



HAL
open science

Le vaccin antivariolique historique Lister : séquence génomique, diversité phénotypique et neuropathogénicité : perspectives vaccinales

Aude Garcel

► To cite this version:

Aude Garcel. Le vaccin antivariolique historique Lister : séquence génomique, diversité phénotypique et neuropathogénicité : perspectives vaccinales. Autre [q-bio.OT]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00198642

HAL Id: tel-00198642

<https://theses.hal.science/tel-00198642>

Submitted on 19 Dec 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURRIER

**ECOLE DOCTORALE INGENIERIE POUR LA SANTE, LA
COGNITION ET L'ENVIRONNEMENT**

Discipline : Virologie

ANNEE : 2007

THESE

Présentée par

Aude GARCEL

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I

**LE VACCIN ANTIVARIOLIQUE HISTORIQUE LISTER :
SEQUENCE GENOMIQUE, DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET
NEUROPATHOGENICITE : PERSPECTIVES VACCINALES**

Directeur de thèse : Pr Daniel GARIN
Thèse réalisée au laboratoire de virologie du
Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
Emile Pardé, Grenoble

Soutenue le 14 décembre 2007

Composition du jury :

Rapporteurs :	Pr Gerd SUTTER Dr Pierre-Olivier COURAUD	Paul-Ehrlich-Institut INSERM U567/CNRS UMR 8104
Examineurs :	Dr Anne-Laure FAVIER Pr Daniel GARIN Dr Robert DRILLIEN Dr Bernard MEIGNIER	CRSSA CRSSA INSERM UMR 7104 sanofi-pasteur

RESUME

Jusqu'en 1980, date à laquelle la variole a été déclarée éradiquée suite à la pratique de la vaccination, elle a constitué un véritable fléau pour l'humanité. Le risque de réémergence du virus de la variole dans un contexte bioterroriste, compte-tenu des conditions de production, de la faible immunité de la population et des complications post-vaccinales liées aux vaccins historiques, rend le développement de nouveaux vaccins antivarioliques nécessaire.

L'objectif du travail de thèse présenté dans ce mémoire est l'étude du vaccin antivariolique historique *Lister* dans un cadre de stratégie d'élaboration d'un nouveau vaccin issu de cette souche.

La séquence génomique de ce vaccin est déterminée et décrite. Sa comparaison avec d'autres souches de virus de la vaccine met en évidence les singularités de la souche *Lister*.

Par ailleurs, l'étude de la diversité de la population virale et sa caractérisation phénotypique et génétique devraient permettre d'éclairer le choix de la stratégie pour développer un nouveau vaccin dit de deuxième génération issu de cette souche : vaccin constitué d'un seul clone viral ou vaccin polyclonal.

Enfin, l'étude de l'interaction du virus de la vaccine avec la barrière hémato-encéphalique montre une augmentation de sa perméabilité suite à l'infection des cellules endothéliales par le virus de la vaccine. De plus, des études *in vivo* mettent en évidence l'entrée et la répllication du virus dans le tissu cérébral, entraînant des atteintes cérébrales parfois mortelles. Ces perspectives permettent d'appréhender la neuropathogénicité du vaccin historique reliée aux encéphalites post-vaccinales, complications létales de la vaccination antivariolique.

Mots clés : vaccin antivariolique, virus de la vaccine, diversité phénotypique, neuropathogénicité, barrière hémato-encéphalique, encéphalite post-vaccinale.

Laboratoire de rattachement : Laboratoire de virologie, Centre de recherches du service de santé des armées Emile Pardé, 24 Avenue des maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche

SUMMARY

Historic Lister smallpox vaccine : genomic sequence, phenotypic diversity and neuropathogenesis : vaccinal perspectives

The smallpox constituted a real scourge for humanity until 1980, the year of the declaration of its eradication due to vaccination. The risk of variola virus reemerging as a biological weapon, considering manufacturing conditions, the low population immunity and historical vaccine post-vaccinal complications, make new smallpox vaccines development a necessity.

In this paper, the historical *Lister* strain vaccine study is described as part of the elaboration strategy of a new vaccine coming from this strain.

The genomic sequence of this vaccine is determined and described. Its comparison with other vaccinia virus strains underlines the Lister strain singularities.

The viral population diversity study as well as the phenotypic and genetic characterization should highlight strategy choice for the development of a new second generation vaccine coming from the *Lister* strain : a clonal vaccine or a polyclonal one.

Finally, the study of the vaccinia virus interaction with the blood-brain barrier demonstrates an increase in permeability due to vaccinia virus endothelial cells infection. Moreover, *in vivo* studies exhibit the viral entry and replication in the brain, sometimes responsible for critical cerebral reaches. These results suggest the first generation smallpox vaccine neuropathogenesis could have caused deadly post-vaccinal encephalitis, smallpox vaccination complications.

Key words : smallpox vaccine, vaccinia virus, phenotypic diversity, neuropathogenesis, blood-brain barrier, post-vaccinal encephalitis.

Laboratory : Laboratoire de virologie, Centre de recherches du service de santé des armées Emile Pardé, 24 Avenue des maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche

Cette thèse est l'aboutissement de dix années d'aventure grenobloise qui n'auraient certainement pas été aussi enrichissantes et plaisantes sans l'enthousiasme et le soutien de toutes les personnes qui m'ont suivie pendant ces années.

