteur génomique de l'extrémité 3' du génome viral et entame la synthèse d'ARN. A chaque séquence inter génique constituée de trois nucléotides, signal de pause pour la polymérase lors de la transcription, l'ARN synthétisé est décroché avant que l'enzyme n'entame la copie du gène suivant. Ce mode de transcription aboutit à la synthèse d'ARNm monocistroniques traduits en protéines par la cellule hôte. De temps en temps, des molécules de polymérase ne « respectent » pas une ou deux pauses inter géniques, ce qui aboutit à la synthèse d'ARNm bi ou tricistroniques, produits aberrants de la transcription. Les séquences inter géniques sont très conservées chez les morbillivirus : CUU, CUA, CAA ou CUA. Pour le PPRV, cette séquence est CUU. Elles sont dites séquences d'atténuation de la synthèse d'ARN. Elles ne sont reconnues comme signal de pause ou d'atténuation que lors de l'étape de transcription et ne sont pas copiées. Une des conséquences du phénomène d'atténuation, en plus de la synthèse d'ARNm mono, bi et tri-cistroniques est l'existence d'un gradient dans la quantité de ces produits car il n'y a qu'un seul point d'entrée de la polymérase, le promoteur génomique pour la transcription. En raison de cette organisation génomique, plus un gène est éloigné du promoteur, moins il est transcrit. Autrement dit c'est l'ARNm N qui est le plus produit et l'ARNm L qui l'est le moins. L'agencement des gènes dans le

génome viral correspond à la proportion relative de chaque protéine nécessaire à la production du virus, N étant la protéine la plus abondante dans le virion et L la moins représentée.

Au cours du cycle viral, la transcription fait progressivement place à la réplication qui consiste en la synthèse complète de génomes viraux. Les signaux tri nucléotides atténuateurs ne sont plus reconnus par la polymérase, qui ne relâche l'ARN synthétisé qu'à la fin de la copie complète du génome, aboutissant ainsi au brin d'ARN(+) complémentaire entier. Cet antigénome est ensuite répliqué pour produire un génome de polarité négative. La transition entre la transcription et la réplication dépend de l'accumulation des protéines N et P. Ces protéines néoformées par la traduction des nouveaux ARNm vont se lier à l'ARN en cours de synthèse par la polymérase. Cette association entraîne probablement un changement allostérique de la polymérase qui ne reconnaîtrait plus les signaux de pause. C'est ainsi que sont formées de nouvelles RNP virales. Celles-ci, grâce à l'affinité des protéines N et M, vont migrer vers la membrane cellulaire où sont insérées les glycoprotéines virales d'enveloppe, c'est-à-dire F et H. L'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe et les RNP permet la formation de bourgeons qui croissent pour finalement se détacher de la cellule cible et donner naissance à un virion complet dans le milieu extérieur. La multiplication du virus entraîne la mort et la lyse de la cellule.

- Eléments de pathogénie

Le plus souvent, les infections à *Morbillivirus* entraînent des maladies aiguës avec des taux de mortalité élevés. En cas de guérison, une immunité de longue durée s'installe. Le virus de la peste des petits ruminants PPR est un virus épithéliotrope [14], à l'origine d'infections caractérisées par des lésions des muqueuses qui entraînent diarrhées, jetages et larmoiements. Mais c'est également un virus lymphotrope. Juste après infection, généralement par voie respiratoire, le virus se multiplie d'abord dans les organes lymphoïdes régionaux de l'hôte. Tous les lymphocytes, les macrophages et les cellules réticulaires peuvent être des cibles cellulaires de la multiplication virale. Les virions néoformés dans le système lymphoïde local sont ensuite disséminés par voie sanguine dans le reste de l'organisme avec un tropisme particulier pour le système immunitaire et les muqueuses. La multiplication du virus dans les cellules du système immunitaire, induisant leur destruction massive, entraîne une sévère immunodépression souvent

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

responsable d'infections secondaires opportunistes. Les souches virales les plus pathogènes correspondraient à celles qui peuvent se multiplier rapidement dans les cellules lymphoïdes, alors que les souches atténuées auraient une capacité d'infection réduite ainsi qu'une perte de leur caractère épithéliotrope [20].

La PPR est surtout une maladie des petits ruminants. Le virus PPR a vraisemblablement une affinité plus importante pour les lymphocytes de ces espèces que pour ceux des bovins [21]. L'espèce, la race et l'âge de l'animal influent sur l'expression de la maladie. D'autres infections, notamment bactériennes, peuvent intervenir dans la sévérité des signes cliniques.

1.1.4. Symptômes

La peste des petits ruminants peut se développer sous quatre formes en fonction de la sensibilité de l'animal infecté.

La forme suraiguë affecte principalement les caprins de plus de quatre mois. L'incubation du virus est de trois jours environ. La maladie se traduit par une forte hyperthermie et une perte d'appétit, la congestion des muqueuses buccales et oculaires. Un à deux jours après l'hyperthermie, des larmoiements et jetages séromuqueux apparaissent (Figure 5, Tableau 2). Une diarrhée profuse se déclare quand la température corporelle commence à baisser. Cinq à six jours après les premiers symptômes, la mort survient dans 100% des cas.

La forme aiguë a une incubation de cinq à six jours. La température de l'animal augmente et les mêmes signes cliniques que pour la forme suraiguë sont présents mais de façon moins prononcée. Les jetages et larmoiements sont mucopurulents et la respiration est laborieuse. Quatre à cinq jours après le début de la maladie, la température corporelle baisse et s'accompagne d'une diarrhée et d'une érosion des muqueuses buccales. La mort survient dans les dix jours suivant l'hyperthermie et le taux de mortalité s'élève à 70-80%. En cas de guérison, la convalescence est rapide.

Figure 5 : signes cliniques des animaux atteints de la peste des petits ruminants : a : jetage purulent ; b : lésions buccales

Lésions macroscopiques
L'animal mort de la PPR est amaigri et souillé par la diarrhée. Les lésions buccales sont les plus évidentes. Les lésions sont congestives voire hémorragiques au niveau de l'intestin, et linéaires au niveau du pharynx et de l'œsophage. La trachée est congestionnée et présente un exsudat spumeux. La rate, elle-aussi congestionnée, est ferme. Les plaques de Peyer sont le siège de foyers de nécrose. L'atteinte pulmonaire est fonction de la complication bactérienne. Les nœuds lymphatiques sont œdémateux et friables.
Lésions microscopiques
Les cellules épithéliales sont vacuolisées et infiltrées par des polynucléaires. Au niveau des muqueuses de l'intestin, l'épithélium est épais avec une infiltration par des neutrophiles et une dégénérescence glandulaire. Le parenchyme pulmonaire est infiltré par des neutrophiles et des macrophages. Des syncytia sont retrouvés dans les différents organes. Des dépôts de fibrine ainsi que des bactéries sont présents dans les foyers de bronchopneumonie.

Tableau 2 : lésions macroscopiques et microscopiques de la peste des petits ruminants

La forme subaiguë se traduit après environ cinq jours d'incubation par une faible hyperthermie. Les autres signes cliniques sont peu intenses, voire absents. Le jetage est peu abondant et se dessèche autour des nasaux pour former des croûtes qui peuvent alors être confondues avec l'ecthyma contagieux.
La forme inapparente est la plus fréquente, notamment dans les zones sahéliennes et ne peut être révélée que lors des enquêtes sérologiques.

1.1.5. Diagnostic

La peste des petits ruminants peut se confondre avec plusieurs maladies des petits ruminants, telles que l'ecthyma contagieux, la pleuropneumonie contagieuse caprine, la pasteurellose ou la peste bovine (Tableau 3). Un diagnostic de laboratoire est donc nécessaire pour distinguer ces maladies.

Symptômes	Peste des Petits Ruminants (PPR)	Peste bovine (PB)	Ecthyma contagieux	Pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC)	Pasteurellose
Hyperthermie	+	+	+	+	+
Lésions érosives	+	+	-	-	-
Diarrhée	+	+	+	-	+
Jetages	+	+	+	+	+
Larmoiements	+	+	+	+	+

Tableau 3 : diagnostic différentiel de la Peste des petits Ruminants. La Peste des Petits Ruminants peut être confondue avec plusieurs maladies des ruminants, telles que l'ecthyma contagieux, la pleuropneumonie contagieuse caprine, la pasteurellose ou la peste bovine. Seul un diagnostic de laboratoire permet de faire la distinction entre la PPR et la PB. Le tableau montre les symptômes de la PPR en comparaison avec ceux des autres maladies. + : présence des symptômes ; - : absence de symptômes

En cas de suspicion de la peste des petits ruminants, des prélèvements peuvent être réalisés sur les animaux vivants (prélèvements de sang en tube ou sur papier buvard [22], écouvillonnages oculaires et nasaux) ou sur les cadavres d'animaux (échantillons d'intestin, de poumon, de nœuds lymphatiques). Sauf pour les papiers buvards, il est important que la chaîne du froid soit respectée lors de l'expédition des échantillons du fait de la sensibilité du virus à la chaleur. L'identification du virus dans les prélèvements est réalisée par des méthodes classiques de diagnostic de laboratoire [23]. L'immunodiffusion en gélose est une technique facile à mettre en œuvre et qui donne des résultats rapides sous 48 heures. Cependant, elle est peu sensible et peut mener à des erreurs de diagnostic entre la peste bovine et celle des petits ruminants. Les techniques d'immunofluorescence sont spécifiques si des anticorps monoclonaux sont utilisés. Le test d'hémagglutination est une méthode rapide de détection des anticorps dans le prélèvement. Il permet de différencier la peste bovine et de la peste des petits ruminants, car le virus de la peste bovine ne possède pas la propriété d'agglutination des globules rouges. Le test ELISA d'immunocapture [24], basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, est une méthode rapide et sensible pour un diagnostic différentiel entre les deux pestes des ruminants. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique rapide, sensible et spécifique. Elle est basée sur l'amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par transcription inverse de l'ARN viral extrait des échantillons. L'amplification est réalisée avec des amorces propres à chaque virus ce qui permet d'obtenir un résultat spécifique [14, 25, 26].

L'isolement viral reste le diagnostic de référence. Il permet de créer une collection de souches virales de référence. Ce diagnostic n'est pas facile et nécessite d'avoir des échantillons de bonne qualité et bien conservés. L'isolement du virus se fait sur des cellules de lignées primaires (cellules de rein ou de poumon de mouton pour la PPR) ou sur des cellules Vero (cellules de rein de singe vert). Depuis plusieurs années, des cellules exprimant le récepteur CD150 à leur surface sont utilisées pour l'isolement et la multiplication des morbillivirus, notamment pour le CDV, MV et RPV [16, 27-29]. Récemment disponibles au laboratoire de virologie, les cellules Vero.DogSLAMtag (exprimant le récepteur CD150 canin) semblent avoir une meilleure sensibilité que des cellules Vero classiques pour l'isolement et la multiplication du virus PPR (Zaheer Nizamani, communication personnelle). Le virus isolé est mis en évidence par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux spécifiques. Le diagnostic sérologique est recommandé par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) dans le cadre d'échanges internationaux d'animaux. Deux types de tests peuvent être utilisés. Le test de séroneutralisation du virus [30] est long et fastidieux (jusqu'à deux semaines pour obtenir un résultat) et nécessite l'utilisation de sérums stériles et le maintien de cultures cellulaires. Des tests ELISA de compétition plus rapides (résultats obtenus en quelques heures) ont été développés [24, 31-33]. Ils sont basés sur l'utilisation d'anticorps anti-N ou anti-H et permettent de traiter un grand nombre d'échantillons à la fois. Toutefois, aucun de ces tests ne permet d'effectuer une distinction systématique entre anticorps anti-PB et anti-PPR. Cependant, les tests ELISA-H ont une meilleure spécificité mais une moins bonne sensibilité que les tests ELISA-N.

1.1.6. Les vaccins

La circulation d'animaux en provenance de zones infectées vers les pays indemnes doit être proscrite. En cas de foyers circonscrits en zone indemne, la solution la plus rapide et efficace reste l'abattage et la destruction des cadavres des animaux infectés. Ces mesures permettent de recouvrer le statut indemne en quelques mois. Toutefois, cela suppose un système de surveillance clinique passive efficace permettant de détecter les premiers foyers de peste bovine ou de peste des petits ruminants en un temps relativement court. Ce système doit être complété par une capacité opérationnelle de diagnostic de laboratoire pour confirmer les suspicions cliniques et détecter toute infection subclinique. Lorsque l'infection a eu le temps de largement diffuser, seule une stratégie de vaccination massive peut être envisagée.

Le vaccin contre la peste bovine a longtemps été utilisé contre la peste des petits ruminants en raison des communautés antigéniques entre les deux virus (immunisation hétérologue). Cette utilisation est maintenant proscrite en raison du risque d'interférence avec le dépistage sérologique pour la surveillance de la peste bovine : en effet aucun outil sérologique ne permet de différencier les animaux vaccinés de ceux infectés par un virus sauvage [34]. Pour la protection des petits ruminants contre la PPR, il existe désormais un vaccin atténué homologue. Il confère une très bonne immunité après une seule injection, sur toute la durée de vie économique habituelle des petits ruminants (environ trois ans) [35]. Comme tous les morbillivirus, le vaccin PPR à virus atténué est sensible à la chaleur. Pour qu'il ne perde pas son activité, il est nécessaire de le conserver au froid pendant les campagnes de vaccination, condition qui n'est pas toujours réalisable dans certains pays du sud. Des essais de stabilisation thermique de ce vaccin ont été effectués et permettent d'étendre la durée de conservation du vaccin à des températures inférieures ou égales à 25°C [36]. Alternativement, des vaccins thermorésistants recombinants ont été développés. En plus de remédier au problème de sensibilité à la chaleur, ces vaccins recombinants peuvent être multivalents ce qui permet de vacciner contre plusieurs maladies à la fois. Un recombinant peste des petits ruminants - capripox a protégé les animaux vis-à-vis de la peste des petits ruminants et de la variole caprine [37, 38].

Un autre enjeu pour le contrôle des morbillivirus des petits ruminants consiste à développer des vaccins DIVA (pour « differentiation of infected and vaccinated animals ») permettant de distinguer sérologiquement un animal vacciné d'un animal infecté. Les vaccins recombinants n'exprimant qu'un antigène du virus, les autres antigènes servant au diagnostic sérologique, répondent à cet objectif. Une approche alternative repose sur le marquage du vaccin à virus atténué actuellement utilisé à l'échelle mondiale. Depuis le début des années 90, les progrès réalisés en génétique inverse [39, 40] pour la manipulation des virus à ARN négatif ont ouvert des perspectives [38]. En effet, le développement d'un vaccin marqué contre la peste des petits ruminants, basé sur le génome de la peste bovine, a été obtenu [41]. Dans cette chimère, les gènes de l'enveloppe virale de la peste bovine (M, F et H) ont été substitués par ceux de la peste des petits ruminants. Ce nouveau virus s'avère être un vaccin efficace contre la peste des petits ruminants. Il pourrait donc être utilisé dans les pays où la PPR est endémique, sans perturber le programme de sérosurveillance de la peste bovine réalisé à partir d'antigène H-PB. Par ailleurs, les tests de diagnostic actuels pour la peste des petits ruminants sont

basés soit sur la protéine N-PPR [31] soit sur la protéine H-PPR [42]. Les animaux vaccinés avec le virus chimère seront séronégatifs avec le test H-PB et le test N-PPR, mais séropositifs avec le test N-PB et le test H-PPR. Les animaux infectés PPR seront positifs avec les tests N-PPR et H-PPR et éventuellement avec le test N-PB, s'ils ont été vaccinés juste avant ou pendant l'infection PPR. De façon similaire, une autre chimère a été obtenue cette fois-ci en remplaçant la nucléoprotéine N de la peste bovine par celle de PPRV [43]. Les animaux vaccinés avec cette chimère sont efficacement protégés contre la peste bovine. Ce nouveau vaccin marqué, en association avec le test ELISA N-PPR pourrait être utile pour une vaccination d'urgence des bovins en cas de réapparition de la peste bovine. Quelle que soit la maladie, les vaccins DIVA ont un intérêt sanitaire et économique évident. Ils permettent en effet de réduire la durée des plans d'éradication de l'infection. Ainsi, pour contrôler l'infection avec un vaccin non marqué, il faut généralement entreprendre plusieurs campagnes consécutives de vaccination de l'ensemble du cheptel, arrêter la vaccination et enfin vérifier sur des jeunes animaux non vaccinés, l'absence d'anticorps signifiant l'absence de circulation du virus sauvage. Toutefois, même en l'absence de circulation virale, les animaux vaccinés ne peuvent faire l'objet d'échanges commerciaux en dehors de la zone préalablement infectée, puisque sérologiquement ils ne peuvent être distingués d'animaux infectés. Avec un vaccin DIVA, les opérations de dépistage du virus sauvage peuvent être concomitantes des opérations de vaccination et il est possible de déterminer si un animal vacciné a été ou non infecté par du virus sauvage, ce qui permet de gagner plusieurs mois voire années pour atteindre l'objectif d'éradication.

Une bonne connaissance des infections à morbillivirus des ruminants et les progrès de la biotechnologie ont permis de développer des outils de diagnostic rapides et des vaccins efficaces. Ces outils associés à une mobilisation internationale sans précédent, sont à la base du succès du programme mondial d'éradication de la peste bovine qui sera en 2010, la seconde maladie éradiquée du globe terrestre, après la variole humaine. Le contrôle de la peste des petits ruminants est plus délicat, car elle touche des espèces de moindre valeur ajoutée (les petits ruminants). C'est pour ces espèces qu'un vaccin marqué aurait un intérêt car il rendrait économiquement plus supportable, un programme de contrôle dans les régions où la peste des petits ruminants est enzootique. L'augmentation croissante des échanges internationaux est à l'origine de l'extension récente de la peste des petits ruminants. Aussi faut-il maintenir un niveau de surveillance performant afin de pouvoir lutter efficacement contre cette maladie présentant un risque d'émergence au nord. Dans

le cas d'une émergence au nord, l'accès à un vaccin marqué serait également essentiel car les abattages d'urgence massifs d'animaux dont on n'apporte pas systématiquement la preuve de l'infection ne sont plus acceptés par la société civile. En permettant d'exclure la possibilité d'une infection concomitante par dépistage sérologique, l'utilisation d'un vaccin DIVA autoriserait le maintien d'une majorité des animaux de la zone infectée dans le circuit de l'alimentation humaine.

1.2. La génétique inverse

Les virus à ARN négatif forment un groupe important au sein des virus enveloppés dans le sens où ils infectent un grand nombre d'espèces et sont responsables d'un certain nombre de maladies à fort impact non seulement sur le plan sanitaire mais aussi au niveau économique. L'organisation génomique des virus ARN(-) est variée. En effet, parmi les sept familles concernées, deux groupes peuvent être distingués. Le premier regroupe les virus dont le génome est segmenté et comprend les familles des *Arenaviridae* (deux segments), des *Bunyaviridae* (trois segments) et des *Orthomyxoviridae* (de six à neuf segments). Le second groupe représente les *Mononegavirales*, c'est-à-dire les virus à ARN(-) non segmenté dont font partie les familles des *Rhabdoviridae,* des *Paramyxoviridae*, des *Filoviridae* et des *Bornaviridae.*

La manipulation des génomes de virus à ARN, au laboratoire, implique de passer par un intermédiaire d'ADN complémentaire, beaucoup plus stable. C'est le principe de la génétique inverse (ARN → ADN). Toutefois, cela suppose d'être par la suite capable de régénérer un virus infectieux à partir de cet intermédiaire d'ADNc. Pour les virus à ARN(+), le génome est une molécule d'ARN directement traduite en protéines par la cellule, ces protéines prenant ensuite le relais pour fabriquer de nouvelles particules virales infectieuses. Il suffit donc de produire un ARN génomique à partir de l'ADNc pour générer un virus infectieux. En revanche, le génome des virus à ARN(-) doit d'abord être transcrit en ARNm par une polymérase virale, puis traduit en protéines par la machinerie cellulaire. Le génome isolé ne peut donc pas être infectieux, car il doit être mis en œuvre par une polymérase virale. Autrement dit, l'ADNc doit permettre de produire d'une part, un génome viral et d'autre part, la polymérase virale. Dans le cas des morbillivirus, seule la protéine L, ARN polymérase dépendante de l'ARN, peut opérer la polymérisation des ARNm à partir de l'ARN génomique viral. Pour être fonctionnelle, cette protéine doit être associée à deux autres protéines (la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P) et à l'ARN viral. Cette association forme la ribonucléoprotéine (RNP) qui, une fois constituée dans le cytoplasme cellulaire, permet la production de particules virales infectieuses. La nucléoprotéine N joue un rôle dans l'encapsidation de l'ARN et doit être présente en grande quantité. La phosphoprotéine P sert de chaperon à la protéine N pour l'encapsidation [44] et joue un rôle dans la réplication. Elle-aussi doit être présente en grande quantité au moment de la transfection. La protéine L a une fonction catalytique et est représentée en plus faible quantité.

Depuis une quinzaine d'année, la génétique inverse des morbillivirus a été développée pour générer *in vitro* des virus infectieux à partir d'un ADNc correspondant à leur génome entier [40, 45]. Ce système est basé sur la reconstitution dans la cellule d'une ribonucléoprotéine virale, c'est-à-dire la reconstitution de l'ensemble du complexe enzymatique nécessaire à la réplication virale et à la transcription de l'ARN viral. L'approche consiste à produire dans le cytoplasme de la cellule, à partir d'ADN plasmidiques, l'ARN correspondant au génome viral et les ARNm des protéines N, P et L. Ces trois protéines traduites par la cellule s'auto-assemblent avec l'ARN génomique viral pour former la RNP qui générera un virus infectieux (Figure 6). Cependant pour le genre *Paramyxoviridae*, la réplication n'est efficace que si la « règle des six » est observée [46-48]. Cette règle est une conséquence de l'association de chaque sous-unité de N avec exactement six nucléotides [49]. En effet, la réplication des virus de la sous-famille des *Paramyxovirinae* peut entraîner des erreurs : la règle des six permet de donner l'avantage aux génomes corrects [50, 51].

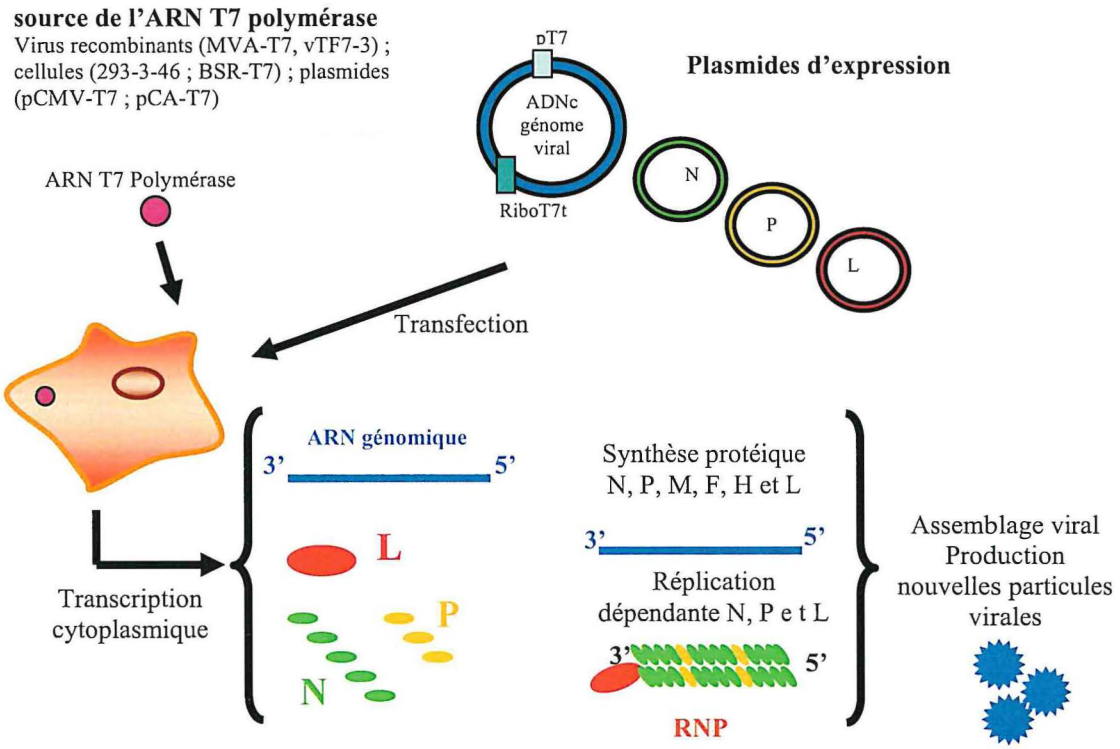


Figure 6 : schéma du principe de la génétique inverse

1.2.1 Récupération de virus à partir de l'ADNc

En 1994, Schnell et son équipe [52] obtenait, à partir d'un ADNc, le premier clone infectieux d'un virus à ARN négatif non segmenté, le virus de la rage. Dans ce cas, l'ADNc du génome entier, cloné sous la dépendance du promoteur pT7, est transfecté dans des cellules exprimant l'ARN T7 Polymérase. La T7 polymérase est apportée par l'infection des cellules par un virus vaccine recombinant exprimant cette protéine. Les protéines N, P et L sont apportées par des plasmides d'expression. Ce résultat a ouvert la voie pour la génération de virus à ARN négatif non segmenté cloné à partir de l'ADN complémentaire de leur génome pour des rhabdovirus, paramyxovirus, filovirus et bornavirus (Tableau 4). Les protocoles utilisés en génétique inverse diffèrent essentiellement par le ratio N : P : L utilisé et par la méthode d'apport de l'ARN T7 polymérase aux cellules. Ainsi, ce ratio pour la transfection doit être optimisé pour chaque virus étudié et peut varier de 20 : 20 : 1 (pour le virus de la peste bovine [53, 54]) à 1 : 1 : 2 (pour le Rhabdovirus du serpent [55] et le virus Ebola [56]). Au sein des morbillivirus eux-mêmes, les quantités de N, P et L sont variables. Plusieurs ratio ont été testés pour la peste bovine (10 : 10 : 1 et 20 : 20 : 1 [53, 54]). Schneider [57] a utilisé un rapport de 2 : 1 : 1 pour la rougeole. Le virus de la maladie de Carré a été reconstitué en génétique inverse en utilisant un ratio de 3 : 3 : 1 [58].

L'ARN T7 polymérase nécessaire au système est apportée par différents moyens selon les protocoles utilisés (Tableau 4). Elle peut être introduite dans les cellules par infection avec un virus recombinant exprimant l'ARN T7 polymérase. Différentes lignées cellulaires exprimant cette enzyme de façon stable ont été également établies. Elle peut être enfin amenée au système par transfection des cellules avec un plasmide d'expression.

En 1986, une souche sauvage du virus de la vaccine a été modifiée pour exprimer l'ARN T7 polymérase [59]. Ce virus modifié vTF7-3 a été ensuite utilisé pour générer des clones infectieux de différents rhabdovirus et paramyxovirus tels que, le virus de la rage [52, 60], le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) [61, 62], les norvirhabdovirus de poisson [55, 63, 64], le virus de Sendai [65], le virus parainfluenza humain de type 3 [66] ou bien encore le virus de la rougeole [67]. L'utilisation du virus vTF7-3, réplicatif en culture cellulaire *in vitro*, impose de purifier le virus reconstitué par génétique inverse. Cette purification peut être réalisée par simple filtration (Schnell 1994, Lawson 1995) ou bien en ajoutant des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN du virus de la vaccine comme l'AraC [65, 66] ou la rifampicine [68].

Genre	virus	ARN T7 polymérase	Références
Rhabdoviridae	**rage**	BSR-T7 vTF7-3	Finke et Conzelmann, 1999 Schnell et al, 1994 ; Ito et al, 2001
	stomatite vésiculeuse (VSV)	vTF7-3 BSR-T7 pCMV-T7	Lawson et al, 1995 Harty et al, 2001 Witko et al, 2006
	Novirhabdovirus 5SHRV (Rabdovirus du serpent)	vTF7-3	Johnson et al, 2000
	Novirhabdovirus IHNV (Novirhabdovirus du saumon)	vTF7-3	Biacchesi et al 2000, a et b
Paramyxoviridae	**rougeole**	MVA-T7 293-3-46 vTF7-3 pCMV-T7	Schneider et al, 1997 Radecke et al, 1995 ; Parks et al, 1999 Takeda et al, 2000 Witko et al 2006
	peste bovine	MVA-T7 FP-T7	Baron and barrett, 1997 Das et al, 2000 a et b
	maladie de Carré	MVA-T7 pCMV-T7	Gassen et al, 1995 Witko et al, 2006
	Sendai	vTF7-3 + AraC vTF7-3	Garcin et al, 1995 Kato et al, 1996
	HPIV-3	vTF7-3 + AraC MVA-T7 pCMV-T7	Hoffmann et Banerjee, 1997 Durbin et al, 1997 Witko et al, 2006
	BPIV-3	MVA-T7 pCMV-T7	Schmidt et al, 2000 Witko et al, 2006
	SV5	MVA-T7	He et al, 1997
	Virus Newcastle	FP-T7 BSR-T7 MVA-T7	Peeters et al, 1999 RomerOderdorfer et al, 1999 Krishnamurty et al, 2000 Nakaya et al, 2001
	oreillons	MVA-T7 pCMV-T7	Clarke et al, 2000 Witko et al, 2006
	RSV	MVA-T7 pCMV-T7	Collins et al, 1995 Witko et al, 2006
	Nipah	MVA-GKT7	Halpin et al, 2004 Yoneda et al, 2006
	Hendra	MVA-GKT7	Halpin et al, 2004
Filoviridae	**Ebola**	BSR-T7	Volchkov et al, 2001
Bornaviridae	**Borna**	BSR-T7 pCA-T7	Schneider et al, 2003, 2005 Schmid et al, 2007 Poenisch et al, 2008 Martin et al, 2006

Tableau 4 : récapitulatif des *Mononegavirales* obtenus en génétique inverse et de la source de l'ARN T7 polymérase

L'inoculation des cellules transfectées ou du surnageant dans des œufs a permis de séparer le virus de Sendai du vTF7-3 [65, 68]. L'utilisation des cellules de carpe pour la récupération des norvirhabdovirus ne nécessite pas une étape de séparation des deux virus car si elles permettent l'expression des gènes du virus de la vaccine vFT7-3, ces cellules n'autorisent pas un cycle de réplication virale complet [55, 63, 64]. La souche atténuée de vaccine (souche Ankara, MVA) est incapable de se multiplier dans des lignées cellulaires humaines ou de mammifères (sauf les cellules BHK). Cette souche de virus de la vaccine a été à son tour modifiée pour exprimer l'ARN T7 polymérase. Deux virus recombinants MVA-T7 ont été développés. Dans un cas, l'expression de l'ARN T7 polymérase est placée sous la dépendance d'un promoteur précoce/tardif p7.5 [69]. Dans le second cas, elle est sous la dépendance du promoteur tardif, p11 [70]. Ces virus recombinants MVA-T7 ont été utilisés en génétique inverse des *Pneumovirus* (virus respiratoire syncitial, RSV) [71] ; des *Rubulavirus* comme le virus simian 5 (SV5) [72] le virus HPIV-2 [73], le virus des oreillons [74] ; des *Respirovirus* tel que les virus parainfluenza bovin de type 3 (BPIV-3) [75] et humain de type -3 (HPIV-3) [76] et des *Morbillivirus* comme la rougeole [57], la peste bovine [53] le virus de la maladie de Carré (CDV) [58]). Un autre poxvirus recombinant a été utilisé pour exprimer l'ARN T7 polymérase. Il s'agit d'un virus recombinant Fowlpox dans lequel l'ARN T7 polymérase est placé sous la dépendance du promoteur précoce/tardif p7.5 [77]. Ce virus recombinant FP-T7 a servi, entre autres, à l'obtention d'un clone infectieux du virus de la maladie de Newcastle [78] et de la peste bovine [54, 79]. Il présente l'avantage de ne pas être réplicatif dans des cellules de mammifères. D'autres virus recombinants exprimant l'ARN T7 polymérase, adénovirus [80, 81] et alphavirus (virus à ARN simple brin positif) (virus Semliki forest (SFV) [82] ou virus Sindbis [83]), existent comme support de l'enzyme ARN T7 polymérase. Le virus Sindbis a été utilisé avec un minigénome du virus respiratoire syncytial (RSV). Cependant cette technique est longue et nécessite plusieurs étapes de préparation des cellules (électroporation avec le réplicon, sélection par puromycine) avant la transfection avec les plasmides. Ceci représente donc une contrainte supplémentaire dans la mise en place de la technique de génétique inverse au laboratoire.

Pour s'affranchir de la contrainte de l'utilisation de virus vecteurs d'expression, en particulier dans un contexte sensible de développement d'un vaccin, des lignées cellulaires ont été modifiées afin d'exprimer de façon stable l'ARN T7 Polymérase. Des cellules 293 exprimant non seulement l'ARN T7 polymérase mais aussi les protéines N et

P du virus de la rougeole ont été obtenues après transfection stable par des plasmides contenant ces protéines [84]. Ces cellules 293-3-46 ont permis de reconstituer des virus de la rougeole. [85]. D'autres cellules sont très souvent utilisées en génétique inverse des *Mononegavirales*. Il s'agit d'une lignée de cellules de rein de bébé hamster (BHK-21, clone BSR-CL13) transformées pour exprimer l'ARN T7 polymérase [86]. Ces cellules BRS-T7 ont notamment servi à la reconstitution d'un virus Ebola [56], d'un virus de la rage [87], d'un virus de la maladie de Newcastle [88], d'un virus de la stomatite vésiculeuse (VSV, [89]) et plus récemment d'un virus de la maladie de Borna [90-92].

Une autre alternative mise au point plus récemment pour fournir l'ARN T7 polymérase au système consiste à co-transfecter les cellules avec un plasmide exprimant cette enzyme. Ainsi un virus Borna a été obtenu, par génétique inverse à partir de l'ADNc cloné, sur des cellules 293 transfectées avec le plasmide pCA-T7 [93]. La même année, Witko et ses collègues [94] parvenaient à générer des clones infectieux de morbillivirus (rougeole, maladie de Carré), de pneumovirus (HPIV-3), de rubulavirus (oreillons), de vesiculovirus (VSV) sur des cellules Vero transfectées avec un plasmide contenant l'ARN T7 Polymérase placée sous la dépendance du promoteur cytomégalovirus pCMV.

1.2.2. Applications de la génétique inverse

Le système de génétique inverse est maintenant établi pour un certain nombre de virus à ARN négatif non segmenté. Les virus obtenus par génétique inverse offrent une grande stabilité due en partie à l'organisation particulière du génome viral, de la stratégie simple mais efficace d'expression des gènes et de la grande stabilité de l'information génétique [95]. La génétique inverse peut être un outil pour étudier l'effet de la délétion d'un gène ou d'une partie d'un gène sur la pathogénicité (l'atténuation surtout) et la réplication du virus. Elle peut aussi permettre d'étudier les effets de mutations sur la séquence du génome viral, le rôle de protéines et de séquences non codantes. L'utilisation des virus à ARN(-) comme vecteurs de gènes étrangers et la génération de virus recombinants permettent d'envisager le développement de nouveaux vaccins, notamment des vaccins marqués.

Atténuation de souches virales

L'atténuation des souches virales est possible par mutagenèse dirigée sur l'ADNc cloné. Ainsi, l'analyse de mutations a permis l'identification de mutations responsables de l'atténuation des souches virales et de leur thermostabilité. En effet, des mutations sur le gène L ont pu être liées à une atténuation de la pathogénicité des souches virales du virus parainfluenza humain de type 3 ou du virus respiratoire syncitial humain [96-98]. La délétion totale ou partielle d'un gène accessoire tel que le gène V (par exemple pour le virus de la maladie de Newcastle, [99]) est une méthode efficace pour diminuer la pathogénicité du virus. L'atténuation est aussi possible par substitution d'un gène par un gène homologue. Ainsi, le virus HPIV-3 a-t-il pu être atténué en remplaçant sa nucléoprotéine N par celle du virus BIPV-3 [100]. Le remplacement des protéines F et G du virus RSV du groupe A par celles du groupe B a également abouti à l'atténuation du virus [101].

Etude des protéines virales

La génétique inverse permet également d'étudier le rôle et l'importance de différents gènes ou de séquences non codantes du virus. Les génomes de rhabdovirus et de paramyxovirus ont une bonne stabilité pour envisager l'intégration de séquences étrangères. Des délétions dans les régions non codantes des glycoprotéines de la rage [52] ou de la rougeole [84] n'ont pas d'effet sur la réplication virale. Des études ont pu être menées sur le rôle et l'importance de la protéine M, impliquée dans le bourgeonnement du

virus [102]. Un virus de la rage, délété du gène M entier, a été obtenu par génétique inverse, en complétant le complexe RNP avec un plasmide contenant la M du virus [103]. Le rendement de virus infectieux libéré est alors bien plus faible (5.10^5 fois moins) qu'avec le virus entier, les particules virales ont une morphologie différentes de celles habituellement observées et en l'absence de la protéine M du virus de la rage, de graves défauts d'assemblage et de bourgeonnement ont été observés [103]. De même, des études conduites sur le gène M du virus de la rougeole [104, 105] ont montré que le bourgeonnement était défectueux à la surface des cellules infectées. La protéine de matrice VP40 du virus Ebola (Filovirus) est capable de libérer seule des particules virales [106]. Cependant la co-expression de VP40 et de la glycoprotéine GP permet d'augmenter le rendement d'efficacité du bourgeonnement. Comme pour les rhabdovirus, la glycoprotéine n'est pas indispensable au bourgeonnement mais elle est nécessaire car son association avec la protéine de matrice le rend plus efficace [102].

Expression et échanges de glycoprotéines

Une approche prometteuse au développement des vaccins marqués est l'échange de glycoprotéines entre les membres proches des *Paramyxoviridae*. Comme ces protéines sont immunogènes et protectrices, leur remplacement par leur(s) gène(s) correspondant(s), ou partie de gène, à partir d'un autre virus donne lieu à de nouveaux virus chimériques viables [54, 107]. Un corollaire à l'échange de ces protéines est l'indication plus fine de leur fonction. Des chimères de virus de la rage [108] et du virus de la stomatite vésiculeuse [109], deux rhabdovirus, obtenues par génétique inverse et délétées de leur seule glycoprotéine G, ont permis de démontrer que le bourgeonnement était quand même possible mais avec un rendement moindre par rapport au virus non modifié. Elle a un rôle dans l'attachement du virus à la cellule cible et dans la fusion des membranes pour permettre au virus d'entrer. Dans ce cas, la glycoprotéine G n'est pas indispensable mais elle aide à un bourgeonnement efficace [102]. Des échanges de glycoprotéines F et H d'un virus RSV de groupe A par celles d'un virus de groupe B [101] ont montré un rôle dans l'atténuation de la souche virale (voir paragraphe précédent sur l'atténuation des souches). La glycoprotéine G du virus IHVN (pour infectious hematopietic necrosis virus, un novirhabdovirus des salmonidés) a été échangée avec celle d'un autre rhabdovirus de poisson, le VHSV (pour viral hemorrhagic septicemia virus) [110]. Cette substitution n'a montré aucune différence entre le virus modifié et le virus sauvage. Dans cette même étude, la glycoprotéine G de IHVN a également été remplacée par celle du virus

vésiculaire de poisson, le SVCV (pour spring viremia of carp virus), capable contrairement à IHVN de se répliquer à haute température. Le virus IHVN modifié obtenu par génétique inverse n'a cependant pas changé sa température habituelle de réplication, soit entre 14 et 20°C, ce qui s'explique par le fait que ce n'est pas l'adhésion et la pénétration du virus qui est thermosensible mais plutôt les étapes enzymatiques de synthèse d'ADN et de protéines virales. Les paramyxovirus (dont font partie les morbillivirus) codent pour deux glycoprotéines : une protéine de fusion F et une protéine d'attachement HN, H ou G. Un morbillivirus chimère viable dans lequel les glycoprotéines de fusion F ou/et d'hémagglutinine H de la peste bovine ont été remplacées par celles de la peste des petits ruminants a été généré [41, 54]. Ce virus recombinant pousse plus lentement que le virus non modifié et produit, anormalement, de grands syncytia. Toutefois, ce virus modifié est un bon candidat vaccin DIVA contre la peste des petits ruminants car les animaux sont bien protégés contre une épreuve virulente PPR [54]. Les deux glycoprotéines doivent être échangées et associées en système homologue (les deux protéines provenant du même virus). En effet, il n'a pas été possible d'obtenir de virus viable par génétique inverse en croisant les glycoprotéines membranaires de différents virus.

Expression de gènes étrangers

Dans l'ADNc génomique cloné, des transgènes ont pu être insérés et des virus exprimant des protéines étrangères à partir de ces unités transcriptionnelles supplémentaires ont été reconstitués [111]. En 1996, les premiers gènes étrangers ont été insérés dans les génomes de *Mononegavirales*, plus précisément dans celui de la rage [112] et du VSV [113]. L'insertion et l'expression d'un transgène rapporteur de type CAT était stable sur au moins 25 passages [112]. Depuis, d'autres insertions de gènes étrangers dans le génome viral ont été réalisées mais toutes sont construites selon le même schéma. Le gène étranger est encadré par les signaux d'initiation et d'arrêt de la transcription et le signal d'arrêt de la polyadénylation, reconnus par la polymérase virale. Le niveau d'expression de la protéine étrangère dépend de sa localisation dans le génome viral. Comme décrit plus haut en ce qui concerne le gradient d'expression des protéines virales, plus l'insertion est proche de l'extrémité 3' du génome viral, plus l'expression est importante [111]. Le marqueur eGFP a été inséré entre les glycoprotéines F et HN du virus de la maladie de Newcastle [114]. Le virus recombinant est stable après cinq passages sur œufs embryonnés. Grâce à ce virus marqué par génétique inverse, l'étude de

la dissémination et de la pathogénicité de NDV est envisageable. Plus récemment, la reconstitution d'un virus Nipah marqué avec l'eGFP offre la possibilité d'analyser les mécanismes moléculaires de la pathogénicité lié à ce paramyxovirus [115]. L'étude de la propagation du virus de la rougeole dans le système nerveux central de la souris a été réalisée grâce à un virus recombinant exprimant la protéine eGFP [116]. L'insertion de l'eGFP entre les gènes P et M de la souche virale vaccinale de la peste bovine ne change pas l'efficacité du vaccin contre une épreuve virulente sur des bovins. De plus, une réponse anticorps contre le marqueur a pu être détectée chez ces bovins vaccinés [117, 118]. Des transgènes d'origine virale peuvent également être insérés. Deux protéines Gag et Env du virus immuno déficient humain de type 1 (HIV1) ont été insérées et exprimées dans le VSV [119]. Il est important de noter toutefois que l'insertion de gènes étrangers dans le génome viral entraîne non seulement une augmentation de la taille du virus pouvant aller jusqu'à 40%, mais aussi une diminution de son titre viral d'environ 3 à 20 fois. Ces variations sont liées à la taille de l'insert et à son niveau d'expression, donc à sa position sur le génome. De façon générale, on observe une certaine stabilité des gènes ajoutés. Des gènes tels CAT ou eGFP sont encore exprimés après plus de 20 passages en cellules. En revanche, d'autres protéines susceptibles d'interférer avec la réplication virale peuvent être neutralisées suite à l'introduction d'une mutation ou l'addition ou délétion de nucléotides.

Développement de vaccins

La génétique inverse permet d'envisager l'utilisation des virus à ARN(-) comme vecteur multivalent pour le développement de nouveaux vaccins à partir des souches vaccinales virales existantes [111]. Par exemple, la souche vaccinale du virus de la rougeole est utilisée pour l'expression de différents gènes viraux étrangers, comme ceux du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) ou du virus du Nil occidental (West Nile) [120-122]. L'obtention d'un virus recombinant rougeole atténué permet de produire à moindre coût un vaccin protégeant contre deux pathologies à la fois. La durée de l'immunité des vaccins recombinants Capripox/PPR [37] générés au laboratoire n'est pas encore établie. L'utilisation de la souche vaccinale PPRV 75/1, comme vecteur d'expression d'un ou plusieurs gènes étrangers est une option intéressante à envisager, puisque ce vaccin PPRV 75/1 confère aux animaux une immunité d'au moins trois ans, ce qui correspond à la durée de vie économique des animaux dans les pays où la maladie sévit.

La génétique inverse offre une bonne approche pour marquer les vaccins. Le marquage peut se faire par délétion ou remplacement d'un ou d'une partie de gène par une autre séquence. Les virus recombinants NDV sont de bons candidats pour un vaccin marqué et permettent de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés [123]. Dans ce cas, un épitope immunodominant pour les cellules B est délété dans la région C-terminale de la protéine N pour générer un vaccin marqué négatif. Cette étude indique qu'il est possible de soustraire une séquence hautement immunogène sans affecter la réplication du virus en culture. De plus, la délétion de cette séquence, n'affecte pas l'efficacité du vaccin, car la réponse anti-N n'est pas absolument requise pour la protection des animaux contre une épreuve virulente. Dans le cas du virus de la peste bovine, la nucléoprotéine N du virus de la peste bovine a été remplacée par celle de la peste des petits ruminants. La réplication du virus chimère reste efficace dans les cellules et chez les animaux vaccinés. Ils sont protégés contre une épreuve virulente avec la souche sauvage de peste bovine, car comme dans le cas précédent, la protection qui ne provient que partiellement de N est surtout générée par les protéines H et F du virus parental. L'utilisation de ce virus chimère associé à son kit de diagnostic ELISA pourrait être un outil intéressant en cas de réémergence de la peste bovine [43]. Un virus peste bovine dont les glycoprotéines F et H ont été substituées par celle du virus de la peste des petits ruminants est protecteur contre la peste des petits ruminants [54]. Ce virus chimère est un candidat potentiel pour un vaccin marqué contre la peste des petits ruminants mais il peut poser un problème d'utilisation puisque c'est un recombinant peste bovine et que cette maladie est entrée dans un programme mondial d'éradication. Toutefois, jusqu'à maintenant, aucun virus de la peste des petits ruminants n'a été obtenu à partir d'un ADNc génomique cloné. C'est l'objet de ce travail.

1.3. Objectifs de cette étude

La peste des petits ruminants, maladie classée dans la liste des maladies à déclaration obligatoire à l'organisation mondiale de la santé animale (OIE), a des conséquences sanitaires et économiques importantes dans les pays où elle sévit. Elle est également en pleine extension vers l'Europe depuis l'infection de la Turquie en 2004 et du Maroc à l'été 2008. Le vaccin actuel, obtenu à partir d'une souche virale atténuée par passages successifs sur lignée cellulaire, est efficace sur plusieurs années après une seule injection. La mise au point d'un vaccin PPR marqué et d'un test de diagnostic sérologique associé, discriminant animaux infectés et animaux vaccinés, est considéré comme un enjeu dans la lutte contre cette maladie au niveau régional et global. Les progrès récents en génétique inverse des virus à ARN négatif permettent de répondre à cet objectif.

Le but essentiel de ce travail de recherche est de développer un vaccin PPR marqué par génétique inverse et les outils de diagnostic associés. Aucun clone infectieux PPR n'a, jusqu'à présent, été obtenu par génétique inverse et cette technologie complexe était tout à fait nouvelle pour l'équipe de virologie lorsque j'ai débuté mes travaux. Le premier objectif de ce travail a été de mettre en place la technologie de génétique inverse adaptée au virus de la peste des petits ruminants. Les premiers travaux ont été réalisés à l'aide d'un modèle minigénome eGFP en contexte PPR. Le second objectif du travail a consisté à assembler, cloner et vérifier l'ADNc du génome complet de la souche virale vaccinale PPRV 75/1. La génération, par génétique inverse, du premier clone infectieux PPR a alors été mise en œuvre. En parallèle, plusieurs types de marquage ont été évalués : délétion d'un segment de la séquence du génome de la souche vaccinale PPRV 75/1, insertion d'une cassette d'expression d'un gène étranger ou substitution d'une partie d'un gène par une séquence homologue dérivée d'un autre morbillivirus ou d'un peptide commercial. Les marques les plus prometteuses sont ensuite utilisées pour mettre au point des tests diagnostics par ELISA.

2. MATERIELS ET METHODES

Au début de ce travail de thèse, la génétique inverse du virus de la Peste des Petits Ruminants était une approche nouvelle pour le laboratoire de virologie de l'UMR contrôle des maladies animales exotiques et émergentes. Avant de commencer à manipuler la souche vaccinale de PPR, obtenue par atténuation de la souche virulente Nigeria 75/1 par passages successifs sur cellules [1], il a été nécessaire de franchir plusieurs étapes consécutives. Tout d'abord, il a fallu mettre au point le système de restauration d'un virus infectieux à partir de l'ADN complémentaire (ADNc) de son génome. Pour ce faire, une ribonucléoprotéine (RNP) virale a dû être reconstituée *in vitro* et sa fonctionnalité validée sur un minigénome eGFP, construit lors de la préparation de mon mémoire de Master. La reconstitution du complexe de la ribonucléoprotéine nécessite l'utilisation de plasmides indépendants contenant les gènes impliqués c'est-à-dire ceux codant pour N, P et L. Les plasmides NPC, PPC, LPC contenant les gènes N, P et L sous promoteur pCMV étaient déjà disponibles au laboratoire car obtenus lors de travaux antérieurs. L'expression des gènes N et P avait été mise en évidence lors d'un travail préalable au laboratoire. Celle de la L et la fonctionnalité de la protéine correspondante n'avaient pas encore été démontrées. Une fois le système de reconstitution virale finalisé *in vitro*, le génome viral a été cloné en plusieurs fragments, assemblés, et sa séquence vérifiée et corrigée. Les essais de reconstitution d'une particule virale ont alors été entrepris. Les stratégies de marquage de ce virus cloné ont également été déclinées. Ce chapitre décrit l'ensemble des matériels et méthodes mis en œuvre pour aborder ces différentes étapes.

2.1. Etude de la séquence de la polymérase L-PPRV 75/1

La séquence du gène L-PPRV 75/1 était disponible mais l'analyse approfondie de la séquence protéique comparativement aux autres morbillivirus et paramyxovirus n'avait pas encore été réalisée. Aussi, avons-nous choisi de mieux caractériser cette séquence, à l'aide d'outils de bioinformatique (logiciels utilisés listés dans le Tableau 5), avant de commencer tout travail de génétique inverse.

Utilisation	Logiciels	Auteurs	liens internet
blocs d'acides aminés	BLOCKS version 14.0	[124]	http://blocks.fhcrc.org
recherche de motifs de séquence	Uniprot, InterPro, Pfam	- - -	http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml, http://www.ebi.ac.uk/interpro/ http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam
structure secondaire	Predator software version 2.1 PROF sec Garnier Psipred Jpred3 sspro4	[125] [126] [127] [128], [129] [130]	http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=predator http://cubic.bioc.columbia.edu/services/NORSp/submit.html http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=garnier http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/ http://contact.ics.uci.edu/sspro4.html
reconnaissance homologies de séquence et structure	software Fugue v2.s.07	[131]	http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/fugue/

Tableau 5 : liste des logiciels utilisés pour l'analyse de la séquence de L-PPRV 75/1

Cette étude est réalisée en comparaison avec les autres séquences de polymérase L de morbillivirus et paramyxovirus disponibles dans GenBank (Tableau 6).

L'alignement des séquences nucléotidiques est réalisé avec le programme ClustalW (Vector NTI, Invitrogen, France). L'analyse phylogénétique est réalisée selon le principe de parcimonie [132]. Les espaces vides dans les alignements multiples sont considérés comme des données manquantes et sont exclus du calcul de dissimilarité [133, 134]. Les arbres sont construits avec le programme « TreeCon MATRIXW » de Darwin [135]. La valeur de confiance du nœud est calculé sur 1000 répétitions [136]. L'alignement des séquences protéiques de différentes L polymérases est obtenu avec le logiciel Vector NTI (Suite 10, Invitrogen, France). Les caractéristiques de L-PPRV 75/1 sont identifiées grâce à plusieurs logiciels en ligne (tableau 5). La structure secondaire consensus obtenue par les logiciels est utilisée pour l'analyse de la séquence protéique de L-PPRV 75/1. D'autres motifs cités dans la littérature sont également positionnés sur cette dernière [8].

Identification	Description du virus	Numéro accession	Référence
BPV	Bovine parainfluenza virus 3	NC 002161	[137]
BRSV	Bovine respiratory syncytial virus	NC 001989	[86]
CDV1	Canine distemper virus, strain 5804P	AY386316	[138]
CDV2	Canine distemper virus, isolate 00-2601	AY443350	Lednicky et al, 2004 (unpublished)
CDV3	Canine distemper virus, isolate 98-2646	AY542312	Lednicky et al, 2004 (unpublished)
CDV4	Canine distemper virus, Onderstepoort isolate	AF378705	[139]
Dolphin	Dolphin morbillivirus	AJ608288	[140]
Ebola	Reston Ebola virus, strain Pennsylvania	NC 004161	[141]
Hendra	Hendra virus	AF0171149	[142]
HPV1	Human parainfluenza virus 1, strain Washington/1964	AF4577102	[143]
HRSV	Human respiratory syncytial virus	NC 001781	[144]
Mumps	Mumps virus, strainMiyahara	NC 002200	[145]
MV1	Measles virus, VERO cell adapted strain 9301V	AB012949	[146]
MV2	Measles virus, virulent Ichinose-B95a strain	AB016162	[147]
MV3	Measles virus, strain Edmonston (Schwarz vaccine)	AF266291	[148]
MV4	Measles virus, attenuated strain AIK-C	S58435	[149]
MV5	Mesales virus, strain Nagahata	D63926	Sheng et al., 2006 (unpublished)
MV6	Measles virus, strain Nagahata(HB)	D63924	Sheng et al., 2006 (unpublished)
MV7	Measles virus, isolate WA.USA/17.98	DQ227321	[150]
MV8	Measles virus, isolate 97-45881	DQ227319	[150]
NDV	Newcastle disease virus	NC 002617	Sellers and Seal, 2000 (unpublished)
Nipah	Nipah virus	NC 002728	[151]
PDV	Phocine distemper virus, Strain Ulster 88	Y09630	[152]
PEVL1	Subacute sclerosing panencephalitis virus, strain Case B	D37775	[153]
PEVL2	Subacute sclerosing panencephalitis virus, strain Case K	D37776	[153]
PPRV1	Peste des petits ruminants virus, Nigeria 75/1 vaccine	X74443	Albina et al, 2005, (unpublished)
PPRV2	Peste des petits ruminants virus, Nigeria 75/1 vaccine	AJ555616	Dash, 2003 (unpublished)
PPRV3	Peste-des-petits-ruminants virus, strain Sungri 94	AY560591	[154]
PPRV4	Peste-des-petits-ruminants virus, strain Turkey 2000	AJ849636	[155]
PPRV5	Peste-des-petits-ruminants virus, strain China/Tibet/0701	EU364809	Bao et al, 2007 (unpublished)
PPRV6	Peste-des-petits-ruminants virus, strain Nigeria 76/1	EU267274	Chard et al, 2008
PPRV7	Peste-des-petits-ruminants virus, strain Ivory Coast IVC89	EU267273	Chard et al, 2008
Rabies	Rabies virus	NC 001542	[156]
RPV1	Rinderpest virus, vaccinal strain RBOK	Z30697	[157]
RPV2	Rinderpest virus, virulent Kabete 'O' strain	X98291	[158]
Sendai	Sendai virus, strain Ohita	NC 001552	[159]
Tupaia	Tupaia paramyxovirus	AF079780	[160]
VSV	Vesicular stomatitis Indiana virus	NC 001560	Joint publications

Tableau 6 : liste des séquences utilisées dans l'alignement et la comparaison de séquences

2.2. Mise en évidence de la fonctionnalité de L-PPRV et validation du système de génétique inverse à l'aide du minigénome eGFP

L'expression de la polymérase L-PPRV 75/1 doit tout d'abord être vérifiée par immunofluorescence avant d'envisager d'utiliser la séquence clonée en génétique inverse.

2.2.1. Expression de la polymérase L-PPRV 75/1

L'expression de la polymérase clonée sous promoteur pCMV est observée par réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI). Les cellules Vero sont transfectées avec le plasmide pLPC à l'aide du transfectant FuGene6 (Roche, France) selon les indications du fournisseur. Des cellules Vero infectées avec la souche vaccinale PPRV 75/1 servent de contrôle positif. Quarante huit heures après la transfection, la présence de la polymérase L est révélée par IFI à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la L de la rougeole (dilué au 1/100) et d'un conjugué FITC anti-lapin dilué au 1/80 (Biorad, France).