J'aimerais que les membres du jury trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements :

Le Docteur Anne-Laure Favier, pour m'avoir encadrée durant ces quatre années de thèse et pour l'autonomie qu'elle m'a accordée au sein de ce travail. Je la remercie chaleureusement pour son optimisme, son soutien constant et ses encouragements amicaux. Je n'oublierai pas les nombreuses heures de travail partagées tout au long de cette thèse ainsi que les moments de détente passés ensemble, en particulier lors des congrès. Je la remercie sincèrement pour sa relecture attentive à domicile dans l'attente d'un heureux événement. Je voudrais qu'elle trouve ici toute ma reconnaissance et mon amitié.

Le Professeur Daniel Garin, pour m'avoir proposé un sujet de thèse au sein de son unité et trouvé un financement en un temps record. Je le remercie pour son suivi et son appui auprès des laboratoires sanofi-pasteur.

Le Docteur Robert Drillen, pour sa disponibilité, ses conseils, ses critiques et ses nombreuses relectures de manuscrits. Je lui suis très reconnaissante d'avoir suivi avec intérêt l'avancée de mes travaux et accepté de participer à ce jury.

Le Docteur Bernard Meignier, pour son suivi régulier et son intérêt constant. Ce travail n'aurait jamais pu être initié sans lui et je le remercie donc chaleureusement pour sa confiance, son soutien et sa participation évidente à ce jury.

Le Professeur Gerd Sutter et le Docteur Pierre-Olivier Couraud, pour avoir accepté de donner de leur temps précieux afin de juger ce travail, et ce dans un temps très court. Je les remercie très sincèrement de cet honneur qu'ils me font.

Que toutes les personnes et institutions qui ont collaboré à la réalisation de ce travail s'en voient ici remerciées :

Le Docteur William Fauquette pour la formidable collaboration qu'il nous a offerte. Je le remercie sincèrement pour le travail que nous avons réalisé en commun, pour le partage de ses connaissances et pour sa précieuse minutie. Il a su rendre très plaisantes les longues heures d'expérimentation ou de réflexion passées ensemble. Je le remercie très chaleureusement pour son soutien sans faille et sa relecture attentionnée. Je souhaite qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de mon amitié sincère.

Les laboratoires sanofi-pasteur qui m'ont autorisée à travailler sur leur vaccin, qui ont permis le financement de cette thèse et qui ont subventionné la présentation de ce travail à l'occasion de plusieurs congrès internationaux.

Le Médecin Général Inspecteur Gérard Martet, le Médecin Chef des Services Eric Multon et le Pharmacien en Chef Dominique Vidal pour m'avoir accueillie au Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, au sein du Département de Biologie des Agents Transmissibles.

Le Professeur Roméo Cecchelli et le Professeur Marie-Pierre Dehouck pour nous avoir généreusement fourni les clones de cellules endothéliales afin d'utiliser le modèle de BHE *in vitro* qu'ils avaient mis au point.

L'ensemble du Service de Biologie Appliquée du CRSSA pour leur travail indispensable auprès des animaux et en particulier Monsieur David Bois pour sa disponibilité et sa précieuse aide technique.

Je n'oublie pas non plus les personnes qui participent à la vie du laboratoire de virologie :

Je remercie très sincèrement le Docteur Jean-Marc Crance pour son profond investissement, ses conseils, sa disponibilité et son écoute inestimable. Je le remercie évidemment pour les soirées qu'il a accordées à la relecture de ce manuscrit après de longues et fatigantes journées au P4.

Je remercie également :

Danielle Gratier et Henri Blanquaert pour leur présence, leur gentillesse et leur travail inestimable ; Sophie Duraffour et Solenne Vigne pour leur soutien, leur bonne humeur quotidienne et leur sympathie ; Corinne Rothlisberger pour son aide à l'occasion de longues heures passées le samedi dans le P2 ; Marie-Ange Deydier pour ses nombreux services ; Josette Guimet pour sa gentillesse et ses gâteaux de Savoie ; Stéphane Richard dont les imitations sont incomparables, pour son essentiel travail de l'ombre ; Frédéric Iséni qui a partagé un « grand moment de solitude » avec moi ; Olivier Flusin pour sa gentillesse ; Laurent Saccucci pour les récits de ses aventures et son amour du chocolat et Julien Périno pour sa participation à mes travaux, son sens de l'humour et ses cafés !

Je remercie singulièrement tous mes proches de longue date et les amis de Pharma avec qui j'ai partagé mes inquiétudes, mes certitudes, mes joies, mes peines, des soirées, des week-ends et des vacances...

J'associe naturellement à ces remerciements tous les membres de ma grande famille « recomposée » pour leur présence et leur soutien, et tout spécialement JiBé pour sa présence à mes côtés, sa patience, sa compréhension et sa sincérité. Qu'ils trouvent ici la preuve de l'affection que j'ai pour eux.

Enfin je dédie cette thèse à mes parents et mes grands-parents sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Je les remercie pour leur soutien, leurs encouragements et leur confiance. Une pensée particulière va à ceux qui nous ont quittés mais qui m'accompagnent dans chaque instant. Que tous voient ici le témoignage de ma reconnaissance et de l'amour que je leur porte.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	14
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
1. La variole et les autres maladies causées par les <i>Orthopoxvirus</i>	19
1.1 Les <i>Poxvirus</i>	19
1.2 La variole	22
1.2.1 La variole à travers l'Histoire	22
1.2.2 Réémergence et menace terroriste	25
1.2.3 La clinique	27
1.2.4 Le diagnostic	30
1.2.5 Les traitements	31
1.2.6 La vaccination	34
1.3 Les autres <i>Orthopoxvirus</i> infectant l'homme	36
1.3.1 Infection par le virus du monkeypox	37
1.3.2 Infection par le virus du cowpox	37
1.3.3 Infection par le virus de la vaccine	38
1.3.4 Traitements et vaccination	38
2. Les vaccins antivarioliques de première génération	39
2.1 Les différentes souches	40
2.2 Efficacité vaccinale	42
2.3 Complications post-vaccinales et traitements	43
3. Les vaccins antivarioliques de deuxième génération	45
3.1 Les vaccins monoclonaux	46
3.2 Les vaccins polyclonaux	46
3.3 Avantages et inconvénients	47
4. Les vaccins antivarioliques de troisième et quatrième génération	48
4.1 Les différentes souches	48
4.2 Avantages et inconvénients	51
5. L'encéphalite post-vaccinale et la barrière hémato-encéphalique.....	52
5.1 L'encéphalite post-vaccinale	52
5.1.1 La clinique.....	52
5.1.2 L'origine.....	53
5.2 Les encéphalites infectieuses	54
5.2.1 Généralités	54

5.2.2 Les encéphalites virales	55
5.2.3 Les encéphalites dues à d'autres pathogènes	59
5.3 La barrière hémato-encéphalique.....	60
CHAPITRE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	65
1. Clonage du vaccin antivariolique de première génération	66
2. Séquence génomique du virus de la vaccine souche <i>Lister</i>	67
2.1 Résultats	68
2.2 Conclusions	103
3. Diversité de la population virale du vaccin antivariolique de première génération.....	104
3.1 Résultats publiés	104
3.2 Résultats non publiés	142
3.3 Conclusions	144
4. Interaction du virus de la vaccine avec la BHE	145
4.1 Matériels et méthodes	149
4.1.1 Cellules et virus	149
4.1.2 Animaux	150
4.1.3 Préparation du modèle de BHE <i>in vitro</i>	150
4.1.4 Infection des cellules endothéliales.....	151
4.1.5 Test de transport au saccharose	152
4.1.6 Microscopie immunofluorescente	153
4.1.7 Etude de la neurovirulence	153
4.1.8 Etude de la neuroinvasion	154
4.1.9 Titrage du virus dans le cerveau, la rate et le sang	154
4.1.10 Statistiques	155
4.2 Résultats	155
4.2.1 Etudes <i>in vitro</i>	155
4.2.1.1 Mise au point du modèle de BHE <i>in vitro</i> infecté	155
4.2.1.2 Etude de la permissivité des cellules endothéliales au VACV ...	157
4.2.1.3 Etude des effets de l'infection virale sur la BHE	158
4.2.2 Etudes <i>in vivo</i>	160
4.2.2.1 Etude de la neurovirulence du VACV.....	160
4.2.2.2 Etude de la pathogénicité du VACV inoculé par voie intraveineuse.....	160
4.2.2.3 Etude de la neuroinvasion du VACV	162
4.3 Discussion et conclusions	163

CHAPITRE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	177
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	203

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1 Famille des *Poxviridae*
- Figure 2 Photo d'un *Orthopoxvirus* en microscopie électronique
- Figure 3 Génome des *Orthopoxvirus*
- Figure 4 Cycle répliatif des *Orthopoxvirus* dans la cellule hôte.....
- Figure 5 Voies intracellulaire de maturation des différentes formes virales
- Figure 6 Photo d'un sujet atteint de variole ordinaire
- Figure 7 Evolution clinique de la variole ordinaire
- Figure 8 Evolution de l'exanthème
- Figure 9 Critères de différenciation de la variole et de la varicelle
- Figure 10 Photo d'une génisse curetée
- Figure 11 Evolution de la prise vaccinale
- Figure 12 Anatomie de la BHE
- Figure 13 Jonctions serrée et adhérente
- Figure 14 Les voies de passage à travers la BHE
- Figure 15 Les voies d'entrée des pathogènes dans le SNC
- Figure 16 Pathogénicité des souches Lister et Western-Reserve chez la souris après inoculation par voie intranasale
- Figure 17 Détermination de la dose discriminante pour l'étude de neuropathogénicité
- Figure 18 Evolution du titre viral dans le tissu cérébral des souriceaux après inoculation de VACV par voie intracérébrale
- Figure 19 Titres viraux dans le tissu cérébral des souriceaux morts après inoculation de VACV par voie intracérébrale
- Figure 20 Formation de « comètes »
- Figure 21 Modèle de BHE *in vitro*
- Figure 22 Courbe de clairance au saccharose de la BHE *in vitro*
- Figure 23 Franchissement du VACV au travers des inserts