2.2.2. Mise en évidence de la fonctionnalité de L-PPRV et validation d'un système de génétique inverse à l'aide du minigénome eGFP et du Fowlpox-T7

Cette validation est réalisée à l'aide du minigénome eGFP. Cette étape consiste à reconstituer *in vitro* la structure minimale du système réplicatif de PPRV, soit le complexe ribonucléoprotéique composé de la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la polymérase L et de l'ARN négatif du minigénome ou à terme du virus. Pour cela, des cellules Vero à 80% de confluence sont préalablement infectées à 0,1 MOI [43] par le virus recombinant Fowlpox-T7 (FP-T7, exprimant de façon stable l'ARN T7 polymérase, généreusement donné par M. Skinner, de l'Institute of Animal Health, de Compton, Grande-Bretagne), afin d'apporter l'ARN T7 Polymérase nécessaire à l'expression de l'ARN négatif du minigénome. Ces cellules infectées sont co-transfectées avec les plasmides contenant les gènes N, P et L clonés sous promoteur pCMV ainsi qu'avec le minigénome. Ce dernier est en fait composé du promoteur pT7 suivi du gène codant pour l'enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) encadré par les séquences du leader et trailer de PPRV 75/1. Cette séquence est terminée par le ribozyme delta du virus de l'hépatite C et du terminateur T7t (construction réalisée et validée en système rougeole au cours de mon master 2 Recherche [161]). Le gène eGFP encadré du leader et du trailer est en position antisens entre le promoteur et le terminateur de la polymérase T7. Seul un ARN négatif est produit et cet ARN(-) ne peut être pris en charge que par le complexe N, P et L viral

reconnaissant le leader. Les cellules Vero infectées par le FP-T7 sont co-transfectées avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen, France) et les 4 plasmides. N : P : L sont utilisés avec un ratio de 20 : 20 : 1 [117, 162]. Le contrôle positif consiste à transfecter les cellules infectées avec le minigénome puis à les infecter avec la souche vaccinale PPRV 75/1 (le virus PPRV 75/1 remplace ainsi les plasmides N, P et L). Le contrôle négatif, quant à lui, correspond à l'essai mais sans le plasmide L. L'activité de la L est confirmée au microscope à fluorescence par la présence de cellules fluorescentes.

Pour confirmer l'expression de l'eGFP par ce système, l'expérience est renouvelée et les ARN totaux sont extraits des cellules, 48h après transfection, avec le « RNeasy mini kit » (Qiagen, France) et traités en partie à la DNase/RNase free (Turbo DNA free^{TM}, Ambion, Applied Biosystems, France). L'ARN messager (ARNm) est extrait des ARN totaux avec le kit Oligotex mRNA spin column (Qiagen, France). La pureté des ARN obtenus est contrôlée par PCR (Polymerase Chain Reaction) directe avec les amorces internes de l'eGFP : eGFPC1-F et eGFPC1-R (Tableau 7). L'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé à partir des ARN totaux et messagers à l'aide du « First strand cDNA synthesis kit » (GEHealthcare, France). Le contrôle de la synthèse d'ADNc est réalisé par PCR avec les amorces βact1et βact2 du gène de ménage βactine (Tableau 7). L'amplification spécifique est réalisée comme précédemment avec les amorces internes à l'eGFP. Tous les produits de PCR sont analysés sur un gel à 1,5% d'agarose en tampon TAE et en présence de bromure d'éthidium.

2.3. Validation d'un système de génétique inverse de PPRV sur cellules 293-T7

Le facteur limitant avec la technique précédente est la constitution d'un stock suffisant de virus recombinant FP-T7. Afin d'avoir une alternative à cette méthode, il est possible d'utiliser des cellules qui expriment de façon stable l'ARN T7 Polymérase : il s'agit des cellules 293-T7 (fournies par F. Tangy, laboratoire de génomique virale et vaccination, Institut Pasteur de Paris). Avec ces cellules, il est possible d'utiliser les plasmides contenant N, P et L sous promoteur pCMV mais aussi des plasmides avec le promoteur pT7. Il faut donc tout d'abord construire les plasmides avec N, P et L sous pT7 ; vérifier ensuite l'expression de ces gènes dans ces conditions pour enfin les tester en génétique inverse à l'aide du minigénome eGFP.

2.3.1. Constructions des plasmides N, P et L sous promoteur pT7

Afin de pouvoir optimiser l'expression de N, P ou L sous promoteur pT7, il faut modifier le plasmide pBluescript (Stratagène, France) afin d'y insérer la séquence interne d'entrée du ribosome (IRES) et celle du ribozyme delta et du T7terminator.

2.3.1.1. Construction du plasmide de clonage pBKS-IRESRT7

Ce plasmide est le plasmide optimisé devant ensuite recevoir les gènes de N, P ou L. La séquence IRES est obtenue par amplification à partir du plasmide pMACS 4-IRES (Miltenyi Biotec, Allemagne). La PCR est réalisée avec la Pfu DNA Polymérase (Stratagène, France) et les amorces IRES-1 et IRES-2 (Tableau 7). Les sites de restriction NotI et BamHI ont été ajoutés sur ces amorces en queue flottante pour faciliter le clonage en pBluescript. Après amplification, le produit de PCR est purifié sur gel d'agarose et l'ADN extrait de l'agarose à l'aide du « Qiaquick gel extraction kit » (Qiagen, France). Après purification le segment est digéré par les enzymes NotI et BamHI pendant 1 heure à 37°C. Les enzymes sont éliminées grâce au « Minelute Reaction Cleanup kit » (Qiagen, France). Le plasmide pBluescript est préparé par clivage enzymatique par NotI et BamHI. Les enzymes de restriction sont éliminées de la même façon que précédemment. L'insert IRES et le vecteur pBluescript ainsi obtenus sont ligués avec l'ADN T4 ligase (Invitrogen, France) une nuit à 16°C. Les bactéries compétentes Top10 (Stratagène, France) sont transformées par choc thermique avec ce produit de ligation et ensemencées sur boite de Pétri contenant du milieu gélosé LB et 100 µg/ml d'ampicilline. Les transformants sont sélectionnés par PCR directe avec les amorces universelles M13 et M13R (Tableau 7). Les clones positifs en PCR sont mis en culture en milieu liquide LB en présence d'ampicilline une nuit à 37°C sous agitation à 230 rpm. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries à l'aide du « Wizard Plus SV minipreps DNA purification system » (Promega, France) puis analysé par restriction enzymatique avec les enzymes NotI et BamHI. Une grande quantité d'ADN est ensuite produite avec le clone sélectionné pour avoir une quantité suffisante de matériel pour la suite du travail. Le plasmide obtenu est nommé pBKSIRES. Dans ce plasmide seront ajoutés les séquences du ribozyme et du T7terminator. L'insert « riboT7t » est obtenu par restriction enzymatique SmaI puis EcoRV du plasmide pBS-Ribo-T7terminator (donné par Michel Brémont, unité de virologie et immunologie moléculaires, INRA de Jouy-en-Josas, France). Le fragment obtenu est purifié sur gel et extrait de l'agarose comme décrit précédemment. Le vecteur pBKSIRES est coupé par SmaI puis EcoRV puis déphosphorylé avec la phosphatase

intestinale de veau (CIP) et purifié sur gel d'agarose. Insert et vecteur sont ligués avec la T4 DNA ligase (Invitrogen, France) une nuit à 14°C. Les bactéries compétentes Top10 sont transformées comme précédemment décrit et les colonies sont criblées directement par PCR avec les amorces RiboT7f et M13R (Tableau 7) afin de déterminer le sens d'insertion du segment « Ribot7t ». Les clones positifs en PCR sont mis en culture comme précédemment et des minipreps d'ADN sont réalisées. Cette fois-ci l'analyse se fait par restriction enzymatique avec SmaI et EcoRV, car les sites sont reconstitués après insertion du fragment « Ribot7t ». Le clone choisi est produit en quantité suffisante pour la suite du travail et est nommé pBKS-IRESRT7. Il est utilisé pour y insérer les gènes N, P ou L de PPRV75/1.

2.3.1.2. Insertion du gène N et construction de pN-BKS-IREST7

Le plasmide pBKS-IRESRT7 est ouvert par SmaI puis déphosphorylé avec l'Antartic Phosphatase (New England Biolabs, Ozyme, France). L'insert N-PPRV75/1 est obtenu à partir d'un plasmide (pBTX) disponible au laboratoire. Le gène N est sorti de ce plasmide par double restriction enzymatique EcoRI et NotI. Le segment est purifié sur gel d'agarose comme décrit en 2.2.1.1 puis les extrémités cohésives sont remplies avec l'ADN T4 polymérase (New England Biolabs, Ozyme, France). Le fragment est purifié par une extraction au phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) puis une précipitation à l'éthanol. L'insert N obtenu est ligué au vecteur pBKS-IRESRT7 une nuit à 14°C. Des bactéries compétentes Top 10 sont transformées et le criblage par PCR est réalisé avec les amorces NP3 et M13R (Tableau 7) afin de déterminer le sens d'orientation du gène N dans le plasmide. Le screening des minipreps d'ADN à partir des clones positifs en PCR est fait avec l'enzyme HindIII. Le clone sélectionné (pN-BKS-IREST7) est produit en quantité (Endofree Plamsid Maxi kit, Qiagen, France) et est séquencé par GATC-Biotech (Allemagne) avec les amorces IRES-3 (GCCAAAAGCCACGTGTATAAGA) et NP5 (GGGAAT GGGGACTATGATAACA).

2.3.1.3. Insertion du gène P et construction de pP-BKS-IREST7

Le gène P de PPRV75/1 est obtenu à partir du plasmide PPC (obtenu au laboratoire lors de précédents travaux) par double coupure enzymatique NheI et NotI. Après coupure, les extrémités sont réparées avec l'ADN T4 polymérase et le fragment est purifié sur gel d'agarose. L'insert P est ligué au vecteur pBKS-IRESRT7 préparé au 2.2.1.2. Comme précédemment, les bactéries Top 10 sont transformées et le criblage des clones se fait par

PCR avec les amorces IRES-3 et PP39 (Tableau I). Les clones positifs en PCR sont mis en culture sur milieu LB + ampicilline et l'ADN plasmidique est extrait. Les minipreps sont contrôlées par coupure par EcoRV ou HindIII. Le clone sélectionné est nommé pP-BKS-IREST7.

Utilisation	Noms des amorces	Séquences amorces	Conditions de PCR
Mise en évidence eGFP	eGFPC1-F eGFPC1-R	CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG CACGAACTCCAGCAGGACCATG	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-1 min} x 30 cycles
Recherche βactine	βact1 βact2	ACCAACTGGGACGACATGGAGA AGCTGGTCCTGCTCGAAGTC	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-30s} x 30 cycles
Amplification IRES	IRES 1 IRES 2	ATGCGGCCGCAATTCCGCCCCTCTCCCTCCCC ATGGATCCGTGTTTTTCAAAGGAAAACCACGTC	{94°C-45s ; 52°C-45s ; 72°C-1min} x 30 cycles
Criblage des colonies pBKS-IRES	M13 M13R	GTAAAACGACGGCCAGT GGAAACAGCTATGACCATG	{94°C-30s ; 50°C-30s ; 72°C-1 min} x 30 cycles
Criblage des colonies pBKS-IREST7	RiboT7f M13R	CCCGGGTCGGCATGGCATCT GGAAACAGCTATGACCATG	{95°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-30s} x 30 cycles
Criblage des colonies pN-BKS-IREST7	NP3 M13R	GTCTCGGAAATCGCCTCACAGACT GGAAACAGCTATGACCATG	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-1min} x 30 cycles
Criblage des colonies pP-BKS-IRSET7	IRES3 PP39	GCCAAAAGCCACGTGTATAAGA CTCCTCCGAGCCCAGCCT	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-50s} x 30 cycles
Criblage des colonies pL-BKS-IREST7	LP4506 LP4876R	GGGCTTTTGATATACATTAATCA GACATCGGCCAGTACACAGAGA	{94°C-30s ; 50°C-30s ; 72°C-30s} x 30 cycles
Criblage des minipreps pL-BKS-IREST7	LP4506 LP4876R	GGGCTTTTGATATACATTAATCA GACATCGGCCAGTACACAGAGA	
	LP6572 M13R	TAATTCGCGATACATCTGCC GGAAACAGCTATGACCATG	
	M13 LP4	GTAAAACGACGGCCAGT CTATATCTAATATTCTTGATAAGGG	{94°C-30s ; 45°C-30s ; 72°C-90s} x 30 cycles
Amplification segment PMint	PPRBglI PPRRsrIIrev	GCAGAAGAACAAGCATACCATG TGGCGCGCTCCGGTGGTGTCGGATGTGT	{94°C-45s ; 50°C-45s ; 72°C-6min} x 30 cycles
Criblage pAssembl2 ciblé sur P-PPR	PP40 PPCLB3000R	AGGATCCAACTCTCAAGTAC GTCCTCAAGAAACCCGCTGT	{94°C-30s ; 50°C-30s ; 72°C-60s} x 30 cycles
Criblage ciblé sur le gène H-PPR	HP46 HP47	CGCACAAAGGGAAAGGATCA CTGATGCCGACTTCATCACC	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-45s} x 30 cycles
Criblage ciblé sur le gène N-PPR	NP3 NP4	GTCTCGGAAATCGCCTCACAGACT CCTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT	{94°C-30s ; 53°C-30s ; 72°C-50s} x 30 cycles
Criblage ciblé sur le gène M-PPR	MP54 MP47	AGGAGCAAGGGCAAC AGTCCTGCCGTGCGCCTCACC	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-90s} x 30 cycles
Criblage pAssemblage3ribo	HP116 M13R	AGTCCGATTGAATTTCAGGGGC GGAAACAGCTATGACCATG	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-60s} x 30 cycles
Criblage pAssemblage4term	LP6572 M13R	TAATTCGCGATACATCTGCC GGAAACAGCTATGACCATG	{94°C-30s ; 55°C-30s ; 72°C-90s} x 30 cycles
Criblage pour insertion AscI	Pg3297 Pg3419r	TCCACAAGATGCTAACAGCCATT GTCATCTTGTCTGTGAAGCTCAGTTGCC	{94°C-30s ; 50°C-30s ; 72°C-30s} x 30 cycles
Amplification eGFP	eGFPBssHII(F) eGFPAscI (rev)	CGTAGCGCGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT ATTAGGCGCGCCATCTTATTATCTAGATCCGGTGGATC	{94°C-30s ; 55°C*-30s ; 72°C-60s}x10 {94°C-30s ; 45°C-30s ; 72°C-60s} x 30

Tableau 7 : liste des amorces utilisées et des conditions de PCR (* : -1°C/cycle)

2.3.1.4. Insertion du gène L et construction de pL-BKS-IREST7

Le gène L est extrait du plasmide LpCRXLTopo (obtenu au laboratoire lors de précédents travaux) par double restriction enzymatique MluI et NotI. Les extrémités sont remplies à l'aide de l'ADN T4 DNA Polymerase. Le fragment est purifié sur gel et extrait de l'agarose avec le « Invisorb DNA gel extraction kit » (Invitek, Eurobio, France). Il est ensuite ligué au vecteur préparé en 2.2.1.2. Les bactéries Stbl3 (Invitrogen, France) sont transformées par choc thermique et ensemencées sur milieu LB + 3% ampicilline et cultivées à 30°C. Les colonies sont analysées par PCR directe avec les amorces LP4506 et LP4876R (Tableau 7) dans un premier temps. Les colonies positives sont mises en culture en milieu LB + 3% ampicilline à 30°C et agitation lente (200 rpm). Les minipreps sont testées en PCR avec trois couples d'amorces différents (LP4506 et LP4876R ; M13 + LP4 ; LP6572 + M13R) (Tableau I) et aussi par coupure enzymatique par BamHI ou NotI ou XhoI ou NdeI. Le clone obtenu est le pL-BKS-IREST7.

2.3.2. Vérification de l'expression de N, P et L sous promoteur T7

Les plasmides contenant les gènes N, P ou L de PPRV75/1 placés sous la dépendance du promoteur pT7 doivent être vérifiés avant d'être testés en génétique inverse. Pour cela, la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) est utilisée. Elle consiste à transfecter les cellules 293-T7, exprimant de façon stable l'ARN T7 polymérase, avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen, France) en respectant le ratio d'une quantité d'ADN à transfecter pour trois quantités de transfectant. Après 48 heures de transfection, les cellules sont fixées à l'acétone 80% et la révélation est faite à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque protéine. Ainsi pour N, on utilise un anticorps monoclonal de souris anti-N-PPR (38/4) dilué au 1/400 ; pour P, un anticorps polyclonal anti-P-PPR dilué au 1/10 et pour L un polyclonal anti-L-MV dilué au 1/100. L'anticorps polyclonal dirigé contre la L de rougeole (L-MV), reconnaît également la L des autres morbillivirus. Les conjugués FITC (Biorad, France) anti-souris (pour N) ou anti-lapin (pour P et L) sont utilisés à la dilution 1/80. La lecture des résultats se fait au microscope à fluorescence.

2.3.3. Comparaison des techniques de transfection des cellules 293-T7 et Vero

Les deux techniques de transfection sont comparées à l'aide du plasmide peGFP-C1 (Clontech, Ozyme, France). Ce plasmide contient le gène eGFP sous promoteur pCMV. L'expression de la protéine fluorescente peut être observée directement par lecture au microscope à fluorescence.

La technique de transfection par précipitation au chlorure de calcium ($CaCl_2$), utilisée pour la transfection des cellules 293-T7 par l'Institut Pasteur, est longue [85, 163]. Le protocole est le suivant : une à trois heures avant la transfection, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu complet neuf. Les différents ADN sont mélangés dans un volume final d'eau de 225 µl. Vingt cinq µl de $CaCl_2$ (2,5 M) sont ajoutés à ce mélange suivi de 250 µl de tampon BBS 2X (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_4). Après une incubation de 20 minutes à température ambiante, cette préparation est répartie goutte à goutte sur les cellules qui sont incubées 3 heures à 37°C, 5% CO_2. Les cellules subissent ensuite un choc thermique de 3 h à 43°C. Elles sont rincées deux fois avec le tampon de lavage (20 mM Hepes ; 150 mM NaCl ; 1 mM $MgCl_2$) puis recouvertes avec du milieu de culture complet et incubées 72 h à 37°C et 5% CO_2. Pour essayer de faciliter la transfection, cette méthode par précipitation au CaCl2 est comparée à la transfection utilisant la lipofectamine 2000 (avec un ratio lipofectamine/ADN de 3/1) et selon les instructions du fabricant. Soixante douze heures après la transfection, les cellules sont observées au microscope et la quantité de cellules fluorescentes par expression de la protéine eGFP est comparée.

2.3.4. Validation du système génétique inverse sur cellules 293-T7

Comme précédemment le système de génétique inverse est testé à l'aide du minigénome eGFP. Cette fois-ci, il s'agit d'utiliser une lignée cellulaire exprimant de façon stable l'ARN T7 Polymérase : les cellules 293-T7. Les plasmides contenant les gènes N, P et L sont co-transfectés sur les cellules en même temps que le minigénome eGFP, avec le même ratio N : P : L de 20 : 20 : 1. Afin de valider ce nouveau système, on utilise soit les plasmides avec le promoteur CMV soit ceux avec le promoteur pT7. En contrôle, les cellules sont transfectées uniquement avec le minigénome puis infectées avec le virus vaccinal PPRV 75/1. La co-transfection sur les cellules 293-T7 se fait avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen, France) avec un rapport ADN / lipofectamine de un pour trois. Comme pour la transfection sur les cellules Vero, les cellules sont observées au microscope à fluorescence dans un premier temps, puis les ARN totaux sont extraits à l'aide du « RNeasy mini kit » et leur qualité testée par PCR spécifique eGFP. Les ARN messagers sont à leur tour extraits des ARN totaux. L'ADNc est synthétisé avec le « First strand cDNA synthesis kit » (GEhealthcare, France) mais soit avec l'amorce universelle pdn6 soit avec une amorce spécifique eGFP, l'amorce eGFPC1-R. Les PCR spécifiques

eGFP sont menées sur les ARN et ADNc obtenus (comme décrit en 2.1) puis analysées sur gel d'agarose.

2.4. Assemblage du génome entier de PPRV 75/1

Après avoir validé le système réplicatif du virus PPRV 75/1 à l'aide du minigénome eGFP, il faut maintenant générer le premier clone infectieux de PPR par génétique inverse. Le premier travail à réaliser est l'assemblage du génome entier de la souche vaccinale PPRV 75/1. Le génome doit être encadré par la séquence du promoteur pT7 et par celle du ribozyme delta et du terminateur T7.

Au début de ce travail de recherche, le génome de la souche vaccinale PPRV 75/1 a été entièrement séquencé et est référencé dans Genbank sous le numéro d'accession X74443. Cette séquence entière a été obtenue par le séquençage gène par gène du virus. Ainsi les 6 clones disponibles au laboratoire de virologie sont-ils le point de départ de ce long travail d'assemblage (Figure 7).

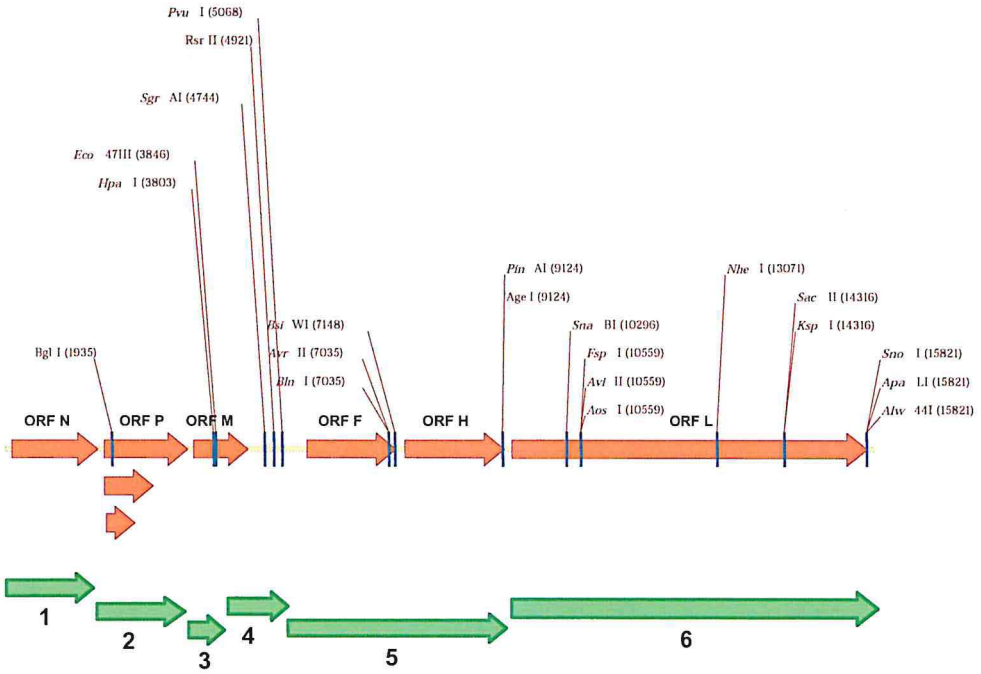


Figure 7 : Représentation du génome entier de la souche vaccinale de la Peste des Petits Ruminants PPRV 75/1 et des 6 clones disponibles au laboratoire. Les flèches en orange représentent les ORF de chacun des gènes. Les flèches vertes symbolisent les différents clones disponibles au laboratoire. Les sites de restriction unique sur le génome entier sont également signalés.

Le clone 1 (pT7hhLNP) contient le gène N de PPRV 75/1 en entier (avec la séquence du leader), la séquence intergénique N-P et le début de la séquence P. Ce fragment est placé sous le promoteur pT7. Le clone 2 contient le gène P en entier encadré respectivement d'un morceau de la séquence intergénique N-P et P-M. Le clone 3 correspond à la séquence entre les gènes P et M. Le clone 4, quant à lui, englobe un morceau de la séquence P-M, le gène M en entier suivi de la séquence M-F. Le clone 5 contient une partie de la séquence intergénique M-F, le gène F en entier, la séquence intergénique F-H, le gène H entier, la séquence intergénique H-L et le début du gène L. Il est nommé p17ML. Le clone 6 contient la fin de la séquence H, la partie intergénique H-L, le gène L en entier et la séquence trailer. Ce segment est disponible à partir des plasmides pL-CRXLTopo, LPC ou bien pL-BKS-IREST7. Après avoir vérifié les séquences de chacun des 6 fragments de PPRV clonés en plasmides, la stratégie de clonage a pu être définie. Les clones 1 et 6 peuvent être utilisés tels quels, mais la grande difficulté repose sur les clones 2, 3 et 4. En effet, les sites de restriction unique n'existent pas de façon à réaliser l'assemblage avec ces segments là. Il a donc fallu construire un nouveau plasmide (pPMinterPCRII) recouvrant les clones 2 à 4. Après avoir vérification de la séquence de tous les clones disponibles, il s'est également avéré que trois bases étaient mutées sur le clone 5. Avant d'utiliser ce segment, il a fallu faire une mutagenèse dirigée afin de corriger la séquence de p17ML.

2.4.1. Obtention du plasmide pPMintpCRII

Les clones 2, 3 et 4 disponibles au laboratoire de virologie recouvrent les gènes P et M ainsi que les parties intergéniques P-M et M-F (Figure 7). Il est difficile, dans le cadre de cette étude, d'utiliser ces trois plasmides pour l'assemblage du génome. En effet, les sites de restriction disponibles sur les parties chevauchantes ne sont pas des sites uniques, ce qui augmente la difficulté de clonage. Il est donc préférable de préparer un nouveau fragment 2 qui regroupera ces trois segments. Pour cela, l'ARN viral est extrait à partir de 10^6 cellules Vero infectées avec la souche vaccinale PPRV 75/1 et l'ADNc est synthétisé selon le protocole du « First strand cDNA synthesis kit ». Les amorces PPRBglI et PPRRsrIIrev (Tableau 7) sont utilisées pour amplifier le nouveau fragment 2, recouvrant ainsi les gènes P et M en entier et une partie des séquences intergéniques N-P et M-F. A chaque extrémité des amorces, les sites de restriction BglI et RsrII ont été introduits de façon à pouvoir faciliter le clonage ultérieur. La PCR est réalisée avec la Pfu DNA Polymérase (Stratagène, France). Le produit de PCR est purifié avec le «Qiaquick PCR

purification kit » (Qiagen, France). Ce fragment 2 est cloné dans le plasmide PCR Blunt selon les indications fournies dans le « Zero Blunt Topo PCR cloning kit » (Invitrogen, France). Les colonies issues de la transformation des bactéries compétentes Top10 sont criblées par PCR avec les amorces M13 et M13R. Les colonies positives sont mises en culture, l'ADN est extrait et contrôlé par restriction enzymatique par EcoRI et BglI. Le plasmide pPMintpCRII est vérifié par séquençage avant d'être utilisé dans l'assemblage du génome entier.

2.4.2. Mutagenèse du plasmide p17ML

Après séquençage du plasmide p17ML, il s'est avéré que trois bases étaient différentes de la séquence de référence : deux sur le gène F et une sur le gène H. Les trois mutations sont réalisées en même temps sur le clone p17ML à l'aide du « Quick Change Multi Site Directed Mutagenesis kit» (Stratagène, France) avec les amorces mutF1, mutF2 et mutH (Tableau 8). Après transformation des bactéries compétentes, les clones sont sélectionnés et envoyés à séquencer chez GATC-Biotech (Allemagne). Le clone nommé p17Mlmut possédant les trois mutations corrigées est choisi et utilisé pour la suite des travaux d'assemblage.

Utilisation	Noms des amorces	Séquences amorces	Kit utilisé
Mutagenèse sur p17ML	mutF1 mutF2 mutH	CAAACTCAGTCTCAAGCTCCTTAGGTATTATAC ; C au lieu de T GCACTGGCAGCTTGCATTGGGGTATCCCTAG ; A au lieu de G CTATTGAAAGACCCTACATCTTACTTGGAGTCC ;A au lieu de G	QuickChange Multi Site Directed mutagenesis (Stratagène, France)
Obtention pBKSmutMCS	pBKSmutBglI1 pBKSmutBglI1rev	CTACAGGGCGCGTCCCATTCACCATTCAGGCTGCGCAAC GTTGCGCAGCCTGAATGGTGAATGGGACGCGCCCTGTAG)	QuickChange mutagenesis kit (Stratagène, France)
	pBKSmutBglI2 pBKSmutBglI2rev	CAGCAATAAACCAGCCAGCTGGAAGGGCCGAGCGCAG CTGCGCTCGGCCCTTCCAGCTGGCTGGTTTATTGCTG	
	MCS1 MCS1rev	GTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCAGCCCCTCAGGCCGGTCCGCCGGTTCCGCGGATTTAAATTTGGCGTAATCATGGTCATAG CTATGACCATGATTACGCCAAATTTAAATCCGCGGAACCGGTCGGACCGGCCTGAGGGGCTGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTAC	QuickChange Multi Site Directed mutagenesis (Stratagène, France)
Obtention pBKSmodifMCS	modif MCS1 modif MCS2	CTCAGGCCGGTCCGAGTAAGGACCGGTTAGTAACCGCGGATTTA TAAATCCGCGGTTACTAACCGGTCCTTACTCGGACCGGCCTGAG	QuickChange Site Directed mutagenesis (Stratagène, France)
Obtention pAssemblage2mut	muthhF muthhrev	GCCAACTTTGTTTGGTCTGATGAGTCCG CGGACTCATCAGACCAAACAAAGTTGGC	QuickChange mutagenesis kit (Stratagène, France)
Insertion AscI dans pPMintPCRII	PPR1AscI PPR1AscIrev	TACAAAAAACTTTCCAAGGTCGGCGCGCCAAGGAGCAAGGGCAAC GTTGCCCTTGCTCCTTGGCGCGCCGACCTTGGAAAGTTTTTTGTA	QuickChange II XL Site Directed mutagenesis (Stratagène, France)
	PPR2AscI PPR2AscIrev	GTCGGCGCGCCAGGCTATTACAAAAAACTTAGGAGCAAGGGCAAC GTTGCCCTTGCTCCTAAGTTTTTTGTAATAGCCTGGCGCGCCGAC	

Tableau 8 : tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour les mutagenèses dirigées

2.4.3. Stratégie d'assemblage du génome entier de PPRV 75/1

Il faut cloner le génome dans son ensemble dans un plasmide avec un site de clonage multiple (MCS) correspondant aux différents sites de restriction que nous voulons utiliser. La première étape consiste à modifier le plasmide pBluescript KS II (Stratagène, France) pour y créer le site de clonage multiple souhaité. Une fois le plasmide de clonage obtenu, les différents segments seront insérés successivement.

2.4.3.1. Obtention du plasmide de clonage pBKSmutMCS

Le plasmide de clonage pBKSmutMCS est obtenu à partir du plasmide commercial pBluescript KS II de chez Stratagène (France). La stratégie est décrite dans le schéma de la Figure 8. La première étape consiste à supprimer, par coupure enzymatique le MCS ainsi que les promoteurs T7 et T3 du plasmide commercial. Après coupure par BssHII une heure à 50°C, le plasmide est purifié sur gel puis ligué sur lui-même une nuit à 16°C avec l'ADN T4 ligase. Les bactéries Top10 sont transformées selon les instructions fournies par Invitrogen. Le screening des minipreps à partir des colonies se fait par clivage enzymatique par BssHII alors site unique sur ce nouveau plasmide intermédiaire obtenu. Les deux sites BglI situés sur le plasmide doivent être supprimés par mutagenèse dirigée afin de ne pas gêner les clonages futurs. En effet, ce site de restriction doit être unique dans le polylinker pour l'insertion du fragment 1.

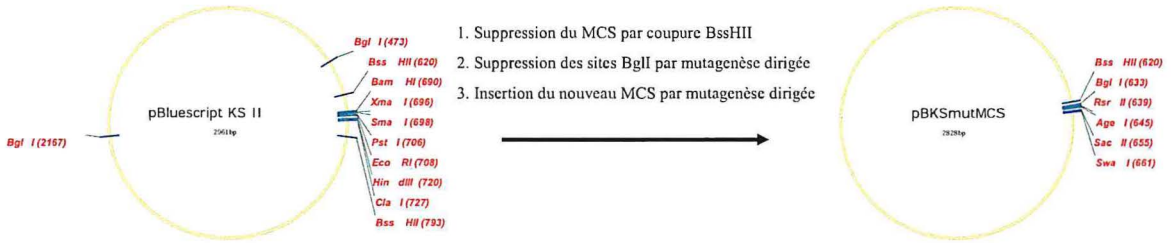


Figure 8 : obtention du plasmide de clonage pBKSmutMCS

Les mutagenèses dirigées sont réalisées à l'aide du « Quick Change mutagenesis kit » (Stratagène, France) selon les indications fournies par le fabricant. La suppression des sites BglI est obtenue en utilisant dans un premier temps les amorces pBKSmutBglI1 et pBKSmutBglI1rev puis les amorces pBKSmutBglI2 et pBKSmutBglI2rev (Tableau 8). Le nouveau site multiple de clonage est inséré par mutagenèse dirigée en utilisant le « Quick Change Multi Site directed mutagenesis kit » (Stratagène, France) avec les amorces MCS1 et MCS1rev (Tableau 8). Le nouveau plasmide obtenu est envoyé au séquençage chez GATC-Biotech (Allemagne) afin de vérifier les modifications apportées. En parallèle, la fonctionnalité des différents sites de coupure du nouveau MCS est testée par restriction enzymatique. Une à une, les enzymes de restriction du polylinker sont testées et les produits de digestion sont analysés sur gel d'agarose en présence de BET. Le plasmide pBKSmutMCS obtenu sert alors de point de départ pour l'assemblage du génome entier de PPRV 75/1.

2.4.3.2. Première stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1

La stratégie d'assemblage du génome entier de la souche vaccinale PPRV75/1 (Figure 9) est composée de plusieurs étapes à partir des 4 clones disponibles : pT7hhLNP, pPMintPCRII, p17ML et pLPC. Le fragment 1 est dégagé du plasmide pT7hhLNP par digestion par les enzymes MluI et BglI. Il est cloné dans le plasmide pBKSmutMCS coupé par BssHII et BglI, les sites BssHII et MluI étant compatibles. Les fragments dégagés sont purifiés sur gel d'agarose et l'ADN extrait avec le kit de purification « Qiaquick Gel extraction kit ». Après transformation en bactéries compétentes Top 10, les colonies sont sélectionnées par PCR avec les amorces M13 et M13R. Les clones positifs sont mis en culture et les minipreps correspondantes analysées par restriction enzymatique par BglI et EcoRI. Avant de poursuivre, le plasmide pAssembl1 obtenu est séquencé par GATC-Biotech (Allemagne).

pAssembl1 et pPMintPCRII sont ensuite préparés par coupure par RsrII et BglI. Le vecteur et le fragment 2 (issu de pPMintPCRII) sont purifiés sur gel comme déjà décrit dans ce chapitre. Le fragment 2 est ligué dans le plasmide pAssembl1 avec l'ADN T4 ligase puis les bactéries Top 10 sont transformées comme d'habitude. L'analyse des clones est faite par PCR avec les amorces ciblant la P, PP40 et PPCLB3000R (Tableau 7), puis par restriction enzymatique BglI + RsrII sur les minipreps d'ADN obtenues à partir des clones positifs en PCR. Une quantité suffisante d'ADN pAssembl2 est alors produite pour poursuivre l'assemblage.

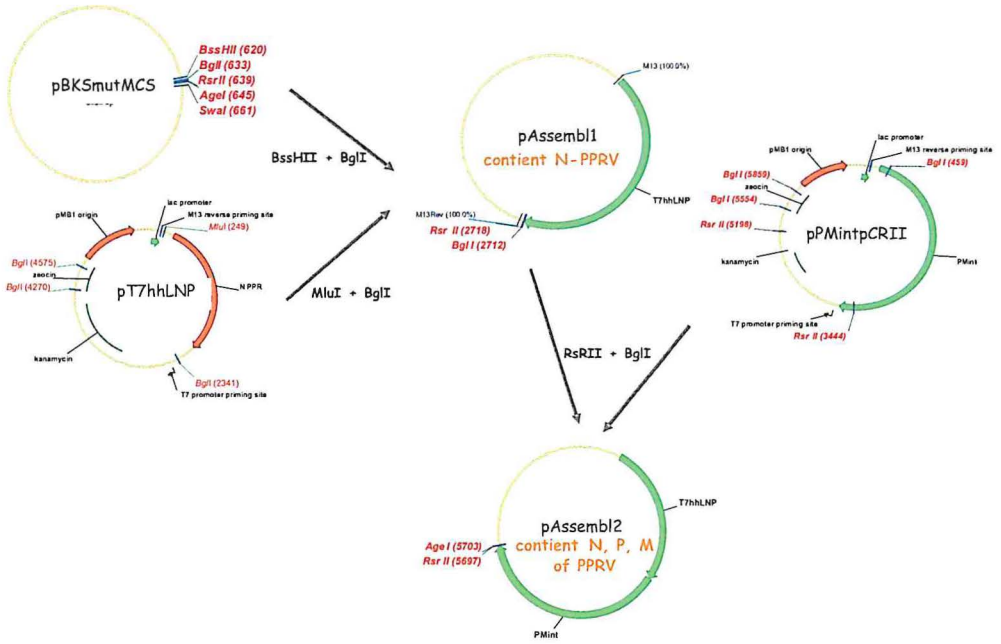


Figure 9a : deux premières étapes de la stratégie d'assemblage : obtention de pAssembl1 et pAssembl2

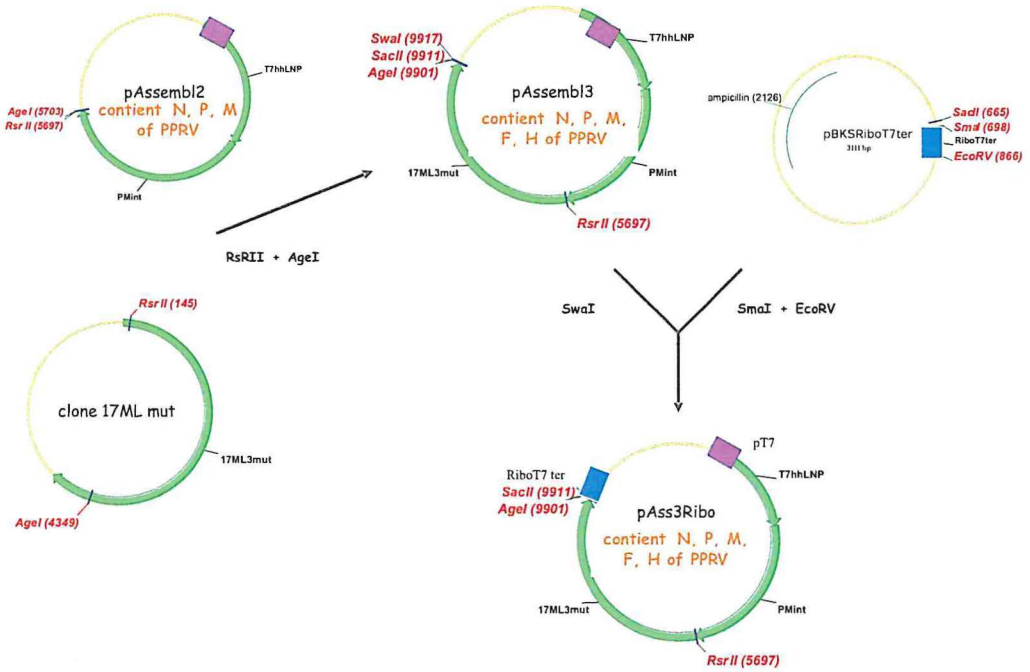


Figure 9b : obtention de pAssembl3 et pAss3Ribo

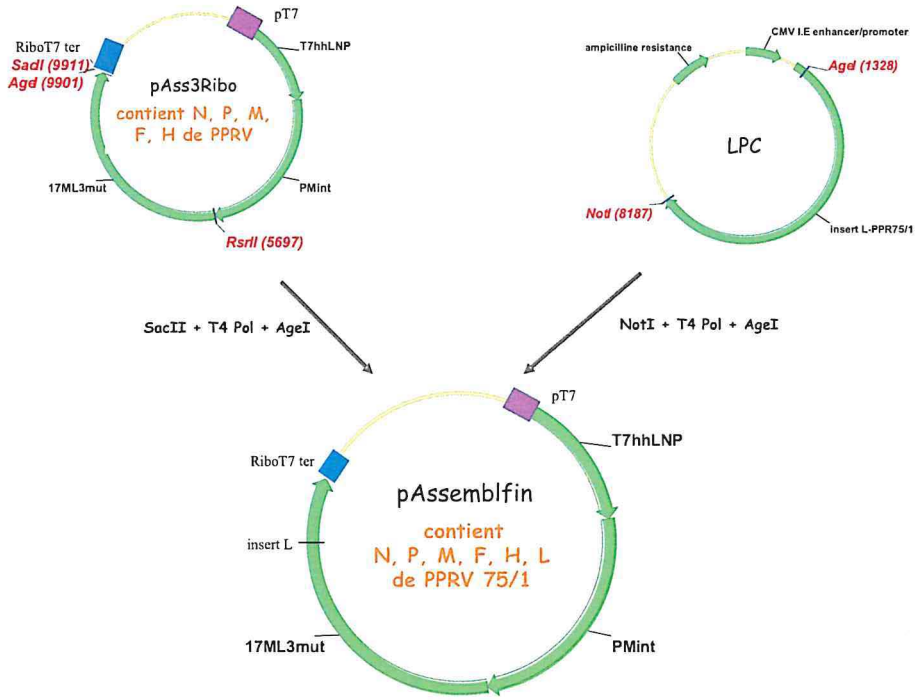


Figure 9c : obtention de pAssemblfin contenant le génome entier PPRV 75/1

Figure 9 : stratégie d'assemblage du génome entier

Le plasmide pAssembl2 et le clone p17MLmut sont coupés par AgeI puis RsRII. Vecteur et insert sont purifiés sur gel d'agarose et l'ADN est extrait de l'agarose à l'aide du « Invisorb spin DNA extraction kit ». La ligation est réalisée avec l'ADN T4 ligase sur la nuit à 16°C. La transformation est réalisée dans la souche *E.coli* Stbl3. Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies sont criblées directement par PCR. Cette dernière est réalisée avec des amorces internes au gène H-PPR : HP46 et HP47 (Tableau 7). Après de nombreux essais, les clones positifs en PCR sont mis en culture sur 10 ml de milieu LB + Ampicilline et l'ADN est extrait à l'aide du « Wizard Plus SV minipreps DNA purification system ». Les minipreps sont contrôlées par restriction enzymatique par NdeI. Le clone pAssembl3 est prêt à être utilisé pour la suite de la stratégie d'assemblage du génome entier de PPR75/1. Il faut alors introduire la séquence du ribozyme-T7 terminator dans le plasmide pAssembl3 et ensuite y introduire le gène L manquant.

pAssembl3 est coupé par SwaI puis déphosphorylé avec l'Antartic phosphatase. L'insert « riboT7t » est obtenu par restriction enzymatique SmaI puis EcoRV du plasmide

pBS-Ribo-T7terminator (voir paragraphe 2.2.1.1.). La ligation est réalisée avec l'ADN T4 ligase sur la nuit à 14°C avec un ratio insert/vecteur de 10/1. La transformation est réalisée dans la souche *E.coli* Stbl3. Les colonies sont criblées directement par PCR avec les amorces spécifiques du gène H, HP46, et M13R. Après de nombreux essais infructueux pour l'insertion du fragment « RiboT7t », nous avons alors décidé de changer la stratégie de clonage.

2.4.3.3. Deuxième stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1

Afin de favoriser les insertions des différents fragments de PPRV75/1, il faut que les sites de coupure des différentes enzymes soient optimisés. Au cours de la première stratégie d'assemblage, l'insertion du fragment 17ML, entre les sites RsrII et AgeI, a été laborieuse. Il s'avère que les sites introduits dans le vecteur de clonage sont très proches l'un de l'autre et pas optimisés pour une bonne coupure enzymatique. Dans le but de favoriser cette insertion, nous avons décidé d'introduire par mutagenèse dirigée quelques bases supplémentaires entre les deux sites. La première étape de cette nouvelle stratégie d'assemblage consiste donc à modifier le site multiple de clonage (MCS) du plasmide de clonage pBKSmutMCS. La mutagenèse dirigée est réalisée avec le « Quick Change Site Directed Mutagenesis kit » et les amorces modif MCS1 et modifMCS2 (Tableau 8). Après criblage et séquençage de plusieurs clones, un seul est choisi pour servir de point de départ à ce nouvel assemblage. Ce nouveau plasmide de clonage est nommé pBKSmodifMCS.

Afin de s'assurer que l'insertion de nouvelles bases autour du site de restriction AgeI favorise le clonage du segment 17ML, l'assemblage commence par celui-ci (Figure 10). Le plasmide pBKSmodifMCS est coupé par AgeI puis par RsrII et purifié sur colonne « Minelute Reaction Clean Up ». L'insert 17ML préparé lors de la première stratégie (voir paragraphe 2.3.3.2) est ligué à ce vecteur avec l'ADN T4 ligase une nuit à 16°C. Les bactéries Top10 sont ensuite transformées et le screening par PCR des colonies est réalisé avec les amorces ciblant la H, HP46 et HP47 (Tableau 7). Les minipreps faites à partir des clones positifs en PCR sont analysées par restriction enzymatique : PstI + SacII ; EcoRI + SacII et enfin AgeI. Le plasmide obtenu est le pAssemblage1.

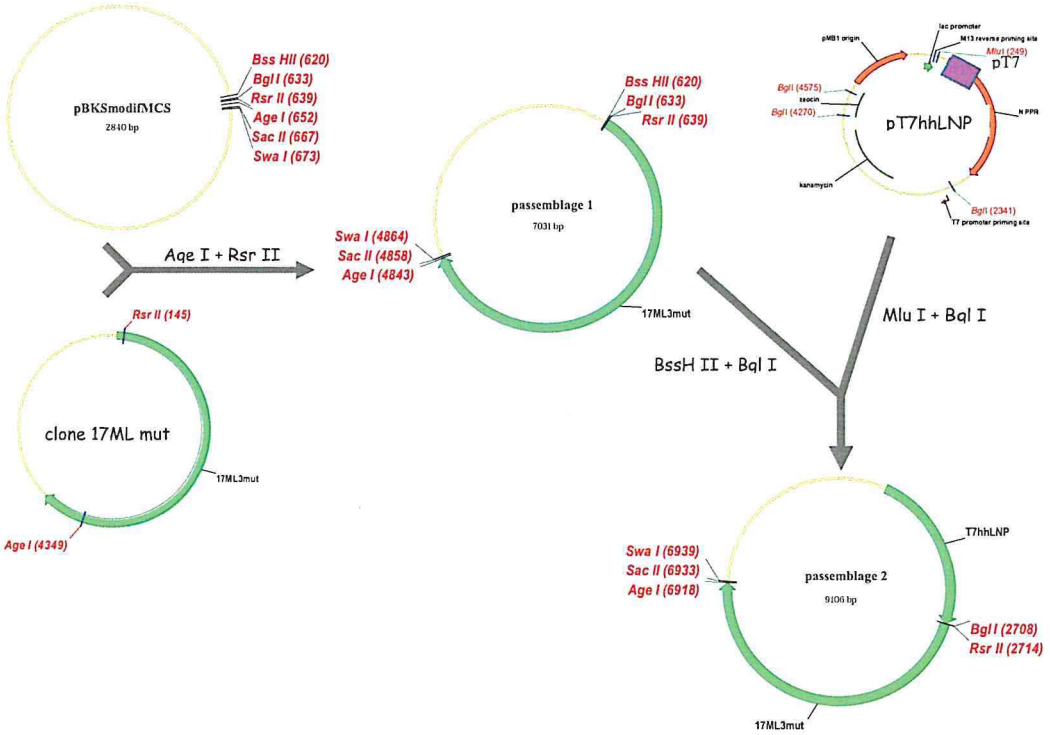


Figure 10a : obtention de pAssemblage1 et pAssemblage2

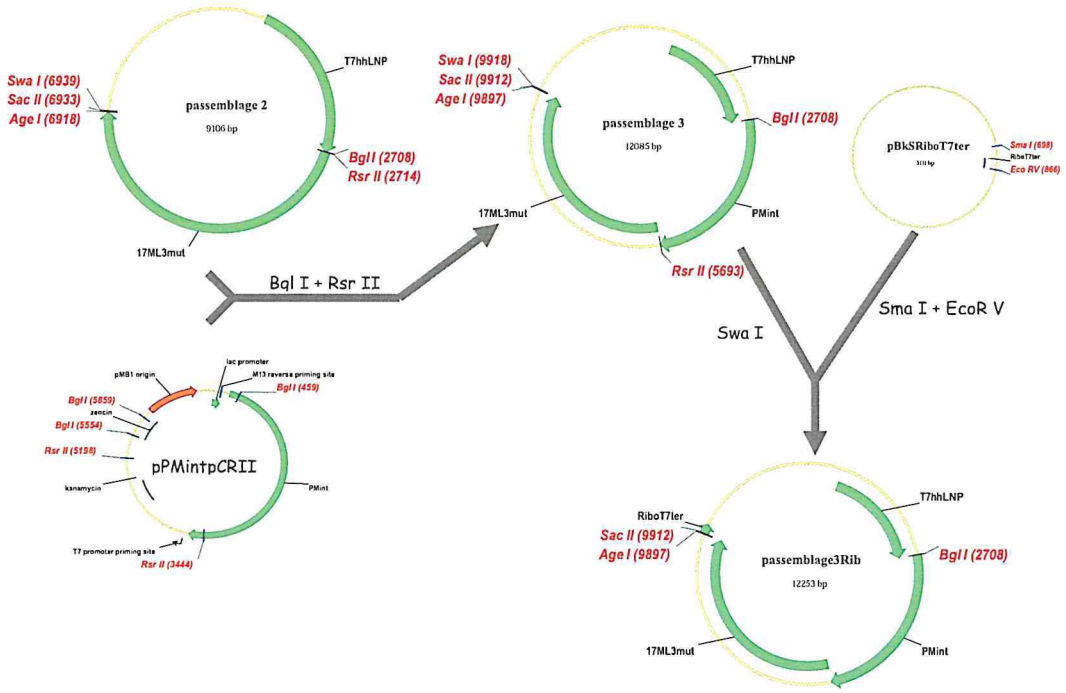


Figure 10b : Obtention des plasmides pAssemblage3 et pAssemblage3Rib

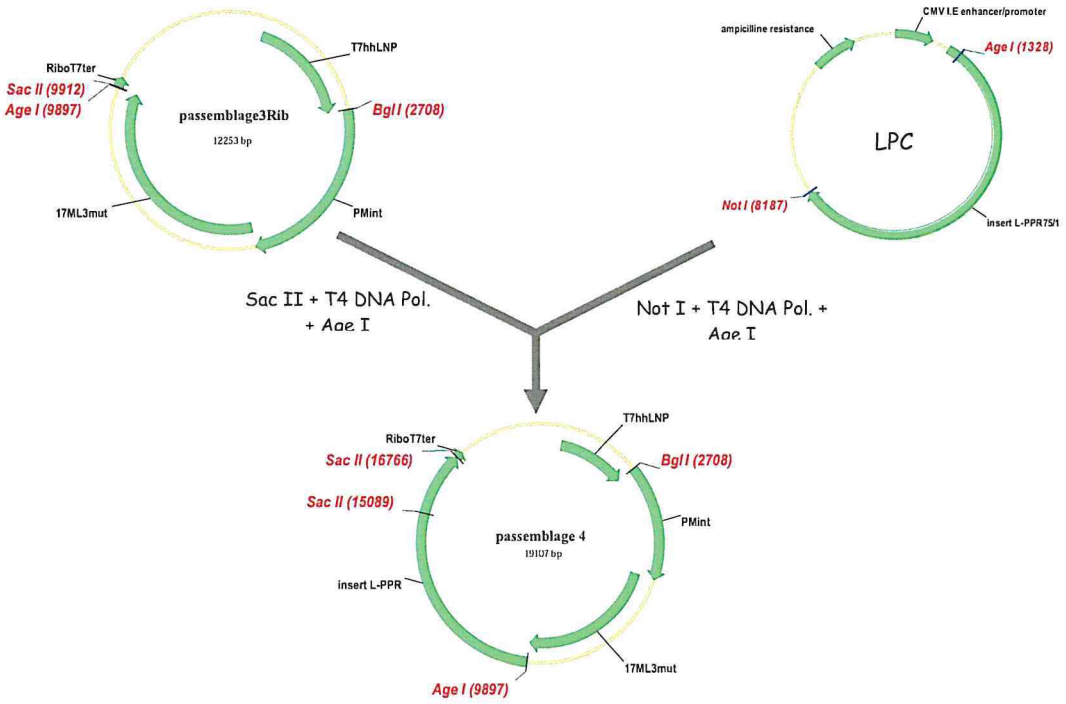


Figure 10c : obtention du plasmide pAssemblage4 contenant le génome entier PPRV

Figure 10 : deuxième stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1

pAssemblage1 est coupé par BglI puis par BssHII et purifié sur gel comme décrit précédemment. Le fragment 1 préparé à partir du plasmide pT7hhLNP lors de la première stratégie est ligué dans le vecteur pAssemblage1. Les bactéries Stbl3 sont utilisées pour la transformation. Les colonies sont sélectionnées par PCR avec les amorces ciblant la N, NP3 et NP4 (Tableau 7), puis par clivage enzymatique par EcoRI. Le plasmide obtenu, pAssemblage2, est alors séquencé par la société GATC-Biotech pour confirmation avant la poursuite de l'assemblage. Une erreur existe sur la séquence T7hhLNP (une base G manquante). Pour ajouter cette base manquante, on utilise le « Quick Change XL mutagenesis kit » (Stratagène, France) sur le plasmide pAssemblage2 avec les amorces muthhF et muthhrev (Tableau 8). Le clone sélectionné est nommé pAssemblage2mut.

Ce dernier plasmide est préparé par restriction enzymatique BglI et RsrII pour y insérer le fragment PMint obtenu à partir de pPMintPCRII (voir paragraphe 2.3.3.2.). Une fois insert et vecteur ligués, les bactéries Top10 sont transformées et les colonies obtenues sont criblées par PCR avec les amorces ciblant la M, MP54 et MP47 (Tableau 7). Les ADN obtenus à partir des clones positifs en PCR, sont analysés par digestion avec l'enzyme PstI. On obtient alors le plasmide pAssemblage3.

On insère ensuite la séquence « RiboT7 » dans pAssemblage3, après avoir linéarisé le plasmide par SwaI et déphosphorylé avec l'Antartic phosphatase. Le produit de ligation obtenu après avoir fait agir l'ADN T4 ligase une nuit à 14°C est utilisé pour transformer les bactéries Stbl3 et Top10. Les colonies obtenues sont analysées par PCR avec les amorces ciblant la H, HP116 et M13R (Tableau 8). Après plusieurs essais, on se confronte à la même difficulté que lors de la première stratégie, à savoir cloner le petit fragment « RiboT7 » dans un gros plasmide. Or nous avons à notre disposition le plasmide pL-BKS-IREST7 qui contient le gène L entier accolé au ribozyme T7 terminator. Nous avons donc une nouvelle fois changé la stratégie d'assemblage afin d'insérer en même temps le gène L-PPRV75/1 manquant et le « RiboT7 ».

2.4.3.4. Troisième stratégie d'assemblage du génome entier PPRV 75/1

Dans ce troisième essai d'assemblage du génome de PPRV, l'insertion du « RiboT7 » et du gène L se fait en une seule étape (Figure 11) contrairement à ce qui avait été envisagé dans la stratégie précédente (Figure 10).