-
- Figure 24 Capacité de réplication du VACV dans les cellules endothéliales
- Figure 25 Cinétique de réplication du VACV dans les cellules endothéliales
- Figure 26 Perméabilité de la BHE *in vitro* suite à une infection de 1h30 et 2h30 par le VACV
- Figure 27 Immunomarquage des jonctions serrées des cellules endothéliales après infection de 2h et 8h par le VACV
- Figure 28 Perméabilité de la BHE *in vitro* suite à une infection de 24h par le VACV
- Figure 29 Immunomarquage des jonctions serrées des cellules endothéliales après infection de 24h par le VACV
- Figure 30 Survie des souris après inoculation de VACV par voie intracérébrale
- Figure 31 Test d'agrippement des souris après inoculation de VACV par voie intraveineuse
- Figure 32 Mortalité des souris après inoculation de VACV par voie intraveineuse
- Figure 33 Morbidité des souris après inoculation de VACV par voie intraveineuse
- Figure 34 Titres viraux dans le sang, le cerveau et la rate des souris après inoculation de VACV par voie intraveineuse
- Tableau 1 Classement des agents biologiques en fonction du type d'encéphalite dont ils sont responsables

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AcN	Anticorps neutralisants
AFSSaPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BPF	Bonnes pratiques de fabrication
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degrés Celsius
CDC	Center for disease control and prevention
CEF	Chicken embryo fibroblasts
CEV	Cell-associated enveloped virus
CM	Cellulose methyl
CMLV	Camelpox virus
CPXV	Cowpox virus
CTP	Cytidine triphosphate
Da	Daltons
DICT	Dose infectieuse cytotoxique
ECTV	Ectromelia virus
EEV	Extra-cellular enveloped virus
EMA	European agency for the evaluation of medicinal products
EMPV	Encéphalomyélite post-vaccinale
EPPV	Encéphalopathie post-vaccinale
EPV	Encéphalite post-vaccinale
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
g	Force gravitationnelle relative
HBSS	Hank's buffered salt solution

HSPV	Horsepox virus
HPMPC	(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine
IEV	Intracellular enveloped virus
IL	Interleukine
IMP	Inosine-5-monophosphate
IMV	Intracellular mature virus
INF	Interféron
ITR	Inverted terminal repeats
IV	Immature virus
JAM	Junctional adhesion molecule
JS	Jonction serrée
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molaire
MOI	Multiplicity of infection
MPXV	Monkeypox virus
NYCBH	New-York city board of health
OMP	Orotidine monophosphate
OMS	Organisation mondiale de la santé
OPV	Orthopoxvirus
PAF	Platelet activating factor
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PC	Polycarbonate
PCR	Polymerase chain reaction
Pe	Coefficient de perméabilité
PFU	Plaque forming unit
p.i.	Post-infection
RPXV	Rabbitpox virus
SAH	S-adenosylhomocysteine
SC	Sérum de cheval
Sch	Sérum de chèvre

SNC	Système nerveux central
SV	Sérum de veau
SVF	Sérum de veau fœtal
TA	Température ambiante
TN	Tampon Tris
TNF	Tumor necrosis factor
UDG	Uracyl DNA glycosylase
UI	Unité internationale
VACV	Virus de la vaccine
VACV-156	Virus de la vaccine souche <i>IHD</i>
VACV-COP	Virus de la vaccine souche <i>Copenhagen</i>
VACV-List	Virus de la vaccine souche <i>Lister</i>
VACV-WR	Virus de la vaccine souche <i>Western-Reserve</i>
VARV	Virus de la variole
VIG	Immunoglobulines anti-vaccine
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
v/v	Volume/volume
X	n fois concentré
ZO	<i>Zonula occludens</i>

INTRODUCTION

Pendant plusieurs siècles, la variole a constitué un véritable fléau pour l'humanité, tuant jusqu'à 10 % de la population mondiale au XVII^e siècle. En 1796 Sir Edward Jenner mit au point le principe de vaccination qui sera à l'origine de l'éradication planétaire de cette maladie. Il prédit « que la disparition de la variole, le plus épouvantable fléau de l'espèce humaine, serait le résultat final de cette pratique ». Au cours des années, la pratique de la vaccination diminua progressivement à travers le monde jusqu'en 1980, date à laquelle l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclara la variole éradiquée. En France, la primo-vaccination n'a plus été pratiquée à partir de 1979 et la revaccination à partir de 1984.

Paradoxalement, ce triomphe de la médecine moderne est à l'origine d'une vulnérabilité, le virus de la variole appartenant aux principaux agents biologiques potentiellement utilisables dans un contexte de bioterrorisme. De plus, cette vulnérabilité est particulièrement accrue par la faible immunité au sein de la population résultant de l'arrêt de la vaccination et de moyens thérapeutiques limités. Le « Plan national de réponse à une menace variole » prévoit des stratégies de réponses adaptées en fonction des différents niveaux d'alerte envisagés, parmi lesquelles la vaccination des équipes dédiées, des sujets exposés, voir même de l'ensemble de la population. Ceci nécessite l'élaboration de nouveaux vaccins antivarioliques, les vaccins historiques dits de première génération, produits chez l'animal par scarification ne répondant plus aux normes sanitaires actuelles. De plus, malgré leur efficacité, les vaccins de première génération ont été responsables de nombreuses complications post-vaccinales parfois létales. Néanmoins, l'efficacité d'un nouveau vaccin ne peut pas être prouvée chez l'homme par des études cliniques en raison de l'éradication de la maladie. Seules des évaluations sur différents modèles animaux permettent l'appréhension de la protection induite par ces vaccins, sans corrélation possible avec l'homme.

Dans ce contexte les problématiques de ce travail de thèse ont été abordées dans la perspective d'élaboration de nouveaux candidats vaccins issus de la souche *Lister*. Ainsi, la séquence génomique du vaccin historique *Lister* a été déterminée et décrite dans le but de disposer d'un outil de travail spécifique à la souche *Lister*. La diversité phénotypique de la population virale a quant à elle été étudiée afin d'appréhender la possibilité et l'intérêt du développement d'un vaccin monoclonal issu de cette souche. Enfin la

neuropathogénicité du vaccin a été abordée à travers l'étude de l'interaction du virus de la vaccine avec la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans la perspective de compréhension de l'origine des encéphalites post-vaccinales.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une revue bibliographique en cinq parties. La première partie traite des différentes pathologies humaines causées par les *Orthopoxvirus*, en particulier la variole, et des mesures prophylactiques ou thérapeutiques disponibles contre ces maladies. Une deuxième partie est consacrée aux vaccins antivarioliques de première génération ayant permis l'éradication de la maladie. Les troisièmes et quatrièmes parties rassemblent les connaissances actuelles sur le développement des nouveaux vaccins dits de deuxième, troisième ou quatrième génération. La cinquième partie réunit les connaissances disponibles sur l'encéphalite infectieuse et post-vaccinale ainsi que la description de la physiologie et des fonctions de la BHE.

Le deuxième chapitre est consacré aux résultats expérimentaux présentés majoritairement sous forme d'articles scientifiques publiés, soumis ou à soumettre pour publication dans des revues scientifiques internationales, avec leurs propres références bibliographiques. Une introduction, un résumé des résultats, les conclusions et les perspectives accompagnent chacun des deux articles afin de mieux cerner le contexte entourant l'étude effectuée.

La première partie décrit le clonage du vaccin antivariolique de première génération de souche *Lister*, à l'origine de ce travail de thèse.

La deuxième partie correspond au premier article publié dans *Journal of General Virology*, intitulé « Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus *Lister* strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses ». Cet article décrit la séquence génomique d'un clone viral isolé et sélectionné comme référence de la population virale du vaccin et la comparaison de cette séquence avec celles de nombreux autres *Orthopoxvirus*.

La troisième partie rassemble les résultats des différentes études réalisées sur la diversité phénotypique et génétique de la population virale du vaccin. Cette partie est

principalement constituée d'un second article soumis à *Journal of Virology*, intitulé « Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine ».

La quatrième partie porte sur l'étude de l'interaction *in vitro* du virus de la vaccine avec la BHE et sur l'étude *in vivo* réalisée chez la souris sur le franchissement de cette barrière par le virus suivi de son entrée dans le tissu cérébral.

En fin de mémoire, une dernière partie est consacrée aux conclusions et perspectives de l'ensemble des résultats obtenus.

CHAPITRE I :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La variole et les autres maladies causées par les *Orthopoxvirus*

1.1 Les *Poxvirus*

Les *Orthopoxvirus* appartiennent à la famille des *Poxviridae* (nom commun : *Poxvirus*), rassemblant les plus grands virus enveloppés à ADN, de structure complexe et se multipliant dans le cytoplasme des cellules infectées. Les *Poxviridae* sont divisés en deux sous-familles : les *Chordopoxvirinae* infectant l'homme, certains animaux sauvages et domestiques et les *Entomopoxvirinae* infectant différents insectes (**Figure 1**). Les *Chordopoxvirinae* comprennent huit genres viraux différents: *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus* et *Orthopoxvirus*. Le genre *Orthopoxvirus* (OPV) regroupe quant à lui huit virus : Le virus de la variole (VARV), le virus monkeypox (MPXV), le virus cowpox (CPXV), le virus de la vaccine (VACV), le virus rabbitpox (RPXV), le virus horsepox (HSPV), le virus camelpox (CMLV) et le virus de l'ectromélie (ECTV).

D'un point de vue structural, les particules virales ont la forme d'une brique ou d'une savonnette de 300-350 nm de long sur 200-270 nm de large, aisément mise en évidence en microscopie électronique (**Figure 2**) (Chastel, 2003). Elles renferment une nucléocapside de forme biconcave appelée « core », contenant le génome et les nucléoprotéines. Le « core » est limité par une enveloppe constituée de deux couches : une couche interne d'aspect continu et dense aux électrons et une couche externe d'aspect discontinu lui conférant une apparence palissadique. Ce « core » est entouré d'une à plusieurs enveloppes lipoprotéiques qui confèrent une structure antigénique complexe. Les virus d'un même genre sont apparentés génétiquement et antigéniquement, ce qui permet de vacciner contre une maladie au moyen d'un virus antigéniquement proche ; ce qui permet de vacciner contre une maladie causée par un *Poxvirus* donné avec un autre virus antigéniquement proche ; c'est le cas de la vaccination contre la variole qui est réalisée avec le VACV (Fenner, 1989).