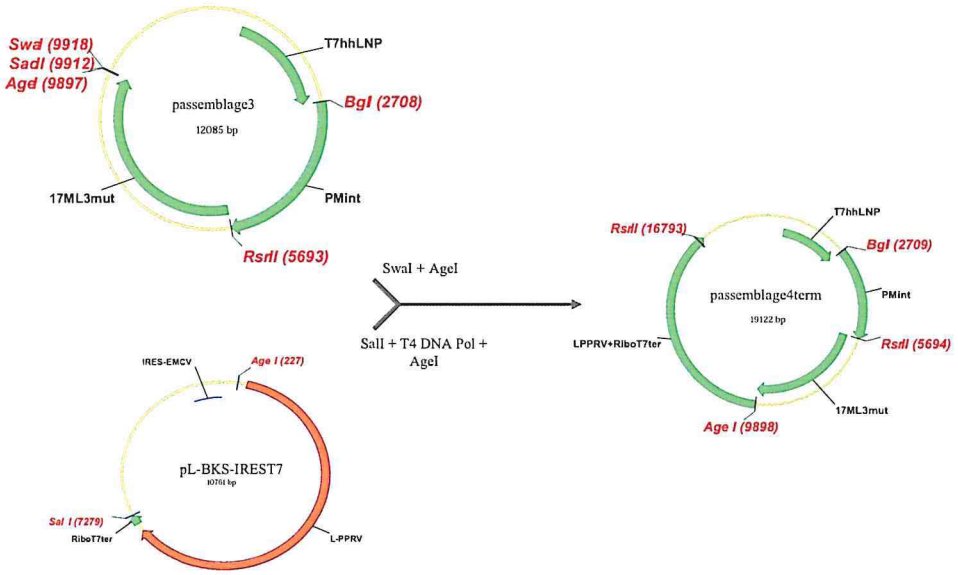


Figure 11 : dernière étape de la troisième stratégie d'assemblage pour l'obtention de pAsseblage4term

Le plasmide pAssemblage3 est coupé par SwaI et AgeI. L'insert « L-RiboT7 » est sorti du plasmide pL-BKS-IREST7 par restriction enzymatique. Le plasmide est tout d'abord linéarisé par SalI et les extrémités générées remplies avec l'ADN T4 Polymérase puis coupé avec AgeI. L'insert est purifié sur gel à l'aide « Invisorb Spin DNA extraction kit ».Le produit de ligation (obtenu après incubation d'une nuit à 16°C) est utilisé pour transformer les bactéries Stbl3. Les colonies sont sélectionnées par PCR avec les amorces ciblant la L, LP6572 et M13R (Tableau I). Les minipreps sont réalisées à partir des clones positifs en PCR puis testées par coupure enzymatique par AgeI + RsrII + BglI. Elles sont également testées en PCR avec 8 couples différents d'amorces répartis sur la séquence entière du génome de PPRV 75/1 (Tableau 9).

Un clone pAssemblage4term est choisi et amplifié, à partir de la culture utilisée pour la miniprep, sur 100 ml de milieu liquide LB+ 1% ampicilline afin de produire l'ADN en quantité suffisante pour les essais en génétique inverse. Le plasmide est envoyé au séquençage chez GATC-Biotech. Après analyse des séquences obtenues, il s'avère que l'échantillon analysé correspond au plasmide pAssemblage3 sans le gène L. Il y a donc un problème de stabilité du clone en culture sur en milieu liquide en gros volume. Il nous faut reprendre le clonage pour obtenir un clone stable contenant le génome entier.

couple	Zone amplifiée	amorces	Séquences
1	Dans gène M	MP 54 + MP47	AGGAGCAAGGGCAAC + AGTCCTGCCGTGCGCCTCACC
2	Dans gène N	NP3 + NP4	GTCTCGGAAATCGCCTCACAGACT + CTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT
3	Fin du gène L + trailer	LP6572 + M13R	TAATTCGCGATACATCTGCC + GGAAACAGCTATGACCATG
4	Fin du gène L+ ribozyme	LP6572 + Ribo1R	TAATTCGCGATACATCTGCC + TTAGCCATCCGAGTGGACGACGTC
5	Dans gène H	HP46 + HP47	CGCACAAAGGGAAAGGATCA + CTGATGCCGACTTCATCACC
6	Plasmide et début du gène N	HP116 + Pg9599r	AGTCCGATTGAATTTCAGGGGC + GGCCGTGAGTAAGATCTGTGCCCAG
7	Fin du gène H et début du gène L	M13 + PGN78R	GTAAAACGACGGCCAGT + ATCTTGCTCCTCCTCCTCTCCCC
8	Dans le gène L	LP4506 + LP4876R	GGGCTTTTGATATACATTAATCA + GACATCGGCCAGTACACAGAGA

Tableau 9 : amorces utilisées pour le criblage des clones pAssemblage4term

2.4.3.5. Stabilisation du clone contenant le génome entier PPRV 75/1

Les problèmes de stabilité d'un clone bactérien peuvent venir du type de bactéries utilisées pour la transformation, des conditions de culture (température, concentration en antibiotique, type de milieu de culture (liquide ou gélosé), agitation par exemple). La société Stratagène commercialise un système spécialement conçu pour les clonages difficiles : le « Difficult cloning competent cell pack ». Ce kit contient les bactéries compétentes AbleK, SURE-2 et XL10GoldKan^r. Dans notre cas, nous testerons seulement les deux derniers types de bactéries, les AbleK étant préconisées pour le clonage de gène toxique pour la bactérie. Les SURE-2 sont conseillées pour éviter les réarrangements et les XL10GoldKan^r pour le clonage de gros plasmides, ce qui est notre cas, le plasmide final ayant une taille de plus 19 kb.

Les bactéries SURE-2 et XL10GoldKan^r sont transformées par choc thermique selon les indications fournies par le fabricant avec le produit de ligation obtenu précédemment. Elles sont ensemencées sur boite LB avec 1 ou 3% d'ampicilline et incubées à 30 ou 37°C pendant une nuit. Aucune colonie n'apparait sur les boites avec les bactéries SURE-2, quelles que soient les conditions de culture. Des colonies sont présentes sur les boites avec les XL10GoldKan^r. Les colonies sont analysées par PCR avec les amorces du couple 3, LP6572 et M13R (Tableau 9) et les minipreps correspondant aux clones positifs en PCR sont testées par coupure par SacII ou par NotI + BglI. Après contrôle enzymatique, aucun clone n'a le bon profil enzymatique.

Une nouvelle transformation est réalisée avec les bactéries XL10GoldKan^r. Après criblage des clones par PCR comme indiqué ci-dessus, les clones positifs sont mis en culture sur boite LB+ Ampicilline et incubés une nuit à 37°C. Les minipreps sont réalisées après avoir gratté le tapis bactérien. Les ADN sont ensuite testés en PCR avec les 8 couples d'amorces décrits dans le Tableau 9 et par clivage enzymatique NotI + BglI. Là également, les profils obtenus ne sont pas ceux attendus.

Une troisième transformation est réalisée en XL10GoldKan^r. Les bactéries positives en PCR sont cultivées sur boites. Une partie de la culture est récoltée par grattage de la gélose et les minipreps sont réalisées. Les ADN sont ensuite testés par clivage enzymatique BglI-NotI et par PCR avec les 8 couples d'amorces (Tableau 9). Le reste de culture sur boite est utilisé pour ensemencer de grandes boites de milieu LB + ampicilline. L'ADN obtenu par midiprep (Wizard® *Plus* Midipreps DNA Purification System, Promega, France) est à nouveau testé en PCR avec les 8 couples d'amorces. Pour

s'assurer que le clone pAssemblage4term obtenu est stable, une dernière transformation de XL10GoldKan^r est réalisée à partir de la préparation d'ADN et cultivé une nuit cette fois-ci sur 100 ml de milieu liquide à 37°C et 200 rpm. L'ADN est extrait et testé en PCR et en restriction enzymatique par BamHI, SacII, NotI, et NotI + BglI. Le clone pAssemblage4term obtenu est stable et est envoyé au séquençage pour une dernière vérification avant utilisation en génétique inverse pour générer le premier clone infectieux de la peste des petits ruminants.

2.5. Reconstitution du virus vaccinal PPRV 75/1

Le système réplicatif de PPR a été validé *in vitro* sur des cellules Vero préalablement infectées avec le virus recombinant Fowlpox-T7 (FP-T7) ou sur des cellules 293-T7 exprimant de façon stable l'ARN T7 Polymérase. Les premiers essais de reconstitution ou « rescue » du virus vaccinal PPRV 75/1 sont réalisés sur ces deux types cellulaires. Pour chacun, le génome entier est co-transfecté avec les plasmides contenant les gènes N, P et L de PPRV placés soit sous promoteur pT7 (pN-BKS-IREST7, pP-BKS-IREST7, pL-BKS-IREST7) soit sous promoteur pCMV (pNPC, pPPC, pLPC). Dans chacun des cas, le ratio N : P : L est le même c'est-à-dire 20 : 20 : 1. Deux protocoles de transfection sont testés en parallèle : l'un utilise un agent de transfection du commerce, la lipofectamine 2000 (Invitrogen, France), l'autre reprend la méthode classique par précipitation au chlorure de calcium. Les cellules Vero (cultivées en milieu MEM + 1% L-Glutamine + 10% SVF) ou 293-T7 (cultivées en milieu DMEM + 10% SVF) sont préparées en plaque 6 puits de façon à être à 60-80% de confluence à 24 heures et incubées à 37°C sous 5% de CO_2.

2.5.1. Reconstitution par transfection des cellules 293-T7

Soixante douze heures après la co-transfection telle qu'indiquée ci-dessus, les cellules 293-T7 sont mises en co-culture avec des cellules Vero pour augmenter les chances d'amplifier le virus reconstitué par génétique inverse. Un passage des cellules en culture est réalisé tous les 7 jours. Trois passages successifs sont ainsi réalisés.

2.5.2. Reconstitution par transfection des cellules Vero

Les cellules Vero n'expriment pas l'ARN T7 Polymérase. Il faut donc leur apporter cette enzyme par le biais d'un virus recombinant, en l'occurrence ici le virus recombinant FP-T7. Les cellules préparées la veille sont tout d'abord infectées avec ce virus

recombinant à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1 par cellule. Après 2 heures d'infection, l'inoculum est retiré et les plasmides N, P, L et pAssemblage4term sont co-transfectés avec la lipofectamine 2000. Comme précédemment, trois passages successifs des cellules en culture sont réalisés à 7 jours d'intervalle chacun, le premier ayant lieu 72 heures après la transfection.

2.5.3. Reconstitution par transfection des cellules Vero.DogSLAMtag

Une autre alternative s'est offerte à nous au cours de ce travail de thèse, pour augmenter les chances de générer le premier clone infectieux du virus de la souche vaccinale PPRV 75/1. En effet, nous avons acquis au laboratoire des cellules Vero exprimant de façon stable le récepteur SLAM (CD150) du chien (cellules Vero.DogSLAMtag, reçues du Dr Takeda, département de virologie de la faculté de médecine, Université de Kyushu, Fukuoka, Japon). Ces cellules ont été utilisées lors d'une étude préalable dans le laboratoire en comparaison avec les cellules Vero classiques pour la multiplication de la souche vaccinale PPRV 75/1. Il s'avère que le lot de virus vaccinal produit sur les cellules Vero-Dog-SLAM a un titre plus élevé (un Log) que celui obtenu sur les Vero de façon traditionnelle (Zaheer Nizamani, communication personnelle, résultats non publiés). De plus, l'évolution de l'infection des cellules par le virus peut s'observer par la formation de syncytia en nombre ce qui n'est pas le cas sur les Vero classiques et l'apparition d'un ECP franc. Afin de favoriser la récupération du virus PPRV 75/1, les cellules Vero-Dog-SLAM sont utilisées en transfection. Préparées la veille, elles sont préalablement infectées avec le virus FP-T7 à 0,1 MOI par cellule, puis co-transfectées avec les plasmides N, P, L (sous promoteur pCMV) et pAssemblage4term avec la lipofectamine 2000 comme décrit précédemment pour les cellules Vero. L'évolution des cellules est observée quotidiennement au microscope. Cinq passages successifs sont réalisés, et les surnageants sont analysés par PCR. L'ARN est extrait à l'aide du « RNeasy mini kit » et une partie est traitée à la DNase (Ambion, France) puis utilisée en RT-PCR. La réaction est réalisée en une seule étape avec le « One-step RT-PCR kit » (Qiagen, France) et les amorces du gène de ménage βactine (βact1 et βact2) et amorces NP3-NP4, HP46-HP47 spécifiques de PPRV. Afin de confirmer les résultats de RT-PCR, les surnageants récoltés sont titrés par immunofluorescence indirecte en comparaison avec la souche vaccinale PPRV 75/1 d'origine. Des cellules Vero.DogSLAMtag (à raison de 2.10^4 cellules par puits d'une plaque P96) sont infectées avec des dilutions de 10 en 10 des surnageants récoltés aux différents passages du clone

infectieux PPRV75/1. Après cinq jours d'incubation à 37°C et 5% CO_2, les cellules sont fixées à l'acétone 80%. La révélation se fait à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-N-PPR 38-4 dilué au 1/400 et le conjugué anti-souris FITC (Biorad, France) dilué au 1/80. Les plaques sont lues au microscope à fluorescence et le titre est donné en $DICT_{50}$/ml et calculé selon la formule :

$$T = 10^{f-t}$$

$t = X_0 - d\,(P-0,5)$;

$f = \log 20 = 1,3$ (50µL de suspension virale par puits)

P = somme des puits positifs à partir de la dilution la plus faible où 100 ecp ;

X_0 = log de la dernière dilution où 100% ecp ;

D = log du facteur de dilution (ici d = 1 car dilution de 10 en 10)

2.6. Marquage du génome du virus vaccinal PPRV 75/1

Le marquage du génome de la souche vaccinale PPRV 75/1 peut se faire de différentes façons. Il est envisageable d'insérer une cassette d'expression d'un gène comme l'eGFP [114, 115, 117, 164]. A contrario, une délétion d'un morceau du gène N-PPR en se basant notamment sur les études préalables menées par Bodjo *et al.* [123, 165, 166], peut permettre de soustraire un antigène d'intérêt pour le diagnostic. Alternativement, la substitution d'une séquence correspondant à la séquence d'un épitope fortement immunogène [123, 167] par une autre séquence immunogène peut être proposée.

2.6.1. Stratégie de marquage par insertion d'une cassette d'expression

Dans le cadre de notre travail, nous avons choisi d'insérer une cassette modèle d'expression eGFP entre les gènes P et M du génome de PPRV en se basant sur l'étude réalisée par Walsh *et al.* sur le virus de la peste bovine [117]. La séquence eGFP doit être encadrée des séquences 5'UTR et 3'UTR de PPRV et être insérée entre les gènes P et M de PPRV 75/1. Il faut donc aménager un site de restriction unique entre les deux gènes de PPRV afin de pouvoir y cloner le gène d'intérêt. Pour des raisons de facilité, la stratégie de clonage envisagée repose sur l'aménagement d'un site de restriction unique entre P et M sur le clone pPMintPCRII, l'insertion de l'eGFP puis le remplacement du fragment « P-M » de pAssemblage4term par le fragment « P-eGFP-M ».

2.6.1.1. Aménagement du site de restriction unique sur pPMintPCRII

Le site de restriction unique AscI est aménagé par mutagenèse sur le plasmide pPMintPCRII (Figure 12). La mutagenèse se fait en deux temps avec le « Quick Change II XL site directed mutagenesis kit » (Stratagène, France) et selon les instructions décrites par le fournisseur. La première PCR est réalisée avec les amorces PPR1AscI et PPR1AscIrev (Tableau II). Les colonies sont criblées par PCR avec les amorces Pg3297 et Pg3419r (Tableau I). Les minipreps d'ADN obtenues à partir des colonies positives en PCR sont testées par coupure enzymatique par AscI. Le clone pPMmut1AscI est utilisé pour la seconde mutagenèse dirigée avec PPR2AscI et PPR2AscIrev (Tableau II). Comme précédemment, les colonies sont sélectionnées par PCR et les minipreps analysées par clivage par AscI et HpaI. Le plasmide pPMintAscI est envoyé à séquencer avant utilisation pour l'insertion de l'eGFP.

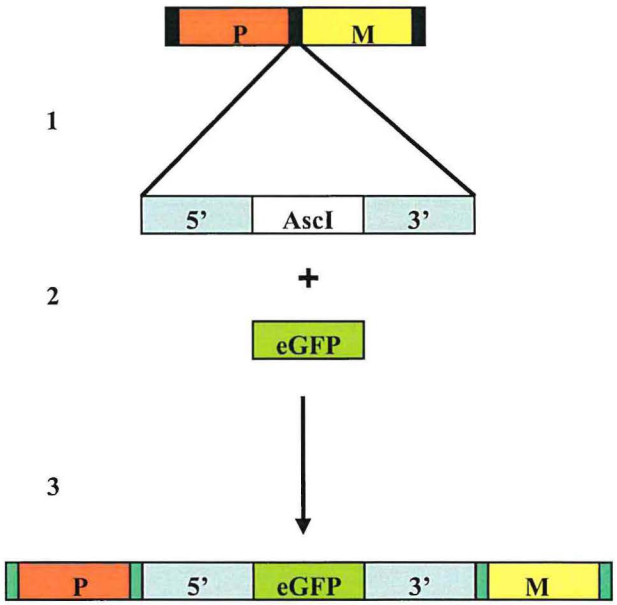


Figure 12 : insertion de la cassette d'expression eGFP entre les gènes P et M. 1 : aménagement du site unique AscI entre les gènes P et M ; 2 : insertion de l'amplicon eGFP au niveau du site AscI ; 3 : obtention du plasmide pPMeGFP contenant la cassette d'expression eGFP entre P et M de PPRV 75/1

2.6.1.2. Insertion de l'eGFP dans pPMintAscI

pPMintAscI est linéarisé par AscI puis déphosphorylé avec la phosphatase CIP. Le vecteur ainsi préparé est purifié par extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) et une précipitation à l'éthanol. L'insert eGFP est obtenu par amplification à partir du plasmide peGFP-C1 avec la Pfu DNA Polymérase et les amorces eGFPBssHII(F) et eGFPAscI (rev) (Tableau 7). Le produit de PCR est purifié sur colonne « Qiaquick PCR purification kit » (Qiagen, France), digéré avec les enzymes BssHII et AscI puis purifié sur colonne « MinElute Reaction Cleanup ». Insert et vecteur sont ligués une nuit à 16°C avec l'ADN T4 Ligase. Les bactéries compétentes XL10Gold (Stratagène, France) sont transformées avec le produit de ligation. Les colonies sont sélectionnées par PCR. La première PCR avec les amorces eGFPC1F et eGFPC1R permet de déterminer la présence de l'insert eGFP ; la seconde, avec les amorces Pg3297 et eGFPC1R, donne l'information sur le sens d'orientation de l'insert dans le vecteur. L'ADN des clones doublement positifs est analysé par restriction enzymatique par SacII ou BssHII. Le clone pPMeGFP obtenu (Figure 13) est envoyé en séquençage avant d'être inséré dans le plasmide pAssemblage4term à la place du segment « P-M».

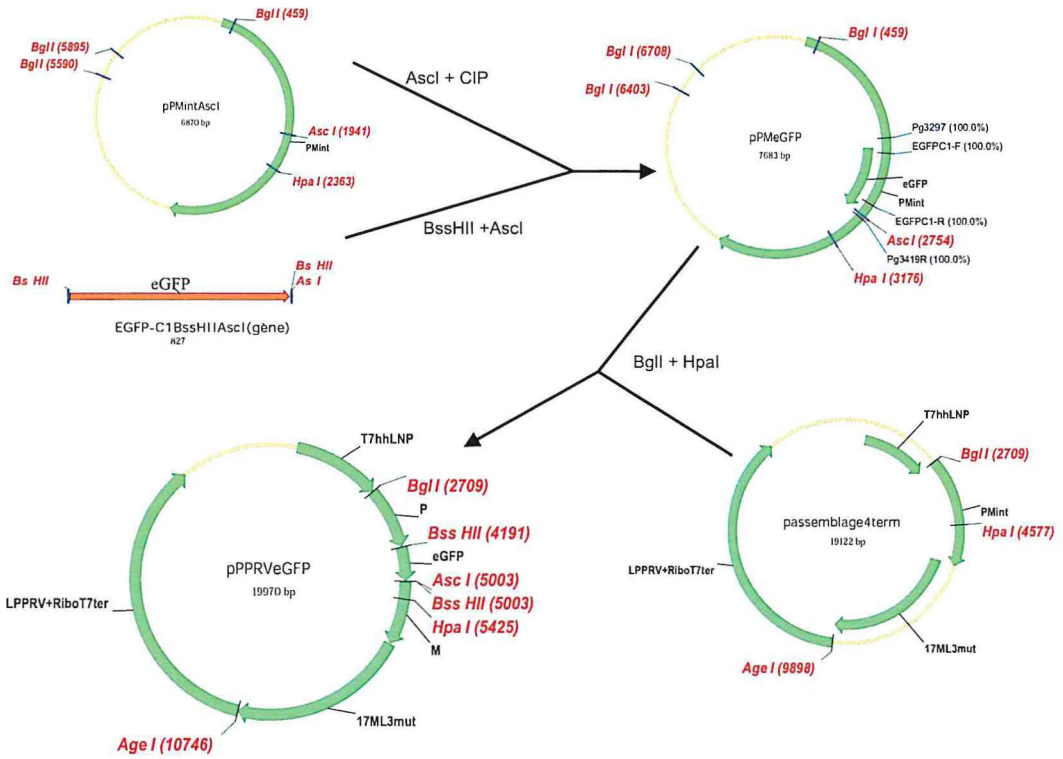


Figure 13 : insertion de l'eGFP pour marquer le génome PPRV 75/1

2.6.2. Marquage par délétion

Bodjo et collaborateurs ont démontré au cours de leurs travaux qu'une protéine N délétée d'un morceau de sa séquence était exprimée et détectée par IFI [165]. Pour s'assurer qu'une protéine N-PPRV avec une délétion reste fonctionnelle, il faut la tester en génétique inverse avec le minigénome eGFP. Le plasmide pNΔ(490-525) (construit par Bodjo et al. [165]) contenant N-PPRV75/1 délétée sur la position 490 à 525 et placé sous le promoteur pCMV est donc utilisé pour cet essai. Les cellules 293-T7 sont co-transfectées avec les plasmides N, P, L et pNΔ(490-525) avec la lipofectamine 2000. L'expression de l'eGFP est observée au microscope à fluorescence 24, 48 et 72 heures après la transfection. Les ARNm sont également étudiés comme décrit dans le paragraphe 2.1 de ce chapitre.

2.6.3. Marquage par substitution

Un épitope est une structure ou une séquence reconnue par le paratope d'un anticorps. Substituer un petit épitope de 3 à 14 aa par un autre est susceptible de ne pas altérer la fonction de la protéine. Le choix de l'épitope de substitution doit ensuite se baser sur sa capacité à donner un signal suffisamment fort pour être détecter par les différentes techniques d'analyse notamment dans notre cas, par ELISA. Au cours de précédents travaux au laboratoire de virologie, un peptide E hautement immunogène avait été identifié dans la région C terminale du gène N de PPRV75/1 (G.Libeau, communication personnelle). Notre travail a consisté à remplacer cet épitope par un autre, soit par un épitope soit par une séquence homologue dérivée d'un autre morbillivirus. Dans un premier temps, nous envisageons de marquer le gène N avec la séquence d'un Tag commercial, déjà utilisé pour des marquages en biologie moléculaire et pour lesquels il existe des réactifs de diagnostic c-ELISA ou un anticorps monoclonal commercial. Après un inventaire des différents Tag disponibles sur le marché [168-171], notre choix s'est porté sur trois candidats (Tableau 10) : Flag, C-myc et protéine C.

Nom	Origine	Séquence protéique
Flag	peptide synthétique	DYKDDDDK
C-myc	Protéine gène humain c-myc	EQKLISEEDL
Protéine C	Protéine C	EDQVDPRLIDGK

Tableau 10 : séquences des Tag identifiés comme marqueurs potentiels du génome

La seconde est de remplacer la séquence du peptide E par la séquence homologue dérivée d'un autre morbillivirus. Après alignement des séquences protéiques de différents morbillivirus dans cette zone (Figure 14), les séquences se rapprochant le plus de celle de PPRV 75/1 sont choisies : il s'agit des séquences de CDV, PDV et du morbillivirus de dauphin. Nous décidons également de tester une séquence chimère (Tableau 11), reprenant les acides aminés les plus fréquemment trouvés à chaque position sur les différents morbillivirus comparés.

	480	502
PPR 75/1	ESSQ NPREAQRSAEAL	FRLQAMA
CDV	DDGN D--DDRKSMEAI	AKMRMLT
Morbillivirus Dauphin	DNTD DPISIQKSAEAL	AKMRAMA
PDV	EGDH D--NDQQSMDGL	AKMRQLT
RPV	EADT DPLESKKSAEAL	LRLQAMA
MV	ESSQ DPQDSRRSADAL	LRLQAMA

Figure 14 : alignement des séquences protéiques de morbillivirus (entre 480 et 502 aa) correspondant à la séquence du peptide E de PPRV 75/1 (en jaune)

Peptide	Origine	Séquence protéique
E	PPRV, souche vaccinale 75/1	NPREAQRSAEAL
PEP 1	chimère synthétique	DPDDDRKSAEAL
PEP 2	CDV	GNDDDRKSMEAI
PEP 3	PDV	DHDNDQQSMDGL
PEP 4	morbillivirus Dauphin	DPISIQKSAEAL

Tableau 11 : séquences des peptides morbillivirus pour le marquage du génome

2.6.3.1. Peptides Tag

Avant d'utiliser ces différentes séquences comme marqueur du génome de PPRV 75/1, il faut tout d'abord s'assurer que l'animal cible est en mesure de reconnaître ces épitopes et de produire des anticorps dirigés contre eux. Les différents peptides sont synthétisés par la société GENEPEP (Prades-le-Lez, France). Avant de commencer tout travail de clonage des Tag, nous avons donc vérifié l'immunogénicité des peptides chez l'animal cible. La

chèvre étant l'espèce cible du vaccin, les peptides Tag sont injectés par voie intramusculaire, à raison de 1 ml à 1 mg/ml mélangé à 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Une injection de rappel est faite dans les mêmes conditions trois semaines plus tard. Les prélèvements sanguins sont réalisés toutes les semaines et les sérums sont récoltés et testés en ELISA (Tableau 12). Différentes dilutions de sérums sont testées : 1/5 ; 1/10 ; 1/20 ; 1/40 ; 1/80 ; 1/160 afin de définir lequel des trois Tag est le plus immunogène et donc le plus adapté à notre projet.

Matériels et réactifs	Protocole
- Plaque 96 puits Maxisorp Nunc 439454 - PBS 1X - Tampon de blocage Sigma B64269 dilué au 1/10 dans H_2O - PBS 1/5 + 0,05% Tween 20 - Peptide dilué dans du PBS 1X (10 µg/ml) - Sérums à tester dilués - Conjugué HRP dilué au 1/1000 en tampon de blocage - H_2O_2 3% (1 tablette / 10 ml H_2O) - OPD (1 pastille dans 75 ml H_2O) - Substrat (40 µl H_2O_2 3% + 11 ml OPD) - H_2SO_4 1N (55 ml + 945 ml H_2O)	- Sensibiliser les plaques avec 50 µl de peptide par puits - Fermer les plaques avec film - Incuber la nuit à 37°C sous agitation (300 tpm) - Bloquer avec 50 µl de tampon de blocage - Incuber 30 min à 37°C sous agitation (300 tpm) - Rincer 3 fois les plaques avec du PBS 1/5 + 0,05% Tween 20 - 50 µl / puits de sérum à tester dilué en tampon de blocage - Incuber 30 min à 37°C sous agitation (300 tpm) - Rincer 3 fois les plaques avec du PBS 1/5 + 0,05% Tween 20 - 50 µl / puits de conjugué dilué en tampon de blocage - Incuber 30 min à 37°C sous agitation (300 tpm) - Rincer 3 fois les plaques avec du PBS 1/5 + 0,05% Tween 20 - 50 µl / puits de substrat - Incuber 10 min à température ambiante - Stopper réaction avec H_2SO_4 1N - Lecture à λ = 492 nm

Tableau 12 : protocole des ELISA peptides

2.6.3.2. Peptides Morbillivirus

Afin de générer des sérums polyclonaux contre les différents peptides morbillivirus pour les tests de sérologie à mener au laboratoire dans le cadre de notre étude, des lapins ont été immunisés. Le lapin est l'espèce idéale pour produire une quantité moyenne de sérums polyclonaux. Une première injection de 1 ml de peptide (à une concentration de 1 mg/ml) mélangé à 1 ml d'adjuvant complet de Freund est faite aux lapins par voie sous cutanée. Deux injections de rappel sont réalisées à 15 jours d'intervalle. Les lapins sont anesthésiés (Imalgen, Sanofi, France), puis saignés pour récolter le maximum de sang. Les

sérums sont récoltés et testés en ELISA afin de déterminer lequel de ces peptides est le plus favorable pour notre projet.

2.6.3.3. Screening des sérums de chèvres disponibles au laboratoire de virologie

Les candidats « marqueurs » retenus à l'étape précédente sont testés avec tous les sérums négatifs et positifs en PPR disponibles au laboratoire de virologie. En effet, il faut confirmer que des sérums de chèvres négatifs ou positifs n'interagissent pas naturellement avec les Tag ciblés. Environ 320 sérums sont ainsi testés en ELISA peptides. La veille de l'essai, les plaques 96 puits sont sensibilisées avec les différents peptides retenus en comparaison avec le peptide E pour le contrôle. Les sérums d'animaux à tester sont dilués au 1/10 dans le tampon de blocage et le protocole développé précédemment (Tableau 7) est mis en œuvre.

3. RESULTATS

Les expériences menées au cours de ce travail de recherche nous ont permis de mettre en place et de valider la technique de génétique inverse, d'assembler le génome entier de la souche vaccinale PPRV 75/1, de faire les premiers essais de reconstitution du virus et de déterminer d'éventuels marqueurs pour le vaccin. Avant de débuter tous ces travaux, une analyse bioinformatique de la séquence L-PPRV 75/1 a été menée en comparaison avec les séquences d'autres polymérases de morbillivirus et de paramyxovirus [8].

3.1. Etude de la L-PPRV 75/1

L'étude bioinformatique de la L-PPRV75/1 nous renseigne sur les séquences nucléique et protéique de cette polymérase par comparaison aux différentes L-polymérases de morbillivirus et paramyxovirus disponibles dans la banque de données GenBank. Les homologies observées entre les différentes souches de PPR ont montré que la souche vaccinale Nigeria 75/1 et celle du Nigeria 76/1 étaient identiques à 98% et plus distantes des souches d'Inde, de Turquie et de Chine qui forment un autre groupe, ou d'une souche de Côte d'Ivoire. Ceci s'explique par leur appartenance à des lignées différentes. La différentiation des ces lignées par le gène L est parfaitement superposable à celle donnée par la comparaison des séquences du gène F ou du gène N [7, 8, 25, 172, 173].

La comparaison des séquences nucléotidique et protéique du gène L avec celles d'autres morbillivirus confirme que PPR est proche de peste bovine et de rougeole (65-73% d'identité sur la séquence nucléotidique ; 75-81 % sur la séquence protéique) [8]. L'arbre phylogénétique représenté sur la Figure 15 montre six groupes distincts parmi les morbillivirus (peste des petits ruminants, peste bovine, rougeole, maladie de Carré, morbillivirus du dauphin et celui du phoque). Il indique également que parmi les morbillivirus, le PPRV est plus proche du virus de la peste bovine et de la rougeole et parmi les autres paramyxovirus, les morbillivrus sont plus proches des virus Tupaia, Nipah et Hendra.

La protéine L-PPRV 75/1 est longue de 2183 acides aminés et a un poids estimé à 247,4 kDa. L'alignement de cette séquence avec celles des autres morbillivirus confirme l'existence de trois domaines distincts A, B et C [8] séparés par des régions variables (607-652 aa et 1695-1717 aa) (Figure 16). La protéine L entière a une charge neutre mais les domaines A et B sont chargés négativement, alors que C est chargé positivement. Leur charge négative, pourrait expliquer la capacité des deux domaines A et B de la polymérase

à interagir avec l'ARN génomique. L'utilisation de différents logiciels d'analyse pour rechercher les motifs et les homologies de séquences ont permis également de retrouver plusieurs régions fonctionnelles [8]. Ainsi, l'activité ARN polymérase ARN dépendante se situe sur les régions 255 à 1314 aa. La région de 653 à 680 aa dans le domaine B correspond au site catalytique de la polymérase. Le domaine de la méthyltransférase identifié entre 1758 et 1964 aa est impliqué dans le coiffage de l'ARN viral. D'autres motifs ont été identifiés comme celui situé à la position 9 - 21 : il correspond au site d'interaction de la polymérase avec la phosphoprotéine P. Le motif 535-553 aa est défini comme celui du motif de liaison avec l'ARN. Dans la partie N terminale du domaine B, sont localisés quatre motifs essentiels à la fonction polymérase incluant le site actif pour la formation des liaisons phosphodiesters.

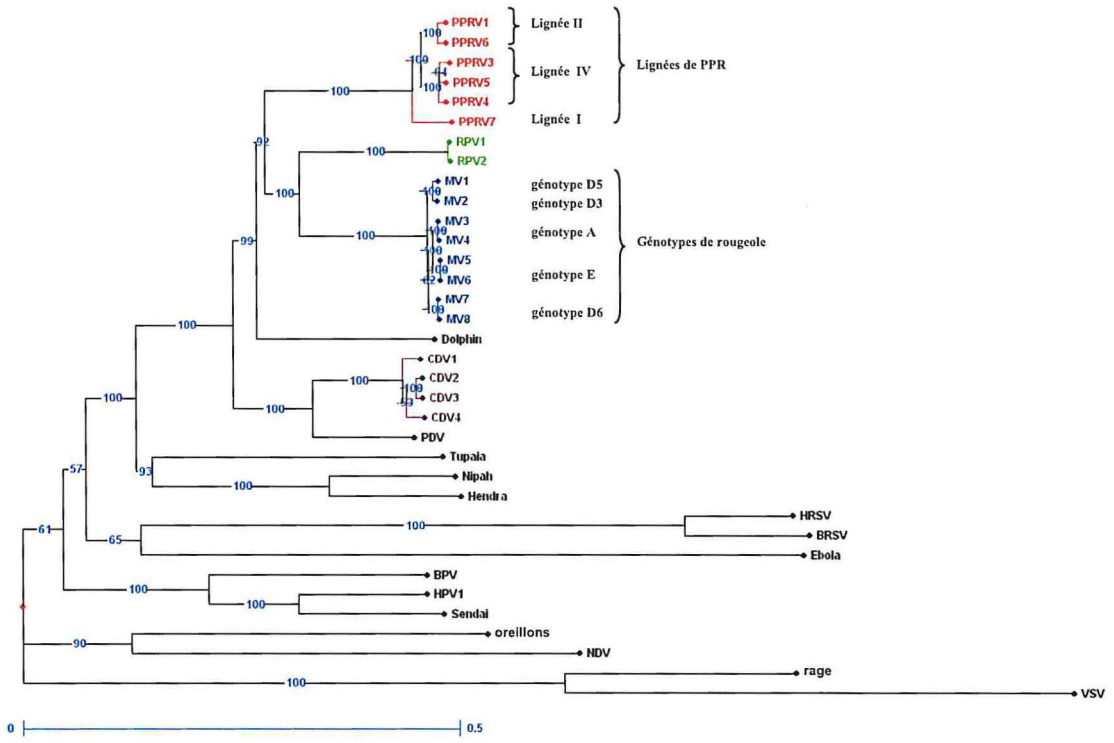
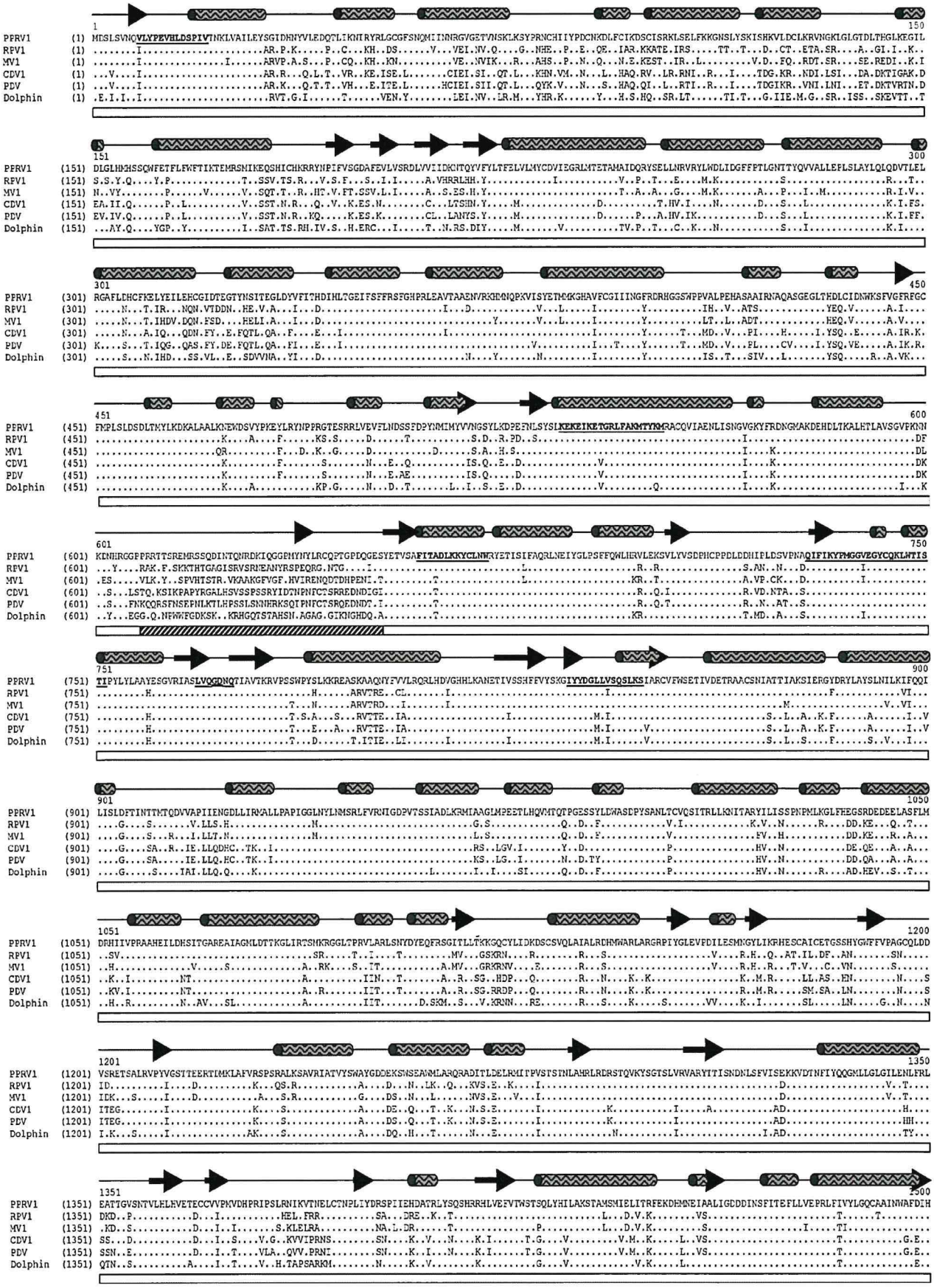


Figure 15 : arbre phylogénétique des paramyxovirus basé sur le gène de la polymérase L. Voir Tableau 6 pour la liste des souches utilisées dans cet arbre phylogénétique. PPRV : virus de la peste des petits ruminants ; RPV : virus de la peste bovine ; MV : virus de la rougeole ; CDV : virus de la maladie de carré ; PDV : virus de la peste des phoques ; HRSV : virus respiratoire syncitial humain ; BRSV : virus respiratoire syncitial bovin ; BPV : virus parainfluenza bovin ; HPV : virus parainfluenza humain ; NDV : virus de la maladie de Newcastle ; VSV : virus stomatite vésiculaire


PPRV1
RPV1
MV1
CDV1
PDV
Dolphin

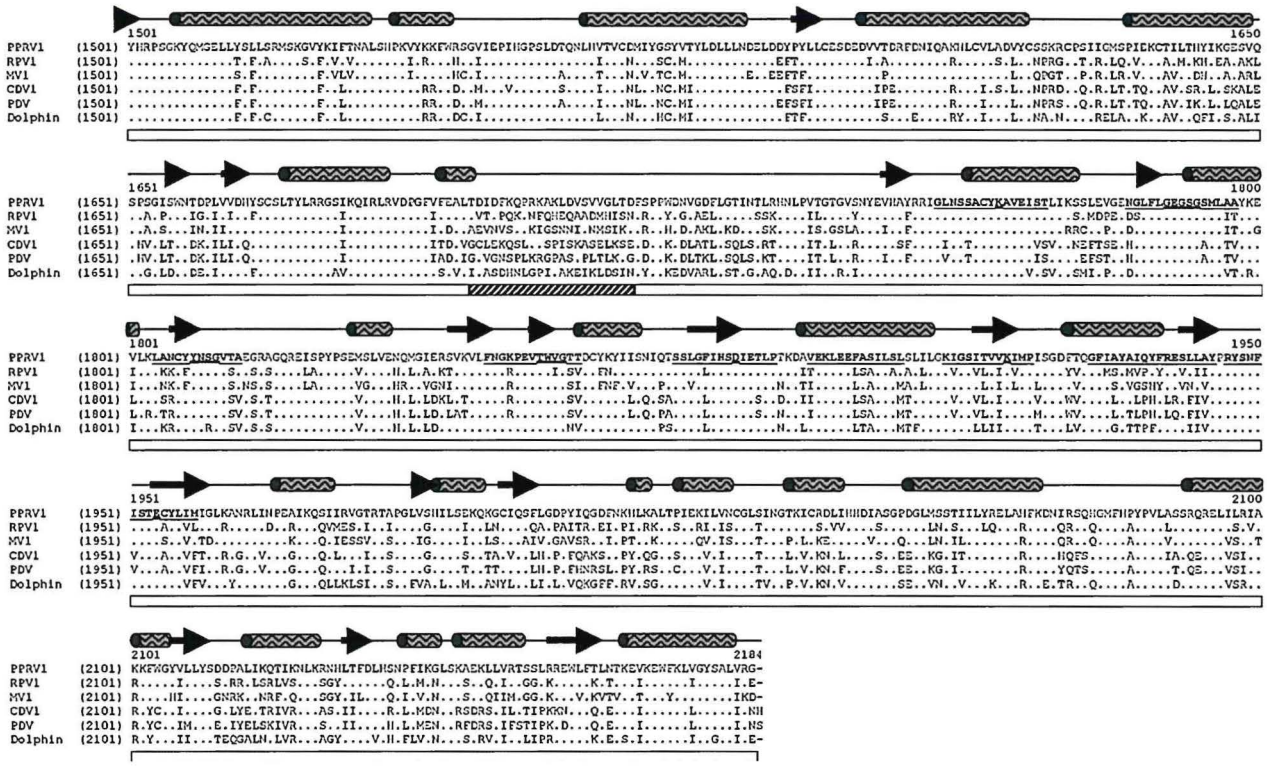


Figure 16 : Alignement multiple de séquences L de différents morbillivirus dont la L-PPRV 75/1 (PPRV1). Voir Tableau 6 pour la liste des abréviations des souches utilisées dans cet alignement

3.2. Validation sur cellules Vero du système réplicatif de PPR à l'aide du minigénome eGFP

La mise en œuvre et la validation de la génétique inverse sont réalisées à l'aide d'un modèle, le minigénome eGFP. Cette construction a été testée en système rougeole lors de mon travail de recherche dans le cadre du master 2 recherche [161]. Un plasmide contenant le gène de l'eGFP encadré des séquences leader et trailer de PPRV 75/1, le tout sous la dépendance du promoteur pT7 a été construit. L'expression du minigénome eGFP en génétique inverse permet non seulement de valider la technique de génétique inverse au laboratoire mais également de vérifier la fonctionnalité du gène L-PPRV 75/1 cloné sous pCMV. En effet, l'expression de L-PPRV 75/1 peut être simplement démontrée par immunofluorescence indirecte (IFI). Toutefois le seul moyen de démontrer que la protéine exprimée est fonctionnelle est de faire exprimer le minigénome eGFP.

3.2.1. Expression de L-PPRV 75/1 sous pCMV

L'expression de la L-PPRV est mise en évidence par immunofluorescence indirecte 48 heures après transfection des cellules Vero. Après lecture des plaques au microscope à

fluorescence, des cellules fluorescentes sont observées dans l'essai et le contrôle positif, alors qu'aucune fluorescence n'est observée dans le témoin négatif (Figure17).

Figure 17 : Expression de L-PPRV 75/1 détectée par immunofluorescence indirecte. (A) cellules Vero transfectées avec le plasmide pLPC ; (B) : contrôle négatif (cellules Vero) ; (C) : contrôle positif (cellules Vero infectées avec PPRV 75/1)

Après réaction d'IFI et observation au microscope, la polymérase de PPRV 75/1 clonée sous promoteur pCMV est bien exprimée dans les cellules Vero dans lesquelles le plasmide pLPC a été transfecté. En outre, le niveau de transfection obtenue est largement compatible avec une utilisation en génétique inverse. Il est alors possible de s'assurer que la L-PPRV exprimée est fonctionnelle.

3.2.2. Fonctionnalité de L-PPRV 75/1 et validation du système de génétique inverse

La mise en évidence de la fonctionnalité de L-PPRV et la validation de la technique de génétique inverse ont été faites sur des cellules Vero préalablement infectées avec du FP-T7 pour apporter l'ARN T7 Polymérase au système. Le but est de recréer *in vitro* la ribonucléoprotéine (RNP) de PPRV 75/1. Pour cela, les cellules sont co-transfectées avec le minigénome eGFP et les plasmides pNPC, pPPC et pLPC, contenant respectivement les gènes N, P et L sous promoteur pCMV. Les conditions sont décrites en 2.2.2 et sont basées sur les travaux de Walsh [117] et Bailey [162].

Comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes, les cellules sont observées au microscope à fluorescence 48 heures après la co-transfection afin de vérifier la présence de cellules fluorescentes dans les puits co-transfectés avec les plasmides N, P, L et le minigénome ainsi que dans le contrôle positif (Figure 18). Cette fluorescence des cellules est attribuée à l'expression de la protéine eGFP par génétique inverse. En effet, le minigénome eGFP seul ne peut pas être traduit en protéine du fait de l'absence du système réplicatif de PPRV. L'ARN obtenu par action de l'ARN T7 polymérase à partir du plasmide du minigénome est un antisens du gène et ne peut donc pas être transcrit directement en ARNm par la cellule. Il doit être pris en charge par la RNP-PPR

reconstituée pour faire un ARNm et exprimer la protéine eGFP. De même, dans les cellules co-transfectées avec seulement N, P et le minigénome, aucune fluorescence n'est observée (résultats non montrés). Dans ce cas, l'absence de la polymérase dans le système empêche la ribonucléoprotéine de se former et donc la synthèse d'ARNm à partir de l'ARN du minigénome.

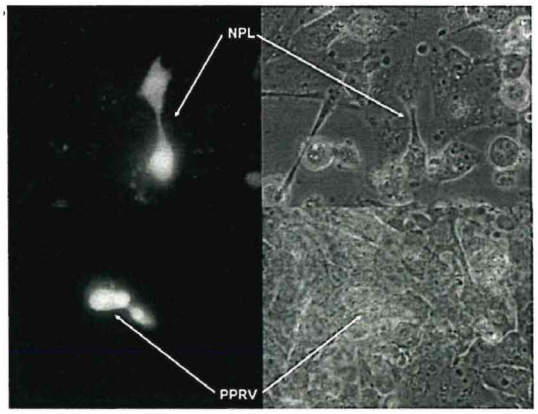


Figure 18 : fonctionnalité de la polymérase L-PPRV 75/1 et validation du système de génétique inverse. A gauche, photos d'épifluorescence ; à droite mêmes photos prises en contraste de phase. En haut, cellules co-transfectées avec le minigénome eGFP et les plasmides N, P et L ; en bas le contrôle positif, c'est-à-dire les cellules transfectées avec le minigénome eGFP puis infectées avec PPRV 75/1

Les cellules fluorescentes sont peu nombreuses dans les différents essais mais bien présentes ainsi que dans le contrôle positif. Pour s'assurer que cette fluorescence est bien due au minigénome reconstitué par le système réplicatif PPR, nous avons poussé l'étude au niveau des ARNm. Pour cela, l'expérience de co-transfection du minigénome eGFP avec les plasmides pNPC, pPPC et pLPC sur les cellules Vero infectées avec le FP-T7 a été reproduite. Quarante huit heures après transfection, les ARN totaux sont extraits à partir de 10^6 cellules et testés directement en PCR spécifique eGFP afin de s'assurer que le plasmide minigénome eGFP n'est pas présent dans les ARN extraits. L'ADNc est synthétisé et contrôlé par PCR sur le gène de ménage βactine. Il est ensuite amplifié par PCR spécifique eGFP (Figure 19). Quel que soit l'échantillon testé, il y a amplification du fragment eGFP, l'ARN T7 Polymérase étant présente dans tous les échantillons où le minigénome est transfecté. En effet, l'ARN T7 Polymérase apportée par le FP-T7, prend en charge le plasmide minigénome qui est alors transcrit en ARN. Par contre pour les ADNc obtenus à partir des ARNm, on observe sur le gel d'agarose l'amplification d'une bande eGFP uniquement pour les échantillons où le minigénome est présent en même temps que les plasmides N, P et L ou le virus PPR 75/1 (Figure 19). En effet, la RNP (générées par l'association des trois plasmides ou l'infection par le virus) prend en charge

l'ARN eGFP et génère un ARNm qui est alors traduit en protéine eGFP. Ce résultat de PCR confirme celui observé au microscope.

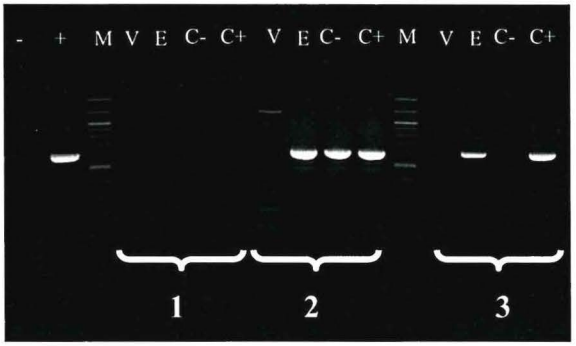


Figure 19 : validation par PCR eGFP de la fonction du minigénome en génétique inverse PPR et de la fonctionnalité de la polymérase L-PPRV 75/1 sur des cellules Vero infectées FP-T7. Seuls les puits contenant une ribonucléoprotéine complète expriment l'eGFP. - : contrôle négatif de PCR ; + : contrôle positif de PCR ; M : marqueur de taille 100 pb (New England Biolabs, Ozyme, France) ; V : contrôle cellules ; E : essai complet (minigénome eGFP + plasmides N, P et L) ; C- : contrôle négatif (minigénome eGFP + plasmides N et P sans L) ; C+ : contrôle positif (minigénome + PPRV 75/1) ; lot 1 : PCR directe sur ARN total ; lot 2 : PCR sur ADNc issu d'ARN total ; lot 3 : PCR sur ADNc issu ARNm.

Nous pouvons donc dire que le minigénome eGFP est validé en génétique inverse au laboratoire de virologie du Cirad. La polymérase L-PPRV 75/1 clonée sous pCMV est non seulement exprimée mais est fonctionnelle puisque la RNP peut prendre en charge l'ARN eGFP obtenu après action de l'ARN T7 polymérase.

3.3. Validation sur cellules 293-T7 du système réplicatif de PPR à l'aide du minigénome eGFP

Dans le système précédent, le facteur limitant à moyen terme est le stock de FP-T7, don de M. Skinner (IAH) pour lequel les essais de production sur différents types de lignées cellulaires (QT35 (ECACC 93120832) ; P142 (ATCC CRL-12203) ; cellules primaires de fibroblastes d'embryon de poulet) sont restés infructueux (résultats non montrés). Aussi, nous nous sommes orientés vers une alternative pour apporter l'ARN T7 Polymérase au système. Nous avons utilisés des cellules exprimant de façon stable l'ARN T7 Polymérase : les cellules 293-T7 (don de F. Tangy, laboratoire de génomique virale et vaccination, Institut Pasteur de Paris). Ces cellules sont en général transfectées par une méthode de précipitation au chlorure de calcium [163]. Cette méthode est longue et nous

décidons de comparer l'efficacité de transfection de ces cellules 293-T7 avec la lipofectamine 2000, plus simple d'utilisation.

3.3.1. Comparaison de l'efficacité des techniques de transfection

Les cellules 293-T7 sont transfectées avec le plasmide peGFP-C1 soit par précipitation au chlorure de calcium soit en utilisant la lipofectamine 2000. Comparativement, des cellules Vero sont transfectées dans les mêmes conditions. L'apparition de la fluorescence dans les cellules est observée 48 heures après la transfection (Figure 20).

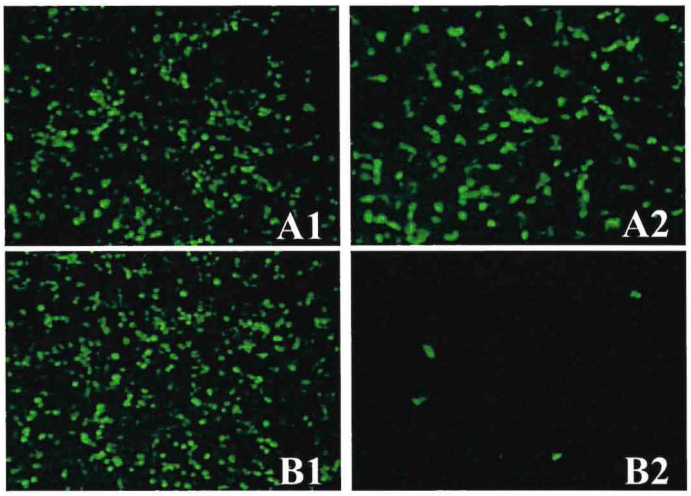


Figure 20 : Comparaison de l'efficacité des techniques de transfection sur les cellules 293-T7 et Vero avec le plasmide pEGFP-C1. **1** : cellules 293-T7 ; **2** : cellules Vero ; **A** : lipofectamine 2000 ; **B** : précipitation au chlorure de calcium.

Pour les cellules Vero, la précipitation au chlorure de calcium est moins efficace. En revanche, pour les cellules 293-T7, les deux techniques sont équivalentes. Pour la suite des essais sur les cellules 293-T7, nous utiliserons donc la technique de transfection par la lipofectamine 2000.

L'utilisation des cellules 293-T7 avec le minigénome eGFP est possible aussi bien avec N, P et L placés sous promoteur pCMV que sous promoteur pT7. Avant d'envisager d'utiliser les plasmides contenant N, P et L sous pT7, il faut vérifier que les constructions réalisées permettent aux protéines de s'exprimer correctement dans les cellules 293-T7.

3.3.2. Expression de N, P et L sous promoteur pT7

Les gènes N, P et L de la souche vaccinale PPRV 75/1 ont été clonés sous promoteur pT7 dans le plasmide pBKS-IRESRT7 comme décrit dans le chapitre 2.2.1. Ces plasmides

sont transfectées sur les cellules 293-T7 avec la lipofectamine 2000. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont fixées et les différentes protéines sont révélées par immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques de chaque protéine. La lecture du résultat se fait au microscope à fluorescence. On observe de la fluorescence dans les trois essais (Figure 21). La fluorescence détectée pour L est très faible mais existe. Les cellules exprimant N et P sont bien visibles.

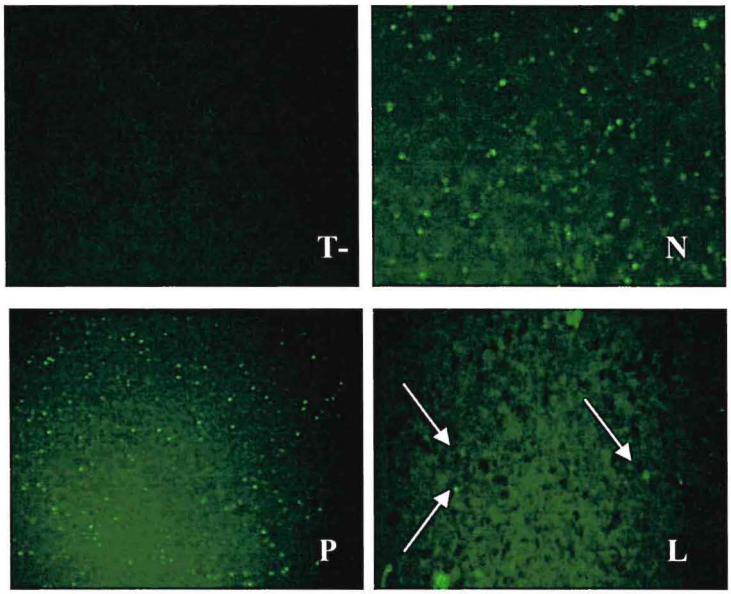


Figure 21 : Mise en évidence par immunofluorescence de l'expression de N, P et L placé sous pT7. T- : cellules non transfectées, contrôle négatif ; N : cellules transfectées avec pN-BKS-IREST7 ; P : cellules transfectées avec pP-BKS-IREST7 ; L : cellules transfectées avec pL-BKS-IREST7

L'expression de N, P et L (placés sous la dépendance du promoteur pT7) nous permet d'envisager d'utiliser ces constructions pour valider le système de génétique inverse sur les cellules 293-T7.