Le génome viral est un long ADN linéaire, bicaténaire, de 130 à 300 kpb, composé d'environ 30 % de bases G+C, terminé aux deux extrémités par des boucles en épingle à cheveux, elles-mêmes précédées de séquences répétées inversées (ITRs) (**Figure 3**). Le profil de restriction de cet ADN a montré que le fragment de 90 kpb, composant la région centrale, est très conservé entre les espèces et les souches, alors que les régions terminales sont variables (Esposito et Knight, 1985 ; Gangemi et Sharp, 1976). Le séquençage nucléotidique a mis en évidence que les gènes de la région centrale codent majoritairement des protéines de structure du virion ou des enzymes impliquées dans la réplication et la transcription virales (Goebel et al., 1990). Les régions terminales, quant à elles, codent des gènes associés à la survie du virus chez son hôte et sont plus variables. Ce sont des gènes codant des protéines homologues de cytokines (virokines) ou de récepteurs de cytokines, d'interférons, d'interleukines, de chimiokines et de facteurs de croissance (virocepteurs) (Kotwal et Moss, 1988 ; Ray et al., 1992; Upton et al., 1991). Ces gènes sont probablement d'origine cellulaire et auraient été « capturés » par les *Poxvirus* au cours de leur longue co-évolution avec leurs hôtes naturels. En mimant leurs homologues cellulaires, ils sont capables de moduler les réactions inflammatoires et immunitaires de l'hôte au bénéfice du virus, y compris le phénomène d'apoptose (Gubser et al., 2004) et se comportent comme des facteurs de virulence. A ce jour, plus de 100 séquences génomiques de *Poxvirus* ont été identifiées, dont 48 de VARVs, 14 de VACVs , 3 de CPXVs et 9 de MPXVs (accessibles en ligne sur www.poxvirus.org). Elles ont permis d'étudier les relations phylogéniques entre les différents virus (Gubser et al., 2004).

Les *Poxvirus* se répliquent dans le cytoplasme cellulaire. L'expression virale est régulée dans le temps tout au long du cycle de réplication qui commence par l'entrée du virus dans la cellule hôte. L'attachement du virus à la cellule hôte est réalisé par l'interaction de trois protéines virales (A27L, H3L et D8L) avec les glycosaminoglycanes cellulaires (Chung et al., 1998 ; Hsiao, Chung, et Chang, 1999 ; Lin et al., 2000). Deux mécanismes d'entrée dans la cellule ont été décrits, d'une part une fusion de la membrane externe avec la membrane cytoplasmique dans un contexte de pH neutre (Carter et al., 2005), et d'autre part, une endocytose suivie de la fusion dépendante d'un faible pH, avec la membrane de l'endosome (Townsend et al., 2006). La fusion est régulée par deux protéines virales, A56R et K2L (Law et Smith, 1992 ; Turner et Moyer, 1992 ; Zhou et al.,

1992), qui interagissent avec un complexe d'entrée et de fusion constitué des 8 protéines virales, A16L, A21L, A28L, H2R, L5R, G9R, G3L et J5L (Senkevich, Ward, et Moss, 2004). Dans les deux cas, il y a libération dans le cytoplasme, du « core » viral contenant le génome, étape que l'on nomme la décapsidation. Après la décapsidation (20 minutes post-infection (p.i.)), les ARNm viraux précoces codant l'ADN polymérase, l'ARN polymérase et les facteurs de transcription viraux sont transcrits et traduits dans une structure granulaire contenant des facteurs de transcription et des polyribosomes de la cellule hôte (**Figure 4**). La synthèse de ces enzymes virales permet alors la réplication de l'ADN viral et la transcription des ARNm intermédiaires codant les facteurs de virulence. Il y a ensuite transcription des ARNm tardifs codant les protéines de structure, les enzymes virales tardives et les facteurs de transcription dits précoces, qui seront « enveloppés » avec la particule virale naissante. La morphogenèse des nouveaux virions a lieu dans une région cytoplasmique dénuée de ribosomes et d'organelles, appelée le « virosome » ou « usine virale », et débute par la formation d'une double couche lipidique présentant à sa surface les protéines virales membranaires (**Figure 5**) (Smith et Law, 2004). Une fois fermée, cette membrane forme la membrane externe du virion immature (IV) (cinq à six heures p.i.). Le clivage de plusieurs protéines capsulaires et l'association au « core » viral sont à l'origine de la transformation des IVs en virions matures intracellulaires (IMVs). Ces derniers, constitués d'une centaine de protéines virales, sont infectieux et relargués soit par cytolysse, soit par bourgeonnement, acquérant une enveloppe supplémentaire pour être libérés sous forme de virions enveloppés extracellulaires (EEVs). Une faible proportion des IMVs acquiert une double membrane lipoprotéique supplémentaire provenant de l'appareil trans-golgi ou d'endosomes primaires. Les virions enveloppés intracellulaires (IEVs) ainsi formés se dirigent alors en direction de la surface cellulaire le long des microtubules et sont propulsés vers la membrane cytoplasmique suite à la formation d'une queue constituée de filaments d'actine. Les IEVs fusionnent avec la membrane cytoplasmique et sont libérés sous forme d'EEVs selon un processus d'exocytose. Certains de ces EEVs peuvent adhérer à la membrane cytoplasmique et devenir des virions enveloppés associés à la cellule (CEVs). Trois formes virales sont responsables de la dissémination virale : les IMVs, les EEVs et les CEVs. Les quantités de chacune de ces formes varient d'une souche à une autre (Meiser et al., 2003 ; Spehner et al., 2000). Les IMVs sont responsables de la dissémination d'un individu à un autre car ils

sont très résistants dans le milieu extérieur, stables à température ambiante et conservent leur pouvoir infectieux même après dessiccation ou une fois enchâssés avec le fibrinogène au sein des croûtes issues de la maturation des pustules. Les EEVs et les CEVs sont responsables de la dissémination au sein de l'organisme infecté. Les EEVs permettent une dissémination à longue portée vers les organes par leur passage dans le sang, alors que les CEVs assurent une dissémination directe dans le tissu par passage de cellule hôte à cellule hôte adjacente (Smith, Vanderplasschen, et Law, 2002).