3.3.3. Validation du système réplicatif sur 293-T7 à l'aide du minigénome eGFP

Les cellules 293-T7 sont transfectées pour un essai du minigénome eGFP avec les plasmides contenant N, P et L placés soit sous promoteur pCMV soit sous promoteur pT7, comme décrit au chapitre 2.3.4. La fluorescence est observée dans les cellules, 48 heures après la transfection. Des cellules fluorescentes sont présentes dans les puits où la ribonucléoprotéine est présente mais elles sont très peu nombreuses (Figure 22). Cependant, il semblerait qu'elles soient un peu plus nombreuses dans le cas où les gènes N, P et L sont clonés sous pCMV.

Figure 22 : Validation du système réplicatif sur les cellules 293-T7 à l'aide du minigénome eGFP. 1 : minigénome + N, P et L sous pT7 ; 2 : minigénome + N, P sans L ; 3 : minigénome + N, P et L sous pCMV

Afin de s'assurer que la fluorescence observée dans quelques cellules est bien due au minigénome eGFP et non pas à un bruit de fonds, une analyse des ARNm est effectuée. Comme pour la validation sur les cellules Vero, les ARNm sont extraits des ARN totaux. Après transcription inverse, les ADNc obtenus sont amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques de l'eGFP. Les produits de PCR sont analysés sur un gel à 1,5% d'agarose en présence de BEt (Figure 23). Après PCR, des bandes de faible intensité sont observées uniquement dans les échantillons où la ribonucléoprotéine est présente, ce qui confirme le résultat observé au microscope. Les mêmes résultats sont obtenus quel que soit le promoteur sous lequel sont placés N, P et L. La technique de génétique inverse peut être appliquée en utilisant les cellules 293-T7 ou bien les cellules Vero infectées avec le virus recombinant FP-T7.

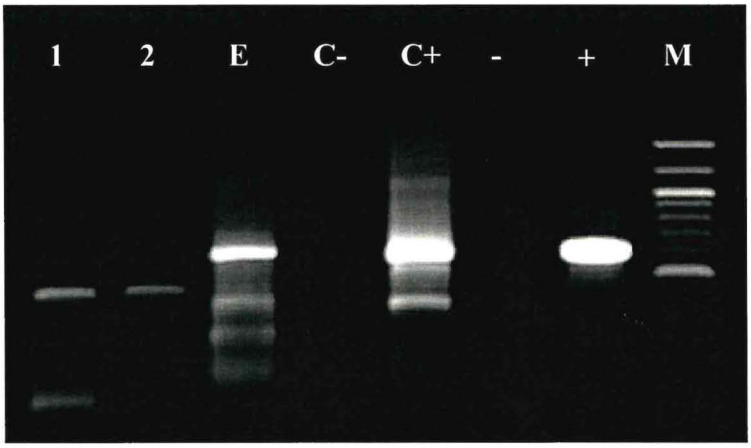


Figure 23 : Validation par PCR eGFP du minigénome par génétique inverse PPR sur cellules 293-T7. Seuls les puits contenant une ribonucléoprotéine complète expriment l'eGFP. 1 : contrôle cellules ; 2 : minigénome seul ; E : essai complet (minigénome eGFP + plasmides N, P et L sous promoteur pCMV) ; C- : contrôle négatif (minigénome eGFP + plasmides N et P sans L) ; C+ : contrôle positif (minigénome + PPRV 75/1) ; - : contrôle négatif de PCR ; + : contrôle positif de PCR ; M : marqueur de taille 100 pb.

Grâce à la validation de ces méthodes, il est possible d'envisager de générer, par génétique inverse, le premier clone infectieux PPRV 75/1. Mais avant de pouvoir atteindre cet objectif, il faut assembler le génome de PPRV 75/1 à partir des clones disponibles au laboratoire.

3.4. Assemblage du génome entier de la souche vaccinale PPRV 75/1

L'assemblage du génome PPRV 75/1 est réalisé à partir des six segments disponibles au laboratoire de virologie (Figure 7).

Après vérification par séquençage des différents plasmides, quelques corrections sont à apporter sur certains d'entre eux. Des mutagenèses sont donc réalisées afin de corriger les erreurs mais également de faire les modifications nécessaires pour permettre l'assemblage des différents fragments de PPRV 75/1. En effet, les clones 2, 3 et 4 ne peuvent être utilisés en l'état car aucun site de restriction n'est disponible pour un assemblage des trois segments entre eux. Nous avons donc décidé de créer un nouveau plasmide (pPMintPCRII) contenant ces 3 segments (chapitre 2.4.1.). Une première stratégie d'assemblage a été définie (Figure 9). Tout d'abord, de nombreuses difficultés sont apparues pour cloner l'insert « M-L » (issu de p17MLmut) dans pAssemblage2. En effet, il est difficile de couper avec les deux enzymes AgeI et RsrII du fait de la proximité de leurs sites. Une autre difficulté est d'introduire le petit fragment « RiboT7 » dans le plasmide pAssemblage3. Plusieurs conditions de ligation en faisant varier le ratio insert/vecteur ainsi que différentes types de bactéries compétentes ont été testées sans succès. Au vu de ces échecs répétitifs, nous avons décidé de modifier un peu la stratégie d'assemblage. Tout d'abord, il a fallu optimiser l'accès aux sites de restriction dans le polylinker que nous avons créé dans le plasmide de clonage pBKSmutMCS. Une mutagenèse est réalisée sur ce plasmide afin d'y insérer quelques bases notamment autour du site AgeI (obtention de pBKSmodifMCS, chapitre 2.4.3.3.). Au cours de cette deuxième stratégie (Figure 10), l'assemblage se déroule sans grande difficulté jusqu'au clonage du « RiboT7 », où le même problème que précédemment survient. Aucune colonie analysée après transformation ne contient cet insert. Il est difficile de cloner un petit fragment d'une centaine de pb dans un gros plasmide d'environ 12 kb. Entre temps, le plasmide pL-BKS-IREST7, contenant le gène L en entier accolé au ribozyme T7 terminator ayant été obtenu au laboratoire, nous choisissons donc de changer à nouveau la stratégie d'assemblage en utilisant ce plasmide (Figure 11). Cela nous permettra d'insérer en une seule fois, le « RiboT7 » et le gène de la polymérase. Un premier clone est obtenu

et amplifié en milieu liquide pour une midiprep d'ADN. Un échantillon de cette préparation d'ADN est envoyé à la société GATC-Biotech pour être séquencé pas à pas (« gene-walking »). La séquence consensus obtenue correspond en fait à celle du plasmide pAssemblage3. Apparemment, le clone n'était pas stable car après vérification il s'avère en effet que le profil enzymatique de la midiprep diffère de celle de la miniprep. Le clone n'étant pas stable, l'insert « L-RiboT7 » a été perdu au moment de la multiplication des bactéries. Le clonage est donc repris et le plasmide final pAssemblage4term a été finalement obtenu. En effet, malgré des colonies positives en PCR au moment du criblage, les profils enzymatiques à partir des minipreps d'ADN ne sont pas les bons. A chaque fois, il manque soit l'insert en entier, soit une partie de cet insert. Après avoir testé différents types de bactéries compétentes spéciales pour les gros plasmides et/ou les clonages difficiles, et en faisant varier les paramètres (température, milieu liquide ou solide, agitation, concentration en antibiotique) de culture des bactéries, un seul clone parmi près de 360 criblés est apparemment stabilisé. Il est séquencé à son tour par « gene-walking ». La séquence obtenue est à la bonne taille (15 948 pb) et respecte la règle « des six ». Cependant 28 bases diffèrent de la séquence de référence X74443. Parmi elles, huit modifient des codons (Figure 24). Deux sont dans le gène H, à la position 7 961 et 8 829 du génome de PPR ; six sur le gène L aux positions 9585, 11 551, 13 212, 13 924, 13 939 et 14 543.

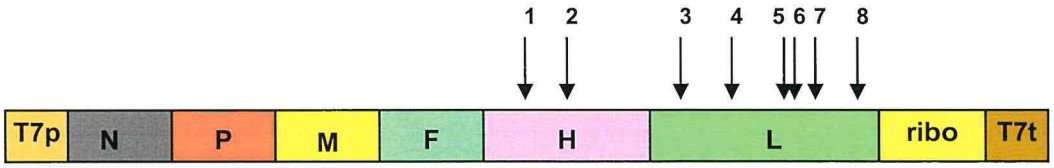


Figure 24 : représentation de PPRV cloné entre T7p et RiboT7. Après séquençage, 28 bases diffèrent de la séquence de référence X74443. Huit de ces erreurs modifient les codons : deux sur le gène H (1 à la position 7 961 et 2 à 8 829) et six sur le gène L (3 à 8 aux positions 9 585, 11 551, 13 212, 13 924, 13 939 et 14 543)

Après vérification, la séquence de pLPC est correcte, mais celle du plasmide pL-BKS-IREST7 contient les six erreurs observées sur le clone entier. La première idée est de remplacer la séquence L-PPRV 75/1 du plasmide final par celle contenue dans le plasmide pLPC. Mais cela s'avère très difficile car les sites uniques ne sont pas disponibles dans cette région pour faire ce changement. La seconde idée est de réaliser les mutagenèses nécessaires pour réparer ces erreurs en travaillant sur le plasmide pL-BKS-IREST7 pour

ensuite insérer le fragment « L modifiée-RiboT7 » dans le plasmide pAssemblage3 comme décrit dans la Figure 11. Les mutagenèses sont réalisées avec le « QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit » (Stratagène, France) selon les indications du fournisseur. Après une mutation, le séquençage est réalisé afin de s'assurer que la correction est bien faite et qu'il n'y a pas d'autres erreurs sur la séquence de la polymérase. Le plasmide obtenu sert alors de matrice pour la mutagenèse suivante. Les amorces utilisées pour modifier les bases sont détaillées dans le Tableau 13.

position	base à muter	amorces	Séquence des amorces
9 585	CGC→ AGC	mut 9598 F mut 9585 R	TTGTATCAAAGATAGCTGCATATCTAGGAAG CTTCCTAGATATGCAGCTATCTTTGATACAA
11 551	TCG→ TTG	mut 11551 F mut 11551 R	GTACTATACCTTACTTGTATCTGGCAGCCTATG CATAGGCTGCCAGATACAAGTAAGGTATAGTAC
13 212	GGA→ AGA	mut 13212 F mut 13212 R	GTGAGGGTTGCAAGATACACAACCATC GATGGTTGTGTATCTTGCAACCCTCAC
13 924 13 939	GAT→ GGT ACT→ ATT	mut 13924-39 F mut 13924-39 R	TTGGCGAAGTGGTGTAATTGAGCCGATTCATGGCCCATCC GGATGGGCCATGAATCGGCTCAATTACACCACTTCGCCAA
14 543	CAG→ CAC	mut 14543 F mut 14543 R	CTATGAAGTCCACGCTTATCGTAG CTACGATAAGCGTGGACTTCATAG

Tableau 13 : liste des amorces utilisées pour corriger la séquence de L-PPRV 75/1 par mutagenèse dirigée

Les bases 13 924 et 13 939 étant proches, leur correction est envisagée en utilisant les mêmes amorces. Après séquençage de plusieurs clones, aucun clone n'a une séquence corrigée à ces deux positions. Il est donc décidé de faire ces changements en deux temps. La mutation sur la base 14 453 est réalisée sur le plasmide contenant les bases 9 585, 11 551 et 13212 modifiées. Puis malgré plusieurs essais, aucune colonie n'est obtenue dans le cas de la mutagenèse dirigée sur la base 13 924 avec les amorces spécifiques mut 13924 F et mut 13924 R. Nous décidons alors d'appliquer une méthode traditionnelle de mutagenèse dirigée. Celle-ci consiste à utiliser des amorces dos à dos et phosphorylées. La première base à muter correspond à la première base de l'amorce sens. La PCR est réalisée avec une enzyme fiable et performante pour l'amplification de longs fragments, l'enzyme « Phusion » (Finnzymes, Ozyme, France) et les amorces sens mut13924Fphos ((Phos)GTGTAATTGAGCCGATTCATGGCCCATCC) et reverse mut13924Rphos ((Phos)CACTTCGCCAAAAT TTCTTGTAAAC). La transformation avec le plasmide muté est réalisée avec les bactéries

compétentes NEB10β (New England Biolabs, Ozyme, France). Après séquençage, la L-PPRV 75/1 obtenue est bien corrigée.

Le plasmide pLΔ-BKS-IREST7 peut alors être utilisé avec pAssemblage3 pour un nouvel assemblage du génome. De nombreux essais de clonage de « LΔ-RiboT7 » dans pAssemblage3 sont réalisés mais les clones obtenus ont toujours un problème de réarrangement. Suite à ces problèmes de stabilité de clonage en bactéries, nous pensons à changer de système et à utiliser un système de clonage en levure. Il faudrait tout d'abord insérer le segment « N-P-M-F-H » de pAssemblage3 dans le plasmide pYes2 (Invitrogen, France) qui peut se multiplier soit en bactéries soit en levures. Une fois pYesAss3 obtenu et pLΔ-BKS-IREST7 linéarisé, l'insertion du fragment « LΔ-Ribo » se fait par recombinaison homologue dans la levure après choc thermique [174].

3.5. Reconstitution d'un virus PPRV 75/1 infectieux

Les erreurs sur la séquence L dans le plasmide pAssemblage4term sont également présentes sur le pL-BKS-IREST7. Ce plasmide a été utilisé avec succès en essai fonctionnel du minigénome eGFP sur les cellules 293-T7 avec les gènes N, P et L sous pT7 ou pCMV. La fonctionnalité de la polymérase L-PPRV 75/1 ne semblait par trop affectée. Nous avons donc décidé de tenter d'obtenir le premier clone infectieux de PPRV 75/1 en utilisant le plasmide pAssemblage4term contenant le génome entier avec ses erreurs par rapport à la séquence initiale.

Les deux premiers essais de reconstitution du virus PPRV 75/1 sont réalisés par transfection soit sur des cellules 293-T7, soit sur des cellules Vero préalablement infectées avec du virus recombinant Fowlpox-T7. Soixante douze heures après la transfection, les cellules 293-T7 sont mises en co-culture sur des cellules Vero. Après trois passages successifs sur les cellules Vero, aucun ECP n'apparait. Il en est de même pour la transfection sur des cellules Vero infectées par le FP-T7. En effet, après quatre passages successifs, aucun ECP n'apparait dans les flacons de culture.

Un troisième essai de reconstitution du virus PPRV 75/1 est réalisé cette fois-ci sur des cellules Vero.DogSLAMtag [175, 176]. Effectivement, dans notre laboratoire il a été constaté que ces cellules sont plus sensibles à l'infection par le virus PPRV 75/1 (Zaheer Nizamani, communication personnelle). En effet, une production de la souche virale

vaccinale 75/1 sur ces cellules permet d'obtenir un titre plus élevé d'un Log que celle produite dans les mêmes conditions sur les cellules Vero. Nous tentons donc un essai de reconstitution du virus sur ces cellules en les infectant auparavant avec le virus recombinant FP-T7. Après trois passages sur les cellules Vero.DogSLAMtag, un ECP ténu apparaît (Figure 25). Le surnageant est récolté et sert d'inoculum pour infecter de nouvelles cellules Vero.DogSLAMtag. Huit à neuf jours après cette infection, des foyers similaires à des foyers de PPRV sur des cellules en culture apparaissent à trois endroits différents dans la boîte de culture. L'aspect des cellules est le même que celui observé lors du précédent passage (Figure 25).

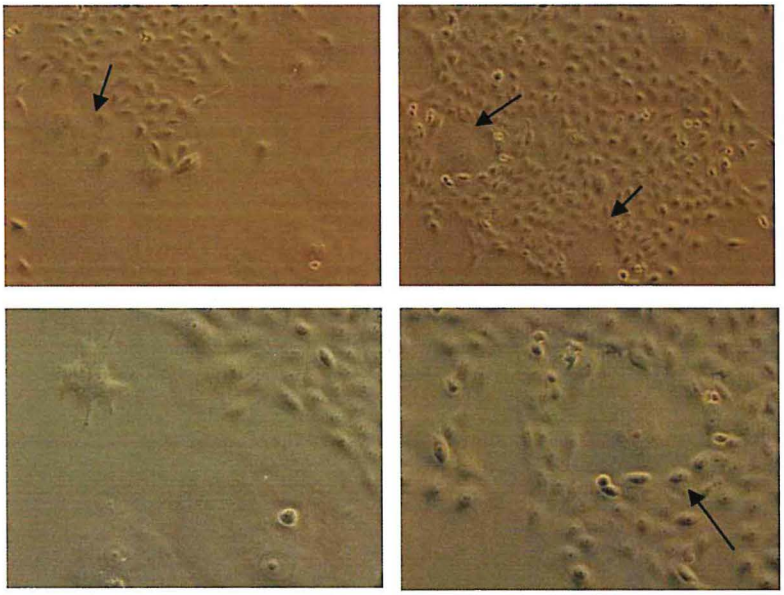


Figure 25 : Essai de reconstitution de PPRV 75/1 sur les cellules Vero.DogSLAMtag

De plus, les surnageants des différents passages sont analysés par RT-PCR. Une partie de l'ARN total extrait avec le RNeasy mini kit (Qiagen) est traité à la DNase afin d'éliminer toute trace éventuelle de plasmides utilisés pour la transfection. Le contrôle de la synthèse d'ADNc est fait par PCR spécifique du gène de ménage βactine. Tous les échantillons sont amplifiés (résultats non montrés). L'ADNc est ensuite amplifié par PCR avec des amorces spécifiques de N-PPRV 75/1 (NP3 et NP4) et d'H-PPRV 75/1 (HP46 et HP47). En parallèle, ces mêmes PCR sont menées directement sur les ARN. Les produits de PCR sont analysés sur gel d'agarose (Figure 24).

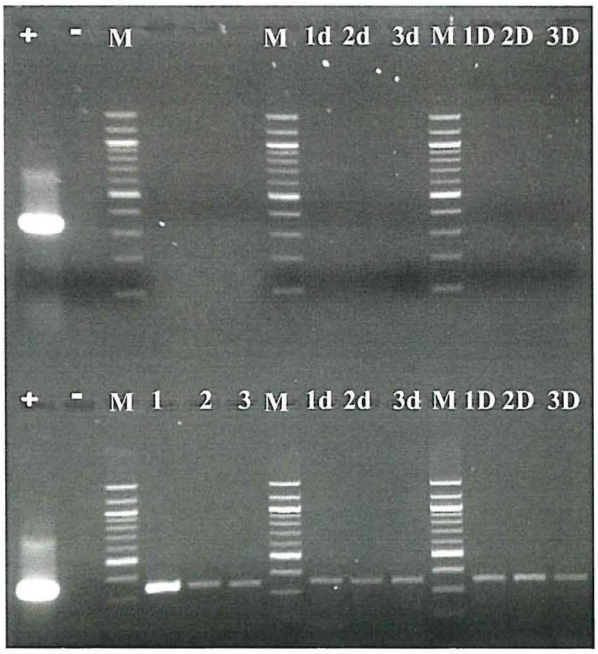


Figure 26a : PCR spécifique N-PPRV avec les amorces NP3 et NP4

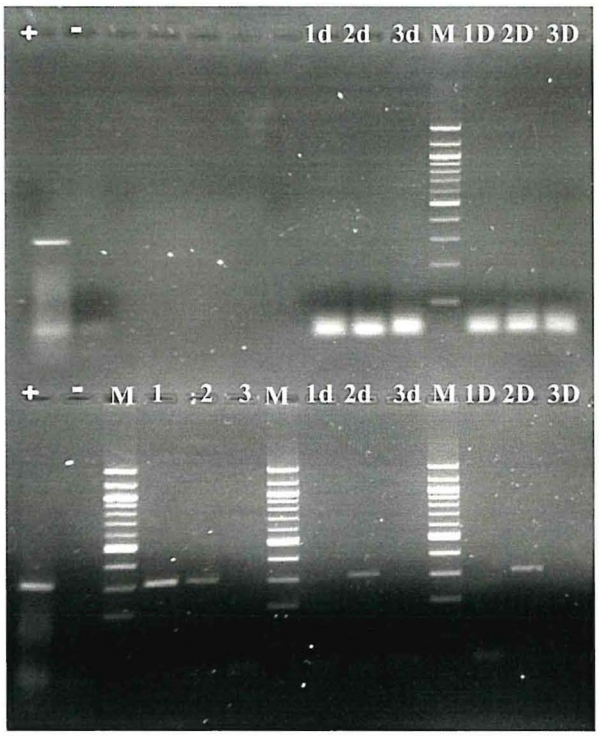


Figure 26b : PCR spécifique H-PPRV avec les amorces HP46 et HP47

Figure 26 : résultats des PCR sur les surnageants de différents passages du rescue sur les cellules Vero.DogSLAMtag. Légende : pour chaque photo, la ligne du haut correspond à une PCR directe sur ARN afin de vérifier la qualité, la ligne du bas à la RT-PCR. + : contrôle positif de PCR ; - : contrôle négatif de PCR ; **1** : surnageant du passage 3 ; **2** : surnageant du passage 4 ; **3** : surnageant du passage 5 ; **D** : ARN avec traitement à la DNase ; d : ARN dilué afin d'être dans les mêmes conditions que l'ARN traité à la DNase.

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

Aucune amplification n'est observée après PCR directe sur les ARN, ce qui indique qu'il n'y a pas de traces d'ADN plasmidiques dans les surnageants testés. Tous les échantillons sont amplifiés après réaction de RT-PCR spécifique de la N-PPRV. Seul le passage 5 n'est pas amplifié en PCR H-PPRV : peut-être que la quantité d'ARN est trop faible pour être détectée et la dilution de l'échantillon trop importante pour pouvoir détecté la H-PPRV par RT-PCR. Ces mêmes surnageants seront testés en RT-PCR en temps réel et titrés par immunofluorescence indirecte en comparaison avec la souche vaccinale initiale PPRV 75/1. Les essais de calibration de cette dernière expérience sont en cours actuellement au laboratoire, ainsi que la PCR en temps réel spécifique de H-PPRV.

3.6. Marquage du génome de la souche vaccinale PPRV 75/1

Le but de notre étude est de développer, par génétique inverse, un vaccin PPR marqué afin de pouvoir différencier par sérologie les animaux vaccinés des animaux infectés. Pour marquer le génome, nous avons exploré plusieurs possibilités : insertion d'une cassette d'expression d'un gène eGFP, délétion d'une partie de la N et substitution de la séquence d'un épitope hautement immunogène (peptide E) par une séquence alternative.

3.6.1. Marquage par insertion d'une cassette d'expression eGFP

Le but est ici d'insérer une cassette d'expression entre les gènes P et M de PPRV 75/1 en se basant sur les travaux menés par Walsh et al sur le virus de la peste bovine [117, 118]. Cette cassette est composée du gène eGFP encadré des séquences 5'UTR et 3' UTR de PPRV 75/1. La stratégie envisagée décrite dans la Figure 13 comporte plusieurs grandes étapes. L'aménagement du site de restriction AscI entre les gènes P et M pour faciliter l'insertion de la cassette est obtenu par deux mutagénèses successives sur le plasmide pPMintPCRII. L'insertion de l'eGFP est réalisée de façon classique par clivage enzymatique, ligation et transformation de bactéries compétentes. Le remplacement du segment « P-M » par « P-eGFP-M » dans pAssemblage4term n'a pas pu être mené à bien comme prévu initialement. Il faut revoir notre stratégie de clonage (Figure 27).

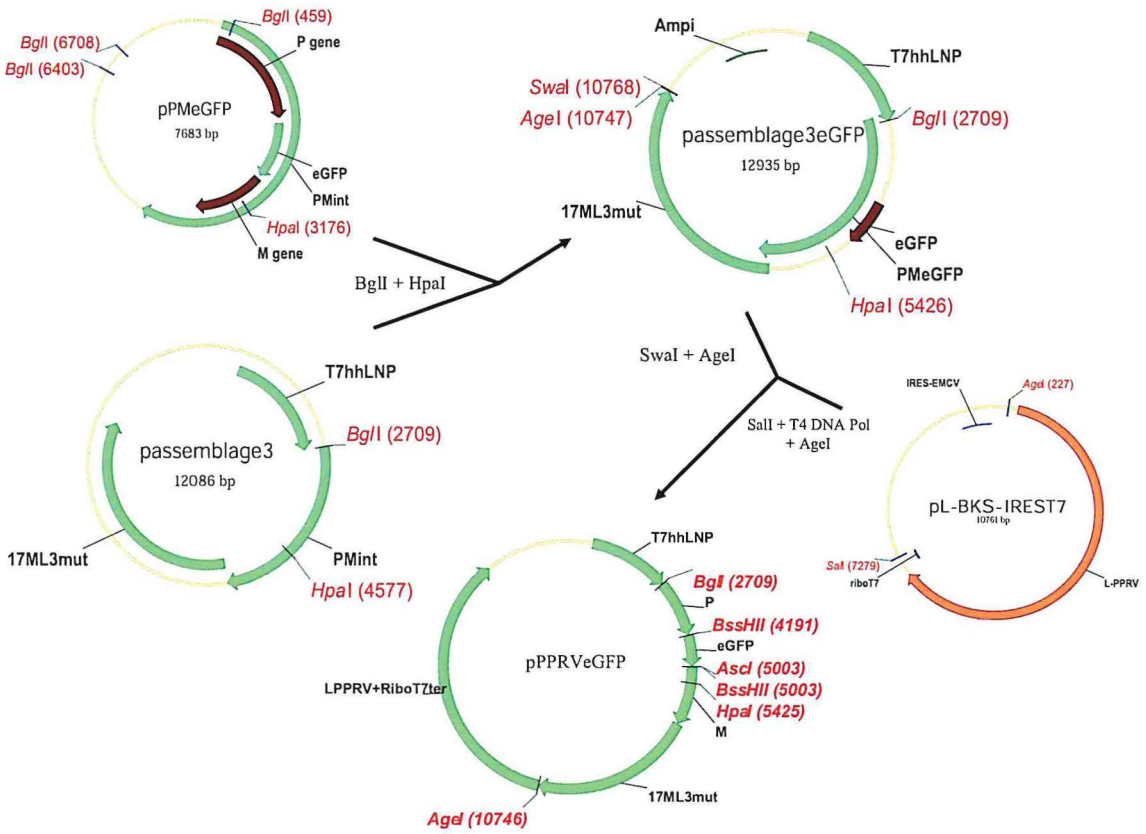


Figure 27 : Stratégie d'insertion de la cassette eGFP dans le génome de PPRV 75/1

Le segment « P-M » de pAssemblage3 est remplacé par « P-eGFP-M » puis le gène L réparé est introduit dans ce nouveau plasmide pour donner une nouvelle construction (pPPRVeGFP) contenant le génome entier marqué avec eGFP.

Tous les essais de clonage du segment « P-eGFP-M » dans pAssemblage3 ont été infructueux. Malgré l'obtention de colonies positives en PCR spécifiques eGFP lors du criblage des colonies après transformation, les clones ne sont pas stables en culture. En effet, l'analyse des minipreps d'ADN à partir des clones positifs en PCR montrent des profils enzymatiques différents de celui théoriquement attendu. Différents types de bactéries compétentes (Stbl3, XL10Gold, NEB10β) et électrocompétentes (ElectroTen-Blue, Stratagène, France) ont été testés ainsi que différentes conditions de culture des bactéries mais sans succès. Ces difficultés de stabilité de clones ralentissent l'obtention du plasmide final contenant la marque positive. Peut-être est-il préférable de revoir la stratégie de clonage elle-même et d'envisager de faire les constructions en système levure comme cela a été envisagé pour l'assemblage du génome entier.

3.6.2. Marquage par délétion

Notre travail se base sur l'étude de Bodjo *et al.* sur les différentes délétions dans le gène N de PPRV [166]. Le choix se porte sur une délétion faite dans la partie C terminale du gène entre 490 et 525 aa, soit une délétion de 35 aa. La délétion contient le peptide E portant un épitope potentiellement intéressant pour le diagnostic différentiel entre animaux vaccinés et infectés (voir chapitre suivant). Toutefois, la protéine N délétée est toujours reconnue en western-blot avec l'anticorps monoclonal anti-N-PPR 38-4, anticorps utilisé dans le test ELISA commercial actuel. Pour peu qu'une N ainsi délétée permette au virus vaccinal de se répliquer, le vaccin DIVA serait alors disponible. Avant de générer une telle délétion dans le génome entier de PPRV 75/1, il faut s'assurer de la fonctionnalité de la nucléoprotéine N délétée. Cette vérification est effectuée en utilisant la N délétée de 490 à 525 aa en génétique inverse avec le minigénome eGFP. La séquence N délétée dans le plasmide pNΔ(490-525) est clonée sous promoteur pCMV. Cette construction est testée avec les plasmides pPPC et pLPC et le minigénome eGFP sur les cellules 293-T7. Deux contrôles positifs sont réalisés en même temps : le premier correspond à la transfection des cellules avec le minigénome et les plasmides pNPC, pPPC, et pLPC, et le second aux cellules transfectées avec le minigénome et infectées avec le virus PPRV 75/1. Le contrôle négatif correspond à des cellules transfectées avec tous les plasmides sauf celui contenant la N. Quarante huit heures après la transfection, les cellules sont observées au microscope. Les cellules fluorescentes ne sont visibles que dans les puits où la ribonucléoprotéine non modifiée est présente (Figure 28).

Les résultats d'expression de fluorescence sont complétés par l'analyse des ARNm. Après RT-PCR, aucune amplification eGFP n'est détectée dans le cas où la nucléoprotéine N est délétée (résultat non montré). Une délétion de 35 acides aminés dans la séquence de N-PPRV 75/1 est apparemment trop importante pour que la protéine modifiée reste fonctionnelle et puisse jouer correctement son rôle dans le système réplicatif viral.

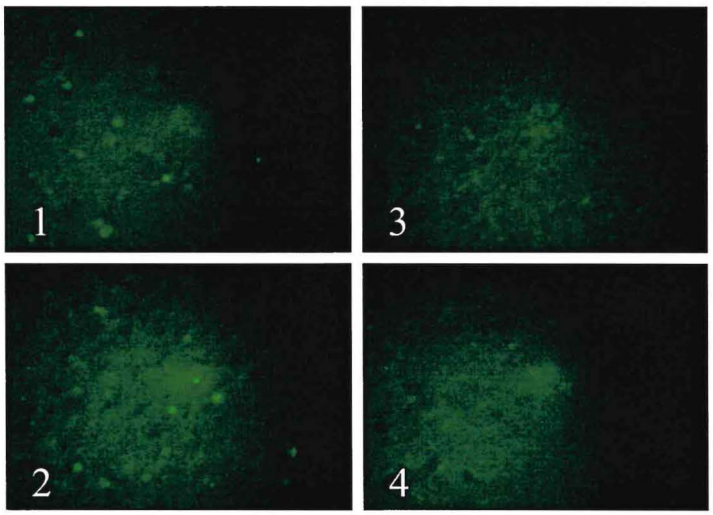


Figure 28 : Contrôle de la fonctionnalité en génétique inverse de N-PPRV 75/1 délétée avec le minigénome eGFP sur les cellules 293-T7. L'eGFP est exprimée uniquement dans les puits où une ribonucléoprotéine intacte est présente. 1 : premier contrôle positif : minigénome + pNPC + pPPC + pLPC ; 2 : second contrôle positif : minigénome + PPRV 75/1 ; 3 : essai : minigénome + pNΔ(490-525) + pPPC + pLPC ; 4 : contrôle négatif : minigénome + pPPC + pLPC sans N

3.6.3. Marquage par substitution

Le marquage par substitution est effectué sur une séquence définie comme hautement immunogène dans le zone C-terminale de la nucléoprotéine, au niveau d'un épitope ou peptide E, défini au cours de précédents travaux d'analyse par Pepscan conduits par G. Libeau (non publiés). Cette séquence peptidique immunogène sera substituée soit par une séquence ou Tag commercial, soit par la séquence homologue dérivée d'un autre morbillivirus.

3.6.3.1. Substitution par un Tag

Comme décrit au chapitre 2.6.3., notre choix des Tag a porté sur trois séquences : Flag, C-myc et protéine C. Avant de commencer tout travail de construction moléculaire, il fallait vérifier l'immunogénécité de ces peptides chez la chèvre. Ceci permettra alors de sélectionner parmi ces trois candidats, le marqueur le plus intéressant pour l'obtention d'un vaccin marqué. Les chèvres reçoivent deux injections de 1 mg de peptide à trois semaines d'intervalle. Les sérums sont récoltés chaque semaine et analysés par test ELISA. Celui-ci a été mis au point en suivant la démarche déjà développée au laboratoire pour d'autres antigènes [24, 31, 32]. L'analyse des animaux immunisés s'effectue en cinétique avec un prélèvement environ toutes les trois semaines et chaque sérum est testé en dilution (Figure 29).

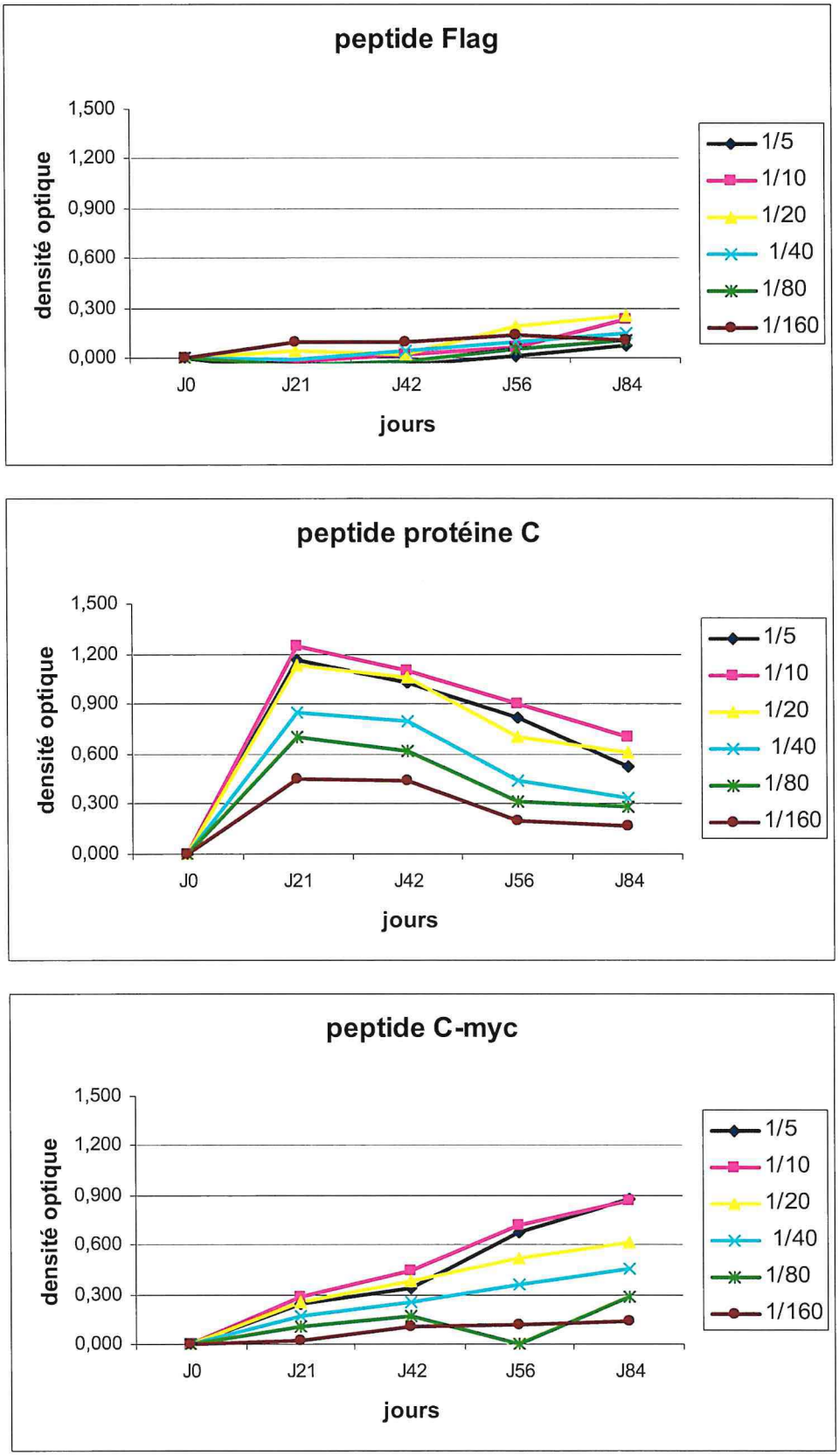


Figure 29 : Résultats des ELISA peptides avec les sérums de chèvres ayant reçu les Tag Flag, protéine C et C-myc.

Les résultats obtenus après analyse des sérums par ELISA, montrent que le peptide Flag n'est pas un bon candidat. En effet, la production par la chèvre d'anticorps anti-Flag n'est pas importante. Pour le Tag protéine C, la production d'anticorps est forte au bout de 21 jours puis tend à diminuer progressivement au cours du temps. Pour le Tag C-myc, la présence d'anticorps est progressive et plus soutenue au cours du temps. La meilleure dilution pour le test C-myc est 1/10. Ces deux derniers Tag semblent être de meilleurs candidats pour la suite des opérations de marquage du vaccin.

3.6.3.2. Substitution par une séquence homologue d'un autre Morbillivirus

Le remplacement du peptide E de PPRV 75/1 par la séquence correspondante d'un autre morbillivirus doit permettre de marquer le vaccin tout en restant le plus proche possible d'un fond génétique morbillivirus. Cela peut permettre de limiter les conséquences fonctionnelles d'une telle modification du génome. Cependant, la modification doit être suffisante pour qu'elle ait une incidence sur l'antigène utilisé dans le diagnostic. Dans ce but, il est important de choisir un morbillivirus suffisant éloigné de PPRV afin d'éviter les réactions croisés : ainsi notre choix a-t-il exclu d'emblée la séquence du virus de la rougeole et celle du virus de la peste bovine. Il s'est porté sur les séquences du virus de la maladie de Carré (CDV, peptide 2), du virus du phoque (PDV, peptide 3), celui de morbillivirus du dauphin (peptide 4). En outre, une séquence chimère reprenant les acides aminés les plus représentés chez les différents morbillivirus (peptide 1) a été également définie et synthétisée. Afin de générer des anticorps polyclonaux contre les différents peptides morbillivirus d'intérêt, notamment pour leur utilisation comme sérum de contrôle positif dans les futurs tests DIVA, les peptides synthétisés ont été injectés à des lapins et les sérums récoltés sont testés par ELISA. L'expérience est réalisée en comparaison avec le peptide E. Les résultats sont présentés dans la Figure 30.

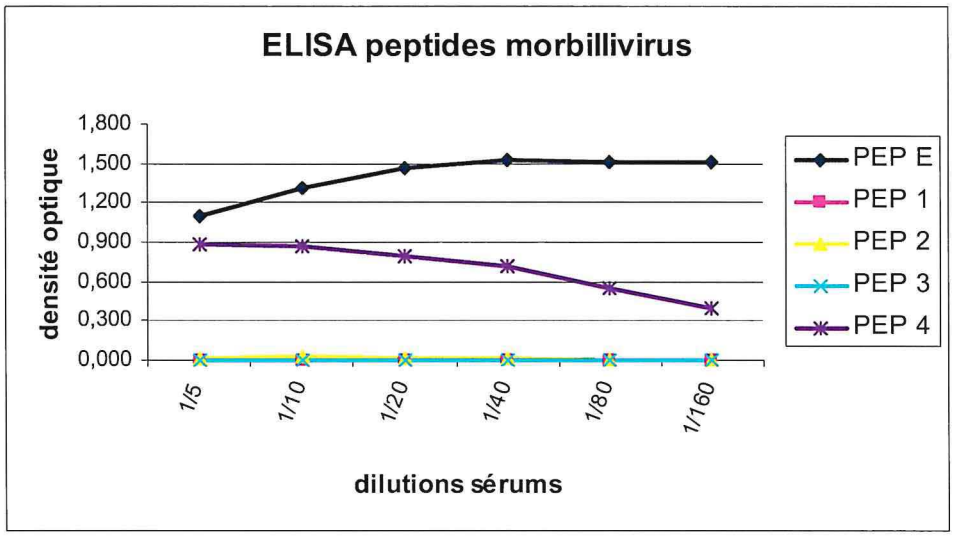


Figure 30 : Résultats des tests ELISA avec les peptides morbillivirus

Seul le lapin ayant reçu le peptide 4, c'est-à-dire celui du morbillivirus de dauphin, a produit des anticorps. Notre choix s'orientera donc vers l'utilisation de la séquence du virus du dauphin après avoir vérifié que ce peptide est également immunogène chez la chèvre (comme pour les tags commerciaux). Ce peptide viendra alors en substitution de la séquence du peptide E de PPRV 75/1.

3.6.3.3. Criblage des sérums de chèvres et moutons

Le choix des marqueurs potentiels pour une substitution s'est porté sur le Tag C-myc ou la protéine C ainsi que sur le peptide de morbillivirus du dauphin (peptide 4), dont la séquence correspond à celle du peptide E de PPRV 75/1. Avant de remplacer cette séquence par un de ces Tag, il faut vérifier que les sérums de chèvre négatifs et positifs en PPR ne croisent pas en ELISA avec ces peptides. Près de 400 sérums d'animaux (négatifs et positifs en PPRV) disponibles au laboratoire de virologie ont été criblés en ELISA avec les différents peptides C-myc, protéine C et peptide 4 en comparaison avec le peptide E. Après analyse, les sérums positifs en PPRV réagissent bien avec le peptide E, confirmant la pertinence de ce peptide pour le test ELISA développé au laboratoire de virologie. Aucun de ces sérums positifs en PPR n'interagit avec les trois peptides choisis. Les sérums négatifs restent bien négatifs en ELISA quel que soit le peptide utilisé pour l'essai (C-myc, protéine C, peptides 4 et E).

Le choix du peptide 4, du C-myc et de protéine C comme marqueur potentiel du vaccin PPR semble être un bon choix. Mais avant de marquer le génome entier avec un de ces trois Tag, il faut vérifier que la nucléoprotéine N modifiée reste fonctionnelle. Pour cela il faut remplacer sur le gène N-PPRV 75/1 (dans pNPC ou pN-BKS-IREST7) la séquence du peptide E par celle du Tag ciblé. Ces trois nouvelles constructions seront ensuite utilisées en essai minigénome eGFP comme cela a été fait pour tester la fonctionnalité de N-PPRV 75/1 délétée de 35 aa.

4. DISCUSSION et PERSPECTIVES

Clonage, expression et validation de la polymérase PPRV en génétique inverse

Le premier objectif de ce travail de recherche consistait à mettre en place au laboratoire de virologie et à valider la technique de génétique inverse appliquée au virus de la peste des petits ruminants, plus particulièrement à la souche vaccinale PPRV 75/1. A l'aide d'un modèle minigénome exprimant la protéine de l'eGFP, le travail réalisé au cours de cette thèse nous a permis d'étudier la structure de la protéine L de la souche de PPRV 75/1 et de montrer sa fonctionnalité en génétique inverse de l'eGFP. La protéine L est, parmi les protéines virales des virus à ARN négatif simple brin, la plus longue et la moins abondante. Son poids moléculaire varie de 200 à 250 kDa. Elle porte les fonctions nécessaires à la réplication de l'ARN génomique et à la transcription, incluant les fonctions de coiffage de l'ARNm, de méthylation, de terminaison et de polyadénylation. La polymérase de la souche vaccinale PPRV 75/1 est composée de 2183 acides aminés, comme celle des morbillivirus de rougeole, de peste bovine et du morbillivirus de dauphin [140, 157, 177]. Par contre, elle contient un codon de plus que les deux autres morbillivirus : la maladie de Carré et le morbillivirus des phoques [178, 179].

L'arbre phylogénétique obtenu par l'alignement des différentes polymérases L de morbillivirus confirme les alignements générés auparavant sur d'autres gènes viraux comme N, M et F [7, 11, 180, 181]. Les morbillivirus sont plus proches de Tupaia et Henipavirus que les autres paramyxovirus. La protéine L est bien conservée au sein des morbillivirus, le plus faible pourcentage étant entre le virus da la maladie de Carré et celui de la peste des petits ruminants (71%). Cette protéine est constituée de trois domaines très conservés séparés par des régions charnières moins conservées, contrairement aux autres virus de la famille des *Paramyxoviridae* pour lesquels six domaines conservés ont été décrits [155, 178]. Des délétions et/ou mutations sur la protéine L des virus à ARN négatif ont montré que les différents domaines avaient un rôle dans les différentes fonctions de la protéine. L'analyse bioinformatique réalisée dans cette étude sur la L-PPRV 75/1 a permis de replacer plusieurs motifs (comme celui du site de liaison avec l'ARN ou celui des liaisons phosphodiesters) par comparaison à d'autres virus à ARN (Figure 3 de l'article Minet *et al.*, 2009). Ces différents motifs trouvés sur la L-PPRV 75/1 sont bien conservés sur les séquences de la polymérase des autres morbillivirus. La protéine L ne peut fonctionner que si elle est associée à la phosphoprotéine P. La région N-terminale de la protéine L est hautement conservée au sein des paramyxovirus. La délétion de ce segment

entraîne une perte de l'activité de synthèse de l'ARN. Chez les paramyxovirus, la séquence protéique entre les acides aminés 9 et 21 (ILYPEVHLDSPIV) est impliquée dans l'interaction entre P et L, nécessaire à la stabilisation de la polymérase [182-184]. Sur les souches virales de PPR, cette séquence a la particularité d'échanger le I du début par un V. Ces deux acides aminés sont hydrophobes et cette substitution n'est pas considérée comme pouvant avoir un impact sur la fonction du motif. Mais pour s'assurer de cela, il faudrait pouvoir comparer les deux séquences l'une avec le I, l'autre avec le V. Seule, la génétique inverse permettrait d'élucider cette question.

Nous avons montré que la polymérase L-PPRV 75/1 est fonctionnelle dans le système de génétique inverse du virus de la peste des petits ruminants. En effet, la présence de la fluorescence eGFP dans les cellules et la détection d'ARNm spécifique eGFP sont bien dues à au fonctionnement du minigénome eGFP dans un contexte PPR et donc à l'efficacité de la ribonucléoprotéine (RNP) reconstituée *in vitro*. L'efficacité de la L est à peu près équivalente à celle du virus lorsqu'il est testé avec le minigénome eGFP et le meilleur ratio N : P : L est défini comme étant celui de 20 : 20 : 1. La mise évidence de la fonctionnalité de la L-PPRV 75/1 grâce à la génétique inverse et le minigénome eGFP était une étape importante dans la reconstitution du premier clone infectieux du virus de la PPR. En outre, les étapes de clonage de la L-PPRV ont produit quelques mutations par rapport à la séquence originale du virus PPRV 75/1 que nous avions établie précédemment (GenBank, numéro d'accession X74443). Le fonctionnement de cette L-PPRV avec un rendement quasi équivalent à celui du virus original nous permet de conclure que les mutations introduites de façon non intentionnelle n'impactent pas sur l'efficacité de la polymérase virale.

Assemblage du génome PPRV et essais de reconstitution d'un virus infectieux par génétique inverse

Pour générer le premier clone infectieux du virus de la peste des petits ruminants à partir de l'ADNc cloné, il fallait tout d'abord assembler le génome entier de la souche virale vaccinale PPRV 75/1. Les six clones disponibles au laboratoire de virologie recouvrent l'ensemble du génome viral de la souche vaccinale PPRV 75/1. De nombreuses difficultés techniques ont été rencontrées lors du clonage des 16 kb du génome viral dans un plasmide pBluescript. Un clone plasmidique stable a finalement été obtenu. Cependant, après séquençage complet de ce clone, des mutations ont été notées.

Sur les 15948 bases que compte le génome de PPRV 75/1, 28 bases diffèrent de la séquence de référence X74443. Parmi ces 28 mutations, 20 sont silencieuses, c'est-à-dire qu'elles ne modifient pas l'acide aminé traduit. Les 8 autres ne sont pas silencieuses et sont réparties sur le génome comme suit : deux sont situées sur le gène H (à la position 7961 et 8829 sur le génome complet) et six sur le gène L (aux positions 9585, 11551, 13212, 13924, 13939 et 14543 sur le génome complet). Nous avons déjà vu que les mutations présentes sur la L n'affectaient pas la fonction de la protéine *in vitro*. Aussi, des essais de reconstitution du virus PPRV 75/1 par génétique inverse à partir du clone plasmidique ont été tentés. Réalisés soit sur des cellules Vero infectées avec le virus recombinant FP-T7, soit sur des cellules 293-T7, ils sont tous restés infructueux. En parallèle, des essais ont été conduits en système réplicatif rougeole. Menés au laboratoire de génomique virale et vaccination de l'Institut Pasteur de Paris (laboratoire de F. Tangy), ils consistent à co-transfecter le génome de PPRV 75/1 et le plasmide contenant la L de rougeole sur des cellules 293-3-46, exprimant de façon stable non seulement l'ARN T7 polymérase mais aussi les protéines N et P de rougeole. Ce système avait permis dans un premier temps de valider la fonctionnalité du minigénome eGFP PPRV (avant confirmation de la fonctionnalité du minigénome en système 100% PPR). Notre objectif était d'augmenter les chances d'obtenir le clone infectieux PPR, en utilisant un système rougeole maîtrisé et pratiquement utilisé en routine dans le laboratoire de l'Institut Pasteur pour générer des virus modifiés par génétique inverse. Cependant, aucun résultat probant n'a été obtenu.

Dans une ultime tentative, de nouvelles cellules acquises au laboratoire du CIRAD ont été mises en œuvre. Il s'agit des cellules Vero.DogSLAMtag. Elles ont la particularité d'exprimer à leur membrane le récepteur CD150 (ou SLAM) qui permet la fixation du virus (plus particulièrement de la protéine H). Une fois le virus lié à la cellule par le pont H-CD150, la protéine de fusion F intervient pour permettre la fusion des membranes virale et cellulaire. La nucléocapside est ensuite libérée dans le cytoplasme de la cellule. Si le récepteur SLAM est disponible sur la membrane de la cellule, la liaison du morbillivirus avec cette dernière est plus forte : c'est le cas des virus de la rougeole, de la peste bovine et de la maladie de Carré avec ou sans spécificité d'espèce pour le récepteur SLAM [16, 28, 185, 186]. Malgré la différence de séquence des virus, la structure nécessaire pour l'interaction des protéines d'enveloppe de morbillivirus est bien conservée sur les séquences SLAM des différentes espèces. Des cellules SLAM ont déjà été utilisées

pour générer par génétique inverse un clone infectieux de rougeole [176]. Ces cellules infectées par le virus recombinant vTF7-3 ont permis d'augmenter le rendement jusqu'à près de 100 fois par rapport au système de génétique inverse précédent [67]. Nous avons donc choisi de tester ces cellules pour générer le virus PPR, en estimant que la présence des récepteurs SLAM faciliterait les premiers cycles d'infection/réplication du premier virus reconstitué et augmenterait ainsi les chances de succès. Les premiers essais d'utilisation de ces cellules Vero.DogSLAMtag au laboratoire avaient montré qu'une production de virus PPRV 75/1 avait un titre augmenté d'environ 1 Log par rapport à celle menée en parallèle sur les cellules Vero (Zaheer Nizamani, communication personnelle). Cela confirme les travaux de Nielsen et son groupe [187] qui démontrait une différence importante pour l'isolement et la multiplication du morbillivirus de dauphin ou du phoque sur les cellules Vero.DogSLAMtag par comparaison aux cellules Vero « classiques » [187].La réplication est bien plus rapide sur les Vero.DogSLAMtag et les titres viraux augmentés. L'utilisation de ces cellules SLAM apporte une amélioration conséquente pour l'isolement viral réalisable sur une période plus courte avec un rendement plus important par rapport à l'utilisation des cellules classiques [187]. Un essai de reconstitution du virus PPRV 75/1 a donc été réalisé sur les cellules Vero.DogSLAMtag. Après transfection des cellules infectées avec le virus recombinant FP-T7 et plusieurs passages successifs en cellules, un ECP est apparu.

L'ECP observé diffère un peu de celui habituellement observé sur les cellules Vero. Des gros syncytia se forment (présence de vacuoles polynucléées). L'analyse des surnageants de culture aux différents passages par RT-PCR confirme la présence d'ARN viral dans les cellules. Toutefois, les résultats de titrage viral par immunofluorescence indirecte ne permettent pas de conclure sur la présence d'un virus de façon certaine. Malgré les incertitudes sur la présence du premier clone infectieux dans nos cultures, ces premiers résultats ont été les plus encourageants de ces derniers mois. En l'occurrence, le système de génétique inverse que nous avons mis en place au laboratoire de virologie sur ces cellules Vero.DogSLAMtag semble être plus prometteur que les techniques traditionnelles sur cellules Vero ou 293-T7. En outre, sous réserve que la présence du virus soit définitivement confirmée, il semble que le phénotype de ce virus ait évolué par rapport à la souche vaccinale parentale : ECP moins invasif avec plus de gros syncytia. Il est encore prématuré de dire si ces modifications phénotypiques sont déterminées par les mutations générées dans l'ADNc génomique. Elles permettent toutefois d'exclure la

possibilité d'une contamination de nos cultures cellulaires par le virus parental, ce que nous pourrons également confirmer par la mise en évidence des signatures génétiques spécifiques du clone produit. Toutefois, en dehors de l'incertitude de la présence du premier clone infectieux dans nos derniers essais de reconstitution, une grande inconnue demeure : les modifications génétiques et phénotypiques portées par le clone sont-elles susceptibles d'affecter sensiblement la capacité de réplication du virus, le rendant par la suite peu compatible avec une production de vaccin à large échelle ? Si l'innocuité de la souche vaccinale parentale est parfaitement établie, qu'en sera-t-il au juste du comportement de cette souche chez l'animal ? Résoudre les inquiétudes que sous-entendent ces questions, c'est déjà accepter la nécessité de corriger les mutations indésirables. Pour cela, nous avons très rapidement envisagé de « réparer » la séquence du gène L-PPRV 75/1 par mutagenèse dirigée puis d'assembler à nouveau le génome entier. Pour des raisons de facilité d'utilisation des kits de mutagenèse dirigée et des enzymes ADN polymérases utilisées en PCR, les erreurs ont été réparées sur la séquence de L contenue dans le plasmide pL-BKS-IREST7. L'assemblage du gène L au reste du génome de PPRV 75/1 suit la stratégie établie au préalable. Mais un problème technique existe toujours dans l'obtention du clone PPRV 75/1 en entier. En effet, malgré le criblage de plusieurs centaines de colonies, les nombreux tests de différentes bactéries compétentes et de conditions de culture, les clones obtenus ne sont pas stables. Ces problèmes de stabilité n'étaient *a priori* pas attendus dans le modèle PPR, puisque plusieurs clones infectieux de morbillivirus ont été générés par le passé (rougeole, peste bovine, maladie de Carré). La séquence du génome du virus PPR peut-elle être responsable de ces difficultés particulières ? Nous pouvons le penser, car une équipe britannique rompue à l'obtention de clones infectieux de virus de la peste bovine, semble également peiner à générer un clone infectieux PPR. Cette équipe n'a pour l'instant réussi qu'à générer des virus chimères avec une ossature peste bovine et la substitution de certains gènes avec ceux du virus de la PPR [41, 54].

Pour essayer de contourner cette problématique particulière, nous avons envisagé plusieurs possibilités. La première consiste à changer le système dans lequel s'effectue le clonage, c'est-à-dire de passer d'un système bactérien à un système levure. La levure peut permettre de cloner de façon plus stable des gros fragments et les réarrangements sont beaucoup plus limités. Nous avons donc commencé à cloner une partie du génome dans un plasmide pYes2 (Invitrogen, France) contenant un promoteur de levure. La séquence

du gène L dans le plasmide pL-BKS-IREST7 contient des séquences communes avec le plasmide pYESassembl3. L'insertion d'un plasmide étranger dans la levure se fait par choc thermique [174]. La séquence L réparée et linéarisée s'insère à la suite du génome par recombinaison homologue. Cette technique est utilisée en routine par P.O. Vidalain [188-190] au laboratoire de génomique virale et vaccination de l'Institut Pasteur de Paris dans l'équipe de F. Tangy, notamment pour l'étude de la fonction de certaines protéines virales, l'obtention de clone de rougeole modifiée et leur utilisation en génétique inverse [188, 189]. La mise en place d'un tel système ici au laboratoire de virologie serait non seulement un atout méthodologique supplémentaire mais nous permettrait de manipuler plus aisément le génome viral de la souche vaccinale PPRV 75/1 et d'y faire plus facilement les insertions délétions ou substitutions nécessaires au marquage du vaccin PPR, but final de ce projet. Les premiers essais de clonage du segment « N-P-M-F-H » dans le plasmide pYes2 sont actuellement en cours au laboratoire. Dans l'hypothèse où cette stratégie ne serait pas efficace, une autre piste pourrait consister à segmenter le génome viral de la souche PPRV 75/1 en s'inspirant des travaux réalisés sur le virus de la rougeole [175]. En effet, un clone infectieux a été obtenu par génétique inverse en utilisant un génome fractionné. En théorie, la segmentation du génome des *Mononegavirales* permettrait non seulement de supprimer les limites de manipulation dues à la longueur du génome mais aussi de diminuer l'effet d'atténuation dû au gradient de la transcription. Dans cette étude, deux clones infectieux de rougeole ont été produits par génétique inverse sur des cellules exprimant de façon stable le récepteur humain SLAM infectées avec le virus recombinant de la vaccine vTF7-3. Le premier cloné a été généré à partir de deux segments du génome viral : « N-P-M-F » marqué avec de DsRed2 et « H-L » marqué avec eGFP. Le second clone a été obtenu à partir de trois segments du génome : « N-P » marqué avec β-galactosidase, « M-F » marqué avec DsRed2 et « H-L » marqué eGFP. La reconstitution de particules virales infectieuses à partir de ces génomes fragmentés s'est avérée efficace. Dans le cas du génome coupé en deux, les deux segments sont essentiels pour que la transcription et la réplication aient lieu. Dans les cas où le génome est partagé en trois, le premier et le troisième segment sont importants pour la transcription et la réplication ; le deuxième porte les protéines de matrice M et de fusion F utiles pour l'assemblage du virion et la fusion de cellule à cellule. Dans les deux cas, les virus obtenus se répliquent bien sur les cellules B95a et produisent des cellules géantes multinucléées exprimant à la fois de la fluorescence verte (eGFP) et rouge (DsRed2). De

plus, pour le virus obtenu à partir des trois fragments, une activité β-galactosidase dans les cellules est observée.

Stratégie de marquage du génome PPRV

Le but final de ce projet est d'obtenir un vaccin marqué PPR. Le marquage du génome viral de la souche vaccinale PPRV 75/1 a été envisagé de trois manières différentes : par insertion d'une cassette d'expression eGFP entre les gènes P et M de PPRV 75/1 ; par délétion d'un morceau de la séquence du gène N ou bien par substitution d'un morceau de séquence dans la partie C-terminale du gène N par une autre séquence.

Le gène codant pour la protéine eGFP a été inséré dans le génome de certains virus à ARN négatif non segmenté comme dans le génome du virus de la peste bovine [117], de la maladie de Newcastle [114], de la maladie de Carré [164], de la rage [191], du virus Nipah [115] ou du virus parainfluenza humain de type 3 (hPIV-3, [192]). L'insertion de la protéine eGFP dans le génome viral peut avoir deux intérêts : étudier le rôle et la fonction de certains gènes ou régions du génome viral [191-193] et marquer le génome d'une souche vaccinale dans le but de valider une approche de vaccin marqueur permettant ainsi de différencier sur un plan sérologique les animaux vaccinés de ceux infectés [117]. A titre d'exemple, Liu et son équipe [191] ont pu démontrer, après insertion de l'eGFP dans le virus de la rage, que la région pseudogène (psi) pouvait transporter et exprimer des gènes étrangers et se comporter comme une unité fonctionnelle indépendante de l'assemblage viral. Tout récemment, en médecine humaine, l'eGFP insérée dans le génome viral du parainfluenza humain de type 3 (hPIV-3) a permis de tester *in vitro* un certain nombre d'antiviraux [192]. L'insertion du gène étranger peut se faire à différents endroits dans le génome. Le taux d'expression de la protéine dépend alors de sa position dans le génome et est tributaire du gradient de transcription. Le gène à exprimer peut être inséré entre les glycoprotéines F et H (virus de la maladie de Newcastle, [114] ou entre les protéines N et P (virus Nipah, [115]). L'eGFP a aussi été inséré en amont du gène de la nucléoprotéine, entre la séquence du leader et du gène de la nucléoprotéine N du virus de la maladie de Carré (CDV, [164]) et du parainfluenza humain de type 3 (hPIV-3, [192]). Dans ce dernier cas, l'auteur a montré que la position du gène eGFP en amont du génome avait des répercussions sur le taux de transcription. En effet, plaçant ainsi le gène étranger comme premier gène du génome, il est fortement exprimé et les protéines suivantes N et P, qui ont un rôle important dans le complexe de la ribonucléoprotéine, ne sont plus suffisamment exprimées. Positionner le gène étranger entre les gènes P et M du génome viral semble ne pas compromettre l'efficacité de la ribonucléoprotéine, les protéines N et

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

P étant alors exprimées normalement. Toutefois, le gène étranger est exprimé en quantité suffisante pour être détecté et induire une réponse anticorps [117, 194]. Récemment, le gène L1 du virus du papilloma humain type 16 (HPV-16) a été inséré dans le génome de la souche vaccinale de rougeole entre les gènes N et P. Le virus recombinant obtenu induit une réponse immunitaire humorale chez la souris à la fois contre la rougeole et contre la protéine L1 du virus papilloma [194]. Le virus de la rougeole est ici utilisé comme vecteur viral pour la production de vaccins multivalent, en l'occurrence dans ce cas, un vaccin préventif dans le développement d'un carcinome lié au papilloma virus. L'insertion d'un gène étranger dans le génome viral d'une souche vaccinale peut également servir à marquer le vaccin afin de pouvoir faire la distinction sur le plan sérologique entre les individus vaccinés et ceux infectés. Ainsi, le gène eGFP a été inséré entre les gènes P et M d'une souche vaccinale de peste bovine [117]. Le virus recombinant obtenu par génétique inverse a été utilisé dans des essais de vaccination sur bovins et caprins. Les animaux vaccinés ont produit une réponse anticorps contre la peste bovine mais aussi contre l'eGFP. De plus, ce vaccin marqué protège les animaux après une épreuve virulente : protection contre la peste bovine pour les bovins et contre la peste des petits ruminants pour les chèvres, du fait des réactions croisées entre les deux maladies. L'utilisation d'un vaccin peste bovine marqué eGFP pour protéger les animaux de la peste des petits ruminants n'est cependant pas directement envisageable, pour deux raisons. L'expression d'un gène eGFP, protéine fluorescente, chez un animal destiné à la consommation humaine pose des questions de sécurité sanitaire. Ce traceur reste donc un modèle permettant de valider en conditions expérimentales, un certain nombre d'hypothèses. Il doit être ensuite remplacé par un traceur plus anodin. Par ailleurs, la peste bovine fait l'objet d'un programme mondial d'éradication. A terme, tous les virus de la peste bovine, qu'ils soient virulents ou atténués devront être sous stocks contrôlés dans un petit nombre de laboratoire autorisés. Il est donc peu probable qu'une souche vaccinale modifiée soit autorisée à être utilisée sur le terrain. Il vaut donc mieux développer un vaccin peste des petits ruminants marqué, ce qui est notre objectif final. Dans un premier temps et pour valider l'approche, nous nous sommes inspirés des travaux de Walsh pour insérer le marqueur eGFP dans le génome de la souche vaccinale PPRV 75/1. Les constructions plasmidiques ne sont pas complètement achevées, car la difficulté réside dans l'assemblage final du génome viral (problèmes de stabilité non résolus). La possibilité de cloner le génome entier, marqué et non marqué, dans un système levure nous laisse espérer de pouvoir utiliser bientôt ce virus recombinant marqué pour des essais *in vivo*.

Cela nous permettra de vérifier que ce type de vaccin permet d'induire chez les animaux des anticorps non seulement contre la peste des petits ruminants mais aussi contre un marqueur. De plus, ce virus recombinant servira de modèle dans d'autres recherches menées au laboratoire de virologie, notamment sur les antiviraux et l'étude des déterminismes génétiques de la virulence. Comme nous l'avons vu, l'utilisation sur le terrain d'un vaccin marqué avec une protéine fluorescente eGFP n'est pas éthiquement envisageable. En revanche, un vaccin marqué par délétion ou par substitution d'un épitope reste possible. Pour cela, nous avons appuyé nos premiers travaux sur ceux réalisés par Bodjo et al [165, 166]. Ceux-ci démontraient qu'une délétion (421-490 ou 421-521 aa) dans le gène de la nucléoprotéine N n'empêchait pas son autoassemblage en présence d'ARN et la reconnaissance de la protéine par l'anticorps anti-N-PPR 38-4 utilisé dans les kits de diagnostic PPRV. Toutefois, les essais réalisés dans le cadre de ce travail de thèse ont montré que cette délétion importante (490-525 soit 35 aa) dans la région C-terminale de la nucléoprotéine de PPRV 75/1 n'était pas fonctionnelle en génétique inverse avec le minigénome eGFP. Déjà en 2002, Mebatsion *et al.* [123] démontrait qu'une délétion de 48 acides aminés dans la région C-terminale du gène de la nucléoprotéine NP du virus de la maladie de Newcastle (NDV) ne permettait pas de reproduire des virus infectieux. Pour modifier la N, il faut donc envisager des délétions moindres ou bien de substituer une fraction de séquence par une autre. En effet dans cette même étude [123], la délétion de 12 ou 18 aa dans la zone d'un épitope immunogène ou bien la substitution de ce dernier par une autre séquence n'empêchait pas la reconstitution de particules virales infectieuses. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur le remplacement de l'épitope du peptide E, situé dans la zone C-terminale de la nucléoprotéine N. Ce peptide a été identifié au laboratoire comme étant immunogène et spécifique du virus de la peste des petits ruminants (résultats en cours de publication). Il a été utilisé en ELISA pour détecter de façon spécifique des animaux infectés par la PPR et pas ceux infectés par le virus de la peste bovine. Nous avons opté pour substituer cette séquence par une autre, soit un tag commercial soit par la séquence homologue d'un autre morbillivirus. A l'issue de nos travaux, nous avons identifié deux tags commerciaux intéressants (C-myc et protéine C) et un épitope dérivé de la séquence du morbillivirus de dauphin. Ces épitopes sont immunogènes chez la chèvre. Il faudra vérifier qu'ils le restent une fois insérés dans la N-PPRV. En outre, la fonctionnalité de la protéine N ainsi modifiée devra être vérifiée en génétique inverse à l'aide du minigénome.

Etapes technologiques à finaliser pour disposer d'un système reproductible

L'objectif à court terme est d'être en mesure de générer de façon reproductible des virus PPRV modifiés. Or, un des facteurs limitant reste le stock de virus recombinant FP-T7. En effet, ce recombinant (don de M. Skinner de l'Institute of Animal Health de Compton, Grande Bretagne) est en quantité limitée. Des essais de production de stock viral ont été tentés sur différents types cellulaires. Au cours des travaux menés dans le cadre de mon master 2 recherche, des cellules de caille QT35 (réf ECACC n°93120832) avaient été testées pour produire un stock viral FP-T7 sans succès. Nous avons testé d'autres types de cellules de fibroblastes d'embryon de poulet soit, de lignée commerciale (P142, réf ATCC n°CRL-12203) ou bien produites au laboratoire à partir d'œufs embryonnés mais sans plus de réussite. Dans l'impossibilité de reproduire ce virus, qui cependant nous a donné d'excellents résultats au laboratoire, nous devrions envisager une alternative. Elle pourrait consister en l'utilisation d'un plasmide exprimant l'ARN T7 polymérase à la place du virus recombinant. En effet, depuis 3 ans, des équipes ont mis au point des protocoles de génétique inverse permettant d'obtenir des virus infectieux sans utiliser ni cellules exprimant de façon stable l'ARN T7 polymérase ni virus recombinant T7 polymérase. Des essais de reconstitution de différents paramyxovirus (rougeole, maladie de Carré, parainfluenza humain et bovin de type 3, des oreillons, du RSV, maladie de Newcastle), de rhabdovirus (VSV) et de bornavirus ont été menés avec succès en utilisant un plasmide exprimant la T7 polymérase sous la dépendance d'un promoteur cytomégalovirus (pCMV) [94]. Nous disposons au laboratoire du plasmide pT7RNAPC qui contient le gène de l'ARN T7 polymérase clonée sous la dépendance du pCMV dans le pCIneo (Clontech, Ozyme, France). Cette construction a été réalisée en 2005 au cours de l'étude menée dans le cadre de mon master 2 recherche [161]. L'utilisation de ce plasmide peut donc être envisagée à très court terme.

L'utilisation des cellules VERO exprimant un récepteur SLAM semble améliorer le rendement de la génétique inverse des morbillivirus. Une autre possibilité pour augmenter le rendement et s'affranchir également de l'emploi du virus recombinant fowlpox exprimant l'ARN T7 polymérase est d'utiliser une autre ARN polymérase. En effet, en 2008, Freiberg et ses collaborateurs [195] ont utilisé l'ARN Polymérase I au lieu de l'ARN T7 Polymérase pour faire fonctionner par génétique inverse un minigénome du

virus Nipah. L'avantage de la transcription par l'ARN polymérase I est l'obtention d'ARN sans modification, ni base supplémentaire. En outre, il n'est pas nécessaire d'insérer une séquence ribozyme en aval du génome. Enfin, les sites de début et d'arrêt de transcription sont mieux définis pour l'ARN polymérase I que pour l'ARN T7 polymérase. Freiberg a réussi à exprimer la protéine CAT clonée entre le promoteur humain de l'ARN polymérase I et le terminateur de souris de l'ARN polymérase I après transfection des cellules avec les plasmides contenant les N, P et L sous promoteurs pCMV. Cette approche mise au point par Freiberg est unique en génétique inverse des paramyxovirus, mais établie dès 2007 pour un virus de la famille des *Bunyaviridae*, virus à ARN (-) segmenté [196]. En 2006, Martin [93] démontrait déjà la possibilité de remplacer le promoteur de l'ARN T7 polymérase (pT7) sous lequel était placé l'ADNc du génome viral soit par un promoteur de l'ARN polymérase I humain (hPol I) ou de souris (mPol I) soit par celui de l'ARN polymérase II (Pol II)[93]. La reconstitution du virus Borna par génétique inverse n'a pas montré de différence significative entre les promoteurs de l'ARN T7 polymérase et ceux de l'ARN polymérase I. En revanche, l'efficacité du système était environ 20 fois supérieure lors de l'utilisation du promoteur Pol II. Dans cette même étude, l'efficacité du système de génétique inverse appliqué à la rougeole montrait une efficacité 100 fois supérieure si l'ADNc était cloné sous Pol II par rapport à un clonage sous pT7. De plus, seulement quelques syncytia sont observés entre 4 et 7 jours après la transfection sur les cellules infectées avec le virus obtenu à partir de l'ADNc cloné sous pT7. Alors que dans le cas du virus généré à partir de l'ADNc sous Pol II, les syncytia sont nombreux dès le quatrième jour suivant la transfection. De plus le titre viral est augmenté de 2 Log par rapport à celui obtenu avec le virus pT7 (100 fois plus). Ainsi, avec les progrès récents en génétique inverse des *Mononegavirales*, plusieurs options s'offrent à nous afin d'améliorer l'efficacité de la génétique inverse appliquée au virus PPR.

Perspectives

Les résultats générés au cours de ces quatre années de travaux de recherche ont permis de mettre en place la technique de génétique inverse et de l'adapter au virus de la peste des petits ruminants, d'être tout proche d'obtenir un premier clone PPRV à partir de l'ADNc cloné et de choisir les marqueurs et de développer les tests ELISA associés. Ces travaux seront finalisés dans le très court terme car les enjeux scientifiques, techniques et de développement sont importants. L'obtention de virus recombinants marqués, permettra

de tester *in vivo* l'efficacité de tels vaccins. Ces essais serviront à mettre en évidence une réponse anticorps contre la PPR et le marqueur chez les animaux vaccinés. Ils permettront aussi de vérifier l'efficacité des vaccins après une épreuve virulente et de tester la durée de l'immunité des nouveaux vaccins. Celle-ci devra être au moins de trois ans, comme pour le vaccin actuel, ce qui correspond à la durée de vie moyenne d'une chèvre dans les pays où la peste des petits ruminants sévit. Une fois validé, le vaccin marqueur sera amené progressivement à remplacer le virus vaccinal parental.

5. CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis de mettre en place au laboratoire de virologie la technique de génétique inverse, appliquée au virus de la peste des petits ruminants et de progresser dans la génération du premier clone infectieux PPR à partir de l'ADNc cloné de la souche vaccinale PPRV 75/1. Les étapes à franchir ont été nombreuses, parfois difficiles et sources de dépit, mais au final très formatrices. Les sauts technologiques que nous avons su apporter à l'équipe trouvent déjà de nombreuses perspectives d'applications. Ainsi, la perspective d'obtenir un vaccin marqué, par substitution d'une séquence du gène de la nucléoprotéine N-PPRV 75/1 est à portée de main. Mais les travaux à accomplir avant de mettre à disposition un vaccin PPR marqué sont encore nombreux. C'est à ce programme de recherche que je souhaite plus particulièrement continuer à contribuer. Au-delà de ces perspectives à moyen terme, l'acquisition au laboratoire de la technique de génétique inverse ouvre la porte à de nombreuses applications en recherche telles que l'étude d'antiviraux, de déterminismes génétiques de la virulence ou l'utilisation de la souche vaccinale PPRV 75/1 comme vecteur pour l'expression d'autres protéines virales et vaccin multivalent.

Ce travail a été financé par le projet européen Markvac (INCO-CT-2004-003670) et le réseau d'excellence Epizone.

6. REFERENCES

1. Diallo, A., et al., *Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants : candidat pour un vaccin homologue.* Rev Elev Med Vet Pays Trop, 1989. **42**(3): p. 311-319.
2. Gargadennec, L. and A. Lalanne, *La peste des petits ruminants.* Bull. Serv. Zoo. Epiz. AOF, 1942. **5**: p. 16-21.
3. Anderson, J. and D. Sammin, *Peste des petits ruminants.* EMPRES bulletin des maladies animales transfrontières, 2005. **27**: p. 12-15.
4. Kul, O., et al., *Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections.* Vet Pathol, 2007. **44**(4): p. 479-86.
5. Javier Sanz-Alvarez; Adama Diallo; Stephane De La Rocque; Julio Pinto; Samuel Thevenet; Juan Lubroth, *Peste des petits ruminants (PPR) au Maroc.* EMPRES watch, 2008: p. 1-7.
6. Barrett, T., *Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores.* Vet Microbiol, 1999. **69**(1-2): p. 3-13.
7. Kwiatek, O., et al., *Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan.* J Comp Pathol, 2007. **136**(2-3): p. 111-9.
8. Minet, C., et al., *Sequence analysis of the large (L) polymerase gene and trailer of the peste des petits ruminants virus vaccine strain Nigeria 75/1: Expression and use of the L protein in reverse genetics.* Virus Res, 2009.
9. Conzelmann, K.K., *Reverse genetics of mononegavirales.* Curr Top Microbiol Immunol, 2004. **283**: p. 1-41.
10. Schnell, M.J. and K.K. Conzelmann, *Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein.* Virology, 1995. **214**(2): p. 522-30.
11. Haffar, A., et al., *The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus.* Virus Res, 1999. **64**(1): p. 69-75.
12. Boxer, E.L., S.K. Nanda, and M.D. Baron, *The rinderpest virus non-structural C protein blocks the induction of type 1 interferon.* Virology, 2009. **385**(1): p. 134-42.
13. Barrett, T., A.C. Banyard, and A. Diallo, *Molecular biology of the morbilliviruses*, in *Rinderpest and Peste des Petits Ruminants. Virus Plagues of Large and Small Ruminants*. 2006, Academic Press Elsevier. p. 31-65.
14. Diallo, A., *peste des petits ruminants*, in *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. 2003. p. 307-321.
15. Bodjo, S., *Etude de la nucléoprotéine des virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants : caractérisation moléculaire des interactions protéiques et des strucutres antigéniques.* thèse de doctorat université de Montpellier II, 2007: p. 133.
16. Tatsuo, H. and Y. Yanagi, *The morbillivirus receptor SLAM (CD150).* Microbiol Immunol, 2002. **46**(3): p. 135-42.
17. Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson, *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster.* Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 431-55.
18. Erlenhofer, C., et al., *Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus.* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 6): p. 1431-6.
19. Manchester, M., D. Naniche, and T. Stehle, *CD46 as a measles receptor: form follows function.* Virology, 2000. **274**(1): p. 5-10.

20. Wohlsein, P., et al., *Pathomorphological and immunohistological findings in cattle experimentally infected with rinderpest virus isolates of different pathogenicity.* Vet Microbiol, 1995. **44**(2-4): p. 141-9.
21. Rossiter, P.B. and R.C. Wardley, *The differential growth of virulent and avirulent strains of rinderpest virus in bovine lymphocytes and macrophages.* J Gen Virol, 1985. **66 (Pt 5)**: p. 969-75.
22. Michaud, V., et al., *Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR.* J Virol Methods, 2007. **146**(1-2): p. 257-65.
23. Diallo, A., et al., *Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants.* Vet Microbiol, 1995. **44**(2-4): p. 307-17.
24. Libeau, G., et al., *Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA.* Vet Rec, 1994. **134**(12): p. 300-4.
25. Ozkul, A., et al., *Prevalence, distribution, and host range of Peste des petits ruminants virus, Turkey.* Emerg Infect Dis, 2002. **8**(7): p. 708-12.
26. Tufan, M., *Animal health authorities and transboundary animal diseases in Turkey.* J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2006. **53 Suppl 1**: p. 35-7.
27. Lan, N.T., et al., *Stability of canine distemper virus (CDV) after 20 passages in Vero-DST cells expressing the receptor protein for CDV.* Vet Microbiol, 2006. **118**(3-4): p. 177-88.
28. Seki, F., et al., *Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells.* J Virol, 2003. **77**(18): p. 9943-50.
29. Tatsuo, H., N. Ono, and Y. Yanagi, *Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors.* J Virol, 2001. **75**(13): p. 5842-50.
30. Yesilbag, K., et al., *Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey.* Vet Rec, 2005. **157**(9): p. 260-1.
31. Libeau, G., et al., *A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest antibodies in cattle and small ruminants.* Vet Microbiol, 1992. **31**(2-3): p. 147-60.
32. Libeau, G., et al., *Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein.* Res Vet Sci, 1995. **58**(1): p. 50-5.
33. Rossiter, P.B., D.M. Jessett, and W.P. Taylor, *Microneutralisation systems for use with different strains of peste des petits ruminants virus and rinderpest virus.* Trop Anim Health Prod, 1985. **17**(2): p. 75-81.
34. Lefèvre, P.C., *Peste bovine.* Tec & doc ed. Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes. Vol. 1. 2003. 285-305.
35. Diallo, A., *Control of peste des petits ruminants: classical and new generation vaccines.* Dev Biol (Basel), 2003. **114**: p. 113-9.
36. Sarkar, J., et al., *Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine.* Vaccine, 2003. **21**(32): p. 4728-35.
37. Berhe, G., et al., *Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections.* J Virol, 2003. **77**(2): p. 1571-7.
38. Diallo, A., et al., *The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control.* Vaccine, 2007. **25**(30): p. 5591-7.
39. Conzelmann, K.K. and G. Meyers, *Genetic engineering of animal RNA viruses.* Trends Microbiol, 1996. **4**(10): p. 386-93.

40. Neumann, G., M.A. Whitt, and Y. Kawaoka, *A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned?* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 11): p. 2635-62.
41. Mahapatra, M., et al., *Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex.* J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 2021-9.
42. Anderson, J. and J.A. McKay, *The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes.* Epidemiol Infect, 1994. **112**(1): p. 225-31.
43. Parida, S., et al., *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, 2007. **88**(Pt 7): p. 2019-27.
44. Curran, J., J.B. Marq, and D. Kolakofsky, *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, 1995. **69**(2): p. 849-55.
45. Conzelmann, K.K., *Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses.* J Gen Virol, 1996. **77 (Pt 3)**: p. 381-9.
46. Calain, P., et al., *Molecular cloning of natural paramyxovirus copy-back defective interfering RNAs and their expression from DNA.* Virology, 1992. **191**(1): p. 62-71.
47. Calain, P. and L. Roux, *The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA.* J Virol, 1993. **67**(8): p. 4822-30.
48. Calain, P. and L. Roux, *Functional characterisation of the genomic and antigenomic promoters of Sendai virus.* Virology, 1995. **212**(1): p. 163-73.
49. Egelman, E.H., et al., *The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states.* J Virol, 1989. **63**(5): p. 2233-43.
50. Kolakofsky, D., et al., *Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited.* J Virol., 1998. **72**(2): p. 891-9.
51. Vulliemoz, D. and L. Roux, *"Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count?* J Virol, 2001. **75**(10): p. 4506-18.
52. Schnell, M.J., T. Mebatsion, and K.K. Conzelmann, *Infectious rabies viruses from cloned cDNA.* Embo J, 1994. **13**(18): p. 4195-203.
53. Baron, M.D. and T. Barrett, *Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA.* J Virol, 1997. **71**(2): p. 1265-71.
54. Das, S.C., M.D. Baron, and T. Barrett, *Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoproteins of peste-des-petits-ruminants virus: homologous F and H proteins are required for virus viability.* J Virol, 2000. **74**(19): p. 9039-47.
55. Johnson, M.C., et al., *Production of recombinant snakehead rhabdovirus: the NV protein is not required for viral replication.* J Virol, 2000. **74**(5): p. 2343-50.
56. Volchkov, V.E., et al., *Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity.* Science, 2001. **291**(5510): p. 1965-9.
57. Schneider, H., et al., *Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector.* J Virol Methods, 1997. **64**(1): p. 57-64.
58. Gassen, U., et al., *Establishment of a rescue system for canine distemper virus.* J Virol, 2000. **74**(22): p. 10737-44.
59. Fuerst, T.R., et al., *Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(21): p. 8122-6.

60. Ito, N., et al., *Rescue of rabies virus from cloned cDNA and identification of the pathogenicity-related gene: glycoprotein gene is associated with virulence for adult mice.* J Virol, 2001. **75**(19): p. 9121-8.
61. Lawson, N.D., et al., *Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4477-81.
62. Whelan, S.P., et al., *Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8388-92.
63. Biacchesi, S., et al., *Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes.* J Virol, 2000. **74**(23): p. 11247-53.
64. Biacchesi, S., et al., *Rescue of synthetic salmonid rhabdovirus minigenomes.* J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 8): p. 1941-5.
65. Garcin, D., et al., *A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus.* Embo J, 1995. **14**(24): p. 6087-94.
66. Hoffman, M.A. and A.K. Banerjee, *An infectious clone of human parainfluenza virus type 3.* J Virol, 1997. **71**(6): p. 4272-7.
67. Takeda, M., et al., *Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA.* J Virol, 2000. **74**(14): p. 6643-7.
68. Kato, A., et al., *Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense.* Genes Cells, 1996. **1**(6): p. 569-79.
69. Sutter, G., M. Ohlmann, and V. Erfle, *Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase.* FEBS Lett, 1995. **371**(1): p. 9-12.
70. Wyatt, L.S., B. Moss, and S. Rozenblatt, *Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells.* Virology, 1995. **210**(1): p. 202-5.
71. Collins, P.L., et al., *Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11563-7.
72. He, B., et al., *Recovery of infectious SV5 from cloned DNA and expression of a foreign gene.* Virology, 1997. **237**(2): p. 249-60.
73. Kawano, M., et al., *Recovery of infectious human parainfluenza type 2 virus from cDNA clones and properties of the defective virus without V-specific cysteine-rich domain.* Virology, 2001. **284**(1): p. 99-112.
74. Clarke, D.K., et al., *Rescue of mumps virus from cDNA.* J Virol, 2000. **74**(10): p. 4831-8.
75. Schmidt, A.C., et al., *Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates.* J Virol, 2000. **74**(19): p. 8922-9.
76. Durbin, A.P., et al., *Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA.* Virology, 1997. **235**(2): p. 323-32.
77. Britton, P., et al., *Expression of bacteriophage T7 RNA polymerase in avian and mammalian cells by a recombinant fowlpox virus.* J Gen Virol, 1996. **77 (Pt 5)**: p. 963-7.
78. Peeters, B.P., et al., *Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence.* J Virol, 1999. **73**(6): p. 5001-9.

79. Das, S.C., et al., *Improved technique for transient expression and negative strand virus rescue using fowlpox T7 recombinant virus in mammalian cells.* J Virol Methods, 2000. **89**(1-2): p. 119-27.
80. Aoki, Y., et al., *A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase.* Virology, 1998. **250**(1): p. 140-50.
81. Tomanin, R., et al., *Development and characterization of a binary gene expression system based on bacteriophage T7 components in adenovirus vectors.* Gene, 1997. **193**(2): p. 129-40.
82. Kohl, A., et al., *Transient gene expression in mammalian and mosquito cells using a recombinant Semliki Forest virus expressing T7 RNA polymerase.* Appl Microbiol Biotechnol, 1999. **53**(1): p. 51-6.
83. Olivo, P.D., et al., *Detection and quantitation of human respiratory syncytial virus (RSV) using minigenome cDNA and a Sindbis virus replicon: a prototype assay for negative-strand RNA viruses.* Virology, 1998. **251**(1): p. 198-205.
84. Radecke, F., et al., *Rescue of measles viruses from cloned DNA.* Embo J, 1995. **14**(23): p. 5773-84.
85. Parks, C.L., et al., *Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock.* J Virol, 1999. **73**(5): p. 3560-6.
86. Buchholz, U.J., S. Finke, and K.K. Conzelmann, *Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter.* J Virol, 1999. **73**(1): p. 251-9.
87. Finke, S. and K.K. Conzelmann, *Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus.* J Virol, 1999. **73**(5): p. 3818-25.
88. Romer-Oberdorfer, A., et al., *Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA.* J Gen Virol, 1999. **80 (Pt 11)**: p. 2987-95.
89. Harty, R.N., et al., *Vaccinia virus-free recovery of vesicular stomatitis virus.* J Mol Microbiol Biotechnol, 2001. **3**(4): p. 513-7.
90. Poenisch, M., P. Staeheli, and U. Schneider, *Viral accessory protein X stimulates the assembly of functional Borna disease virus polymerase complexes.* J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 6): p. 1442-5.
91. Schneider, U., et al., *Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein.* J Virol, 2003. **77**(21): p. 11781-9.
92. Schneider, U., M. Schwemmle, and P. Staeheli, *Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3441-6.
93. Martin, A., P. Staeheli, and U. Schneider, *RNA polymerase II-controlled expression of antigenomic RNA enhances the rescue efficacies of two different members of the Mononegavirales independently of the site of viral genome replication.* J Virol, 2006. **80**(12): p. 5708-15.
94. Witko, S.E., et al., *An efficient helper-virus-free method for rescue of recombinant paramyxoviruses and rhadoviruses from a cell line suitable for vaccine development.* J Virol Methods, 2006. **135**(1): p. 91-101.
95. Conzelmann, K.K., *Reverse genetics of Monnegavirales*, in *Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics*, Y. Kawaoka, Editor. 2004. p. 1-41.

96. Skiadopoulos, M.H., et al., *Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes.* J Virol, 1998. **72**(3): p. 1762-8.
97. Skiadopoulos, M.H., et al., *Identification of mutations contributing to the temperature-sensitive, cold-adapted, and attenuation phenotypes of the live-attenuated cold-passage 45 (cp45) human parainfluenza virus 3 candidate vaccine.* J Virol, 1999. **73**(2): p. 1374-81.
98. Skiadopoulos, M.H., et al., *Attenuation of the recombinant human parainfluenza virus type 3 cp45 candidate vaccine virus is augmented by importation of the respiratory syncytial virus cpts530 L polymerase mutation.* Virology, 1999. **260**(1): p. 125-35.
99. Mebatsion, T., et al., *A recombinant newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos.* J Virol, 2001. **75**(1): p. 420-8.
100. Bailly, J.E., et al., *A recombinant human parainfluenza virus type 3 (PIV3) in which the nucleocapsid N protein has been replaced by that of bovine PIV3 is attenuated in primates.* J Virol, 2000. **74**(7): p. 3188-95.
101. Whitehead, S.S., et al., *Replacement of the F and G proteins of respiratory syncytial virus (RSV) subgroup A with those of subgroup B generates chimeric live attenuated RSV subgroup B vaccine candidates.* J Virol, 1999. **73**(12): p. 9773-80.
102. Schmitt, A.P. and R.A. Lamb, *Escaping from the cell : assembly and budding og negative-strand RNA viruses*, in *Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics*, Y. Kawaoka, Editor. 2004. p. 145-196.
103. Mebatsion, T., F. Weiland, and K.K. Conzelmann, *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, 1999. **73**(1): p. 242-50.
104. Cathomen, T., et al., *A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain.* Embo J, 1998. **17**(14): p. 3899-908.
105. Patterson, J.B., et al., *Evidence that the hypermutated M protein of a subacute sclerosing panencephalitis measles virus actively contributes to the chronic progressive CNS disease.* Virology, 2001. **291**(2): p. 215-25.
106. Noda, T., et al., *Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP.* J Virol, 2002. **76**(10): p. 4855-65.
107. Park, M.S., et al., *Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8203-8.
108. Mebatsion, T., M. Konig, and K.K. Conzelmann, *Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein.* Cell, 1996. **84**(6): p. 941-51.
109. Schnell, M.J., et al., *Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus.* Embo J, 1998. **17**(5): p. 1289-96.
110. Biacchesi, S., et al., *Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a Novirhabdovirus.* J Virol, 2002. **76**(6): p. 2881-9.
111. von Messling, V. and R. Cattaneo, *Toward novel vaccines and therapies based on negative strand RNA viruses*, in *Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics*, Y. Kawaoka, Editor. 2004. p. 281-312.
112. Mebatsion, T., et al., *Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7310-4.
113. Schnell, M.J., et al., *The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus.* J Virol, 1996. **70**(4): p. 2318-23.

114. Engel-Herbert, I., et al., *Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein.* J Virol Methods, 2003. **108**(1): p. 19-28.
115. Yoneda, M., et al., *Establishment of a Nipah virus rescue system.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16508-13.
116. Duprex, W.P., et al., *In vitro and in vivo infection of neural cells by a recombinant measles virus expressing enhanced green fluorescent protein.* J Virol, 2000. **74**(17): p. 7972-9.
117. Walsh, E.P., et al., *Development of a genetically marked recombinant rinderpest vaccine expressing green fluorescent protein.* J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 3): p. 709-18.
118. Walsh, E.P., et al., *Recombinant rinderpest vaccines expressing membrane-anchored proteins as genetic markers: evidence of exclusion of marker protein from the virus envelope.* J Virol, 2000. **74**(21): p. 10165-75.
119. Haglund, K., et al., *Expression of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein precursor and envelope proteins from a vesicular stomatitis virus recombinant: high-level production of virus-like particles containing HIV envelope.* Virology, 2000. **268**(1): p. 112-21.
120. Lorin, C., et al., *A paediatric vaccination vector based on live attenuated measles vaccine.* Therapie, 2005. **60**(3): p. 227-33.
121. Lorin, C., et al., *A recombinant live attenuated measles vaccine vector primes effective HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocytes and broadly neutralizing antibodies against HIV-1 conserved epitopes.* Vaccine, 2005. **23**(36): p. 4463-72.
122. Tangy, F. and H.Y. Naim, *Live attenuated measles vaccine as a potential multivalent pediatric vaccination vector.* Viral Immunol, 2005. **18**(2): p. 317-26.
123. Mebatsion, T., et al., *Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope.* J Virol, 2002. **76**(20): p. 10138-46.
124. Henikoff, S. and J.G. Henikoff, *Automated assembly of protein blocks for database searching.* Nucleic Acids Res., 1991. **19**(23): p. 6565-72.
125. Frishman, D. and P. Argos, *PREDATOR. Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino-acid sequence.* Protein Engineering., 1996. **9**: p. 133-142.
126. Liu, J., H. Tan, and B. Rost, *Loopy proteins appear conserved in evolution.* J Mol Biol, 2002. **322**(1): p. 53-64.
127. Garnier, J., D.J. Osguthorpe, and B. Robson, *Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins.* J Mol Biol, 1978. **120**(1): p. 97-120.
128. McGuffin, L.J., K. Bryson, and D.T. Jones, *The PSIPRED protein structure prediction server.* Bioinformatics, 2000. **16**(4): p. 404-5.
129. Cuff, J.A., et al., *JPred: a consensus secondary structure prediction server.* Bioinformatics, 1998. **14**(10): p. 892-3.
130. Cheng, J., et al., *SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server.* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W72-6.
131. Shi, J., T.L. Blundell, and K. Mizuguchi, *FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties.* J Mol Biol, 2001. **310**(1): p. 243-57.
132. Saitou, N. and M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.* Mol Biol Evol, 1987. **4**(4): p. 406-25.
133. Kimura, M., *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.* J Mol Evol, 1980. **16**(2): p. 111-20.

134. Perrier, X., A. Flori, and F. Bonnet, *Data analysis methods.*, in *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, P. Hamos, et al., Editors. 2003, Gifield Science Publishers: Montpellier. p. 43-76.
135. Van de Peer, Y. and R. De Wachter, *TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees.* Comput Appl Biosci, 1993. **9**(2): p. 177-82.
136. Felsenstein, J., *Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.* J Mol Evol, 1981. **17**(6): p. 368-76.
137. Bailly, J.E., et al., *Sequence determination and molecular analysis of two strains of bovine parainfluenza virus type 3 that are attenuated for primates.* Virus Genes, 2000. **20**(2): p. 173-82.
138. von Messling, V., et al., *A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression.* J Virol, 2003. **77**(23): p. 12579-91.
139. von Messling, V., et al., *The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity.* J Virol, 2001. **75**(14): p. 6418-27.
140. Rima, B.K., A.M. Collin, and J.A. Earle, *Completion of the sequence of a cetacean morbillivirus and comparative analysis of the complete genome sequences of four morbilliviruses.* Virus Genes, 2005. **30**(1): p. 113-9.
141. Groseth, A., et al., *Molecular characterization of an isolate from the 1989/90 epizootic of Ebola virus Reston among macaques imported into the United States.* Virus Res, 2002. **87**(2): p. 155-63.
142. Wang, L., et al., *Molecular biology of Hendra and Nipah viruses.* Microbes Infect, 2001. **3**(4): p. 279-87.
143. Newman, J.T., et al., *Sequence analysis of the Washington/1964 strain of human parainfluenza virus type 1 (HPIV1) and recovery and characterization of wild-type recombinant HPIV1 produced by reverse genetics.* Virus Genes, 2002. **24**(1): p. 77-92.
144. Karron, R.A., et al., *Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13961-6.
145. Okazaki, K., et al., *Molecular cloning and sequence analysis of the mumps virus gene encoding the L protein and the trailer sequence.* Virology, 1992. **188**(2): p. 926-30.
146. Takeda, M., et al., *Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins.* J Virol, 1998. **72**(11): p. 8690-6.
147. Takeuchi, K., et al., *Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and vero cell-isolated measles viruses from the same patient.* Virus Genes, 2000. **20**(3): p. 253-7.
148. Parks, C.L., et al., *Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage.* J Virol, 2001. **75**(2): p. 910-20.
149. Mori, T., et al., *Molecular cloning and complete nucleotide sequence of genomic RNA of the AIK-C strain of attenuated measles virus.* Virus Genes, 1993. **7**(1): p. 67-81.
150. Baricevic, M., et al., *A comparison of complete untranslated regions of measles virus genomes derived from wild-type viruses and SSPE brain tissues.* Virus Genes, 2007. **35**(1): p. 17-27.
151. Chua, K.B., et al., *Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus.* Science, 2000. **288**(5470): p. 1432-5.
152. McIlhatton, M.A., M.D. Curran, and B.K. Rima, *Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence).* J Gen Virol., 1997. **78**(Pt 3): p. 571-6.

153. Komase, K., et al., *A comparison of nucleotide sequences of measles virus L genes derived from wild-type viruses and SSPE brain tissues.* Virology, 1995. **208**(2): p. 795-9.
154. Muthuchelvan, D., et al., *Comparative sequence analysis of the large polymerase protein (L) gene of peste-des-petits ruminants (PPR) vaccine virus of Indian origin.* Arch Virol., 2005. **150**(12): p. 2467-81. Epub 2005 Aug 1.
155. Bailey, D., et al., *Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus.* Virus Res, 2005. **110**(1-2): p. 119-24.
156. Tordo, N., et al., *Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses.* Virology, 1988. **165**(2): p. 565-76.
157. Baron, M.D. and T. Barrett, *The sequence of the N and L genes of rinderpest virus, and the 5' and 3' extra-genic sequences: the completion of the genome sequence of the virus.* Vet Microbiol, 1995. **44**(2-4): p. 175-85.
158. Baron, M.D., et al., *The genome sequence of the virulent Kabete 'O' strain of rinderpest virus: comparison with the derived vaccine.* J Gen Virol, 1996. **77 (Pt 12)**: p. 3041-6.
159. Itoh, M., et al., *Isolation of an avirulent mutant of Sendai virus with two amino acid mutations from a highly virulent field strain through adaptation to LLC-MK2 cells.* J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 12)**: p. 3207-15.
160. Tidona, C.A., et al., *Isolation and molecular characterization of a novel cytopathogenic paramyxovirus from tree shrews.* Virology, 1999. **258**(2): p. 425-34.
161. Minet, C., *utilisation d'un fowlpox-T7 et d'un minigénome pour valider la technique de génétique inverse du virus de la peste des petits ruminants.* mémoire de master 2 recherche 2005.
162. Bailey, D., et al., *Reverse genetics for peste-des-petits-ruminants virus (PPRV): promoter and protein specificities.* Virus Res, 2007. **126**(1-2): p. 250-5.
163. Lorin, C., et al., *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., 2004. **78**(1): p. 146-57.
164. Plattet, P., et al., *Recovery of a persistent Canine distemper virus expressing the enhanced green fluorescent protein from cloned cDNA.* Virus Res, 2004. **101**(2): p. 147-53.
165. Bodjo, S.C., et al., *Mapping and structural analysis of B-cell epitopes on the morbillivirus nucleoprotein amino terminus.* J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 4): p. 1231-42.
166. Bodjo, S.C., et al., *Mapping the Peste des Petits Ruminants virus nucleoprotein: identification of two domains involved in protein self-association.* Virus Res, 2008. **131**(1): p. 23-32.
167. Peeters, B.P., et al., *Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals.* Vaccine, 2001. **19**(13-14): p. 1616-27.
168. Guy, J., et al., *Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy.* Ann Neurol, 2002. **52**(5): p. 534-42.
169. Lee, A.S., et al., *A novel capture-ELISA for detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) based on c-myc peptide recognition in carboxy-terminally tagged recombinant neutrophil serine proteases.* J Immunol Methods, 2005. **307**(1-2): p. 62-72.
170. Roche, *Epitope Tagging Basic Laboratory Methods.* 2000. **chap 1 : introducing to epitope tagging**.

171. Terpe, K., *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.* Appl Microbiol Biotechnol, 2003. **60**(5): p. 523-33.
172. Kerur, N., M.K. Jhala, and C.G. Joshi, *Genetic characterization of Indian peste des petits ruminants virus (PPRV) by sequencing and phylogenetic analysis of fusion protein and nucleoprotein gene segments.* Res Vet Sci, 2007.
173. Shaila, M.S., et al., *Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus.* Virus Res, 1996. **43**(2): p. 149-53.
174. Walhout, A.J. and M. Vidal, *High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping.* Methods, 2001. **24**(3): p. 297-306.
175. Takeda, M., et al., *Generation of measles virus with a segmented RNA genome.* J Virol, 2006. **80**(9): p. 4242-8.
176. Takeda, M., et al., *Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells.* Virus Res, 2005. **108**(1-2): p. 161-5.
177. Blumberg, B.M., et al., *Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase.* Virology, 1988. **164**(2): p. 487-97.
178. McIlhatton, M.A., M.D. Curran, and B.K. Rima, *Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence).* J Gen Virol, 1997. **78 (Pt 3)**: p. 571-6.
179. Sidhu, M.S., et al., *Canine distemper virus L gene: sequence and comparison with related viruses.* Virology, 1993. **193**(1): p. 50-65.
180. Diallo, A., et al., *Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses.* J Gen Virol, 1994. **75 (Pt 1)**: p. 233-7.
181. Meyer, G. and A. Diallo, *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, 1995. **37**(1): p. 23-35.
182. Cevik, B., S. Smallwood, and S.A. Moyer, *Two N-terminal regions of the Sendai virus L RNA polymerase protein participate in oligomerization.* Virology, 2007. **363**(1): p. 189-97.
183. Holmes, D.E. and S.A. Moyer, *The phosphoprotein (P) binding site resides in the N terminus of the L polymerase subunit of sendai virus.* J Virol, 2002. **76**(6): p. 3078-83.
184. Malur, A.G., et al., *Role of a highly conserved NH(2)-terminal domain of the human parainfluenza virus type 3 RNA polymerase.* J Virol, 2002. **76**(16): p. 8101-9.
185. Tatsuo, H., et al., *SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus.* Nature, 2000. **406**(6798): p. 893-7.
186. Yanagi, Y., et al., *Measles virus receptor SLAM (CD150).* Virology, 2002. **299**(2): p. 155-61.
187. Nielsen, O., et al., *Use of a SLAM transfected Vero cell line to isolate and characterize marine mammal morbilliviruses using an experimental ferret model.* J Wildl Dis, 2008. **44**(3): p. 600-11.
188. Caignard, G., et al., *Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2.* Virology, 2009. **383**(1): p. 112-20.
189. Caignard, G., et al., *Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling.* Virology, 2007. **368**(2): p. 351-62.
190. Ozden, S., et al., *Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein.* J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 21899-908.

191. Liu, X.H., et al., *[Rescue of chimeric rabies virus expressing green fluorescent protein]*. Bing Du Xue Bao, 2008. **24**(5): p. 401-3.
192. Roth, J.P., et al., *A recombinant, infectious human parainfluenza virus type 3 expressing the enhanced green fluorescent protein for use in high-throughput antiviral assays.* Antiviral Res, 2009. **82**(1): p. 12-21.
193. Patch, J.R., et al., *The YPLGVG sequence of the Nipah virus matrix protein is required for budding.* Virol J, 2008. **5**: p. 137.
194. Cantarella, G., et al., *Recombinant measles virus-HPV vaccine candidates for prevention of cervical carcinoma.* Vaccine, 2009. **27**(25-26): p. 3385-90.
195. Freiberg, A., et al., *Establishment and characterization of plasmid-driven minigenome rescue systems for Nipah virus: RNA polymerase I- and T7-catalyzed generation of functional paramyxoviral RNA.* Virology, 2008. **370**(1): p. 33-44.
196. Ogawa, Y., et al., *Rescue of Akabane virus (family Bunyaviridae) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I.* J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 12): p. 3385-90.

7. PUBLICATIONS

Virus Research 145 (2009) 9–17

Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Sequence analysis of the large (L) polymerase gene and trailer of the peste des petits ruminants virus vaccine strain Nigeria 75/1: Expression and use of the L protein in reverse genetics

C. Minet[a], M. Yami[b], B. Egzabhier[b], P. Gil[a], F. Tangy[c], M. Brémont[d], G. Libeau[a], A. Diallo[e], E. Albina[a,*]

[a] CIRAD, UMR CIRAD/INRA Contrôle des Maladies, Montpellier, F-34398 Montpellier, France
[b] National Veterinary Institute, Debre Zeit, Ethiopia
[c] Viral Genomics and Vaccination Laboratory, Institut Pasteur, Paris, France
[d] Unité de Virologie et Immunologie, INRA Jouy- en-Josas, France
[e] Animal Production Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency's Laboratories, IAEA, Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 October 2008
Received in revised form 4 June 2009
Accepted 5 June 2009
Available online 18 June 2009

Keywords:
Peste des petits ruminants
Morbillivirus
Paramyxovirus
L polymerase
Reverse genetics

ABSTRACT

The large (L) polymerase gene and the 5′-terminal UTR of the genome of peste des petits ruminants virus (PPRV), vaccine strain Nigeria 75/1, were cloned and sequenced. The L protein was also expressed in eukaryotic cells and its polymerase activity was quantitatively measured in a PPR reverse genetics assay using a reporter minigenome. Comparative sequence analysis of this functional L gene with corresponding genes of other morbilliviruses showed a degree of conservation exceeding 70%. The multiple sequence alignment and the phylogenetic study of L gene discriminated the morbilliviruses in 6 clusters, which are more closely related to Tupaia and Henipaviruses than to other paramyxoviruses. Important protein domains and functional motifs of the L polymerase of the PPRV Nigeria 75/1 vaccine were also identified by using different bioinformatics tools.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Peste des petits ruminants (PPR) is a contagious acute and fatal viral infection of small ruminants caused by an enveloped non-segmented negative single-stranded RNA virus (NSV), peste des petits ruminant virus (PPRV), which belongs to the genus *Morbillivirus*, in the family *Paramyxoviridae*. The genus *Morbillivirus* also includes the human measles virus (MV), the bovine rinderpest virus (RPV), the dolphin morbillivirus (DMV), and the canine and phocine distemper viruses (CDV and PDV). In small ruminants, the disease is characterized by high pyrexia (up to 41 °C), anorexia, nasal and ocular discharges, diarrhea, and necrotizing stomatitis. These symptoms rapidly lead to the death of up to 90% of the animals. The disease is widely spread in Africa, the Middle-East, and South-West Asia (Lefevre and Diallo, 1990). A live attenuated vaccine, derived from the PPRV Nigeria 75/1, was produced by multiple passages in Vero cells (Diallo et al., 1989). This vaccine provides a life-long immunity against PPR and is used worldwide. However, the existence of asymptomatic infections (Bidjeh et al., 1995) and the impossibility to discriminate between vaccinated and infected animals make it difficult economically to eradicate the infection. This objective, however, may be envisioned with the use of a DIVA vaccine (differentiating infected from vaccinated animals) (van Oirschot, 1999). One of the best options for such a vaccine for PPR control is probably to introduce a marker in the current PPR vaccine. Indeed, this vaccine has proven over decades to be intrinsically safe and it provides life-long immunity. Manipulation of the NSV RNA genome is now possible through the reverse genetics technology (for review, see Conzelmann and Meyers, 1996; Walpita and Flick, 2005). Using this, rinderpest and measles vaccine strains were used as vectors to express foreign genes, and it was shown that these recombinant viruses induced an immune response in the vaccine recipients (Baron et al., 1999; Lorin et al., 2004). These works and others on other negative strand RNA viruses demonstrated the potential of reverse genetics to generate DIVA vaccines. The genetic manipulation of the PPR vaccine strain requires the development of an in vitro rescue system based on the expression of a ribonucleoprotein (RNP) complex that associates to the NSV RNA genome. The RNP complex serves as the template for the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) activities that are responsible for all viral RNA synthesis. RdRp consists of two different virus-encoded proteins: the phosphoprotein P and the large protein L. The L subunit of the RdRp is thought to possess all the enzymatic activi-

* Corresponding author at: CIRAD, UMR 15 Contrôle des Maladies Animales, 34398 Montpellier cedex 5, France. Tel.: +33 467593705; fax: +33 467593798.
E-mail address: emmanuel.albina@cirad.fr (E. Albina).

0168-1702/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.virusres.2009.06.002

ties associated with RNA synthesis, including initiation, elongation, termination, capping, methylation, and polyadenylation (Schnell and Conzelmann, 1995). Seven sequences of the L gene and trailer of PPRV are available in GenBank (accession nos. AJ555616, AJ849636, AY560591, X74443, EU364809, EU267273 and EU267274, all submitted between 2003 and 2007). The first and fourth sequences were generated from the vaccine strain PPRV 75/1 (Diallo et al., 1989), but they have ten nucleotide (nt) variations. In addition, the overall nt identity for the seven sequences is only 87.7%. Therefore, the objectives of this work were to clone the full length of the L gene and virus trailer of the PPR vaccine strain Nigeria 75/1, to generate and analyze the corresponding sequences, and to check in vitro by reverse genetics the biological activities of the L protein expressed from this cloned L gene. To our knowledge, this is the first comparative sequence analysis of the L gene of peste des petits ruminants virus and the first demonstration of the RNA-dependent RNA-polymerase activity in vitro of the PPRV vaccine strain Nig75/1 in a complete PPRV reverse genetics assay. Our results also complete and correct the sequence of the full-length genome of the vaccine strain PPRV 75/1 (GenBank accession no. X74443).

2. Material and methods

2.1. Cell culture and virus production

VERO cells (ECACC no. 84113001) were used for the replication of the virus. They were grown at 37 °C and 5% CO_2 in modified Eagle's medium (MEM, Eurobio, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Invitrogen, France). The vaccine strain PPRV Nigeria 75/1 was derived from a virulent strain isolated in Nigeria in 1975 by attenuation through multiple successive passages on VERO cells (Diallo et al., 1989). For the production of genetic material in this study, the VERO cells were infected with the virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01. The virus was harvested after 5–7 days of cell culture, when the cytopathic effect affected about 80% of the cells.

2.2. RNA and DNA preparation, L gene and trailer cloning

The approach was based on direct cloning of the full-length L gene and trailer. The virus RNA was first extracted from infected cells using the RNeasy Mini kit according to the instructions of the manufacturer (Qiagen, France) and retro-transcribed with the "ImProm II reverse Transcription system" (Promega, France, A3800). Complementary DNA was amplified with the Expand Long Template PCR system (Roche, France) using the following primers designed in a previous unpublished study by gene walking sequencing of the L polymerase gene of PPRV Nig75/1: forward AGTTCGATTGAATTTCAGGGGC and reverse ACCAGACAAAGCTGGG. The purified segment was cloned in PCR XL Topo vector according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, France).

Plasmids were replicated in Top 10 competent bacteria (Invitrogen, France) cultivated on LB agar medium (Gibco, Invitrogen, France) under kanamycin selection (30 μg/ml). The X-Gal selection marker (80 μg/ml, Promega, France) was used according to standard procedure for the detection of transformed bacteria. Transformed bacteria were confirmed by specific PCR on the cloned fragment, and then plasmids produced by bacteria cell cultures were purified by the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, France) and sequenced as described below.

2.3. Sequence analysis

Sequencing was done in both directions and each position was read four times on three different clones, by primer walking procedure and according to the sequencing protocol of ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit (Perkin–Elmer Applied Biosystem, France) on an automated ABI Prism 377 (Perkin–Elmer, France). The L gene sequences of other morbilliviruses and other paramyxoviruses were downloaded from GenBank. The viruses used in the phylogenetic analysis are listed in supplementary material A. The alignment of nt sequences were created by the ClustalW program (Vector NTI, Invitrogen, France). Phylogenetic analysis was carried out by means of the "criterion of neighborhood based on the principle of parsimony" (Saitou and Nei, 1987). Gaps in the multiple sequence alignments were considered as missing data and therefore, excluded from the calculation of dissimilarities. Dissimilarities and edge length of dissimilarities between the sequences were first determined with Darwin software (Perrier et al., 2003), selecting the correction of (Kimura, 1980). Tree construction was based on the unweighted "Neighbor-Joining" method proposed by (Gascuel, 1997). Trees were generated with the TreeCon MATRIXWprogram of Darwin (Van de Peer and De Wachter, 1993). "Bootstrap" confidence values were calculated on 1000 replicates according to the maximum likelihood approach of (Felsenstein, 1981).

The similarity along the amino acid (aa) sequences of L polymerases included in the multiple sequence alignments was generated by the Vector NTI (suite 10, Invitrogen, France). Conserved and variable regions on the L protein alignment of the different viruses were identified by the software. Features of the protein L-PPRV1 were identified by different software applications accessible on line (see supplementary material B). The consensus secondary structure from all structures generated by these softwares was used for further analysis of our LPPRV1 amino acid sequence. Other motifs found in the literature were also placed.