1.2 La variole

1.2.1 La variole à travers l'Histoire

La variole est l'une des maladies les plus dévastatrices qu'ait connue l'humanité. Pendant des siècles, les épidémies à répétition ont déferlé sur les continents, décimant les populations et changeant le cours de l'histoire.

Les origines de la variole sont inconnues et les documents anciens s'y référant sont peu fiables. La plus ancienne trace de présence de variole concerne des momies égyptiennes datant de 3000 ans avant J-C. De là, il semble que la variole se soit propagée en Inde par voie terrestre ou maritime, où elle aurait persisté pendant plus de 2000 ans. C'est au I^{er} siècle après J-C que cette maladie endémique a été introduite en Chine par le Sud-Ouest où elle a sévit dans la population locale jusqu'au VI^e siècle, date à laquelle le Japon a été touché. Dans l'Ouest, la variole s'est manifestée périodiquement en Europe avant de définitivement s'établir lors de l'augmentation de la population et des nombreux déplacements dus aux croisades vers l'an 600. Ainsi, au fur et à mesure de l'augmentation de la taille des populations en Inde, en Chine et en Europe, la variole s'est installée dans les villes où elle a atteint principalement les enfants avec des épidémies périodiques tuant jusqu'à 30 % des personnes infectées. Au XVI^e siècle, elle est devenue une très importante cause de morbidité et de mortalité en Europe, en Asie du Sud-Ouest, en Inde et en Chine. Le nombre de jeunes enfants tués par la variole a été tel que la coutume

interdisait de donner un nom au nouveau-né jusqu'à ce qu'il ait contracté et survécu à la maladie.

Au cours des vagues successives d'exploration et de colonisation, la variole s'est propagée depuis l'Europe aux autres continents. En 1507, la variole a été introduite dans les Iles Caraïbes puis en 1520 à Mexico. Elle a fortement touché les populations locales et a été un facteur important lors de la conquête des territoires aztèques et des incas par les hispaniques. L'Amérique du Nord a, quant à elle, été touchée un siècle plus tard. Au XVII^e siècle, la variole tuait encore plus de 10 % de la population mondiale. Au milieu du XVIII^e siècle, la variole était une maladie endémique présente partout dans le monde, exceptée en Australie et sur quelques petites îles, où seuls des cas sporadiques ont été rapportés en 1789 et 1829.

Au cours du XVIII^e siècle, la variole a causé la mort de personnages importants tels que la Reine Mary II d'Angleterre, l'Empereur Joseph 1^{er} d'Autriche, le roi Louis 1^{er} d'Espagne, le Tsar Pierre II de Russie, la reine Ulrika Elenora de Suède et le roi Louis XV de France. Ceci a fortement influencé les royautés à promouvoir la variolisation, consistant à l'inoculation par voie nasale du VARV chez les sujets sains. Cette pratique a en effet permis la diminution de la mortalité en Grande-Bretagne, aux Pays-Bas et en Suisse, mais elle est restée très impopulaire en France, en Italie, en Espagne et en Suède. C'est à cette époque que le VARV a été utilisé pour la première fois comme arme biologique. Lors de la guerre franco-anglaise en Amérique du Nord (1754-1767), Sir Jeffrey Amherst fit distribuer aux tribus indiennes ennemies des couvertures infestées de VARV. Non immunisés contre cette maladie encore inconnue en Amérique du Nord, les indiens furent sévèrement touchés par l'épidémie qui fit des ravages considérables dans leurs rangs.

En 1796, tandis que l'Europe, durement frappée, connaissait plus de 400000 décès, Jenner découvrait que l'inoculation du CPXV par scarification protégeait contre cette maladie. Avec la publication de sa découverte, Jenner a été à l'origine de campagnes de vaccination organisées par les pays européens, contrairement à la variolisation. Ainsi, l'incidence de la variole diminuait fortement et restait à un faible niveau durant les premières décades du XIX^e siècle. Néanmoins deux pandémies apparaissaient entre 1824-1829 et 1837-1840 touchant quasiment toute l'Europe. Certaines explications ont été