2.4. Expression of the L gene

The L gene was further sub-cloned in a pCIneo plasmid (Promega, France) under the Human cytomegalovirus promoter. Then, VERO cells were prepared to be at 80% confluence at 24 h and transfected with the plasmid (0.05 ng/cell) using the Fugene6 transfection reagent according to the manufacturer instructions (Roche, France). After 48–72 h, the presence of PPRV L polymerase protein in the cell cytoplasm was checked by indirect immunofluorescence. Because of the presence of common antigens in the L proteins of PPRV and measles virus, we used a rabbit polyclonal antibody against the L of measles virus for this immunofluorescence test. This polyclonal antibody gave a good signal/background ratio in our hands.

2.5. Functional activities of L protein

To assess the biological activity of the L polymerase of PPRV 75/1 vaccine strain, we developed a rescue system for minigenome. The expression of proteins from a negative RNA coding sequence requires the presence of the PPRV ribonucleoprotein complex consisting of the nucleoprotein (N), the phosphoprotein (P), and the L polymerase. Therefore, we developed a minigenome rescue system similar to the one described by Bailey et al. (2007). The minigenome consisted of a plasmid with a T7 polymerase promoter followed downstream by the reverse complementary sequence of PPRV1 leader, the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene, and the PPRV1 trailer. This sequence was finally completed by the human delta virus ribozyme and the T7 polymerase terminator. For the rescue of the minigenome, Vero cells were infected with a recombinant Fowlpox virus that expressed the prokaryotic T7 polymerase (gift from M. Skinner, Institute of Animal Health, Compton, United Kingdom). Infected cells were then co-transfected with the minigenome and plasmids expressing the N, P, and L genes of PPRV1 (ratio 20:20:1) under the control of the human cytomegalovirus pro-

Table 1
Identity percentages of the L gene and protein from different morbilliviruses and the Tupaia, Hendra, and human parainfluenza virus 1 (HPV1).

Amino acid sequence	Nucleotide sequence								
	MV1	RPV1	PPRV1	Dolphin	CDV1	PDV	Tupaia	Hendra	HPV1
MV1		73	65	69	66	65	54	54	50
RPV1	81		68	68	66	65	53	53	49
PPRV1	75	76		68	65	65	54	53	49
Dolphin	74	75	74		67	67	54	54	50
CDV1	72	73	71	75		79	55	54	50
PDV	72	72	71	75	90		55	54	51
Tupaia	49	48	49	49	50	50		53	49
Hendra	46	46	46	45	45	45	44		50
HPV1	38	38	38	38	38	38	38	38	

moter (pCMV). The positive control of this study consisted of the PPRV vaccine strain (1 $TCID_{50}$/cell) instead of plasmids N, P, and L. The negative control corresponded to the same experiment without L in the assay. The biological activity of PPRV L polymerase was then assessed by the presence of fluorescent cells. To confirm the expression of eGFP, total RNA was extracted from 10^6 cells 48 h post-transfection using the RNeasy mini kit (Qiagen, France). Then, mRNA was purified from total RNA treated with DNase I from Turbo DNA free kit (Ambion, Applied Biosystems, France), by using the Oligotex mRNA spin column (Qiagen, France). The absence of DNA was verified by direct PCR on total RNA and mRNA with eGFP primers EGFPC1-F (CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG) and EGFPC1-R (CACGAACTCCAGCAGGACCATG). Complementary DNA was generated from the mRNA as described previously in this paper and tested by specific PCR for eGFP and the housekeeping gene β actin. eGFP PCR was performed using primers EGFPC1-F and EGFPC1-R while β actin PCR was based on the following primers forward (ACCAACTGGGACGACATGGAGA) and reverse (AGCTGGTCCTGCTCGAAGTC) on the other hand. Twofold serial dilutions of the PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel in Tris–Acetate–EDTA buffer (TAE).

3. Results

The full complementary DNA sequence of the L gene and trailer generated in this study is accessible in GenBank (PPRV1, full genome sequence, accession no. X74443). Nucleotide homologies among PPRV strains were examined (excluding PPRV2, accession no. AJ555616, because of sequence mistakes relative to PPRV1, see supplementary material C). Maximum identity (98%) was observed between Nigerian strains PPRV1 (Nigeria 75/1) and PPRV6 (Nigeria 76/1) and between strains PPRV3 (Indian strain), PPRV4 (Turkish

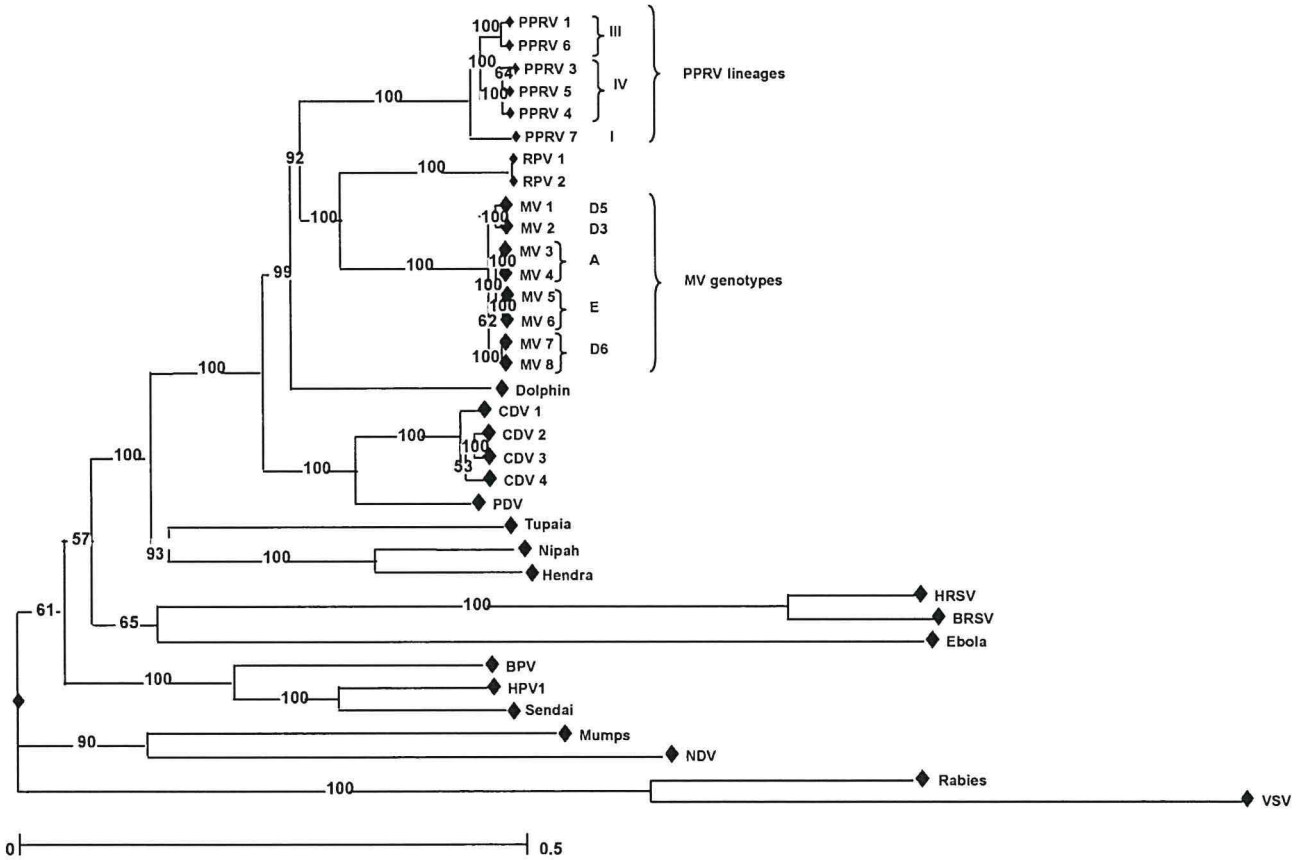


Fig. 1. Majority rule consensus tree of L gene of different paramyxoviruses based on the multiple alignment of the nucleotide sequences ("Neighbor-Joining method"). "Bootstrap values" on 1000 tree replicates are shown on each edge of the majority rule consensus tree. The scale represents the edge length of dissimilarities between the sequences, thus illustrating the phylogenetic relationship between the viruses. PPRV and MV lineages were placed according the description of Kwiatek et al. (2007) and Bankamp et al. (2008), respectively.

Table 2
Comparison of the features of the L gene and trailer of different morbilliviruses and one virus representative of the genus *Henipavirus* (Hendra virus) and *Respirovirus* (human parainfluenza virus). Consensus sequences are used for each virus and observed mutations are shown below. In the last column are shown, from upstream to downstream, the polyadenylation signal (in bold), polyadenylated sequence, intergenic motif (in bold), and the 5′-terminal part of virus genome in which the last 16 nucleotides (in bold) are conserved and form inverted terminal repeats of the genome. "–" represents a deletion and C means a consensus with the sequence of MV. [1] Accession numbers for sequence analysis: all are in A.

Virus	Description of L gene				5' terminal region of L gene and 5' end of genome[c]
	3'UTR size in nucleotides	3'UTR sequence (in bold, intergenic motif and initiation codon)	Gene size in nucleotides	5'UTR size in nucleotides	ORF size in nucleotides	
MV[1]	22	CGU AGGGUCCAAGUGGUUCCCCGUU **AUG** G U	6552	69	6643	**AUU** AAAGAAAA **CUU** -UGAAAAUACGAAGUUUCUAUU CCCAGCUUUGUCUGGU
RPV[2]	22	CGU AGGGUCCAAGCUGUAUUUCACC **AUG** G	6552	69	6643	ACU AAAGAAAA CUU -CAAAGAUGUGAAGUUUCUAUC CCCAGCUUUGUCUGGU GA C A
PPRV[3]	22	CUU AGGAGCCAAGGUUGUAGGAGCC **AUG** G G G C A G G	6552	69	6643	AUU AAAGAAAA CUA -CAUAUUGGAUAAGUAUCUAUU CCCAGCUUUGUCUGGU C U
Dolphin[3]	22	CUU AGGGACCAGGAUUAUUGCAGAG **AUG** G	6552	69	6643	AUU AAGAAAAA CAA -GAUUCGAUUUAAGUACCUAUA CCCAGCUUUGUCUGGU
CDV[4]	22	CUA AGGAUCCAAGAUCCUUUUAGCC **AUG** G G C U	6555	65	6642	ACG AAAAAAAA CAA CGGUUAUUAAUAAGUUAUCAUA CCCAGCUUUGUCUGGU C
PDV[5]	22	CUA AGGAUCCAGGAUCCUUUUAACC **AUG** G	6555	65	6642	ACU AAAAAAAA CAA CAGAAGUUAAUAAGUUUC.....
Hendra[3]	153	CUU AGGACCCAAGUCCUUUAAACGU [N_{131}] **AUG** G	6735	67	6955	AUU AAGAAAAA CUU -----AAUA---ACGAUCUCUC UUUACCCUUGUUCGGU
HPV1[3]	7	CUU AGGGU----------UA **AUG** C	6693	100	6800	AGU AAGAAAAA CUU [N_{18}] AAUAAUAUAUCGAUAUUUCU UAAACUCUUGUCUGGU

strain), and PPRV5 (Chinese strain). The first two strains clustered in the same lineage while the three others fell in another lineage as identified by sequence comparison on the F and N genes (Kerur et al., 2007; Kwiatek et al., 2007; Ozkul et al., 2002; Shaila et al., 1996). The minimum percentage of identity (91%) was between the Ivorian strain PPRV7 and PPRV3/PPRV5. Again, the Ivorian strain belongs to a distinct lineage. The comparison of the L gene and protein sequences of PPRV with those of other paramyxoviruses is shown in Table 1. PPRV appears more closely related to the Rinderpest and Measles viruses, with 65-73% of nt identity and 75-81% of aa identity. Within the morbilliviruses, the closest viruses are first RPV and MV and then CDV and PDV. The phylogenetic tree in Fig. 1 confirms these relationships. Six morbillivirus clusters are identified: PDV, CDV, Dolphin morbillivirus, PPRV, RPV, and MV. These clusters are more closely related to the Tupaia, Nipah, and Hendra viruses than to other paramyxoviruses. The common features of the L genes and trailers from virus representatives of the 6 morbillivirus clusters, the Hendra virus, and human parainfluenza virus 1 were also compared (Table 2). Following the intergenic sequence CUU, the PPRV1 L gene, with a length of 6653 nt, starts with AGGAGCCAAG, in agreement with the consensus morbillivirus L gene start motif sequence AGG(A/G)NCCA(A/G)G where N is any nt. This motif is also conserved in the Hendra virus. All morbillivirus genes start with a similar intergenic sequence. This motif is a recognition signal for the virus polymerase that has to generate different viral mRNA when reading the full genome sequence from its most 3′-end. As for HRSV and VSV (Kuo et al., 1996, 1997; Wang et al., 2007), this conserved nt motif is supposed to be the site for the initiation of mRNA synthesis and is also recognized in a sequence-specific manner as a signal for the formation of the methylated cap, these two activities probably being located within the L protein (Li et al., 2006; Whelan et al., 2004). The 5′ and 3′ untranslated region (UTR) consists of 22 and 65–69 nt, respectively. The coding region starts from nt 23 and stops at nt 6552 or 6555: it encodes a protein of 2183 aa for PPRV, RPV, MV, and Dolphin morbillivirus and 2184 aa for CDV and PDV. Except for MV, all other morbilliviruses have their AUG initiation codon flanked by a Kozak sequence motif (A/G)CC AUG that promotes translation in eukaryotic cells (Kozak, 1986). For all viruses, the 5′ UTR region is ended by a polyadenylation signal A(UU/CU/CG/GU) AA(AG/AA/GA)AAAA followed by the intergenic region CUA, CUU, or CAA and the sequence of the trailer, which consists of 30–54 nt. The organization of this region in morbilliviruses is comparable to that in other paramyxoviruses.

Protein L from our vaccine strain PPRV1 is 2183 aa long for an estimated molecular weight of 247.4 kDa. The multiple sequence alignments of this protein with others of morbilliviruses shows three conserved domains A, B, and C separated by two variable regions (positions 607–652 and 1695–1717, Fig. 2). The whole L protein is neutral but the first two domains are negatively charged while the last domain is positively charged. The negative charge of the first two domains may be linked to their capacity to interact with the virus genomic RNA. The N and P proteins that also interact with the virus genome to form the ribonucleoprotein complex are also negatively charged. The online softwares used for sequence motif and homology search allowed us to identify different functional regions. The RNA-dependent RNA-polymerase activity encompasses region 255–1314. In the second domain B, region 653–860 is the RNA-directed RNA-polymerase catalytic site. It contains four putative polymerase core motifs (Fig. 2). Through the multiple sequence alignments of morbillivirus L proteins and Pfam search, a FtsJ-like methyltransferase domain was identified at position 1758–1964, which also matched with the N-terminus of flaviviral NS5 protein (PF01728, result not shown). This is a putative methyltransferase domain involved in viral RNA capping. Indeed, our sequence contains all of the nine motifs previously described as involved in the methyltransferase activity of NSV (Fig. 2). Among them, the K–D–K–E tetrad (K1766 D1881, K1917 and E1954), 1788-GEGSGSM-1794, 1809-YNSG-1812, and 1855-TWVG-1858 would be considered the most critical. The first aa of the tetrad K–D–K–E of our LPPRV1 is included in an α-helix whereas the three others are within a β-sheet (Fig. 2). Several other specific motifs were also identified on our sequence. The schematic representation of these motifs is shown in Fig. 3. Motif VLYPEVHLDSPIV (in position 9–21 predicted to be a coiled stretch between a β-sheet and an α-helix, see Fig. 2) is a putative interaction domain for the P protein. It differs from the motif found in other morbilliviruses by only one aa: the first is V for PPRV strains so far sequenced instead of I for other morbilliviruses. It is not known whether this change has any significance on the activity of the motif. Motif KEKEIKETGRLFAKMTYKM (position 535–553) is on an α-helix (Fig. 2) and is thought to be

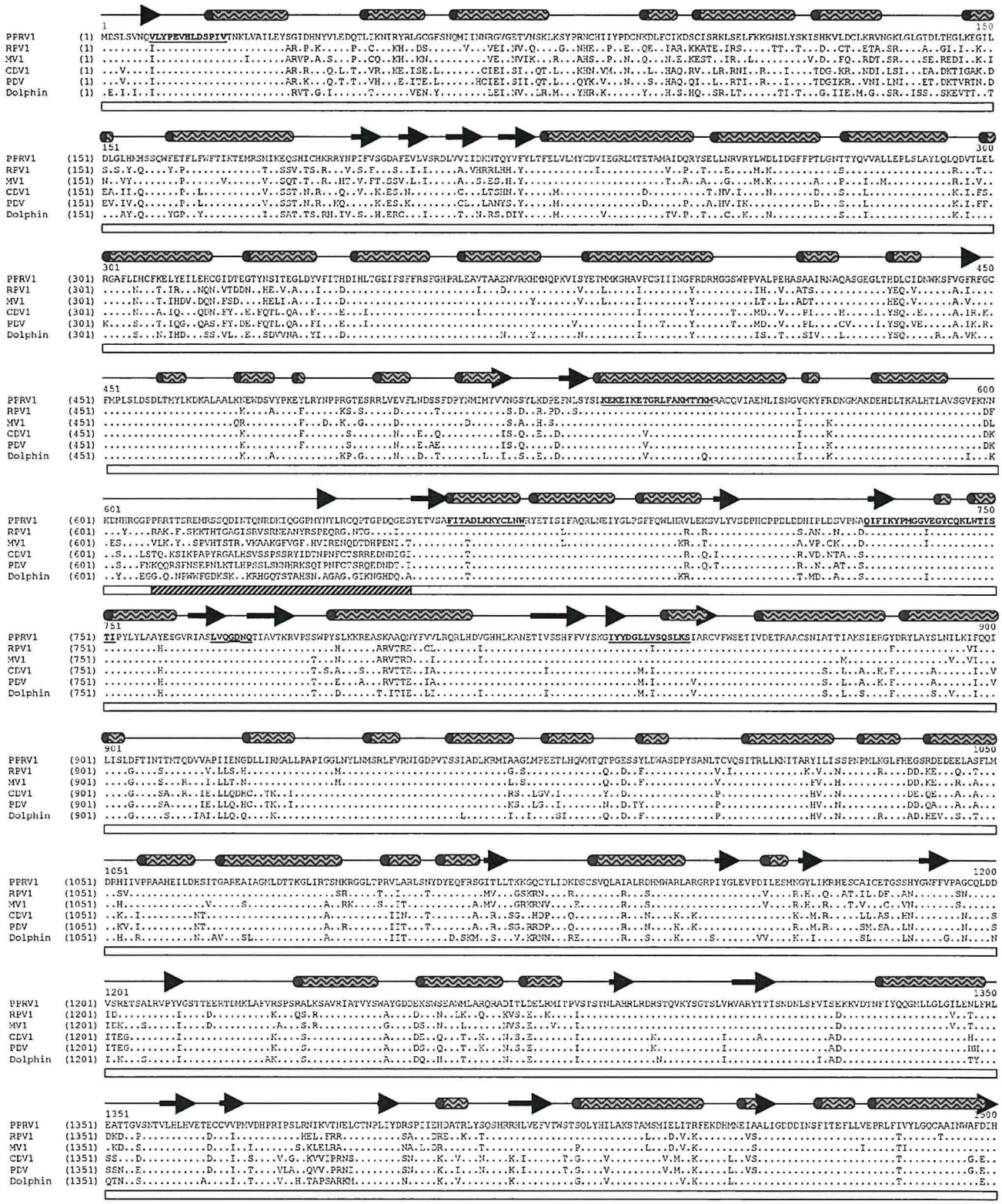


Fig. 2. Multiple alignments of L amino acid sequences of different morbilliviruses. The amino acid sequence of the PPRV1 strain Nig75/1 is the first one, and only variations in the sequences of other morbilliviruses are shown. Characters in bold type and thin underline represent functional motifs. Bold characters with thick underline represent critical residues or motifs. The polymerase catalytic domain is in position 653–860 in which are underlined the four polymerase core motifs (Muthuchelvan et al., 2005; Poch et al., 1989). The methyltransferase domain is in position 1758–1964, in which the nine core motifs are underlined (Bujnicki and Rychlewski, 2002). The secondary structure of the LPPRV1 protein is depicted above the amino acid sequence (roll, arrow, and line for α-helix, β-sheet, and coils, respectively). Open bars underline the three conserved domains A, B and C whereas slashed bars show the variable hinge regions.

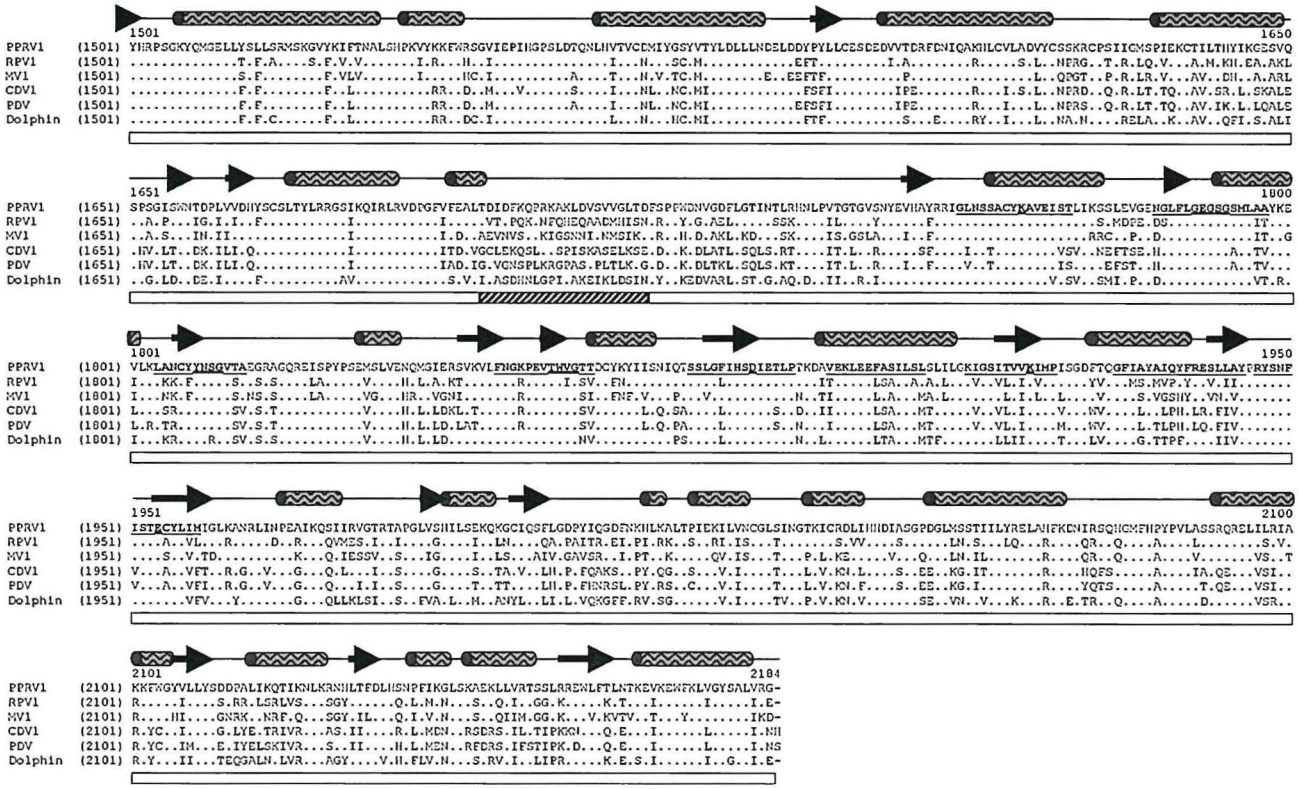


Fig. 2. (*Continued*).

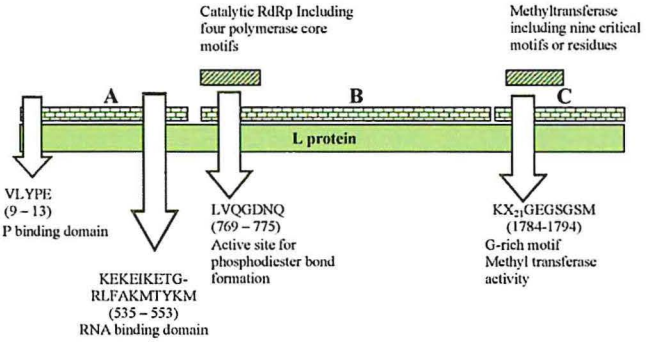


Fig. 3. Schematic representation of the L-PPRV1 protein domains, its functional regions and motifs. The green bar represents the L protein (2183 amino acids). The brick-bars show the three domains of the L protein. The slashed bars give the position of two functional regions of the L protein and arrows localize the functional motifs. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

the RNA-binding motif. The N-terminal part of domain B contains the four core polymerase motifs that are thought to be essential for polymerase function and includes motif LVQGDNQ, which is the active site for phosphodiester bond formation. This motif is in position 769–775 and is predicted by the different softwares to be a coiled stretch between two β-sheets (Fig. 2). However, the prediction model of Garnier, which is the only one to differentiate turns and coils, identified motif QGD as turns between two adjacent β-sheets, thus giving a β-turn-β structure to motif LVQGDNQ. Motif KX_{17}GLFLGEGSGSM found in the third domain (position 1766–1794 predicted to be a coiled stretch adjacent to an α-helix, Fig. 2) is a putative purine nucleotide-binding element.

The complete PPRV1 L gene was cloned into a plasmid for the expression of the protein in VERO cells. Fig. 4 shows the detection of the protein by indirect immunofluorescence. In a second approach, we tested the capacity of our PPRV L gene to express a biologically active RdRp. For that, we used the eGFP minigenome rescue system. The reporter gene eGFP was clearly detected by epifluorescence microscopy (Fig. 5a). The capacity of our PPRV1 L gene to express a

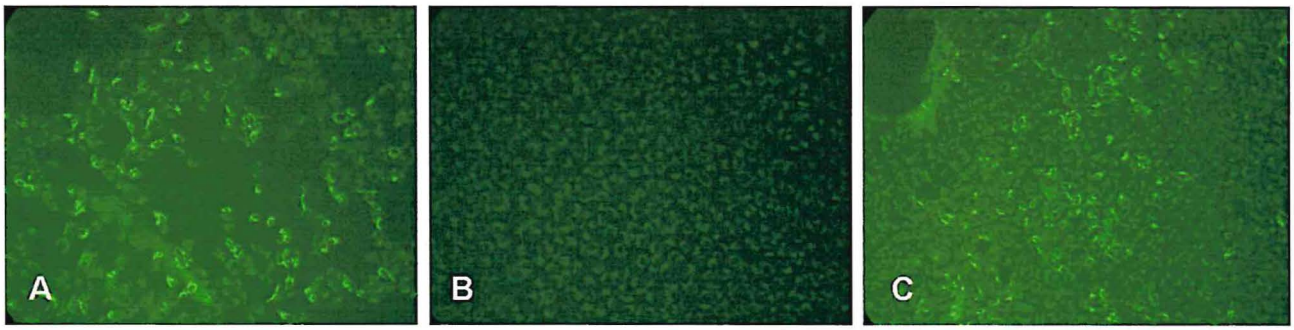


Fig. 4. Expression of L detected by indirect immunofluorescence with anti-L antibody. (a) Vero cells + plasmid L; (b) negative control (Vero cells); (c) positive control (Vero cells infected with PPRV 75/1).

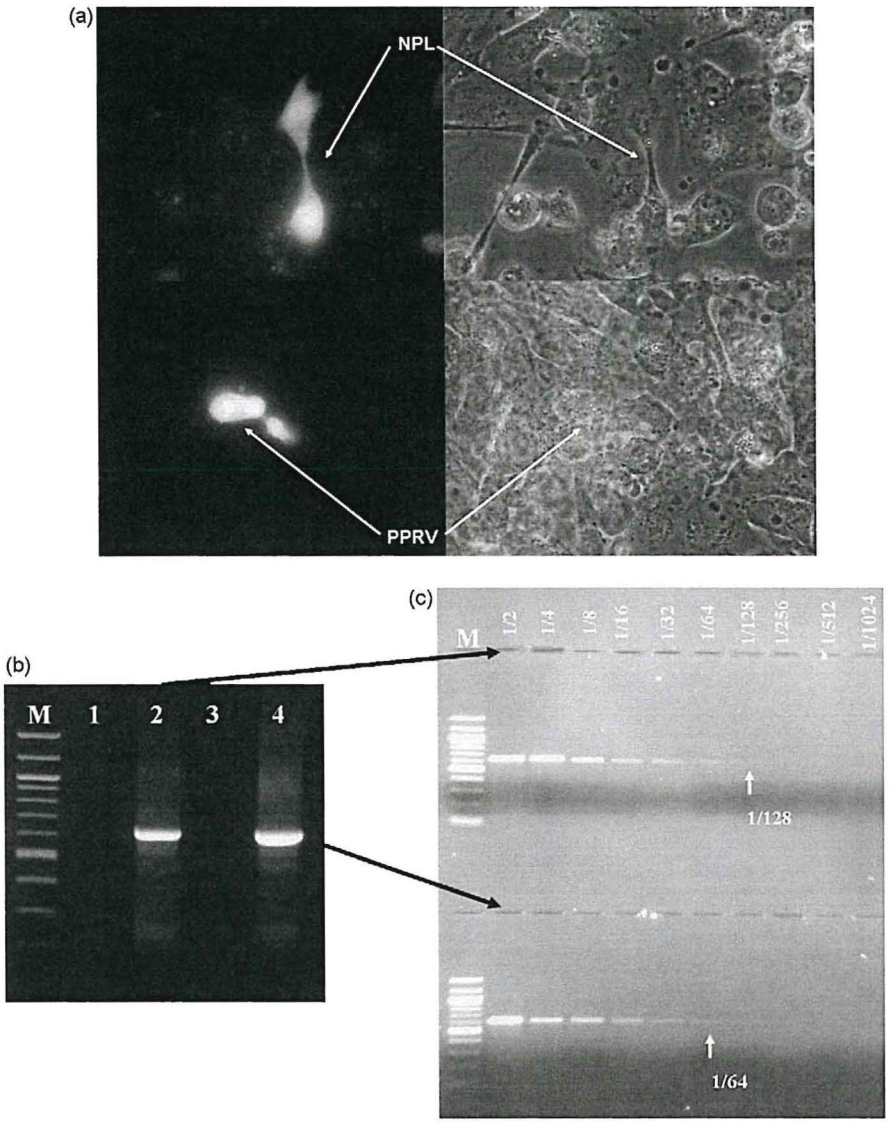


Fig. 5. Functionality of L-PPRV using the minigenome eGFP. (a) Epifluorescence and light microscopy on cells either transfected with the L polymerase (NPL) or infected with the virus (PPRV). Only cells expressing a full ribonucleoprotein complex allowed the expression of the minigenome. (b) Expression of eGFP checked by RT-PCR on the mRNA. M: 100 bp DNA ladder (Biolabs); (1) RNA from Vero cells; (2) RNA from Vero cells co-transfected with N, P, L and minigenome; (3) RNA from Vero cells transfected with N, P and minigenome; (4) RNA from Vero cells transfected with minigenome and infected with PPRV. Only cells expressing a full ribonucleoprotein complex (N + P + L) allowed the expression of eGFP (lanes 2 and 4). (c) Twofold serial dilutions of the eGFP PCR products were compared to estimate the relative detection limit: the cloned L-PPRV and the virus gave detection limits of 1/128 and 1/64, respectively.

biologically active L polymerase was further confirmed by RT-PCR. We first checked by PCR that the extraction of total RNA from VERO cells and the DNase treatment removed the residual minigenome DNA (data not shown). Then, RT-PCR carried out on purified mRNA only gave a product when a functional L polymerase was present, either by transfection of the L-PPRV1 gene with N and P genes or by infection with PPRV1 (Fig. 5b). To determine the relative efficacy of the cloned L-PPRV in comparison with the virus itself, twofold serial dilutions of the eGFP and β actin PCR products were deposited on electrophoresis gels. The detection limits for the β actin gene were 1/256 and 1/512 for the cloned L-PPRV and the virus, respectively (data not shown). In contrast, the detection limits of the eGFP gene were 1/128 and 1/64, respectively (Fig. 5c).

4. Discussion

The full-length sequence of the L gene and trailer of the PPRV vaccine strain Nigeria 75/1 is established in this paper. The L protein, the viral RdRp of non-segmented negative single-stranded RNA viruses (NSV), is the largest of the virus proteins and is also the least abundant. It migrates with an apparent molecular weight of about 200–250 kDa and because of its size, it is assumed to carry all the activities necessary for genomic RNA replication and transcription, including mRNA capping, methylation, termination, and polyadenylation. The L-PPRV1 is composed of 2183 aa like the L protein of other PPRV strains and MV, RPV, and DMV (Baron and Barrett, 1995; Blumberg et al., 1988; Rima et al., 2005). This protein is one aa longer in CDV and PDV (McIlhatton et al., 1997; Sidhu et al., 1993). Analysis of the predicted nt and aa sequence of our L-PPRV1 gene with six other PPRV sequences allowed us to identify putative sequencing errors in the previously submitted L gene of PPRV 75/1 (GenBank accession no. AJ555616) and also in another vaccine strain of Indian origin (Muthuchelvan et al., 2005). Our sequence was confirmed to express a functional RdRp in our reverse genetics system. To our knowledge, this reverse genetics assay is the first described that use N, P and L proteins, and the leader and trailer of PPRV Nig75/1 for the minigenome expression. The reconstituted RNP of PPRV Nig75/1 appeared to

be quantitatively as efficient as the virus itself in the minigenome assay. The phylogenetic analysis carried out on the L gene of the different morbilliviruses confirms previous results on other virus genes: in the group, CDV and PDV form a branch that is more distantly related to those of other viruses; among those, MV and RPV are the closest (Diallo et al., 1994; Haffar et al., 1999; Meyer and Diallo, 1995). The L gene sequence analysis carried out in this paper shows that morbilliviruses are genetically more closely related to Tupaia and Henipa viruses than to other paramyxoviruses. At the aa level, the L protein is conserved between morbilliviruses, the lowest percentage of identity being 71% between CDV and PPRV. The alignment of the L proteins of morbilliviruses confirms that these proteins have three conserved domains separated by less conserved "hinge regions" in contrast with other genera of the family *Paramyxoviridae*, for which six conserved domains were described (Bailey et al., 2005; McIlhatton et al., 1997). All deletion/site mutation studies carried out so far on the L protein of different NSV indicate that these different domains perform the diverse functions of the protein (Cartee et al., 2003; Malur et al., 2002a,b). Since the functional motifs of the L proteins of morbilliviruses are not fully delineated, our L-PPRV1 was analyzed using bioinformatics tools available on line. These tools allowed sequence and motif identification by comparison with protein databanks containing information on other RNA viruses. Important motifs like RNA-binding site, phosphodiester bonds-forming site, and purine nucleotide-binding element described by others (Blumberg et al., 1988; Poch et al., 1989, 1990) are found in the L of PPRV Nigeria 75/1 and they are well conserved with the sequence of other morbillivirus L proteins (see supplementary material D).

The L protein can only function as an RdRp when it is associated with its co-factor, the P protein. Within the N-terminal region of the L protein, which is highly conserved among *Paramyxoviridae*, was mapped the P-binding site for MV, simian virus 5, and RPV (Chattopadhyay et al., 2004; Horikami et al., 1994; Parks, 1994). RNA synthesis activity is lost with the deletion of this fragment. Sequence ILYPEVHLDSPIV at positions 9–21 of paramyxoviruses is involved in P–L interactions, which are required to stabilize the polymerase (Cevik et al., 2007; Holmes and Moyer, 2002; Malur et al., 2002a). It must be stressed, however, that deletions/mutations in other regions of the L protein may contribute to the loss of P–L complex formation, simply by the misfolding or aggregation of the L protein (Canter and Perrault, 1996). The conserved sequence ILYPEVHLDSPIV found in morbilliviruses has an exception with PPRV strains, which present a V instead of I as first aa of the motif. Both aa are hydrophobic and their substitution is not considered to have an impact on the function of the motif. Only the use of a reverse genetics system and the comparison of two L proteins with I/V substitution could give a definite answer. In addition to its involvement in P binding, the N-terminus of the L of paramyxoviruses, at least the first 174 aa for the Sendai virus, seems to be implicated in L self-interactions without the participation of P (Cevik et al., 2007; Smallwood and Moyer, 2004). Functional P being in the form of a tetramer (Tarbouriech et al., 2000), it was proposed by Cevik et al. (2003) that the functional RdRp complex may consist of the association of L_2P_4 or L_2P_8. An even higher degree of complexity is achieved when considering that the C and V proteins that are expressed from the P gene of morbilliviruses can also bind the L protein and exhibit regulatory functions (Sweetman et al., 2001).

In conclusion, a complete comparative sequence analysis of the L gene and protein of peste des petits ruminants virus strain Nig75/1 is provided and all important motifs and secondary structures previously described for paramyxoviruses are identified. This gene is shown to express a functional polymerase in vitro. This work is a step towards the development of the first infectious PPRV clone by reverse genetics.

Acknowledgments

This study was partly funded by the EU INCO projet Markvac (003670, 01/01/2005–31/12/2008) and the EU network of excellence EPIZONE (016236, 01/06/2006–31/05/2011). The authors thank Stéphane Biacchesi from the Unité de Virologie et Immunologie, INRA Jouy- en-Josas (France) for very helpful advices and technical help on reverse genetics and Julien Cau from the Institut de Génétique Humaine, Montpellier, France for his help for the microscopy and pictures.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.virusres.2009.06.002.

References

Bailey, D., Banyard, A., Dash, P., Ozkul, A., Barrett, T., 2005. Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus. Virus Res. 110 (1–2), 119–124.

Bailey, D., Chard, L.S., Dash, P., Barrett, T., Banyard, A.C., 2007. Reverse genetics for peste-des-petits-ruminants virus (PPRV): promoter and protein specificities. Virus Res. 126 (1–2), 250–255.

Bankamp, B., Lopareva, E.N., Kremer, J.R., Tian, Y., Clemens, M.S., Patel, R., Fowlkes, A.L., Kessler, J.R., Muller, C.P., Bellini, W.J., Rota, P.A., 2008. Genetic variability and mRNA editing frequencies of the phosphoprotein genes of wild-type measles viruses. Virus Res. 135 (2), 298–306.

Baron, M.D., Barrett, T., 1995. The sequence of the N and L genes of rinderpest virus, and the 5′ and 3′ extra-genic sequences: the completion of the genome sequence of the virus. Vet. Microbiol. 44 (2-4), 175–185.

Baron, M.D., Foster-Cuevas, M., Baron, J., Barrett, T., 1999. Expression in cattle of epitopes of a heterologous virus using a recombinant rinderpest virus. J. Gen. Virol. 80 (Pt 8), 2031–2039.

Bidjeh, K., Bornarel, P., Imadine, M., Lancelot, R., 1995. First-time isolation of the peste des petits ruminants (PPR) virus in Chad and experimental induction of the disease. Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop. 48 (4), 295–300.

Blumberg, B.M., Crowley, J.C., Silverman, J.I., Menonna, J., Cook, S.D., Dowling, P.C., 1988. Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase. Virology 164 (2), 487–497.

Bujnicki, J.M., Rychlewski, L., 2002. In silico identification, structure prediction and phylogenetic analysis of the 2′-O-ribose (cap 1) methyltransferase domain in the large structural protein of ssRNA negative-strand viruses. Protein Eng. 15 (2), 101–108.

Canter, D.M., Perrault, J., 1996. Stabilization of vesicular stomatitis virus L polymerase protein by P protein binding: a small deletion in the C-terminal domain of L abrogates binding. Virology 219 (2), 376–386.

Cartee, T.L., Megaw, A.G., Oomens, A.G., Wertz, G.W., 2003. Identification of a single amino acid change in the human respiratory syncytial virus L protein that affects transcriptional termination. J. Virol. 77 (13), 7352–7360.

Cevik, B., Smallwood, S., Moyer, S.A., 2003. The L-L oligomerization domain resides at the very N-terminus of the sendai virus L RNA polymerase protein. Virology 313 (2), 525–536.

Cevik, B., Smallwood, S., Moyer, S.A., 2007. Two N-terminal regions of the Sendai virus L RNA polymerase protein participate in oligomerization. Virology 363 (1), 189–197.

Chattopadhyay, A., Raha, T., Shaila, M.S., 2004. Effect of single amino acid mutations in the conserved GDNQ motif of L protein of Rinderpest virus on RNA synthesis in vitro and in vivo. Virus Res. 99 (2), 139–145.

Conzelmann, K.K., Meyers, G., 1996. Genetic engineering of animal RNA viruses. Trends Microbiol. 4 (10), 386–393.

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 (Pt 1), 233–237.

Diallo, A., Taylor, W.P., Lefevre, P.C., Provost, A., 1989. Attenuation of a strain of rinderpest virus: potential homologous live vaccine. Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop. 42 (3), 311–319.

Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17 (6), 368–376.

Gascuel, O., 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. Mol. Biol. Evol. 14 (7), 685–695.

Haffar, A., Libeau, G., Moussa, A., Cecile, M., Diallo, A., 1999. The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. Virus Res. 64 (1), 69–75.

Holmes, D.E., Moyer, S.A., 2002. The phosphoprotein (P) binding site resides in the N terminus of the L polymerase subunit of sendai virus. J. Virol. 76 (6), 3078–3083.

Horikami, S.M., Smallwood, S., Bankamp, B., Moyer, S.A., 1994. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. Virology 205 (2), 540–545.

Kerur, N., Jhala, M.K., Joshi, C.G., 2007. Genetic characterization of Indian peste des petits ruminants virus (PPRV) by sequencing and phylogenetic analysis of fusion protein and nucleoprotein gene segments. Res. Vet. Sci..
Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16 (2), 111–120.
Kozak, M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell 44 (2), 283–292.
Kuo, L., Fearns, R., Collins, P.L., 1997. Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. J. Virol. 71 (7), 4944–4953.
Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M.G., Collins, P.L., 1996. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. J. Virol. 70 (10), 6892–6901.
Kwiatek, O., Minet, C., Grillet, C., Hurard, C., Carlsson, E., Karimov, B., Albina, E., Diallo, A., Libeau, G., 2007. Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. J. Comp. Pathol. 136 (2-3), 111–119.
Lefevre, P.C., Diallo, A., 1990. Peste des petits ruminants. Rev. Sci. Technol. 9 (4), 935–981.
Li, J., Wang, J.T., Whelan, S.P., 2006. A unique strategy for mRNA cap methylation used by vesicular stomatitis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (22), 8493–8498.
Lorin, C., Mollet, L., Delebecque, F., Combredet, C., Hurtrel, B., Charneau, P., Brahic, M., Tangy, F., 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 (1), 146–157.
Malur, A.G., Choudhary, S.K., De, B.P., Banerjee, A.K., 2002a. Role of a highly conserved NH(2)-terminal domain of the human parainfluenza virus type 3 RNA polymerase. J. Virol. 76 (16), 8101–8109.
Malur, A.G., Gupta, N.K., De Bishnu, P., Banerjee, A.K., 2002b. Analysis of the mutations in the active site of the RNA-dependent RNA polymerase of human parainfluenza virus type 3 (HPIV3). Gene Exp. 10 (3), 93–100.
McIlhatton, M.A., Curran, M.D., Rima, B.K., 1997. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence). J. Gen. Virol. 78 (Pt 3), 571–576.
Meyer, G., Diallo, A., 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 (1), 23–35.
Muthuchelvan, D., Sanyal, A., Singh, R.P., Hemadri, D., Sen, A., Sreenivasa, B.P., Singh, R.K., Bandyopadhyay, S.K., 2005. Comparative sequence analysis of the large polymerase protein (L) gene of peste-des-petits ruminants (PPR) vaccine virus of Indian origin. Arch. Virol. 150 (12), 2467–2481, Epub 2005 August 1.
Ozkul, A., Akca, Y., Alkan, F., Barrett, T., Karaoglu, T., Dagalp, S.B., Anderson, J., Yesilbag, K., Cokcaliskan, C., Gencay, A., Burgu, I., 2002. Prevalence, distribution, and host range of Peste des petits ruminants virus, Turkey. Emerg. Infect. Dis. 8 (7), 708–712.
Parks, G.D., 1994. Mapping of a region of the paramyxovirus L protein required for the formation of a stable complex with the viral phosphoprotein P. J. Virol. 68 (8), 4862–4872.
Perrier, X., Flori, A., Bonnet, F., 2003. Data analysis methods. In: Hamos, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. (Eds.), Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants. Gifield Science Publishers, Montpellier, pp. 43–76.
Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., Tordo, N., 1990. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. J. Gen. Virol. 71 (Pt 5), 1153–1162.
Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., Tordo, N., 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. EMBO J. 8 (12), 3867–3874.
Rima, B.K., Collin, A.M., Earle, J.A., 2005. Completion of the sequence of a cetacean morbillivirus and comparative analysis of the complete genome sequences of four morbilliviruses. Virus Genes 30 (1), 113–119.
Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4 (4), 406–425.
Schnell, M.J., Conzelmann, K.K., 1995. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. Virology 214 (2), 522–530.
Shaila, M.S., Shamaki, D., Forsyth, M.A., Diallo, A., Goatley, L., Kitching, R.P., Barrett, T., 1996. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. Virus Res. 43 (2), 149–153.
Sidhu, M.S., Menonna, J.P., Cook, S.D., Dowling, P.C., Udem, S.A., 1993. Canine distemper virus L gene: sequence and comparison with related viruses. Virology 193 (1), 50–65.
Smallwood, S., Moyer, S.A., 2004. The L polymerase protein of parainfluenza virus 3 forms an oligomer and can interact with the heterologous Sendai virus L, P and C proteins. Virology 318 (1), 439–450.
Sweetman, D.A., Miskin, J., Baron, M.D., 2001. Rinderpest virus C and V proteins interact with the major (L) component of the viral polymerase. Virology 281 (2), 193–204.
Tarbouriech, N., Curran, J., Ebel, C., Ruigrok, R.W., Burmeister, W.P., 2000. On the domain structure and the polymerization state of the sendai virus P protein. Virology 266 (1), 99–109.
Van de Peer, Y., De Wachter, R., 1993. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. Comput. Appl. Biosci. 9 (2), 177–182.
van Oirschot, J.T., 1999. Diva vaccines that reduce virus transmission. J. Biotechnol. 73 (2-3), 195–205.
Walpita, P., Flick, R., 2005. Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: a global perspective. FEMS Microbiol. Lett. 244 (1), 9–18.
Wang, J.T., McElvain, L.E., Whelan, S.P., 2007. Vesicular stomatitis virus mRNA capping machinery requires specific cis-acting signals in the RNA. J. Virol. 81 (20), 11499–11506.
Whelan, S.P., Barr, J.N., Wertz, G.W., 2004. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 283, 61–119.

John Libbey EUROTEXT

L'essentiel de l'information scientifique et médicale

www.jle.com

Le sommaire de ce numéro

http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio_rech/vir/sommaire.md?type=text.html

Montrouge, le 26/08/2009

E. Albina

Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article en format électronique (pdf) :
Infections à Morbillivirus chez les ruminants: la peste bovine en voie d'éradication et la peste des petits ruminants en extension vers le Nord

paru dans
Virologie, 2009, Volume 13, Numéro 2

John Libbey Eurotext

Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire. Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.
© John Libbey Eurotext, 2009

Virologie

Virologie 2009, 13 (2) : 103-13

Infections à *Morbillivirus* chez les ruminants : la peste bovine en voie d'éradication et la peste des petits ruminants en extension vers le Nord

C. Minet[1]
O. Kwiatek[1]
D. Keita[1]
A. Diallo[2]
G. Libeau[1]
E. Albina[1]

[1] UMR Cirad/Inra, Contrôles des maladies, 34398 Montpellier, France
<emmanuel.albina@cirad.fr>

[2] Animal Production Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency's Laboratories, Wagramerstrasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienne, Autriche

Résumé. La peste bovine et la peste des petits ruminants sont des maladies contagieuses affectant les ruminants domestiques et sauvages et entraînant des taux de mortalités souvent élevés. Elles sont provoquées par deux virus différents mais très apparentés antigéniquement et appartenant au genre *Morbillivirus*, famille des *Paramyxoviridae*. Les outils de contrôle effectif de ces deux maladies (vaccins et tests de diagnostic spécifiques) sont disponibles. Ils ont été mis à profit lors du programme mondial d'éradication de la peste bovine, (GREP pour Global Rinderpest Eradication Programme). Grâce à ce programme, il sera certainement possible de déclarer l'éradication de la peste bovine à l'échelle du globe en 2010. Malheureusement une telle campagne mondiale n'existe pas pour la peste des petits ruminants qui est en pleine expansion. Avec l'infection de la Turquie et du Maroc, elle se trouve maintenant aux portes de l'Europe. Pour une lutte plus efficace contre cette maladie, supportable sur le plan économique, la mise au point d'un vaccin marqueur ou DIVA (differentiation of infected and vaccinated animals) et d'un test sérologique discriminant serait un atout supplémentaire. Les outils de génétique inverse permettent désormais d'envisager cette possibilité.

Mots clés : peste bovine, peste des petits ruminants, *Paramyxoviridae*, *Morbillivirus*

Abstract. Rinderpest (RP) and peste des petits ruminants (PPR) are contagious viral diseases of domestic and wild ruminants producing high mortality. They are caused by viruses belonging to the *Morbillivirus* genus, *Paramyxoviridae* family. Control tools (vaccines and specific diagnostic tests) exist for these two diseases. They have been successfully used during the global rinderpest eradication programme (GREP) and the disease is expected to be eradicated by 2010. In contrast, a similar programme does not exist for PPR, which is still spreading in Africa and Asia. The persistence of PPR in Turkey and its recent introduction in Morocco, make the disease a real threat for Europe. Improvement of control measures against PPR would benefit from the development of a marker vaccine and its companion serological test, thus allowing the differentiation between infected and vaccinated animals (DIVA vaccines and tests). The recent development of reverse genetics for morbilliviruses offers this new possibility.

Key words: rinderpest, peste des petits ruminants, *Paramyxoviridae*, *Morbillivirus*

doi: 10.1684/vir.2009.0250

Tirés à part : E. Albina

© John Libbey Eurotext, 2009

Tiré à part auteur

Introduction

La peste bovine (PB) et la peste des petits ruminants (PPR) sont des maladies contagieuses dues à deux virus différents mais très apparentés et appartenant au genre *Morbillivirus*. Avec des taux de mortalité et de morbidité souvent élevés car pouvant atteindre 90 à 100 %, ces deux maladies ont un impact économique important dans les pays où elles sévissent. Elles font partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE).

Dans le passé, les épizooties de peste bovine ont été catastrophiques d'un point de vue économique. Considérée par certains comme pouvant être une des sept plaies d'Égypte, cette maladie animale reste une des plus meurtrières chez le bovin. Disparue d'Europe depuis la première moitié du XXe siècle, elle est en passe de devenir, grâce à la mobilisation de la communauté internationale, la première maladie éradiquée au niveau mondial, après la variole humaine.

Au contraire de la peste bovine, la peste des petits ruminants est en expansion. Elle ne bénéficie pas d'une campagne mondiale de contrôle. Décrite seulement pour la première fois en 1942, en Côte d'Ivoire [1], la PPR a probablement existé bien longtemps avant cette date mais était probablement confondue avec d'autres maladies de symptomatologie similaire telles que la peste bovine, à cause des lésions érosives des muqueuses et de la diarrhée, ou la pasteurellose à cause des signes de bronchopneumonie. À la faveur du développement et de la disponibilité d'outils permettant un diagnostic spécifique, les foyers de PPR sont de plus en plus signalés ça et là. Elle sévit de façon endémique en Afrique sub-saharienne, au Moyen-Orient et en Asie du Sud-Ouest. À présent son aire d'extension est aux frontières de l'Europe. En effet, en octobre 2004, des foyers de PPR ont été observés dans la province d'Edirne, région de la Thrace en Turquie [2, 3]. Plus récemment, en juillet 2008, un premier foyer de PPR a été déclaré au Maroc par l'OIE. En quelques semaines, la maladie s'est étendue sur le territoire marocain pour atteindre les régions frontalières de l'Algérie [4]. La présence avérée de la peste des petits ruminants au Maroc constitue une menace réelle pour les pays d'Europe du sud, avec lesquels les échanges existent depuis longtemps, notamment l'Espagne où le cheptel ovin et caprin est important.

Des virus pléomorphes

Les virus PB (PBV) et PPR (PPRV) sont des virus du genre *Morbillivirus*, famille des *Paramyxoviridae*. Les virus de ce groupe possèdent une spécificité d'hôte assez prononcée. Le virus PB infecte les artiodactyles, principalement les bovins et les buffles, mais également les petits ruminants. Le virus de la peste des petits ruminants affecte les petits ruminants domestiques (ovins, caprins) et de la faune sauvage. Le virus de la rougeole (MV pour Measles Virus) affecte l'homme, celui de la maladie de Carré (CDV pour Canine Distemper Virus) les canidés. D'autres *Morbillivirus* atteignent plus particulièrement les cétacés (CMV pour Cetacean *Morbillivirus*) ou les phoques (PDV pour Phocine Distemper Virus).

Les *Morbillivirus* sont des virus enveloppés, pléomorphes dont la taille varie de 150 à 700 nm. Leur génome a une taille d'environ 16 kilobases (kb) et respecte la « règle de six », qui s'applique à tous les virus de la sous-famille des *Paramyxovirinae*. Cette règle est la conséquence de l'association de chaque sous-unité de la nucléoprotéine N à exactement six nucléotides. Quand le génome est un multiple de six, l'efficacité de réplication est meilleure. En effet, la réplication de ces virus peut entraîner des erreurs : la « règle de six » laisse l'avantage aux génomes corrects [5]. Ce génome est constitué d'un ARN monocaténaire négatif non segmenté codant pour six protéines structurales *(figure 1)*. Cet ARN ne peut pas être directement traduit en protéines. Il doit d'abord être transcrit en ARN messagers (ARNm) par la polymérase virale. Ces ARNm sont ensuite traduits en protéines par la machinerie enzymatique de la cellule infectée. Le virion est composé de 6 protéines : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et l'ARN polymérase ARN dépendante (L). Le génome du virus PPR comprend 15 948 bases. Il est associé à trois protéines virales pour former la ribonucléoprotéine (RNP) : N, P et L, protéines composées respectivement de 525, 509 et 2 183 acides aminés (aa). La ribonucléoprotéine (RNP) constitue la structure minimale essentielle pour la transcription et la réplication du génome viral dans le cytoplasme cellulaire. La nucléoprotéine N est la protéine majoritaire de la RNP. Elle forme un manchon protecteur autour de l'ARN génomique et est responsable de la structure hélicoïdale de la nucléocapside. La région centrale est engagée dans le processus d'auto-assemblage et d'encapsidation de l'ARN génomique. La phosphoprotéine P interagit avec la protéine N et favorise l'encapsidation des ARN viraux néosynthétisés. Elle interagit aussi avec L pour former le complexe de polymérisation de l'ARN dépendant de l'ARN, responsable de la synthèse des ARNm et de la réplication de l'ARN viral génomique. La polymérase L possède toutes les activités enzymatiques nécessaires à la polymérisation de l'ARN, initiation, élongation, terminaison, coiffage, méthylation et polyadénylation [6]. Lors de sa libération, le virus emprunte son enveloppe à celle de la cellule hôte dans laquelle s'insèrent trois autres protéines virales : M, F et H. La protéine M, la plus petite des protéines virales (335 aa) recouvre la face intérieure de l'enveloppe virale et sert de lien entre la nucléocapside [7] et les deux glycoprotéines de

© John Libbey Eurotext, 2009

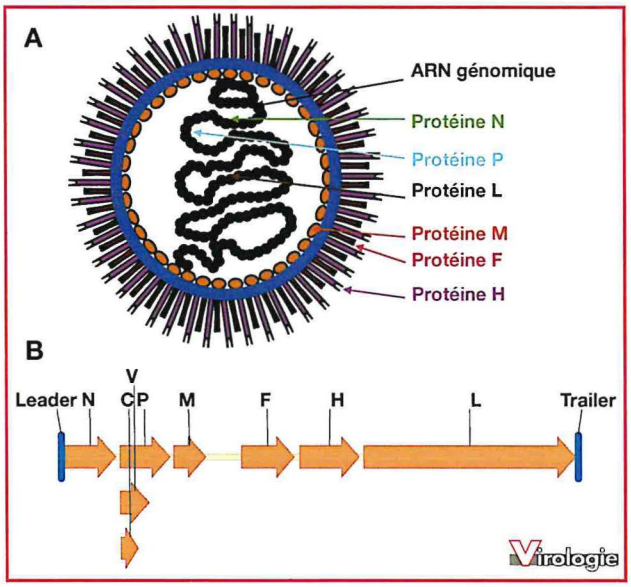


Figure 1. Structure des *Morbillivirus* (d'après D. Keita [43]).
1A. Schéma de la structure de *Morbillivirus* (d'après D. Keita [43]).
1B. Représentation du génome de la peste des petits ruminants.

surface, F et H. La protéine d'hémagglutinine, longue de 609 aa, est une protéine glycosylée qui permet la fixation du virus au récepteur de la cellule hôte. La seconde protéine glycosylée est la protéine de fusion F, composée de 546 aa. Elle est responsable de la fusion entre les membranes du virus et de la cellule hôte. Cette activité n'est acquise qu'à la suite d'un processus de maturation qui aboutit au clivage de F en deux sous-unités F1 et F2. Ce clivage, effectué par une protéase cellulaire, permet de libérer à l'extrémité de F1 un peptide très hydrophobe dit peptide de fusion.

Le génome viral encode également deux protéines non structurales C et V qui ne sont retrouvées que dans les cellules infectées. Leur synthèse est dirigée par le gène de la protéine P. Au cours de la multiplication virale, le gène correspondant à cette protéine est transcrit en deux ARNm. Le premier est une copie exacte du gène. Il est traduit en P (507 aa) à partir du premier codon d'initiation AUG rencontré par les ribosomes de la cellule infectée. Cependant il existe un deuxième codon AUG en aval du premier, en position 23 sur l'ARN, et qui se trouve dans des conditions favorables pour jouer une fonction de codon d'initiation. Il permet la synthèse d'une deuxième protéine C (177 aa) plus petite que P. Le second ARNm du gène P n'est pas une copie exacte du gène car il comporte une base G supplémentaire insérée dans l'ARN au cours de sa synthèse par un mécanisme de bégaiement de la polymérase connu sous le terme « editing ». L'addition de cette base supplémentaire est faite à un point précis de l'ARNm, en position 693. La conséquence de cette insertion est le changement du cadre de lecture de l'ARNm à partir de cette position, générant un nouveau codon stop à la position 894 : ce processus entraîne la synthèse d'une protéine plus courte, la protéine V (298 aa). La protéine C a un rôle dans la transcription et la V, dans la réplication du génome viral. Ces deux protéines interfèrent également avec l'immunité innée en bloquant la réponse interféron [8, 9]. La transcription et la réplication du virus sont contrôlées par deux régions non codantes situées aux extrémités 3' et 5' du génome, le *leader* et le *trailer*. Le *leader* (positions 1-54) et la partie 3' non codante de la N (positions 55-107) constituent le promoteur génomique (107 bases), utilisé par la polymérase virale pour la synthèse des ARNm. La partie 5' non codante de la polymérase L (positions 15840-15908) et le *trailer* (15909-15948) constituent le promoteur antigénomique (109 bases), utilisé par la polymérase pour la synthèse de l'ARN (+), intermédiaire de réplication du génome viral. Le *leader* et le *trailer* ont des séquences inversées complémentaires sur leurs 16 premières bases qui constituent probablement le signal de reconnaissance de la polymérase virale.

Interactions virus et cellules

L'infection de la cellule cible commence par l'interaction des spicules de la glycoprotéine H avec son ligand cellulaire [10]. Deux protéines cellulaires ont été identifiées comme récepteur permettant la fixation du virus de la rougeole (MV). Comme pour le virus de la rougeole ou de la peste bovine, le ligand naturel du virus PPR est probablement le CD150 (surface leukocyte adhesion molecule) ou SLAM (Signalling Lymphocyte Activation Molecule). Ce premier récepteur cellulaire utilisé par les morbillivirus est exprimé à la surface des lymphocytes activés, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques matures [11, 12]. Le second récepteur est le récepteur CD46, initialement décrit comme un composant du système de régulation de l'activité du complément [13]. Ce récepteur est utilisé par les souches vaccinales du virus de la rougeole, adaptées à la culture cellulaire [14, 15].

Une fois le virus lié à la cellule par le pont H-CD150, la protéine virale de fusion F intervient pour permettre la fusion des deux membranes virale et cellulaire. À la suite de ce processus de fusion, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte. Grâce au complexe RNP, la transcription du génome viral est initiée. La polymérase ARN dépendante de l'ARN s'accroche au promoteur génomique de l'extrémité 3' du génome viral et entame la synthèse d'ARN. À chaque séquence intergénique constituée de trois nucléotides, signal de pause pour la polymérase lors de la transcription, l'ARN synthétisé est décroché avant que l'enzyme n'entame la copie du gène suivant.

© John Libbey Eurotext, 2009

Ce mode de transcription aboutit à la synthèse d'ARNm monocistroniques traduits en protéines par la cellule hôte. De temps en temps, des molécules de polymérase ne « respectent » pas une ou deux pauses intergéniques, ce qui aboutit à la synthèse d'ARNm bi ou tri-cistroniques, produits aberrants de la transcription. Les séquences intergéniques sont très conservées chez les *Morbillivirus :* CUU, CUA, CAA ou CUA. Pour le PPRV, cette séquence est CUU. Elles sont dites séquences d'atténuation de la synthèse d'ARN. Elles ne sont reconnues comme signal de pause ou d'atténuation que lors de l'étape de transcription et ne sont pas copiées. Une des conséquences du phénomène d'atténuation, en plus de la synthèse d'ARNm mono, bi et tricistroniques est l'existence d'un gradient dans la quantité de ces produits car il n'y a qu'un seul point d'entrée de la polymérase, le promoteur génomique pour la transcription. En raison de cette organisation génomique, plus un gène est éloigné du promoteur, moins il est transcrit. Autrement dit c'est l'ARNm N qui est le plus produit et l'ARNm L qui l'est le moins. L'agencement des gènes dans le génome viral correspond à la proportion relative de chaque protéine nécessaire à la production du virus, N étant la protéine la plus abondante dans le virion et L la moins représentée.

Au cours du cycle viral, la transcription fait progressivement place à la réplication qui consiste en la synthèse complète de génomes viraux. Les signaux trinucléotides atténuateurs ne sont plus reconnus par la polymérase, qui ne relâche l'ARN synthétisé qu'à la fin de la copie complète du génome, aboutissant ainsi au brin d'ARN+ complémentaire entier. Cet antigénome est ensuite répliqué pour produire un génome de polarité négative. La transition entre la transcription et la réplication dépend de l'accumulation des protéines N et P. Ces protéines néoformées par la traduction des nouveaux ARNm vont se lier à l'ARN en cours de synthèse par la polymérase. Cette association entraîne probablement un changement allostérique de la polymérase qui ne reconnaîtrait plus les signaux de pause. C'est ainsi que sont formées de nouvelles RNP virales. Celles-ci, grâce à l'affinité des protéines N et M, vont migrer vers la membrane cellulaire où sont insérées les glycoprotéines virales d'enveloppe, c'est-à-dire M, F et H. L'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe et les RNP permet la formation de bourgeons qui croissent pour finalement se détacher de la cellule cible et donner naissance à un virion complet dans le milieu extérieur. La multiplication du virus entraîne la mort et la lyse de la cellule.

Éléments de pathogénie

Le plus souvent, les infections à *Morbillivirus* entraînent des maladies aiguës avec des taux de mortalité élevés. En cas de guérison, une immunité de longue durée s'installe. Les virus PB [16] et PPR [10] sont des virus épithéliotropes, à l'origine d'infections caractérisées par des lésions des muqueuses qui entraînent diarrhées, jetages et larmoiements. Mais ce sont également des virus lymphotropes. Juste après infection, généralement par voie respiratoire, le virus se multiplie d'abord dans les organes lymphoïdes régionaux de l'hôte. Tous les lymphocytes, les macrophages et les cellules réticulaires peuvent être des cibles cellulaires de la multiplication virale. Les virions néoformés dans le système lymphoïde local sont ensuite disséminés par voie sanguine dans le reste de l'organisme avec un tropisme particulier pour le système immunitaire et les muqueuses. La multiplication du virus dans les cellules du système immunitaire, induisant leur destruction massive, entraîne une sévère immunodépression souvent à l'origine d'infections secondaires opportunistes. Les souches virales les plus pathogènes correspondraient à celles qui peuvent se multiplier rapidement dans les cellules lymphoïdes, alors que les souches atténuées auraient une capacité d'infection réduite ainsi qu'une perte de leur caractère épithéliotrope [17].

La PPR est surtout une maladie des petits ruminants. Le virus PPR a vraisemblablement une affinité plus importante pour les lymphocytes de ces espèces que pour ceux des bovins, et vice versa avec le virus PB [18]. L'espèce, la race et l'âge de l'animal influent sur l'expression de la maladie. D'autres infections, notamment bactériennes, peuvent intervenir dans la sévérité des signes cliniques.

La peste bovine

La durée d'incubation de la peste bovine est de quatre à sept jours en moyenne. Cette maladie peut apparaître sous plusieurs formes [16]. La forme aiguë peut se décomposer en quatre phases : prodromale, érosive, intestinale et finale. Au cours de la phase prodromale, une forte hyperthermie et un état typhique sont observés. Ces signes sont suivis de l'apparition de jetage muqueux et de larmoiements abondants *(figure 2)*, ainsi que de la congestion des muqueuses buccales et oculaires. La phase érosive laisse apparaître dans un premier temps un liseré congestif à la base des incisives. Celui-ci évolue jusqu'au développement de vastes zones de muqueuses ulcérées, recouvertes d'un enduit de tissu nécrotique à l'odeur nauséabonde. La phase intestinale apparaît au moment où la température commence à chuter. Elle se caractérise par une diarrhée profuse, parfois hémorragique *(encadré 1)*. L'animal, très déshydraté, meurt dans un état d'amaigrissement important six à douze jours après l'apparition des premiers signes cliniques. La maladie peut toutefois évoluer vers la guérison après plusieurs semaines de convalescence.

© John Libbey Eurotext, 2009

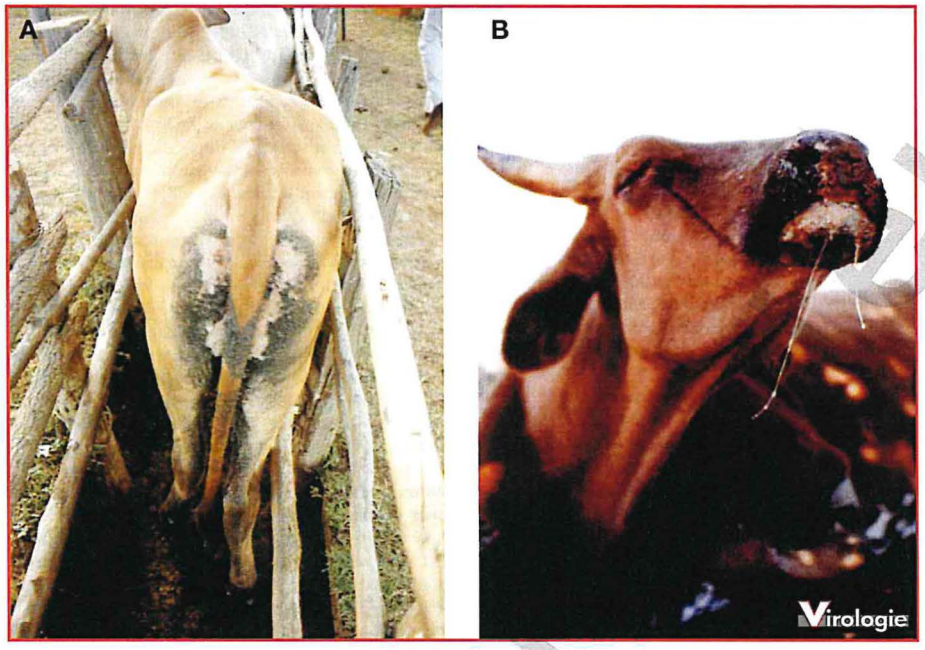


Figure 2. Signes cliniques des animaux atteints de la peste bovine. 2A : diarrhée ; 2B : jetage.

La forme suraiguë est caractérisée par une hyperthermie sans autre symptôme et une mortalité qui survient en trois à quatre jours. Les formes atypiques (nerveuse ou cutanée) peuvent exister mais sont rares. La forme subaiguë et la forme frustre se traduisent par des symptômes (hyperthermie et diarrhée passagère) moins marqués qui évoluent généralement vers la guérison. Cependant, la peste bovine peut réactiver un certain nombre d'infections latentes : d'autres symptômes viennent alors perturber le tableau clinique initial en provoquant notamment un second pic d'hyperthermie vers le sixième jour.

Chez les petits ruminants, l'infection par le virus PB passe souvent inaperçue. L'animal infecté est cependant dangereux sur le plan épidémiologique car il peut être source de diffusion du virus. La peste bovine se confond alors avec la peste des petits ruminants, et seul le diagnostic de laboratoire peut les distinguer.

La peste des petits ruminants

La peste des petits ruminants peut se développer sous quatre formes cliniques en fonction de la sensibilité de l'animal infecté [10]. La forme suraiguë affecte principalement les caprins de plus de quatre mois. L'incubation du virus est de trois jours environ. La maladie se traduit par une forte hyperthermie et une perte d'appétit, la congestion des muqueuses buccales et oculaires *(figure 3)*. Un à deux jours après le début de l'hyperthermie, des larmoiements et un jetage séromuqueux apparaissent. Une diarrhée profuse se déclare quand la température commence à baisser. Cinq à six jours après les premiers symptômes, la mort survient dans 100 % des cas. La forme aiguë a une incubation de cinq à six jours. La température de l'animal augmente et les mêmes signes cliniques que pour la forme suraiguë sont présents mais ils sont moins prononcés. Jetage et larmoiement sont mucopurulents et la respiration est laborieuse. Quatre à cinq jours après le début de la maladie, la température baisse et s'accompagne d'une diarrhée et d'une érosion des muqueuses buccales. La mort survient dans les dix jours suivant le début de l'hyperthermie et le taux de mortalité s'élève à 70-80 %. En cas de guérison, la convalescence est rapide. La forme subaiguë se traduit après environ cinq jours d'incubation par une faible hyperthermie. La gravité de cette forme est fonction du degré de complication microbienne souvent fréquente. Les autres signes cliniques sont peu intenses, voire absents. Le jetage est peu abondant et se dessèche autour des nasaux pour former des croûtes qui peuvent alors être confondues avec l'ecthyma contagieux *(tableau 1)*. La forme inapparente est assez fréquente, notamment dans les zones sahéliennes et ne peut être révélée que lors d'enquêtes sérologiques.

L'importance d'un dépistage spécifique

La peste bovine, sous sa forme classique ou aiguë, peut être aisément confondue avec la diarrhée à virus des bovins

© John Libbey Eurotext, 2009

Encadré 1

Lésions macroscopiques et microscopiques de la peste bovine et de la PPR.

Lésions macroscopiques

Peste bovine

Le cadavre est émacié et souillé par la diarrhée.
Les lésions buccales sont étendues et recouvertes d'un enduit pultacé cachant souvent une ulcération.
La muqueuse intestinale est recouverte d'un enduit visqueux muco sanguin. Celle du gros intestin présente des zones d'hémorragie et d'ulcération.
Les plaques de Peyer sont le siège d'une importante altération.
D'autres organes peuvent être atteints : des lésions peuvent être présentes dans la caillette mais sont rares dans les premiers estomacs.
La muqueuse vésicale est congestionnée avec des pétéchies.
Le rein est congestionné et la muqueuse de la vessie desquamée.

Peste des Petits Ruminants

L'animal mort de la PPR est amaigri et souillé par la diarrhée.
Les lésions buccales sont les plus évidentes.
Les lésions sont congestives voire hémorragiques au niveau de l'intestin, et linéaires au niveau du pharynx et de l'œsophage.
La trachée est congestionnée et présente un exsudat spumeux.
La rate, elle aussi congestionnée, est ferme.
Les plaques de Peyer sont le siège de foyers de nécrose.
L'atteinte pulmonaire est fonction de la complication bactérienne.
Les nœuds lymphatiques sont œdémateux et friables.

Lésions microscopiques

Peste bovine

Au niveau de l'épithélium des muqueuses, les lésions commencent par une dégénérescence des cellules avec des inclusions intracytoplasmiques.
La fusion des cellules donne naissance à des syncytia.
Les foyers sont ensuite envahis par les polynucléaires.
Une nécrose des cellules épithéliales apparaît et progresse vers les muqueuses jusqu'à former un enduit pultacé. En s'éliminant, celui-ci laisse place à une érosion à bords francs.
Dans les tissus lymphoïdes, les neutrophiles infiltrent la zone corticale de façon précoce. L'infiltration des plaques de Peyer entraîne la nécrose du centre germinatif et peut aboutir à la formation d'abcès évoluant en ulcération.

Peste des Petits Ruminants

Les cellules épithéliales sont vacuolisées et infiltrées par des polynucléaires.
Au niveau des muqueuses de l'intestin, l'épithélium est épais avec une infiltration par des neutrophiles et une dégénérescence glandulaire.
Le parenchyme pulmonaire est infiltré par des neutrophiles et des macrophages.
Des syncytia sont retrouvés dans les différents organes.
Des dépôts de fibrine ainsi que des bactéries sont présents dans les foyers de bronchopneumonie.

(BVD) [16]. Toutefois, l'impact de la peste bovine à l'échelle d'un troupeau dépasse celui de la BVD. La peste des petits ruminants, quant à elle, peut être confondue avec plusieurs maladies des petits ruminants, telles que l'ecthyma contagieux, la pleuropneumonie contagieuse caprine, la pasteurellose ou la peste bovine *(tableau 1)* [10]. Un diagnostic de laboratoire est donc nécessaire pour distinguer ces maladies. En cas de suspicion de l'une ou l'autre des pestes, des prélèvements peuvent être réalisés sur les animaux vivants (prélèvements de sang en

© John Libbey Eurotext, 2009

Tirés-à-part auteur

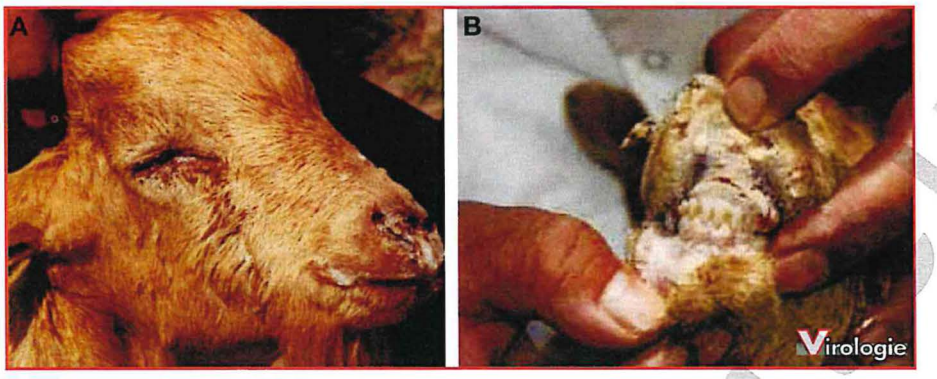


Figure 3. Signes cliniques des animaux atteints de la Peste des Petits Ruminants. 3A : jetage purulent ; 3B : lésions buccales.

Tableau 1. Diagnostic différentiel de la Peste des Petits Ruminants. La Peste des Petits Ruminants peut être confondue avec plusieurs maladies des ruminants, telles que l'ecthyma contagieux, la pleuropneumonie contagieuse caprine, la pasteurellose ou la peste bovine. Seul un diagnostic de laboratoire permet de faire la distinction entre la PPR et la PB. Le tableau montre les symptômes de la PPR en comparaison avec ceux des autres maladies. + : présence des symptômes ; - : absence de symptômes

symptômes	Peste des Petits Ruminants (PPR)	Peste bovine	Ecthyma contagieux	Pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC)	Pasteurellose
Hyperthermie	+	+	+	+	+
Lésions érosives	+	+	-	-	-
Diarrhée	+	+	+	-	+
Jetage	+	+	+	+	+
Larmoiement	+	+	+	+	+

tube ou sur papier buvard [19], écouvillonnages oculaires et nasaux) ou sur les cadavres d'animaux (échantillons d'intestin, de poumon, de nœuds lymphatiques). Sauf pour les papiers buvards, il est important que la chaîne du froid soit respectée lors de l'expédition des échantillons du fait de la sensibilité des *Morbillivirus* à la chaleur. L'identification du virus dans les prélèvements est réalisée par des méthodes classiques de laboratoire [20]. L'immunodiffusion en gélose est une technique facile à mettre en œuvre mais elle ne donne des résultats qu'au bout de 24-48 heures. Elle est peu sensible et peut provoquer des confusions entre la peste bovine et celle des petits ruminants. Les techniques d'immunofluorescence sont spécifiques si des anticorps monoclonaux sont utilisés. Dans le cas de la PPR, le test d'hémagglutination [21], peu utilisé actuellement, est une méthode rapide de détection des anticorps. Il permet de différencier la peste bovine de la peste des petits ruminants, car contrairement au PPRV, le virus PB ne possède pas la propriété d'agglutination des globules rouges. Le test ELISA d'immunocapture [22], fondé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, est une méthode rapide et sensible pour un diagnostic différentiel entre les deux pestes des ruminants. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique rapide, sensible et spécifique. Elle est fondée sur l'amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par transcription inverse de l'ARN viral extrait des échantillons. L'amplification est réalisée avec des amorces propres à chaque virus ce qui donne un résultat spécifique [23]. L'isolement viral reste indispensable pour la caractérisation moléculaire fine du virus et pour alimenter les collections de souches de référence. L'isolement viral nécessite des échantillons de bonne qualité et bien conservés. Il se fait sur des cellules primaires (cellules embryonnaires de rein de veau pour la peste bovine, cellules de rein ou de poumon de mouton pour la PPR) ou sur des cellules Vero (cellules de rein de singe vert). Des cellules Vero exprimant le récepteur CD150 humain [24] semblent avoir une meilleure sensibilité que des cellules Vero classiques pour l'isolement du virus PPR. Le virus isolé est mis en évidence par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux spécifiques. Le diagnostic sérologique est recommandé par l'OIE dans le cadre d'échanges commerciaux d'animaux. Deux types de tests peuvent être utilisés. Le test de séroneutralisation est long et fastidieux (deux semaines pour obtenir un résultat) et nécessite l'utilisation de sérums et de cultures cellulaires stériles [25]. Des tests ELISA de compétition plus rapides (résultats obtenus en quelques heures) ont été développés [26]. Ils sont fondés sur l'utilisation d'anticorps anti-N ou anti-H et permettent de traiter un grand nombre d'échantillons à la fois. Toutefois, aucun

© John Libbey Eurotext, 2009

de ces tests ne permet d'effectuer une distinction systématique entre anticorps anti-PB et anti-PPR. Cependant, les tests ELISA-H ont une meilleure spécificité mais une moins bonne sensibilité que les tests ELISA-N. Par exemple, le test ELISA-NPPR peut détecter jusqu'à 30 % des sérums contenant des anticorps PB.

Grâce au succès consécutif à la mise en œuvre d'un programme mondial d'éradication (GREP pour Global Rinderpest Eradication Programme), la peste bovine a pratiquement disparu. Ce programme global consiste en un ensemble de mesures de contrôle et de vaccination. La déclaration officielle de son éradication en 2010 est en bonne voie, ce qui ferait de la PB la deuxième maladie infectieuse éliminée du globe, après la variole humaine *(figure 4)*. L'utilisation du vaccin PB est désormais interdite.

La peste des petits ruminants sévit actuellement de façon enzootique en Afrique sub-saharienne, aux Moyen et Proche-Orient et en Asie [27] *(figure 5)*. Depuis 2004, cette maladie est aux portes de l'Europe puisqu'elle est présente dans la région de la Thrace en Turquie [28]. Plus récemment, une épizootie de peste des petits ruminants s'est déclarée à l'été 2008, au Maroc. Elle constitue désormais une menace pour les autres pays du Maghreb et pour les pays du sud de l'Europe. La comparaison des séquences partielles de différents isolats provenant de différentes origines géographiques a permis d'identifier quatre lignées génétiques [27, 29] *(figure 5)*. La lignée IV, traditionnellement cantonnée au Moyen-Orient et en Asie, vient d'être introduite au Maroc.

Contrôle

La circulation d'animaux en provenance de zones infectées vers les pays indemnes doit être proscrite. En cas de foyers circonscrits en zone indemne, la solution la plus rapide et efficace reste l'abattage et la destruction des cadavres. Ces mesures permettent de recouvrer le statut indemne en quelques mois. Toutefois, cela suppose un système de surveillance clinique passive efficace permettant de détecter les premiers foyers de peste bovine ou de peste des petits ruminants en un temps relativement court. Ce système doit être complété par une capacité opérationnelle de diagnostic de laboratoire pour confirmer les suspicions cliniques et détecter toute infection subclinique. Lorsque l'infection a eu le temps de largement diffuser, seule une stratégie de vaccination massive peut être envisagée.

Le vaccin utilisé pour lutter contre la peste bovine est un vaccin à virus atténué par passages successifs en culture cellulaire [30]. Il confère une bonne immunité, pratiquement à vie. Cette efficacité a été un des éléments du succès de la campagne mondiale d'éradication de la peste bovine. Le même vaccin a longtemps été utilisé contre la peste des

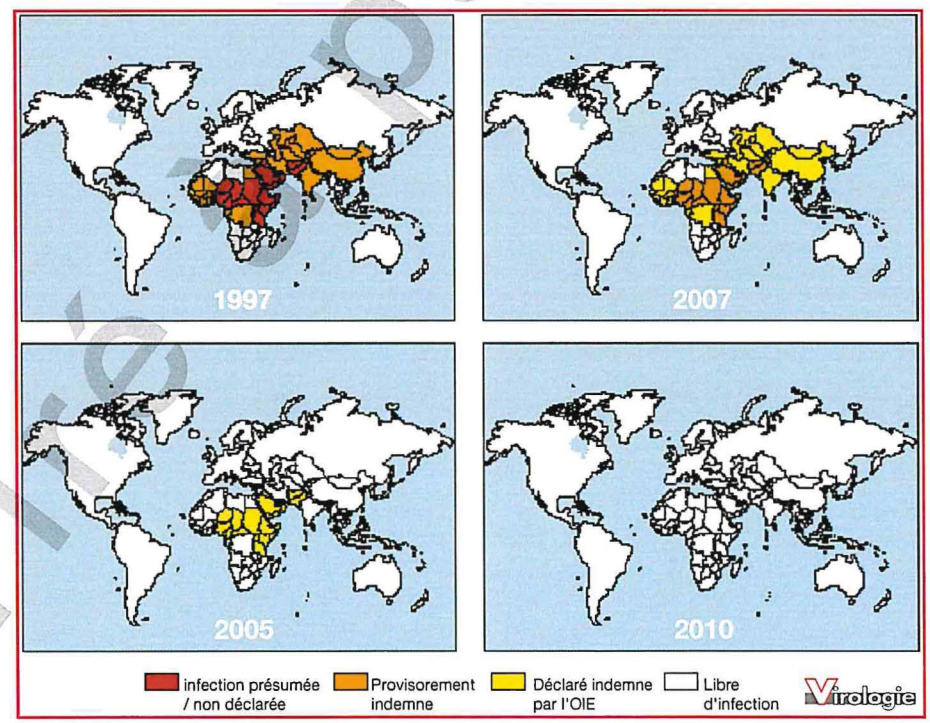


Figure 4. Évolution de la répartition géographique de la peste bovine et objectif d'éradication en 2010 (d'après FAO).

© John Libbey Eurotext, 2009

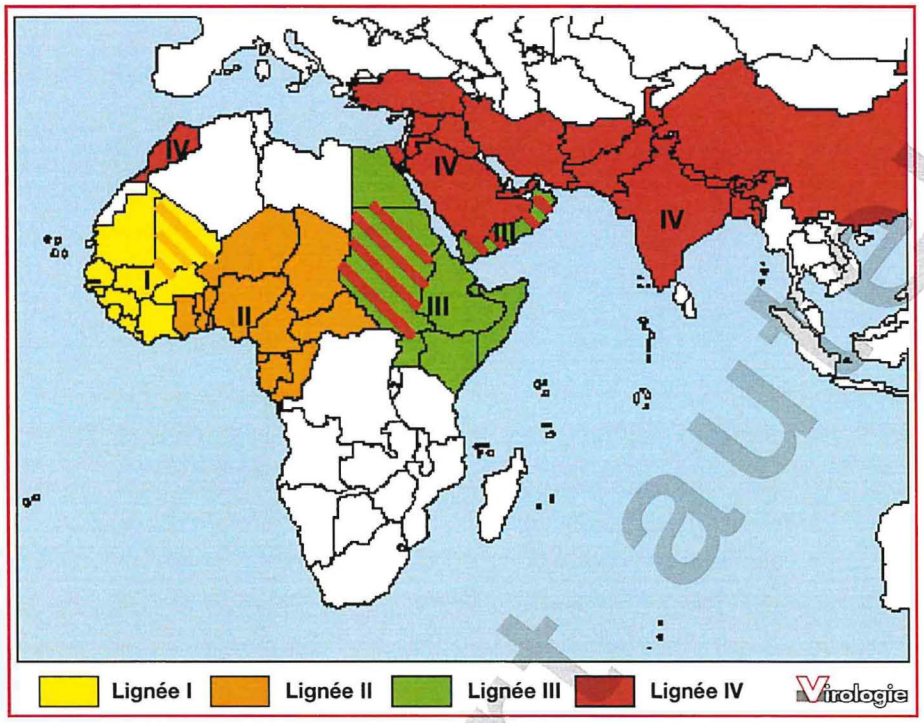


Figure 5. Carte de répartition géographique de la peste des petits ruminants en 2008.

petits ruminants en raison des communautés antigéniques entre les deux virus (immunisation hétérologue). Cette utilisation est maintenant proscrite en raison du risque d'interférence avec le dépistage sérologique pour la surveillance de la peste bovine : en effet aucun outil sérologique ne permet de différencier les animaux vaccinés de ceux infectés par un virus sauvage [16]. Pour la protection des petits ruminants contre la PPR, il existe depuis une vingtaine d'années, un vaccin atténué homologue. Il confère une très bonne immunité après une seule injection, sur toute la durée de vie économique habituelle des petits ruminants (environ trois ans) [31]. Comme tous les *Morbillivirus*, le vaccin PPR à virus atténué est sensible à la chaleur. Pour qu'il ne perde pas son activité, il est nécessaire de le conserver au froid pendant les campagnes de vaccination, condition qui n'est pas toujours réalisable dans certains pays du Sud. Des essais de stabilisation thermique de ce vaccin ont été effectués et permettent d'étendre la durée de conservation du vaccin à des températures inférieures ou égales à 25 °C [32]. Alternativement, des vaccins thermorésistants recombinants ont été développés. En plus de remédier au problème de sensibilité à la chaleur, ces vaccins recombinants peuvent être multivalents ce qui permet de vacciner contre plusieurs maladies à la fois. Un recombinant peste bovine-capripoxvirus a ainsi permis de contrôler la peste bovine et la dermatose nodulaire contagieuse [33, 34]. Un recombinant équivalent peste des petits ruminants-capripox a protégé les animaux vis-à-vis de la peste des petits ruminants et de la variole caprine [35, 36].

Un autre enjeu pour le contrôle des *Morbillivirus* des petits ruminants consiste à développer des vaccins DIVA (pour « differentiation of infected and vaccinated animals ») permettant de distinguer sérologiquement un animal vacciné d'un animal infecté. Les vaccins recombinants n'exprimant qu'un antigène du virus, les autres antigènes servant au diagnostic sérologique, répondent à cet objectif. Une approche alternative repose sur le marquage du vaccin à virus atténué actuellement utilisé à l'échelle mondiale. Depuis le début des années 1990, les progrès réalisés en génétique inverse [37, 38] pour la manipulation des virus à ARN négatif ont ouvert des perspectives [36]. En effet, le développement d'un vaccin marqué contre la peste des petits ruminants, fondé sur le génome de la peste bovine, a été obtenu [39]. Dans cette chimère, les gènes de l'enveloppe virale de la peste bovine (M, F et H) ont été substitués par ceux de la peste des petits ruminants. Ce nouveau virus s'avère être un vaccin efficace contre la peste des petits ruminants. Il pourrait donc être utilisé dans les pays où la PPR est endémique, sans perturber le programme de sérosurveillance de la peste bovine réalisé à partir d'antigène H-PB. Par ailleurs, les tests de diagnostic actuels pour la peste des petits ruminants sont fondés soit sur la protéine N-PPR [40] soit sur la protéine H-PPR [41]. Les animaux vaccinés avec le virus chimère seront séronégatifs avec le test H-PB

© John Libbey Eurotext, 2009

Tirés-à-part auteur

et le test N-PPR, mais séropositifs avec le test N-PB et le test H-PPR. Les animaux infectés PPR seront positifs avec les tests N-PPR et H-PPR et éventuellement avec le test N-PB, s'ils ont été vaccinés juste avant ou pendant l'infection PPR. De façon similaire, une autre chimère a été obtenue cette fois-ci en remplaçant la nucléoprotéine N de la peste bovine par celle de PPRV [42]. Les animaux vaccinés avec cette chimère sont efficacement protégés contre la peste bovine. Ce nouveau vaccin marqué, en association avec le test ELISA N-PPR pourrait être utile pour une vaccination d'urgence des bovins en cas de réapparition de la peste bovine. Quelle que soit la maladie, les vaccins DIVA ont un intérêt sanitaire et économique évident. Ils permettent en effet de réduire la durée des plans d'éradication de l'infection. Ainsi, pour contrôler l'infection avec un vaccin non marqué, il faut entreprendre plusieurs années consécutives de vaccination de l'ensemble du cheptel, arrêter la vaccination et enfin vérifier sur des jeunes animaux non vaccinés, l'absence d'anticorps signifiant l'absence de circulation du virus sauvage. Avec un vaccin DIVA, les opérations de dépistage du virus sauvage peuvent être concomitantes des opérations de vaccination, ce qui permet de gagner plusieurs mois voire années pour atteindre l'objectif d'éradication.

Conclusion

Une bonne connaissance des deux infections à *Morbillivirus* des ruminants et les progrès de la biotechnologie ont permis de développer des outils de diagnostic rapides et des vaccins efficaces. Ces outils associés à une mobilisation internationale sans précédent, sont à la base du succès du programme mondial d'éradication de la peste bovine qui sera en 2010, la seconde maladie éradiquée du globe terrestre, après la variole humaine. Le contrôle de la peste des petits ruminants est plus délicat, car elle touche des espèces de moindre valeur ajoutée (les petits ruminants). C'est pour ces espèces qu'un vaccin marqué aurait un intérêt car il rendrait économiquement plus supportable, un programme de contrôle dans les régions où la peste des petits ruminants est enzootique. L'augmentation croissante des échanges internationaux est à l'origine de l'extension récente de la peste des petits ruminants. Aussi faut-il rester vigilant et maintenir un niveau de surveillance performant afin de pouvoir lutter efficacement contre cette maladie présentant un risque d'émergence au nord, dans un futur plus ou moins proche.

Remerciements. Les auteurs remercient Denise Bastron (Cirad-Bios, UMR15, Montpellier, France) pour son aide à la réalisation des cartes géographiques de répartition des maladies.

Références

1. Gargadennec L, Lalanne A. La peste des petits ruminants. *Bull Serv Zoo Epiz AOF* 1942 ; 5 : 16-21.

2. Anderson J, Sammin D. Peste des petits ruminants. *EMPRES bulletin des maladies animales transfrontières* 2005 ; 27 : 12-15.

3. Kul O, Kabakci N, Atmaca HT, *et al.* Natural peste des petits ruminants virus infection: novel pathologic findings resembling other morbillivirus infections. *Vet Pathol* 2007 ; 44 : 479-86.

4. Sanz-Alvarez J, Diallo A, de La Rocque S, *et al.* Peste des petits ruminants (PPR) au Maroc. *EMPRES watch* 2008 : 1-7.

5. Conzelmann KK. "Reverse genetics of mononegavirales". *In* : Kawaoka Y (ed.). *Biology of negative strand RNA viruses: the power of reverse genetics*. Springer, 2004, p. 1-41.

6. Schnell MJ, Conzelmann KK. Polymerase activity of in vitro mutated rabies virus L protein. *Virology* 1995 ; 214 : 522-30.

7. Haffar A, Libeau G, Moussa A, *et al.* The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus Res* 1999 ; 64 : 69-75.

8. Boxer EL, Nanda SK, Baron MD. The rinderpest virus non-structural C protein blocks the induction of type 1 interferon. *Virology* 2009 ; 385 : 134-42.

9. Barrett T, Banyard AC, Diallo A. *Molecular biology of the morbilliviruses. Rinderpest and Peste des Petits Ruminants. Virus Plagues of Large and Small Ruminants*. Academic Press, Elsevier, 2006, p. 31-65.

10. Diallo A. « Peste des petits ruminants ». *In* : Tec & doc (éd.). *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes* ; 2003 ; 1 : 307-21.

11. Bodjo S. Étude de la nucléoprotéine des virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants : caractérisation moléculaire des interactions protéiques et des strucutres antigéniques. Thèse de doctorat, université de Montpellier-II, 2007 : 133.

12. Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol* 2002 ; 46 : 135-42.

13. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991 ; 9 : 431-55.

14. Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, *et al.* Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* 2002 ; 83 : 1431-6.

15. Manchester M, Naniche D, Stehle T. CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology* 2000 ; 274 : 5-10.

16. Lefèvre PC. « Peste bovine ». *In* : Tec & doc (éd.). Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes 2003 ; 1 : 285-305.

17. Wohlsein P, *et al.* Pathomorphological and immunohistological findings in cattle experimentally infected with rinderpest virus isolates of different pathogenicity. *Vet Microbiol* 1995 ; 44 : 141-9.

18. Rossiter PB, Wardley RC. The differential growth of virulent and avirulent strains of rinderpest virus in bovine lymphocytes and macrophages. *J Gen Virol* 1985 ; 66 : 969-75.

19. Michaud V, Wamwayi HM, Trautwein G, *et al.* Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *J Virol Methods* 2007.

20. Diallo A, Libeau G, Couacy-Hymann E, *et al.* Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants. *Vet Microbiol* 1995 ; 44 : 307-17.

21. Wosu LO, Ezeibe MC. Haemagglutination-inhibition technique for definitive diagnosis of rinderpest-virus-specific antibody. *Beitr Trop Landwirtsch Veterinarmed* 1992 ; 30 : 299-304.

© John Libbey Eurotext, 2009

22. Libeau G, Diallo A, Colas F, *et al.* Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet Rec* 1994 ; 134 : 300-4.

23. Forsyth MA, Barrett T. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res* 1995 ; 39 : 151-63.

24. Takeda M, Ohno S, Seki F, *et al.* Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res* 2005 ; 108 : 161-5.

25. Rossiter PB, Jessett DM, Taylor WP. Microneutralisation systems for use with different strains of peste des petits ruminants virus and rinderpest virus. *Trop Anim Health Prod* 1985 ; 17 : 75-81.

26. Libeau G, Préhaud C, Lancelot R, *et al.* Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res Vet Sci* 1995 ; 58 : 50-5.

27. Kwiatek, Minet C, Grillet C, O *et al.* Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *J Comp Pathol* 2007 ; 136 : 111-9.

28. Tufan M. Animal health authorities and transboundary animal diseases in Turkey. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006 ; 53 (Suppl 1) : 35-7.

29. Shaila MS, Shamaki D, Forsyth MA, *et al.* Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. *Virus Res* 1996 ; 43 : 149-53.

30. Plowright W, Taylor WP. Long-term studies of the immunity in East African Cattle following inoculation with rinderpest culture vaccine. *Res Vet Sci* 1967 ; 8 : 118-28.

31. Diallo A. Control of peste des petits ruminants: classical and new generation vaccines. *Dev Biol (Basel)* 2003 ; 114 : 113-9.

32. Sarkar J, Sreenivasa BP, Singh RP, *et al.* Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Vaccine* 2003 ; 21 : 4728-35.

33. Romero CH, Barrett T, Kitching RP, *et al.* Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease with a recombinant capripoxvirus expressing the fusion protein gene of rinderpest virus. *Vet Rec* 1994 ; 135 : 152-4.

34. Yamanouchi K, Barrett T. Progress in the development of a heat-stable recombinant rinderpest vaccine using an attenuated vaccinia virus vector. *Rev Sci Tech* 1994 ; 13 : 721-35.

35. Berhe G, Minet C, Le Goff C, *et al.* Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J Virol* 2003 ; 77 : 1571-7.

36. Diallo A, Minet C, Le Goff C, *et al.* The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine* 2007 ; 25 : 5591-7.

37. Conzelmann KK. Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 381-9.

38. Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? *J Gen Virol* 2002 ; 83 : 2635-62.

39. Mahapatra M, Parida S, Baron MD, *et al.* Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex. *J Gen Virol* 2006 ; 87 : 2021-9.

40. Libeau G, Diallo A, Calvez D, *et al.* A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest antibodies in cattle and small ruminants. *Vet Microbiol* 1992 ; 31 : 147-60.

41. Anderson J, McKay JA. The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes. *Epidemiol Infect* 1994 ; 112 : 225-31.

42. Parida S, Mahapatra M, Kumar S, *et al.* 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* 2007 ; 88 : 2019-27.

43. Keita D. Utilisation de l'interférence ARN pour l'inactivation post-transcriptionnelle de gènes viraux et le contrôle de la réplication de deux virus animaux in vitro : *Morbillivirus* (ARN) et Peste Porcine Africaine (ADN). Thèse de doctorat université de Montpellier-II, 2008.

Tiré à part auteur

© John Libbey Eurotext, 2009

J. Comp. Path. 2007, Vol. 136, 111–119

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

ELSEVIER
www.elsevier.com/locate/jcpa

Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan

O. Kwiatek*, C. Minet*, C. Grillet*, C. Hurard†, E. Carlsson‡, B. Karimov‡, E. Albina*, A. Diallo§ and G. Libeau*

**CIRAD, Département EMVT, UPR15, FAO/OIE Reference Laboratory for « Peste des Petits Ruminants », TA 30/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France, †CIRAD, Département CP, UPR31, European Biological Control Laboratory, USDA-ARS, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France, §Animal Production Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, IAEA Laboratories, A-2444 Seibersdorf, Austria, and ‡FAO, 7 Tashkentskaya Street, Dushanbe, Tajikistan*

Summary

The occurrence of outbreaks of peste des petits ruminants (PPR) in three districts of Tajikistan is described. The causal strain (PPR Tajikistan) was characterized and the sequence of its N gene was compared with that of 43 other strains isolated since 1968 in Africa, the Middle East and Asia. The study demonstrated (1) the value of the N gene as a target in comparing isolates obtained over an extended period of evolution, and (2) that clustering was related to the geographical origin of strains.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: goat; peste des petits ruminants; rinderpest; sheep; Tajikistan; viral infection

Introduction

Peste des petits ruminants virus (PPRV) causes a severe disease in sheep, goats and small wildlife ruminants. The virus belongs to the genus *Morbillivirus*, family *Paramyxoviridae*, together with rinderpest virus (RPV), canine distemper virus (CDV), measles virus (MV) and phocine distemper virus (PDV). Peste des petits ruminants (PPR), also known as goat plague, kata and pseudo-enteritis complex (Otte, 1960; Rowland *et al.*, 1969; Rowland and Bourdin, 1970; Hamdy *et al.*, 1976) is similar clinically to rinderpest. The disease is characterized by high fever resulting in depression, anorexia, ocular and nasal discharge, pneumonia, necrosis and ulceration of mucous membranes and inflammation of the gastrointestinal tract leading to severe diarrhoea. Morbidity and mortality rates vary but may reach 90–100% (Lefèvre and Diallo, 1990; Taylor *et al.*, 1990). These rates are usually lower in endemic areas, where mortality may be 20% or less, and serosurveillance is sometimes the only indicator of infection. The seroprevalence rate in sheep and goats rises with age, the symptoms increasing in severity when associated with infections such as sheep and goat pox, and being rapidly fatal in young animals. Morbilliviruses are rapidly inactivated at environmental temperature by solar radiation and desiccation. This means that transmission must occur by direct contact with infected animals or their excretions or secretions. Transmission of PPRV occurs primarily by droplet infection but may also occur by ingestion of contaminated feed or water. PPR was first described (Gargadennec and Lalanne, 1942) in West Africa and for 30 years was thought to be confined to this area. The disease has since been recognized as endemic in West and Central Africa (Scott, 1981) and in the north-east of the continent, Sudan (El Hag Ali and Taylor, 1984; Taylor *et al.*, 1990; Haroun *et al.*, 2002), Kenya and Uganda (Wamwayi *et al.*, 1995) and Ethiopia (Roeder *et al.*, 1994; Abraham *et al.*, 2005). In 1987 it appeared in the Middle East and has since then been confirmed in Jordan (Lefèvre *et al.*, 1991), Pakistan (Amjad *et al.*, 1996),

Correspondence to: G. Libeau (e-mail: genevieve.libeau@cirad.fr).

0021-9975/$ - see front matter
doi:10.1016/j.jcpa.2006.12.002

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

southern India (Shaila *et al.*, 1989; Nanda *et al.*, 1996), Turkey (Özkul *et al.*, 2002; Toplu, 2004; Yesilbag *et al.*, 2005) and Israel (Abraham, Libeau *et al.*, unpublished). Recent evidence, however, suggests that the disease appeared in India in the early 1940s, from where it spread to West Africa (Taylor and Barrett, in press). PPR 75-1 vaccine (Diallo *et al.*, 1989), used with some success in infected countries, fails to contain the disease, which causes severe economic losses, especially in goats. In 2004, an outbreak of PPR was detected in Thrace, i.e., the European part of Turkey (Anderson and Sammin, 2005).

Laboratory confirmation of suspected cases is necessitated by the clinical similarity of rinderpest (RP). Enzyme-linked-immunoassay (ELISA) is now routinely used (Libeau *et al.*, 1992, 1995). Virus isolation and differential neutralization in cell culture are slow, tedious and of low efficiency. Immunocapture (Libeau *et al.*, 1994) and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by nucleotide sequencing (Forsyth and Barrett, 1995; Shaila *et al.*, 1996; Couacy-Hymann *et al.*, 2002) are the current diagnostic methods for all morbillivirus infections.

This report describes outbreaks of PPR in three provinces of Tajikistan in 2004, with characterization of the strain of virus responsible.

Materials and Methods

Samples

These were collected from outbreaks of disease associated with high mortality in sheep and goats in three separate districts of Tajikistan (Fig. 1), for serology or virus detection and identification. From the town of Rasht in the Gharm district, 30 serum samples were collected from 145 surviving goats out of 270 sick animals as reported by the local authorities. In the Farkhror district, sera were collected from nine sheep and one goat out of 30 animals in poor health. In the Tavildara district, investigation of an outbreak in five "households" revealed 10 sick animals. These were examined clinically and one, a young goat aged 8 months, was killed and subjected to necropsy. Twenty-one samples (nasal, oral or rectal swabs, or cardiac fluid) were taken from these animals for virus identification.

Laboratory Investigations

Competitive ELISA (C-ELISA) tests were performed to detect antibodies to PPRV and RPV, as described in the Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines of the Office International des Epizooties (edition 2004). The PPR C-ELISA antibodies for detecting the haemagglutinin (H) and the nucleoprotein (N) and the RP C-ELISA anti-H antibodies were those described previously (Anderson and McKay, 1994; Libeau *et al.*, 1995). Reading was carried out with a Multiskan (Titertek, Helsinki, Finland) ELISA reader at 492 nm. Optical density values were converted to percentage inhibition values (PI) by the following formula: PI = 100−(OD test/OD 0 per cent control) × 100.

Detection of PPRV RNA by RT-PCR was performed as described previously (Couacy-Hymann *et al.*, 2002). In brief, viral RNA was extracted from 100 µl of sample suspension mixed with the lysis solution of the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf,

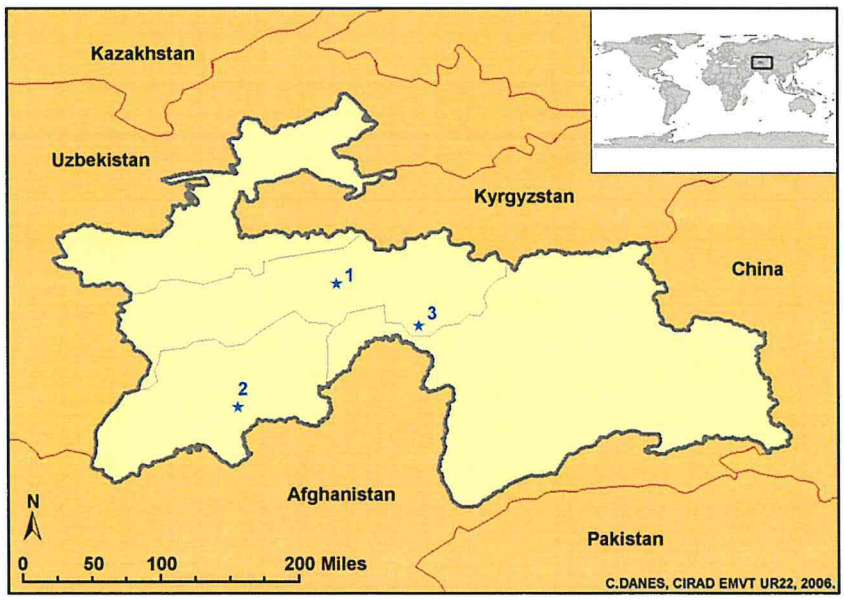


Fig. 1. Map of Tajikistan showing the three districts (Gharm 1, Farkhor 2 and Tavildara 3) in which the samples were collected.

Table 1
List of the oligonucleotides (primers) used for differential diagnosis

Specificity	*Name*	*Purpose*	*Target*	*Location*	*Sequence (5′-3′)*
PM	Nad1	Forward	N gene	790 < 812	5′CAAGCCAAGGATTGCAGAAATGA 3′
PM	Nad2	Reverse	N gene	1012 > 988	5′AATTGAGTTCTCTAGAATCACCAT 3′
PPRV	NP3	Forward	N gene	1232 < 1255	5′GTCTCGGAAATCGCCTCACAGACT 3′
PPRV	NP4	Reverse	N gene	1583 > 1560	5′CCTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT 3′
RPV	B12	Reverse	N gene	1270 > 1292	5′CAAGGGGGTGAGATCCAGCACAA 3′
RPV	B2	Forward	N gene	1543 < 1566	5′ATCCTTGTCGTTGTATGTTCTCGG 3′

PM, pan-morbillivirus; PPRV, peste des petits ruminants virus; RPV, rinderpest virus.

France) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was reverse transcribed with Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by means of the First-strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biosciences, Amersham, UK). For differential diagnosis of PPRV and RPV, three sets of primers selected on the N protein gene sequence were used (Table 1). Pan-morbillivirus primers located in the middle of the gene (Nad1 and Nad2) allow the amplification of the N gene of all morbilliviruses and give a product of 222 bases. The RP (B12, B2) and PPR (NP3–NP4) specific primers situated at the 3′ end of N gene give amplification products of 296 and 351, respectively. The amplification cycle consisted of an initial denaturation at 94 °C, for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. The final cycle had a prolonged extension time (72 °C for 5 min). The amplified products were analysed by electrophoresis in 1.0% agarose gel. PCR products were purified from gel with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and directly used in the sequencing reaction or amplified with a Blunt End Cloning Kit (Roche). In the sequencing reaction, the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) was used and products were run on an automated DNA sequencer (Prism 377; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France,).

Sequence Data, Alignment and Phylogenetic Analysis

The nucleic acid sequences obtained from PCR products obtained with NP3-NP4 primer from this study were aligned with sequences from PPRV strains that were maintained in the database (Table 2). Phylogenetic analysis was performed on the 255 nucleotides located on the 3′ end of the nucleoprotein gene of the virus. The known PPRV sequences were derived from strains isolated over a period of 30 years. They consisted of "historical" strains, such as the Nigeria 75/1, from which the PPR vaccine was developed, and also the Dorcas strain isolated from a Dorcas gazelle in a zoological collection in the United Arab Emirates (Furley *et al.*, 1987). Strains isolated between 1988 and 1996 originated from Burkina Faso, India and Turkey, and more recent strains principally from western Asia, the Middle East (Iran, Israel, Saudi Arabia) and Africa (Mali).

The alignment of nucleotide sequences was created by means of the Clustal W program (Vector NTI, Informax, Inc., Rockville, Maryland, USA). Phylogenetic analysis was carried out by means of the "criterion of neighbourhood based on the principle of parsimony" (Saitou and Nei, 1987). Dissimilarities and edge length of dissimilarities between the sequences were first determined with Darwin software (Perrier *et al.*, 2003). Tree construction was based on the unweighted "Neighbor-Joining" method proposed by Gascuel (1997). Trees were generated with the TreeCon MATRIXW program of Darwin (Van de peer and De Watchter, 1993). "Bootstrap" confidence values were calculated on 1000 replicates. The RBOK vaccine strain of RPV was considered as an out-group.

Results

History of the Outbreaks and Status of Sampled Animals

From April to November 2004, high mortality occurred in sheep and goats from three districts in Tajikistan (Fig. 1). In early November, samples were collected for serology or virus identification. PPRV-specific antibody prevalence was detected in animals from all three districts (Table 3). In Gharm district, according to the veterinarian, the outbreak occurred in May, affecting 270 goats imported from eastern districts of Tajikistan bordering Afghanistan and China. The sick animals had shown fever, coughing, diarrhoea and inappetence, but for the last 2 months no mortality had been recorded among the 145 survivors. Most of the 30 serum samples from this group showed high PI values in the C-ELISA against the N and H protein of PPRV, but two females aged 5 years gave negative results. In the Farkhror district, rumours of high mortality in

Table 2
Selected strains of peste des petits ruminants virus from the database ("historical" and recent isolates) of the FAO/OIE Reference Laboratory for PPR in CIRAD, Département EMVT, France

Lineage	*Year**	*Country*	*Name of the strain*	*Reference or source*	*Genbank Accession No*
I	1968	Senegal	SENEGAL68	Laurent, 1968	DQ840165
III	1972	Sudan	MIELIK72	El Hag Ali and Taylor, 1984	DQ840159
III	1972	Sudan	SINAR72	El Hag Ali and Taylor, 1984	DQ840158
II	1975	Nigeria	NIGERIA75 2	Taylor and Abegunde, 1979	DQ840161
II	1975	Nigeria	NIGERIA75 3	Taylor and Abegunde, 1979	DQ840162
II	1975	Nigeria	VAC . NIGERIA75 1	Diallo *et al.*, 1989	DQ840160
II	1976	Nigeria	ACCRA76	Taylor, Pers com.	DQ840163
II	1976	Nigeria	NIGERIA76 1	Taylor and Abegunde 1979	DQ840164
II	1978	Ghana	ACCRA78	Taylor, Pers com.	DQ840167
II	1978	Ghana	GHANA78	Taylor, Pers com.	DQ840166
III	1983	Oman	IBRI83	Taylor *et al.*, 1990	DQ840168
III	1986	United Arab Emirates	DORCAS86	Furley *et al.*, 1987	DQ840169
I	1988	Burkina Faso	BURKINA88	A.Diallo, Pers com.	DQ840172
I	1988	Guinea	GUINEA88	A.Diallo, Pers com.	DQ840170
I	1989	Côte d'Ivoire	CI89	A.Diallo, Pers com.	DQ840199
I	1989	Guinea Bissau	BISSAU89	A.Diallo, Pers com.	DQ840171
IV	1993	Israel	ISRAEL ARBELLA	Kimron Vet. Institute	DQ840173
III	1994	Ethiopia	ETHIOP94	Diallo, Pers com.	DQ840175
IV	1994	India	INDIA94	Nanda *et al.*, 1996	DQ840176
IV	1994	India	SASSAYAN94 2	A.Diallo, Pers com.	DQ840179
IV	1994	India	THATAGULLAN 94 1	A.Diallo, Pers com.	DQ840180
I	1994	Senegal	SENEGAL94	M.Diop *et al.*, 2005	DQ840174
IV	1995	India	CALCUTTA95	A.Diallo, Pers com.	DQ840177
IV	1995	India	PRADESH95 1	A.Diallo, Pers com.	DQ840178
IV	1995	India-Tamilnadu	TAMILNADU95 2	A.Diallo, Pers com.	DQ840182
IV	1995	Israel	ISRAEL95 3	Kimron Vet. Institute	DQ840181
III	1996	Ethiopia	ETHIOPIA96	A.Diallo, Pers com.	DQ840183
IV	1996	Turkey	TURKEY96	A.Diallo, Pers com.	DQ840184
IV	1998	Iran	IRAN98	A.Diallo, Pers com.	DQ840185
IV	1998	Iran	IRAN98 3	A.Diallo, Pers com.	DQ840186
IV	1998	Iran	IRAN98 4	A.Diallo, Pers com.	DQ840187
IV	1998	Israel	ISRAEL98 10	Kimron Vet. Institute	DQ840191
IV	1998	Israel	ISRAEL98 2	Kimron Vet. Institute	DQ840188
IV	1998	Israel	ISRAEL98 6	Kimron Vet. Institute	DQ840189
IV	1998	Israel	ISRAEL98 7	Kimron Vet. Institute	DQ840190
II	1999	Mali	MALI 99 373	K. Tounkara, Pers com.	DQ840194
II	1999	Mali	MALI99 1	K. Tounkara, Pers com.	DQ840192
II	1999	Mali	MALI99 366	K. Tounkara, Pers com.	DQ840193
IV	1999	Saudi Arabia	SAUDI99 7	A.Diallo, Pers com.	DQ840195
IV	1999	Saudi Arabia	SAUDI 99 9	A.Diallo, Pers com.	DQ840196
IV	1999	Saudi Arabia	SAUDI 99 8	A.Diallo, Pers com.	DQ840197
IV	2004	Tajikistan	TAJIKISTAN/04	This publication	DQ840198
II	2005	Unknown	VAC.RUSSIA05	This publication	DQ837640

*Year of isolation or reception in the laboratory.

sheep and goats came to the knowledge of the local FAO office at the end of October. A field visit on November 1 failed to confim this report clinically, but PPR was confirmed by the C-ELISA in 10 animals in poor health, nine giving a positive reaction in the N-based test and eight in the H-based test. The mean PI value in both tests for this group was high (63% and 77.5%, respectively). In this group and the previous group, the H-ELISA gave negative results for RP. In early November 2004 an outbreak was reported in the Tavildara district, affecting five households. Investigations revealed 10 sick animals (nine goats and one sheep) aged 8–18 months. These 10 animals were numbered according to household (1–5) and, when more than one animal per household was examined, also by letter (e.g., 3a, 3b, 3c); in all, 21 samples were taken from this group for serology and virus identification, and results are given in Table 4. The mean PI values were comparatively low (59% and 69% for the N-and H-PPR C-ELISA, respectively), which accords

Table 3
PPRV serological status of animals sampled

District	*Number of animals*	*Age (years)*	*Number of positive animals*	*PPR ELISA (mean positive PI value in %)**		*RT-PCR result*
				N	*H*	
Gharn	30†	2–6	28	72.3	79	NA
Farkhror	10‡	–	8	63	77.5	NA
Tavildara	10§	0.5–1.5	10	59	69	+

NA, tissue samples were not collected.
*Positive threshold, ⩾ 50%.
†All goats;
‡all sheep except for one goat;
§all goats except for one sheep.

Table 4
Laboratory results of PPR cases submitted from Tavildara district, Tajikistan

Animal				*ELISA (PI value in %)**			*RT-PCR*			
								Prime set		
no.	*Age (months)*	*Species*	*Sex*	*N-PPR*	*H-PPR*	*H-RP*	*Sample*	*PM*	*PPRV*	*RPV*
1	NR	Goat	F	48	58	30	NA	...	...	...
2	12	Goat	–	53	72	32	Tears+nasal	+	+	–
3a	12	Goat	–	74	85	31	NA	...	...	...
3b	NR	Goat	F	70	69	19	NA	...	...	...
3c	18	Goat	M	58	71	34	Nasal+rectal	+	+	–
4	9	Sheep	F	83	83	32	Nasal+rectal	+	–	–
5a	18	Goat	M	50	56	20	Nasal	+	+	–
5b	NR	Goat	F	51	54	25	Nasal	+	+	–
5c	8	Goat	–	50	73	27	Cardiac fluid	+	+/–	–
5d	7	Goat	–	52	74	23	NA	...	...	...

NR, age not recorded. NA, tissue samples were not collected.
*Positive threshold, ⩾ 50%. PM, pan-morbillivirus; PPRV, peste des petits ruminants virus; RPV, rinderpest virus.

with the fact that animals were in the erosive phase of the disease and just developing an antibody response. PPRV was detected in a number of the tissue samples, (tear [1], nasal mucus [5], rectal mucus [2] and cardiac fluid [1]), with RPV/PPRV specific primers and also with the pan-morbillivirus primer set.

Most of the clinically affected animals from the Tavildara district showed severe lachrymation, nasal discharge, coughing, signs of bronchopneumonia, and blood-stained diarrhoea. All animals had a rectal temperature of 39.5–41.5 °C. Some had isolated dry crust formations at the corners of the lips and a white-yellow crustation on the surface of the tongue and inside the lips. Lesions seen at necropsy (animal 5c, Table 4) included focal haemorrhages in the mucous membrane of the trachea, focal haemorrhagic inflammation with isolated necrotic foci of various sizes in the right apical lobe of the lung, bronchopneumonia with fibrinous pleural effusion and pleural adhesions, dot-shaped necrotic foci in the rumen, and petechiae in the small intestine. Large intestine contents were liquid and contained sexually mature *Strongloides* sp. larvae.

Characterization of the Strain and Determination of its Geographical Lineage

To obtain epidemiological information and analyse the genetic relation of the Tajikistan strain 2004 (from Tavildara district) with strains of different geographical origin, the sequence of this isolate was included in a large analysis of PPRV genotypes from strains collected in various parts of the world. These strains, representative of the geographical diversity of the virus, were analysed on the 255 nucleotides that are located on the C terminus end of the nucleoprotein of the virus (84 aa). The method applied ("Neighbor-joining") to compare the strains on this sequence resulted in a phylogenetic tree bearing four different lineages which were supported by the "bootstrap values", suggesting a co-evolution of the lineages in relation to their geographical

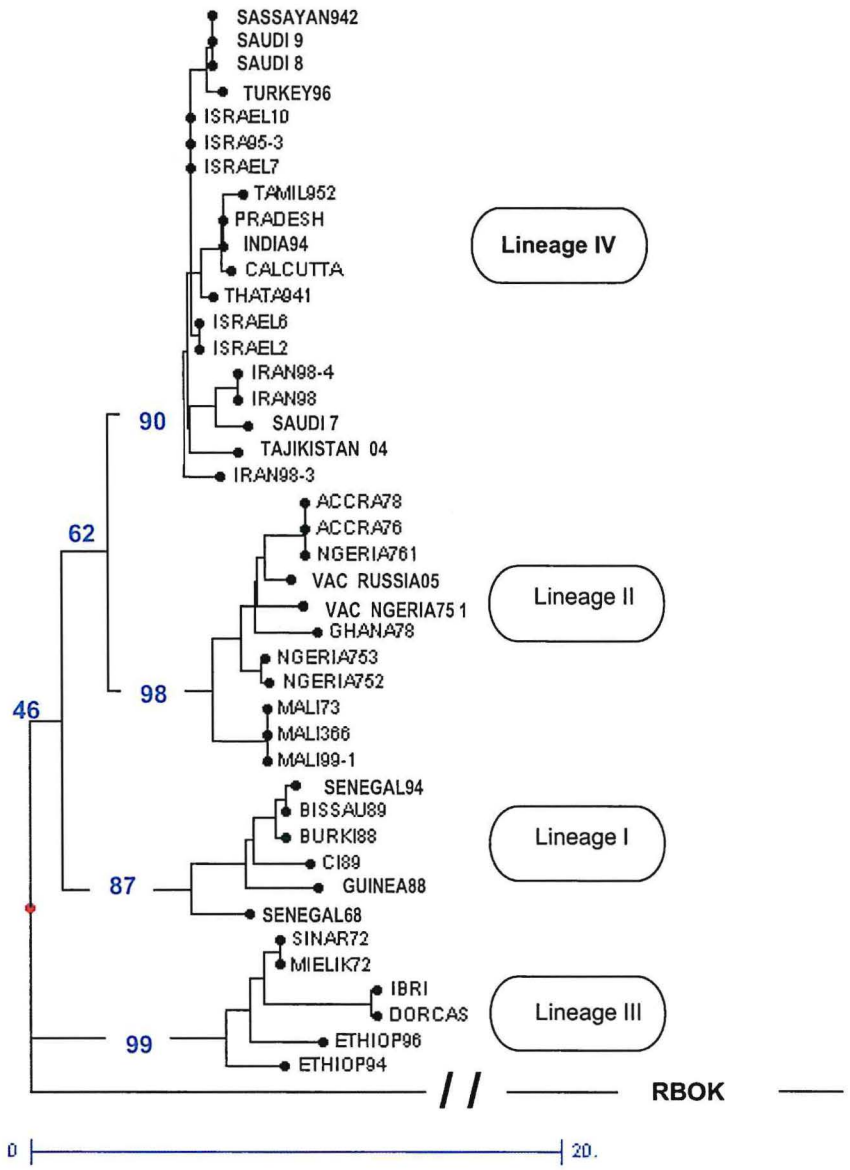


Fig. 2. Majority rule consensus tree of PPRV based on the alignment of the nucleotide sequences (1232–1560) of the N protein gene ("Neighbor-joining method"). Distances were generated with TreeCon MATRIXW program. "Bootstrap values" on 1000 tree replicates are shown on each edge of the majority rule consensus tree. The scale represents the edge length of dissimilarities between the sequences, thus illustrating the relationship between the RBOK vaccine strain of rinderpest virus collected from Genbank (Z30697) and all other PPRV strains.

origin (Fig. 2). As expected, the Tajikistan strain of PPRV fell into lineage IV and was closely related to strains isolated since 1998 in Asia, principally in Iran and in Saudi Arabia. Viruses from Israel and Turkey formed a cluster which was distinct—albeit slightly—from the India, Calcutta, Pradesh and Tamilnadu strains. Three lineages present in Africa, were numbered I–III, in accordance with the apparent progression of the disease from west to east. Viruses isolated from West Africa (Senegal, Guinea, Guinea-Bissau, Côte d'Ivoire and Burkina Faso) formed lineage I and those from Ghana, Nigeria and Mali formed lineage II. The African viruses isolated in the East of the country (Ethiopia and Sudan) were genetically close to those found in the southern part of the Arabian Peninsula (e.g., Oman and the United Arab Emirates) which were grouped in lineage III. This nomenclature differs from that of the publication of Shaila *et al.* (1996), based on sequence data derived from part of the fusion protein. The present paper refers to the original lineage I as lineage II and *vice versa*.

Discussion

Over a period of several months, outbreaks of respiratory disease with high mortality in sheep and

goats were reported to FAO in Tajikistan. The local veterinarians described the outbreaks as pasteurellosis, and indeed the national laboratories also frequently isolated *Pasteurella* spp. from lung tissue of these cases. Facilities identifying *Pasteurella* spp. are not available in Tajikistan, but it is believed that *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hamolytica* are the species most commonly present. As a result, sheep and goats in Tajikistan are generally vaccinated against pasteurellosis but not against PPR, which has not been diagnosed previously.

The clinicopathology of the outbreaks in Tajikistan, as well as the serological and virological findings in this study, confirmed that the disease was PPR. Clinical and post-mortem findings may be sufficient for the diagnosis of PPR in endemic areas, but molecular methods of characterization are indispensable in areas where the disease is introduced for the first time or in which outbreaks occur sporadically (Scott, 1990). PPR has also been confused with rinderpest and pasteurellosis. Clinical rinderpest in sheep and goats has been reported in the past in Kenya (Libeau and Scott, 1960; Rossiter and Jessett, 1982), Nigeria (Beaton, 1955; Johnson, 1958), Uganda (Scott and Brown, 1961) and India (Taylor *et al.*, 2002). However, some of these infections were later confirmed as PPR. In India, PPR was reported for the first time in 1987, having previously been misdiagnosed as rinderpest.

Characteristic erosive-ulcerative lesions of PPR associated with high body temperature were observed in the sick goats in the present study. PCR analysis of samples confirmed the diagnosis of PPR and led to genetic characterization of the strain by sequencing of a limited area of the viral genome. Genotypic classification based on the N-protein gene appeared to be an efficient method for discriminating between geographically separated lineages. Phylogenetic analysis of the PPR Tajikistan strain showed that it belonged to lineage IV, which is known to occur in countries bordering Tajikistan. The Arabian Peninsula, the Middle East and parts of the Indian sub-continent were swept by an epidemic of PPR in 1993–1995, caused by a virus now known to be of lineage IV (Nanda *et al.*, 1996). PPR is believed to be widespread in Afghanistan, where the disease was reported in association with a rinderpest outbreak in 1995 (Geiger and Amir, personal communication). Since then, the disease has remained endemic in most of these regions and in much of the Indian sub-continent (Nanda *et al.*, 1996; Shaila *et al.*, 1996). The data presented here improve our understanding of the molecular epidemiology of PPRV. The geographical distribution of lineage IV covers a large area, probably because of the importance of trade in small ruminants in Asia. In contrast, viruses of lineage I and II, distributed in the west and central part of Africa, seem to be indigenous to that continent and have certainly evolved independently due to the north–south orientation of livestock transhumance. Lineage III is, however, shared by the eastern part of Africa and the southern part of the Middle-East on both sides of the Red Sea. Similarly, the isolates covering most of the major geographical areas of Asia, from Turkey to Tamilnadu, were found to belong to lineage IV. Thus, the areas covered by strains belonging to lineages III and IV reflect the traditional routes of exchange and trade of small ruminants. The genetic relationship between viruses of distinct geographical origin based on the N gene supports the study of Shaila *et al.* (1996), which was based on sequence data derived from the fusion protein gene. However, the N gene appears to be more powerful in clustering strains in accordance with their geographical origin. For example, two viruses (Sinar72 and Mielik72), both isolated in 1972 from the Sudan, were previously grouped in two separate lineages (I and III), whereas the present study placed them both in lineage III with the Oman (Ibri) and United Arab Emirates (Dorcas) isolates. The presence of four distinct genogroups suggests that the disease may have settled in Asia, the Middle-East and Africa long before the initial isolation and characterization of the causative agent. These four genogroups probably originated from a common ancestor, which may or may not have been genetically distinct. In any event, the distribution of strains into these different genogroups argues against the hypothesis of the spread of infection in recent decades from West to East. Indeed, it suggests that lineages have evolved independently over a prolonged period within large, mainly unconnected areas.

Acknowledgments

The authors thank Dr W.P. Taylor (consultant) for timely advice and discussion.

References

Abraham, G., Sintayehu, A., Libeau, G., Albina, E., Roger, F., Lackemariam, Y., Abayneh, D. and Awoke, K. M. (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. and Rossiter, P. B. (1996). Peste des petits ruminants in goats. *Pakistan Veterinary Record*, **139**, 118–119.

Anderson, J. and McKay, J. A. (1994). The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes. *Epidemiology and Infection*, **112**, 225–231.

Anderson, J. and Sammin, D. (2005). Peste des petits ruminants in the Thrace region of Turkey. *EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin*, **27**, 12–15.

Beaton, W. G. (1955). Natural rinderpest in sheep and goats. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, **2**, 415.

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

Diallo, A., Taylor, W. P., Lefèvre, P. C. and Provost, A. (1989). Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue vivant. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **42**, 311–319.

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

El Hag Ali, B. and Taylor, W. P. (1984). Isolation of peste des petits ruminants virus from Sudan. *Research in Veterinary Science*, **36**, 1–4.

Forsyth, M. A. and Barrett, T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Research*, **39**, 151–163.

Furley, C. W., Taylor, W. P. and Obi, T. U. (1987). An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. *Veterinary Record*, **121**, 443–447.

Gargadennec, L. and Lalanne, A. (1942). La peste des petits ruminants. *Bulletin des Services Zootechniques et des Epizooties de l'Afrique Occidentale Française*, **5**, 16–21.

Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 685–695.

Hamdy, F. W., Dardiri, A. H. and Nduaka, O. (1976). Etiology of stomatitis-pneumoenteritis complex in Nigerian dwarf goats. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **40**, 276–284.

Haroun, M., Hajer, I., Mukhtar, I. and Ali, B. E. (2002). Detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in sera of cattle, camels, sheep and goats in Sudan. *Veterinary Research Communications*, **26**, 537–541.

Johnson, R. H. (1958). An outbreak of rinderpest involving cattle and sheep. *Veterinary Record*, **70**, 457–461.

Laurent, A. (1968). Aspects biologiques de la multiplication du virus de la peste des petits ruminants sur les cultures cellulaires. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **21**, 297–308.

Lefèvre, P. C. and Diallo, A. (1990). Peste des petits ruminants. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, **9**, 935–981.

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

Libeau, G., Diallo, A., Calvez, D. and Lefèvre, P. C. (1992). A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest in cattle and small ruminants. *Veterinary Microbiology*, **31**, 147–160.

Libeau, G., Diallo, A., Colas, F. and Guerre, L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Veterinary Record*, **134**, 300–304.

Libeau, G., Prehaud, C., Lancelot, R., Colas, F., Guerre, L., Bishop, D. H. and Diallo, A. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Research in Veterinary Science*, **58**, 50–55.

Libeau, J. and Scott, G. R. (1960). Rinderpest in Eastern Africa today. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, **8**, 23–26.

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 Taylor, W. P. (1996). The isolation of peste des petits ruminants virus from northern India. *Veterinary Microbiology*, **51**, 207–216.

Otte, E. (1960). Clinical studies on « abu nini » in the Sudan: a contagious disease of goats and sheep possibly caused by pleuropneumonia-like organism. *Veterinary Record*, **72**, 140–145.

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

Perrier, X., Flori, A. and Bonnet, F. (2003). Data analysis methods. In: *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, P. Hamos, M. Seguin, X. Perrier and J.C. Glaszmann, Eds, Gifield Science Publishers, Montpellier, pp. 43–76.

Roeder, P. L., Abraham, G., Kenfe, G. and Barrett, T. (1994). Peste des petits ruminants in Ethiopian goats. *Tropical Animal Health and Production*, **26**, 69–73.

Rossiter, P. B. and Jessett, D. M. (1982). Detection of rinderpest virus antigens in vitro and in vivo by direct immunofluorescence. *Research in Veterinary Science*, **33**, 198–204.

Rowland, A. C. and Bourdin, P. (1970). The histological relationship between peste des petits ruminants and kata in West Africa. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **23**, 301–307.

Rowland, A. C., Scott, G. R. and Hill, D. H. (1969). The pathology of an erosive stomatitis and enteritis in West African dwarf goats. *Journal of Pathology*, **98**, 83–87.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, **4**, 406–425.

Scott, G. R. (1981). Rinderpest and peste des petits ruminants. In: *Virus Diseases of Food Animals*, Vol. II, E.P.J. Gibbs, Ed., Academic Press, New York, London, pp. 401–432.

Scott, G. R. (1990). Peste des petits ruminants. In: *Virus Infections of Ruminants*, Vol.3, Z. Dinter and B. Morein, Eds, Elsevier, Amsterdam, pp. 355–361.

Scott, G. R. and Brown, R. D. (1961). Rinderpest diagnosis with special reference to agar double diffusion test. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, **9**, 83–125.

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

Shaila, M. S., Shamaki, D., Forsyth, M. A., Diallo, A., Kitching, R. P. and Barrett, T. (1996). Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. *Virus Research*, **43**, 149–153.

Taylor, W. P. and Abegunde, A. (1979). The isolation of peste des petits ruminants virus from Nigerian sheep and goats. *Research in Veterinary Science*, **26**, 94–96.

Taylor, W.P. and Barrett, T. (in press). Peste de petits ruminants and rinderpest. In: *Diseases of Sheep*, 4th Edition, I.D. Aitken, Ed, Blackwells Science, Oxford.

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

Taylor, W. P., Diallo, A., Gopalakrishna, S., Shreeramalu, P., Wilsmore, A. J., Nanda, Y. P., Libeau, G., Rajasekhar, M. and Mukhopadhyay, A. K. (2002). Peste des petits ruminants has been widely present in southern India since, if not before, the late 1980s. *Preventive Veterinary Medicine*, **52**, 305–312.

Toplu, N. (2004). Characteristic and non-characteristic pathological findings in peste des petits ruminants (PPR) of sheep in the Ege district of Turkey. *Journal of Comparative Pathology*, **131**, 135–141.

Van de peer, Y. and De Watchter, R. (1993). Treecon: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Computor Applications in the Biosciences*, **9**, 177–182.

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

Yesilbag, K., Yilmaz, Z., Golcu, E. and Özkul, A. (2005). Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey. *Veterinary Record*, **157**, 260–261.

[*Received, April 4th, 2006*
Accepted, December 18th, 2006]

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Vaccine 25 (2007) 5591–5597
Vaccine
www.elsevier.com/locate/vaccine

The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control

A. Diallo [a,*], C. Minet [b], C. Le Goff [b], G. Berhe [c], E. Albina [b], G. Libeau [b], T. Barrett [d]

[a] *Animal Production Unit, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency's Laboratories, Wagramerstrasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Vienna, Austria*
[b] *CIRAD Department EMVT, Control of Exotic and Emerging Animal Diseases (UPR15), TA 30/G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 05, France*
[c] *National Veterinary Institute, NVI, Debre Zeit, P.O. BOX 19, Ethiopia*
[d] *Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Surrey GU 24 ONF, UK*

Received 23 August 2006; received in revised form 24 January 2007; accepted 2 February 2007
Available online 26 February 2007

Abstract

Peste des petits ruminants (PPR) is a highly contagious animal disease caused by a virus in the genus *Morbillivirus*, family *Paramyxoviridae*. This infection is responsible for high morbidity and mortality in sheep and goats and in some small wild ruminant species. The huge number of small ruminants, which are reared in the endemic areas makes PPR a serious disease threatening the livelihood of poor farmers. Taking advantage of the closely relationship between rinderpest and PPR viruses, the attenuated rinderpest vaccine was used in the control of PPR. It is now replaced by the homologous attenuated PPR vaccine. Unfortunately, animals that have received this vaccine cannot be distinguished serologically from infected animals. With the advent of DNA recombinant technology, efforts are being made to develop effective PPR marker vaccines to enable such differentiation and which would allow countries to implement both vaccination and disease surveillance programmes at the same time.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Peste des petits ruminants (PPR); Morbillivirus; Marker vaccine; Reverse genetics; Poxvirus recombinant vaccines

1. Introduction

Peste des petits ruminants (PPR) is a highly contagious disease of domestic and wild small ruminants. It is caused by a virus, peste des petits ruminants virus (PPRV), which is classified in the genus *Morbillivirus* within the family *Paramyxoviridae* [1]. The French nomenclature for this disease of small ruminants, *peste des petits ruminants*, which recalls "*peste bovine*" (rinderpest), is indicative of its clinical resemblance to rinderpest. However, it was also known as stomatitis pneumoenteritis complex [2,3] which better describes the clinical signs associated with this disease. PPR may manifest itself in different forms ranging from mild to severe but the latter form, the acute form, is dramatic and is the most characteristic. It is characterised by fever followed by oculo-nasal discharges, which are watery at the beginning of the disease but gradually become mucopurulent and may stick parts of the eyelids together (ocular discharges) or may partially block the nose (nasal discharges). At the time the fever starts to drop, appear diarrhoea and numerous necrotic lesions in the oral cavity. The mortality rate for this form of PPR is about 70–80%, most animals dying within the 10–12 days following the onset of disease. A consequence of this high mortality was the inclusion of PPR in the list A of the former animal disease classification of the OIE (Office International des Epizooties), the World Organisation for Animal Health. In the new OIE classification it is included

* Corresponding author. Tel.: +43 1 2600 28355.
E-mail address: a.diallo@iaea.org (A. Diallo).

0264-410X/$ – see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vaccine.2007.02.013

in a group of economically important animal diseases, which must be notified to the Organisation. In all regions where PPR is endemic, it constitutes a serious threat to small ruminant production and thereby influences on the livelihood of poor farmers, the main owners of sheep and goats. Thus its control is a major goal for programmes aimed at poverty alleviation. Here we review the current epidemiological situation with regard to the disease and outline approaches adopted for the development of vaccines to control of PPR.

2. Epidemiology: PPR an emerging disease

2.1. Geographic distribution

Compared to rinderpest, which has been known for centuries, PPR is a relatively recently recognised disease. The first scientific description dates back to 1942. At that time Gargadennec and Lalanne [4] reported on an epidemic disease in Côte d'Ivoire which was clinically similar to rinderpest but which was affecting only small ruminants while in-contact cattle apparently remained healthy. Until the mid 1980s, PPR was regarded as a disease of West African countries but in 1984 its presence in Sudan was mentioned in a report [5] and this extended its endemic area to the eastern part of the continent. From that period onwards the known distribution of PPR has progressed to include the Middle East, Iran, the Indian sub-continent, Turkey and now some countries in Central Asia [6]. This expansion of our knowledge in the geographical distribution of PPR is certainly a consequence of the development and use of specific diagnostic tests, which can distinguish PPR from diseases with similar signs:

- Pasteurellosis due to the severe bronchopneumonia seen in the acute form of the disease. In fact, pasteurellosis coexists with PPR in many cases as a consequence of superinfection by *Pasteurella* [7].
- Rinderpest infection in small ruminants, the two diseases being difficult to differentiate clinically, apart from the bronchopneumonia which is common in PPR acute cases. Accumulated data on rinderpest in small ruminants indicate that they are less susceptible to this disease. Their infection by rinderpest viruses, even by highly virulent strains, is either sub-clinical or results only in mild clinical signs [8–11]. Therefore, some of the supposed rinderpest outbreaks documented in the past in small ruminant populations, particularly in India, may in fact have been due to PPRV infections [12].

2.2. Host range

At first, sheep and goats were considered the only animals susceptible to PPRV but its host range was extended to wild small ruminants in 1987 [13] after its identification in pathological samples from gazelles, which died in a zoo in the Arabian Gulf in the late 1980s. This virus was also suspected to have been involved in a respiratory disease, which affected camels in Ethiopia [14]. There was also a report of a rinderpest-like disease in Indian buffalo, which was caused by PPRV [15]. Rossiter and Wardley [16] reported that virulent PPRV strains can replicate in bovine lymphocytes, although less efficiently than in sheep and goat cells. Considering the immunosuppressive effect of PPRV as all other morbilliviruses [17,18], it may therefore be possible, depending on the age, and physical state of the host animal, that PPRV can occasionally overcome the innate resistance of large ruminants and lead to the development of clinical signs similar to rinderpest. This may explain the disease signs that had occurred in buffalo and camels following PPRV infection. This ability of PPRV to infect large ruminants could pose a serious threat to cattle populations in PPR endemic areas which, with the success of the global rinderpest eradication programme, are no longer vaccinated against rinderpest and so do not possess cross-protective immunity against this virus.

3. Structure of PPRV

Peste des petits ruminants virus (PPRV) is a paramyxovirus classified in the *Morbillivirus* genus along with rinderpest virus (RPV), measles virus (MV), canine distemper virus (CDV), phocine distemper virus (PDV) and dolphin morbillivirus (DMV). All these viruses are closely related and between them there are immunological cross reactions. PPR virions, as the other morbilliviruses, are enveloped, pleomorphic particles containing single strand RNA as the genome. It is composed of 15,948 nucleotides, the longest of all morbillivirus genomes sequenced so far (see Table 1) [19]. This genomic RNA is wrapped by the nucleoprotein (N) to form the nucleocapsid into which are associated two other viral proteins: the phosphoprotein (P) and the large protein (L). The phosphoprotein is the co-factor of L, the viral RNA dependant RNA polymerase (RdRp). To the viral envelope which derives from the host cell membrane are associated three viral proteins: the matrix protein (M) which is located inside the envelope and serves as a link between the nucleo-

Table 1
Comparison of rinderpest full-length genome sequence with those of some other morbilliviruses [19]

Virus	Genome length in nucleotides	Percentage of similarity with rinderpest
Rinderpest	15 882	100
Measles Virus	15 894	70.50
Peste des Petits Ruminants	15 948	66.98
Dolphin Morbillivirus	15 882	65.91
Canine Distemper	15 702	63.58

capsid and the two external viral proteins, the fusion protein (F) and the haemagglutinin (H). By this position, M plays an important role in ensuring efficient incorporation of nucleocapsids into virions during the virus budding process. The haemagglutinin allows the virus to bind to the cell receptor during the first step of the viral infection process. This binding is followed by the fusion of the viral envelope with cell membrane, a process mediated by F and this leads to the delivery of the nucleocapsids into the cell cytoplasm were takes place the viral multiplication. By their positions and their functions, both F and H are very important for the induction of protective host immune response against the virus and most of the neutralising antibodies are directed against H. However N, the most abundant and also the most immunogenic among PPRV proteins, does not induce protective immunity against the virus (A. Diallo, unpublished data). It has been used in the development of diagnostic tests [20–22]. Analysis of partial sequencing data of N gene has pointed out small variations between PPRV strains and has allowed their grouping into four lineages, which is better reflecting their geographical origins than the variations of genes of the external glycoproteins F and H ([6,23]; Shyam G. and Diallo A., unpublished data). Out of these four lineages (Fig. 1), three are from Africa and all Asian strains are grouped into lineage IV. This latter co-exist with lineage III, the East African PPRV group, in the Middle East, certainly as a consequence of small ruminant importations from both the East African and the Asian PPR endemic regions.

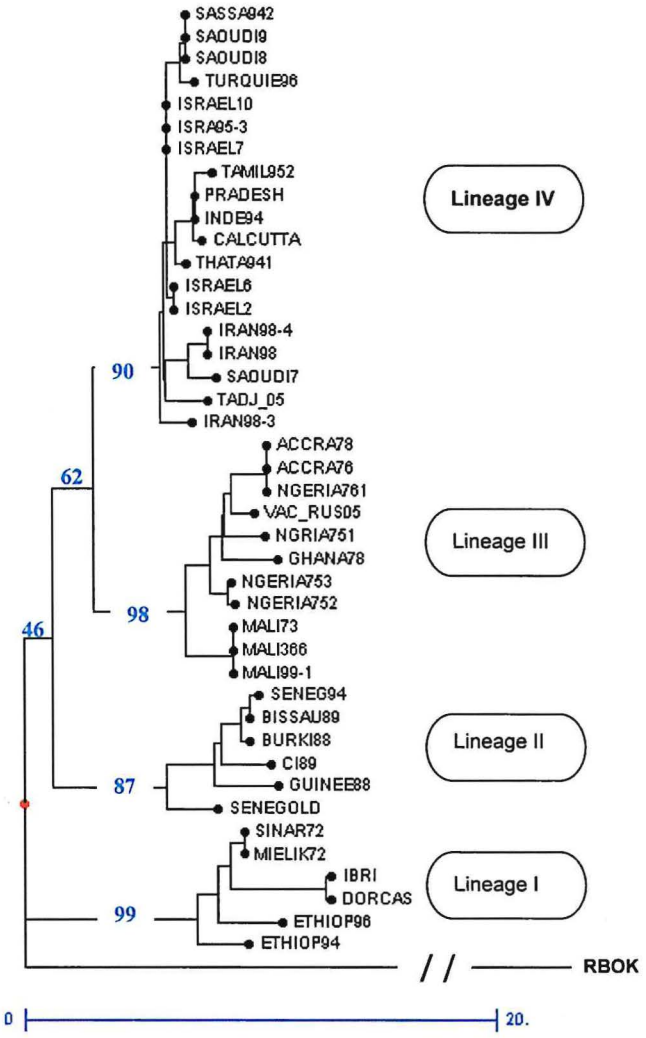


Fig. 1. Phylogenetic tree of PPRV based on the alignment of the nucleotide sequences (1232–1560) of the N protein gene (neighbor-joining method of the Darwin package). Distances were generated with TreeCon MATRIXW program. Percentages of 1000 bootstrap replicates supporting each group are indicated. The rinderpest vaccine RBOK strain N protein gene sequence is included as outgroup [6].

4. Progress in the development of PPR vaccines

The main characteristic of the pathogenesis of PPRV infection, as for all other morbilliviruses, is the profound but transient immunosuppression induced by this virus in its host with the consequence of increased susceptibility to opportunistic infections and increased mortality. This immunosuppression effect is a resultant not only of the direct effect of the virus multiplication in lymphoid cells but also of the different strategies morbilliviruses, as many other viruses, have evolved to overcome the host immune defence system [24,25]. However, despite the profound immunosuppression they may induce, this effect is transient and recovery from the disease is usually followed by the establishment of a strong, specific and long-term protective immune response of the host [26,27]. In the case of MV, it is suggested that this apparent paradox may be explained in part by preferential long-term activation of type 2 CD4+ T cells by the virus [26]. In the case of PPR, as well as of rinderpest, information are lacking with regards to the immune response necessary for recovery from or for protection against infection. However, for the control of this disease, vaccines were developed or are on the development following the same strategy as for the other morbilliviruses.

4.1. Conventional attenuated vaccines

Soon after the first isolation of PPRV in tissue culture in the 1960s, preliminary attempts were made to develop an attenuated live vaccine but these were unsuccessful [28,29]. At that time, an attenuated tissue culture rinderpest vaccine, very effective against rinderpest, was available [30]. Considering the closely antigenic relationship between RPV and PPRV, this live attenuated rinderpest vaccine was tested in goats for vaccination against PPR. Evaluation of the serological immune response of these vaccinated animals demonstrated the presence of neutralising antibodies against RPV but not against PPRV, or only on few occasions [31]. However, all animals resisted to PPRV challenge and this was accompanied by rising levels of PPRV neutralising antibody activity [31]. This result indicates probably that some

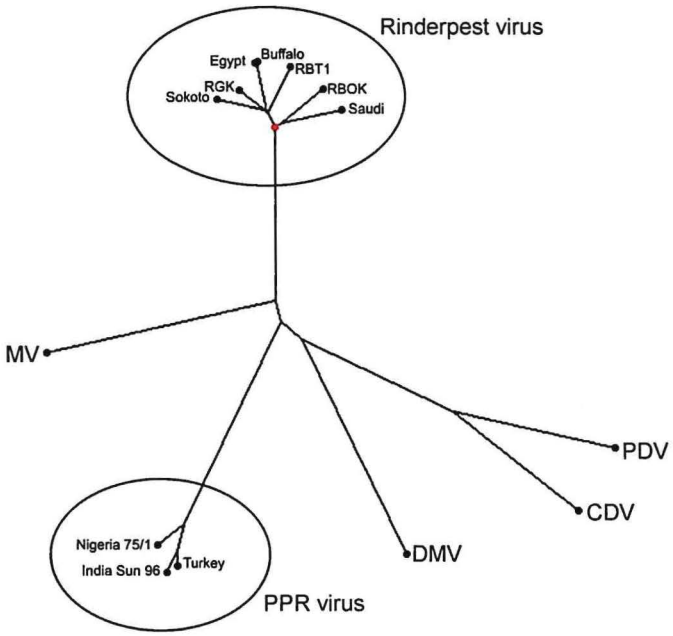


Fig. 2. Phylogenetic tree of morbilliviruses based on the alignment of the full nucleoprotein gene nucleotide sequences. For RPV and PPRV sequences of many strains were included to highlight the well separation of PPRV from RPV. Distances were generated with TreeCon MATRIXW program.

replication of PPR challenge virus occurs in animals vaccinated with this RP vaccine prior to its clearance by the rinderpest-primed immune response. Despite this possible PPRV transient replication in the vaccinated animals, rinderpest attenuated vaccine was successfully used to protect small ruminants against PPR disease, a protection which lasts for at least one and probably 3 years [7,31–33]. However it is not known if such vaccinated animals can then transmit the challenge virus during its short period of replication. If gene sequencing data have confirmed previous serological results on the closely relationship between RPV and PPRV, they however have shown that percentage the homology between H protein of the two virus is relatively low, the two proteins sharing less than 60% of amino acids [19]. Only F, the second protective viral protein, is well conserved with about 80% of homology. In fact, as it can been seen in Fig. 2 which has been constructed based on the sequencing data of the nucleoprotein gene, one of the well conserved proteins within the morbillivirus group, the closest virus to RPV is measles virus but not PPRV. The cross protection provided by RPV against PPRV infection is probably due to the fusion protein which is well conserved. This protein seems to induce mainly cellular immune response. The fact that PPRV neutralising was not detected in RPV vaccinated small ruminants before challenge has encouraged continuing research on the development of a homologous PPR vaccine. In 1989 this goal was finally achieved by the successful attenuation of PPRV strain Nigeria 75/1 through serial passages on Vero cells [34]. Several trials have demonstrated the efficacy of this vaccine on more than 98,000 sheep and goats in the field between 1989 and 1996. During those trials no unwanted side effects such as abortion in pregnant animals were recorded. It was demonstrated also that animals vaccinated with this attenuated PPRV were unable to transmit the challenge virus to in-contact animals. Anti-PPRV antibodies generated by vaccinated animals last for at least 3 years, the effective economic life of the animals. PPRV Nigeria 75/1 belongs to lineage I. During the development process of the attenuated vaccine based on this virus, different PPRV strains were used as challenge viruses and all failed to induce disease in the vaccinated animals, result demonstrating the potential worldwide effective use of this vaccine to control PPR. The availability of a homologous vaccine for PPR is fortunate since the use of rinderpest vaccine in all animal species has now been discontinued worldwide. This is to ensure a rinderpest serologically negative ruminant population to allow for effective epidemiosurveillance of rinderpest disease to fulfil the OIE requirements needed to obtain the status of a rinderpest free country or zone. The attenuated homologous PPRV vaccine is now the only vaccine permitted for use in sheep and goats to protect them against PPRV infections.

4.2. Vaccine stability

As with all members of the family *Paramyxoviridae*, PPRV is very heat sensitive and this is a serious drawback to the efficient use of the live attenuated vaccine in the endemic areas, which have hot climatic environments. In addition these regions usually have poor infrastructures and under these conditions it is difficult to maintain a cold chain to ensure the preservation of vaccine potency. This drawback was overcome by Worwall et al. through the development of a thermotolerant vaccine freeze dried in the presence of a cryoprotectant containing trehalose [35]. Under these production conditions the vaccine is stable at 45 °C for 14 days with minimal loss of potency (see Table 2). PPR control will benefit greatly from the use of this thermostable form of the

Table 2
Thermostability of PPR Xerovac at different concentrations of trehalose: titre of the vaccine in TCID50/ml at different days of post storage at 45 °C

		Titre, in TCD50/ml, of the vaccine stored at + 45 °C				
% of trehalose in the vaccine	RM*%	Day 0	Day 3	Day 5	Day 8	Day 14
1	1.04	5.20	4.25	4.0	2.15	<1.5
2	1.8	5.10	4.55	4.40	3.30	2.6
4	2.0	5.20	4.80	4.75	3.45	2.75
8	1.3	5.00	4.75	4.85	4.15	3.10

RM*: percentage of residual moisture (RM) in the final vaccine product after dehydration.

attenuated vaccine. A similar vaccine was recently produced in India using a local strain of PPRV [36].

4.3. DIVA vaccines

A major disadvantage when using classical live attenuated vaccine is that the antibody responses they induce in animals cannot be distinguished from those following a natural infection. This makes sero-epidemiosurveillance of the disease impossible in endemic areas where a vaccination programme has been or is being implemented. A way to combine activities, vaccination and serosurveillance, for the better management of the disease would be the use of DIVA vaccines, the acronym used for vaccines which enable *d*ifferentiation between *i*nfected and *v*accinated *a*nimals [37]. Originally this term was applied to gene-deleted marker vaccines for large DNA viruses when used with their vaccine-specific serological tests, but it can also apply to sub-unit vaccines [38,39], heterologous vaccines [40] or some killed whole pathogen vaccines such as the highly purified Foot and Mouth Disease Vaccine which is used in conjunction with non-structural protein-based serological tests [41]. It can be used also for recombinant-based vaccines.

4.3.1. PPR poxvirus-based recombinant vaccines

PPRV, like other morbilliviruses, is an enveloped RNA virus with two external glycoproteins, the fusion (F) and haemagglutinin (H) proteins. These proteins are responsible for inducing protection against the disease in animals. The H and F protein genes of several morbilliviruses have been expressed in various vector systems and they can be used as effective sub-unit vaccines [42–48]. Following this approach, the F protein of PPRV was inserted into the genome of an attenuated capripox virus vaccine [49]. The resulting recombinant virus expressed the PPRV F protein on the surface of infected cells, which was recognised by an anti-F monoclonal antibody. This recombinant was then tested in goats and shown to be effective in protecting inoculated animals against PPR at a dose as low as 0.1 pfu. A similar vaccine which expressed the PPRV H protein was also produced and it is effective at a minimal dose of 10 pfu [50]. The duration of immunity provided by these two vaccines and also the effect of capripox pre-immunity over the vaccination have yet to be determined. They offer the advantage of being able to differentiate non-infected but vaccinated animals from those which have been exposed to PPRV. Indeed a competitive ELISA has been developed for the detection of antibodies to PPRV, test based on the use of PPRV nucleoprotein (N) produced in insect cells [21]. The N protein is the most immunogenic viral protein and induces in the host high amounts of antibodies anti N. In the present case of using recombinant vaccine devoted from PPRV N protein, anti N antibodies will only be detected in naturally infected animals or in animals vaccinated with the recombinant, which subsequently become infected with the PPRV. Apart from their advantage as DIVA vaccines, these capripox recombinant vaccines can be used to immunize animals against two major diseases of small ruminants in a single treatment, capripox and PPR.

4.3.2. Reverse genetics for vaccine development

The development of the reverse genetics technology for negative strand RNA viruses has given us another means of producing marker vaccines to combat viral diseases such as PPR. One of these recombinant vaccines has the rinderpest vaccine virus genome as the backbone into which the matrix (M), the F and H protein genes of RPV were replaced by those of PPRV. The resulting chimeric virus proved to be a safe and effective vaccine which could protect goats against virulent challenge with PPRV [51]. This chimeric PPR marker vaccine can be used in any endemic country without compromising the global rinderpest serosurveillance effort since all antibody tests are based on either the N or H virus proteins which are quite distinguishable serologically between rinderpest and PPR viruses. Animals which have never been in contact with rinderpest but which are vaccinated with this vaccine would test seronegative in the rinderpest H-based cELISA [52] but positive for the presence of anti-RPV N protein antibody [53]. Likewise, animals without any prior exposure to PPR will be positive for antibodies in the PPRV H-based cELISA if vaccination is successful, but negative in the PPRV N-based cELISA and so will be distinguishable serologically from naturally infected animals.

5. Conclusion

PPR is an important animal disease which now threatens the billion-strong small ruminant population in Africa, the Middle and Near East, South-West and Central Asia. Its economic importance was highlighted in a report on an international survey carried out by Perry et al. [54]. In that report they identified PPR as one of the priority animal diseases whose control is considered important for poverty alleviation in Western Africa and Southern Asia. In the same report it was also pointed out that PPR is still a poorly recognised disease, particularly with regard to epidemiological features such as transmission dynamics under different production systems. A great deal of more research into this aspect of the disease is urgently required. The fact that PPRV can infect cattle, buffaloes and camels [17,18] gives PPR an even higher priority, particularly in the current situation where vaccination against rinderpest in cattle has been stopped. The availability of an effective marker vaccine along with its companion serological tests will greatly assist in designing effective control programmes for this disease in future.

References

[1] Gibbs EPJ, Taylor WP, Lawman MPJ, Bryant J. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the Genus Morbillivirus. Intervirology 1979;11:268–74.

[2] Rowland AC, Scott GR, Hill DH. The pathology of an erosive stomatitis and enteritis in West African dwarf goats. J Pathol 1969;98:83–7.
[3] Rowland AC, Bourdin P. The histological relationship between peste des petits ruminants and kata in West Africa. Rev Elev Méd Vét Pays Trop 1970;23:301–7.
[4] Gargadennec L, Lalanne A. La peste des petits ruminants. Bull Serv Zoot Epiz AOF 1942;5:16–21.
[5] El Hag Ali B, Taylor WP. Isolation of peste des petits ruminants virus from Sudan. Res Vet Sci 1984;36:1–4.
[6] Kwiatek O, Minet C, Grillet C, Hurard C, Carlsson E, Karimov B, et al. Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan. J Comp Path, 2007, in press.
[7] Rossiter PB, Taylor WP. Peste des petits ruminants. In: Coetzer AW, Thomson GR, Tustin RC, editors. Infectious diseases of livestock, vol. II. 1994. p. 758–65.
[8] Plowright W. Observations on the behaviour of rinderpest virus in indigenous African sheep. Brit Vet J 1952;108:450–7.
[9] Scott GR. Experimental rinderpest in Red Masai sheep. Bull Epi Dis of Africa 1962;10:126–423.
[10] EL Hag Ali B, Taylor WP. An investigation on rinderpest virus transmission and maintenance by sheep, goats and cattle. Bull Ani Hlth Prod Africa 1988;36:290–4.
[11] Couacy-Hymann E, Bidgeh K, Angba A, Domenech J, Diallo A. Protection of goats against rinderpest by vaccination with attenuated peste des petits ruminants virus. Res Vet Sci 1995;59:106–9.
[12] Taylor WP, Diallo A, Gopalakrishna S, Shreeramalu P, Wilsmore AJ, Nanda YP, et al. Peste des petits ruminants has been widely present in southern India since, if not before, the late 1980s. Prev Vet Med 2002;52:305–12.
[13] Furley CW, Taylor WP, Obi TU. An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. Vet Rec 1987;121:443–7.
[14] Roger F, Gebre Yesus M, Libeau G, Diallo A, Yigezu LM, Yilma T. Detection of antibodies of rinderpest and peste des petits ruminants viruses (Paramyxoviridae, Morbillivirus) during a new epizootic disease in Ethiopian camels (Camelus dromadarius). Rev Méd Vét 2001;152:265–8.
[15] Govindarajan R, Koteeswaran A, Venugopalan AT, Shyam G, Shagu Seth, Shaila MS, et al. Isolation of peste des petits ruminants virus (PPRV) from an outbreak in Indian Buffalo (*Bubalus bubalus*). Vet Rec 1997;141:573–4.
[16] Rossiter PB, Wardley RC. The differential growth of virulent and avirulent strains of rinderpest virus in bovine lymphocytes and macrophages. J Gen Virol 1985;66:969–75.
[17] Heaney J, Barrett T, Cosby SL. Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. J Virol 2002;76:3579–84.
[18] Laine D, Trescol-Biemont MC, Longhi S, Libeau G, Marie JC, Vidalain PO, et al. Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcgammaRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. J Virol 2003;77:11332–46.
[19] Barrett T, Banyard AC, Diallo A. Molecular biology of the morbilliviruses. In: Barrett T, Pastoret P-P, Taylor WP, editors. Rinderpest and peste des petits ruminants. Virus plagues of large and small ruminants. Amsterdam: Academic Press, Elsevier; 2005. p. 31–67.
[20] Libeau G, Diallo A, Colas F, Guerre L. Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. Veterin Record 1994;134:300–4.
[21] Libeau G, Prehaud C, Lancelot R, Colas F, Guerre L, Bishop DH, et al. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. Res Veterin Sci 1995;58:50–5.
[22] Couacy-Hymann E, Roger F, Hurard C, Guillou JP, Libeau, Diallo A. Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. J Virol Meth 2002;100:17–25.
[23] Shaila MS, Shamaki D, Forsyth MA, Diallo A, Kitching RP, Barrett T. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. Virus Res 1996;43:149–53.
[24] Rajak KK, Sreenivasa BP, Hosamani M, et al. Experimental studies on immunosuppressive effects of peste des petits ruminants (PPR) virus in goats. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2005;28:287–96.
[25] Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, Volker ter Meulen V. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. Curr Molec Med 2001;1:163–81.
[26] Servet-Delprat C, Vidalain PO, Valentin H, Rabourdin-Combe C. Measles virus and dendritic cell functions: how specific response cohabits with immunosuppression. Curr Top Microbiol Immunol 2003;276:103–23.
[27] Cosby SL, Kai C, Yamanouchi K. Immunology of rinderpest- an immunosuppression but a lifelong vaccine protection. In: Barrett T, Pastoret P-P, Taylor WP, editors. Rinderpest and peste des petits ruminants. Virus plagues of large and small ruminants. Amsterdam: Academic Press, Elsevier; 2005. p. 197–221.
[28] Gilbert Y, Monnier J. Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1962;15:321–35.
[29] Benazet B. La peste des petits ruminants: étude expérimentale de la vaccination. Thèse Doctorat Vétérinaire, Université de Toulouse, 1973.
[30] Plowright W, Ferris RD. Studies with rinderpest virus in tissue culture. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. Res Vet Sci 1962;3:172–82.
[31] Taylor WP. Protection of goats against peste des petits ruminants with attenuated rinderpest virus. Res Vet Sci 1979;27:321–4.
[32] Bourdin P, Rioche M, Laurent A. Emploi d'un vaccin anti-bovipestique produit sur cultures cellulaires dans la prophylaxie de la peste des petits ruminants au Dahomey. Rev Elev Méd Vét Pays Trop 1970;23:295–300.
[33] Taylor WP, al Busaidy S, Barrett T. The epidemiology of peste des petits ruminants in the Sultanate of Oman. Vet Microbiol 1990;22:341–52.
[34] Diallo A, Taylor WP, Lefèvre PC, Provost A. Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue. Rev Elev Méd vét Pays Trop 1989;42:311–7.
[35] Worrwall EE, Litamoi JK, Seck BM, Ayelet G. Xerovac. An ultra rapid method for the dehydration and preservation of live attenuated rinderpest and peste des petits ruminants vaccines. Vaccine 2001;19:834–9.
[36] Sarkar J, Sreenivasa BP, Singh RP, Dhar P, Bandyopadhyay SK. Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR). Vaccine 2003;21:4728–35.
[37] van Oirschot JT. DIVA vaccines that reduce virus transmission. Biotechnol 1999;73:195–205.
[38] Ahrens U, Kaden V, Drexler C, Visser N. Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine Porcilis Pesti in pregnant sows. Vet Microbiol 2000;77:83–97.
[39] de Smit AJ, Bouma A, de Kluijver EP, Terpstra C, Moormann RJ. Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination. Vet Microbiol 2001;78:307–17.
[40] Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. Development of a DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. Avian Pathol 2003;32:47–55.
[41] Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES, Salt JS, Nqindi J, Mackay DKJ. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. Arch Virol 1998;143:1–16.
[42] Drillien R, Spehner D, Kirn A, Giraudon P, Buckland R, Wild F, et al. Protection of mice from fatal measles encephalitis by vaccination with vaccinia virus recombinants encoding either the hemagglutinin or the fusion protein. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:1252–6.
[43] Tsukiyama T, Yoshikawa Y, Kamata H, Imaoka H, Asano K, Funahashi S, et al. Development of heat-stable recombinant rinderpest vaccine. Arch Virol 1989;107:225–35.
[44] Wild F, Giraudon P, Spehner D, Drillien R, Lecocq JP. Fowlpox virus recombinant encoding the measles virus fusion protein:

protection of mice against fatal measles encephalitis. Vaccine 1990;8: 441–2.

[45] Stephensen CB, Welter J, Thaker SR, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. J Virol 1997;71:1506–13.

[46] Romero CH, Barrett T, Evans SA, Kitching RP, Gershon PD, Bostock C, et al. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. Vaccine 1993;11:737–42.

[47] Romero CH, Barrett T, Chamberlain RW, Kitching RP, Fleming M, Black DN. Recombinant capripoxvirus expressing the haemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. Virology 1994;204:425–9.

[48] Taylor J, Weinberg R, Tartaglia J, Richardson C, Alkhatib G, Briedis D, et al. Non-replicating viral vectors as potential vaccines: recombinant canarypox virus expressing measles virus fusion (F) and haemagglutinin (HA) glycoproteins. Virology 1992;187:321–8.

[49] Berhe G, Minet C, Le Goff C, Barrett T, Ngangnou A, Grillet C, et al. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. J Virol 2003;77:1571–7.

[50] Diallo A, Minet C, Berhe G, Le Goff C, Black DN, Fleming M, et al. Goat immune response to capripox vaccine expressing the haemagglutinin protein of peste des petits ruminants. Ann NY Acad Sci 2002;969:88–91.

[51] Mahapatra M, Parida S, Baron MD, Barrett T. Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex. J Gen Virol 2006;87:2021–9.

[52] Anderson J, McKay JA. The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes. Epidemiol Infect 1994;112:225–31.

[53] Libeau G, Diallo A, Calvez D, Lefèvre PC. A competitive ELISA using anti-N monoclonal antibodies for specific detection of rinderpest in cattle and small ruminants. Vet Microbiol 1992;31:147–60.

[54] Perry BD, Randolph TF, McDermott JJ, Sones KR, Thornton PK. Investing in animal health research to alleviate poverty. Nairobi, Kenya: ILRI (International Livestock Research Institute); 2002. pp. 148.

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie virale infectieuse, contagieuse et souvent fatale, qui affecte les animaux domestiques et la faune sauvage de l'Afrique subsaharienne, du Moyen-Orient et de l'Asie du sud-ouest. Cette maladie est due à un virus à ARN négatif monocaténaire non segmenté, de la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Morbillivirus* et sa réplication est placée sous la dépendance de trois protéines : N, P et L. Le vaccin actuel est une souche virulente atténuée par passages successifs sur cellules VERO. Ce vaccin confère une bonne immunité. N'étant pas un vaccin DIVA, il ne permet de faire, par diagnostic sérologique, la distinction entre les animaux vaccinés-animaux infectés. Le développement, par génétique inverse, d'un clone vaccinal infectieux marqué (vaccin DIVA) est l'objectif principal de ce travail de recherche, associé la mise au point d'outils de diagnostic différentiel. La mise en place de la génétique inverse adaptée au virus de la peste des petits ruminants a été notre premier travail. Elle a été réalisée à l'aide d'un minigénome eGFP, dont le gène ne peut être fonctionnel que dans le contexte d'une expression de type virus PPR. La seconde partie du travail a consisté à assembler, cloner et vérifier l'ADNc du génome complet de la souche virale vaccinale PPRV 75/1. La génération, par génétique inverse, du premier clone infectieux PPR a ensuite été mise en œuvre et est toujours en cours. Les résultats obtenus à ce jour ne permettent pas de conclure à la présence d'un clone infectieux. En parallèle, plusieurs stratégies de marquage du vaccin ont été évaluées : délétion d'un segment de la séquence du génome de la souche vaccinale PPRV 75/1, insertion d'une cassette d'expression d'un gène étranger ou substitution d'une partie d'un gène par une séquence homologue dérivée d'un autre morbillivirus ou d'un peptide commercial. Les marques les plus prometteuses ont été ensuite utilisées pour mettre au point des tests diagnostics ELISA.

Development of a DIVA vaccine against Peste des Petits Ruminants by reverse genetics

Peste des Petits Ruminants (PPR) is an infectious, contagious and fatal viral disease of goats, sheep and wildlife in sub-Saharan African countries, Middle-East and South-West of Asia. It is caused by a single strand negative RNA virus belonging to the *Morbillivirus* genus among the *Paramyxoviridae* family. Current vaccines consist of viral strains attenuated by several passages on cell cultures. These vaccines protect animals against PPR but they are not DIVA vaccines and thus do not permit the distinction between vaccinated and infected animals. However, the manipulation of negative RNA strand by reverse genetics allows the generation of an infectious and marked clone of PPR vaccine strain. Therefore, the aim of this work was to develop both a PPR marked vaccine using reverse genetics technology and the associated diagnosis tools. The first task was to adapt the reverse genetics to the PPR virus using the eGFP minigenome model. Then the full genome of PPR vaccine strain 75/1 was assembled in a plasmid after translation of genomic negative RNA in cDNA. Attempts to generate the first recombinant PPRV are ongoing but up to now, we cannot conclude on the presence of an infectious rescued virus. In parallel, different strategies for vaccine marks were also evaluated: deletion of a region of PPRV genome, insertion of foreign genes or substitution by homologous sequence derived from another morbillivirus or a commercial peptide. In the same time, ELISA assays corresponding to the most promising markers were developed.

Discipline : biochimie et biologie moléculaire

Mots-clés : peste des petits ruminants ; morbillivirus, paramyxovirus ; génétique inverse

Cécile MINET

Laboratoire : CIRAD – Département Systèmes Biologiques, UMR 15 « Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes », équipe de virologie, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier, cedex 5, France