avancées pour expliquer cette résurgence : tout d'abord, avec la baisse de l'incidence de la variole, l'enthousiasme pour la vaccination avait fortement diminué ; de plus, la pratique de la vaccination « unique » n'induisait pas de protection au long cours. Ce dernier problème a effectivement été mis en évidence lors d'un rappel de vaccination mis en place en Allemagne en 1829 et la revaccination a été étendue à la population civile en 1858. Par la suite, la guerre franco-russe de 1870-1871 a été associée à une forte résurgence de la variole. D'un côté, l'armée russe, constituée de 800000 hommes recevant un rappel de vaccination tous les 7 ans, a supporté seulement 8463 pertes dues à la variole avec un taux de décès de 5,4 %. De l'autre, l'armée française qui n'était plus protégée a supporté 125000 cas avec une mortalité de 18,7 %. Dans le même temps, la variole a disséminé depuis les pays belligérants au reste de l'Europe, entraînant au moins un demi million de morts. Suite à cette dissémination, une législation a été mise en place dans de nombreux pays européens, obligeant la population à se faire vacciner et à recevoir un rappel, même si de violents mouvements anti-vaccination ont eu lieu, s'appuyant sur le fait que l'obligation de vaccination était contraire aux libertés individuelles. A l'aube du XX^e siècle, la variole était toujours endémique dans de nombreux pays européens et l'amélioration de la qualité et des méthodes de production du vaccin antivariolique ainsi que la mise en place d'une infrastructure de santé publique, étaient devenues des priorités. Ensuite, l'autorisation d'utilisation d'un vaccin glycérimé, ainsi que l'intensification de la vaccination et de ses rappels, ont conduit à un fort déclin de la variole dans la plupart des pays européens. En France, en 1920, au sein d'une population de 39 millions d'habitants, 392 cas de variole ont été dénombrés et 5 cas en 1937. En 1955, alors qu'elle comptait 42 millions d'habitants, la France a connu son dernier cas de variole en Bretagne. En mai 1959, lors de sa 12^{ème} assemblée, l'OMS a décidé la mise en place d'un programme d'éradication globale de la variole. En 1967, la campagne s'est intensifiée, avec en 1972 le dernier cas européen diagnostiqué en Yougoslavie. Le dernier cas naturel a été diagnostiqué en Somalie en 1978. Finalement, lors de sa 33^{ème} assemblée en 1980, l'OMS a déclaré solennellement « que le monde et tous ses habitants avaient gagné leur liberté contre la variole ».

1.2.2 Réémergence et menace terroriste

Les attentats du 11 septembre 2001 à New-York, Etats-Unis, et la découverte dans les jours qui ont suivi, de la présence d'anthrax dans des courriers postaux, ont fait craindre une évolution vers un nouveau type de terrorisme : le bioterrorisme. En effet, l'arme biologique a un rapport efficacité / coût particulièrement attractif. D'après le rapport de mission du Pr. D. Raoult (Raoult, 2003), il a été évalué que pour tuer 50 % des habitants d'une surface d'un kilomètre carré, il en coûtait deux milles dollars avec les armes traditionnelles, huit cents dollars avec l'arme nucléaire et seulement un dollar avec une arme biologique. Contrairement aux autres types d'agents terroristes (de nature explosive, nucléaire ou chimique), le risque biologique pose, en plus des problèmes d'organisation de la sécurité et des secours et de mise en place des traitements, un problème majeur de diagnostic étiologique. En effet, il est nécessaire d'identifier l'agent en cause, d'imputer sa présence à une action criminelle et d'évaluer la sensibilité de l'agent aux traitements anti-infectieux ou anti-viraux (en particulier pour les pathogènes susceptibles d'être modifiés génétiquement). De plus, il est indispensable de mettre en place une stratégie d'isolement des patients infectés ou suspectés de l'être dans les cas de pathogènes contagieux (tels que la peste et la variole). Par ailleurs, la phase d'incubation de la maladie, correspondant au temps entre l'exposition d'un individu et l'apparition des premiers symptômes, potentialise le risque biologique, ralentissant d'une part, considérablement l'établissement du diagnostic et favorisant d'autre part, la propagation de l'infection au sein de la population.

Le virus de la variole est classé par le Center for Diseases Control (CDC) dans la catégorie A des agents potentiellement utilisables dans un contexte de bioterrorisme, laquelle regroupe des agents responsables d'une mortalité élevée et posant des problèmes majeurs de dissémination et de transmission entre individus. Depuis son éradication en 1980, seuls deux centres de recherches ont été autorisés par l'OMS, à conserver et à réaliser des recherches avec ce virus: les laboratoires CDC à Atlanta, Etats-Unis et du centre VECTOR de Koltsovo à Novosibirsk, Russie.

Le VARV est le chef de file des agents viraux militarisables pour les raisons suivantes (Mahy, 2003) : ce virus est stable dans l'environnement et est fortement transmissible par voie aérienne d'une personne à une autre ; l'immunité de la population mondiale est faible suite à l'arrêt de la vaccination ; une forte morbidité et un taux de mortalité proche de 30 % ; un diagnostic différentiel avec la varicelle délicat ; enfin, l'absence de traitement spécifique disponible ; sans négliger les effets inhérents de désorganisation socio-économique et de « panique ».

Par ailleurs la découverte d'un programme soviétique secret de militarisation de la variole fait craindre depuis l'effondrement du bloc soviétique, la mise à disposition d'une souche virulente à des pays « potentiellement proliférants » ou à des groupes terroristes (Alibek, 1999 ; Orent, 1998). Dans un scénario réalisé aux Etats-Unis, un délai de quinze jours pour le premier diagnostic est considéré comme optimiste (O'Toole, 1999). En moins de deux mois, 15000 à 20000 personnes seraient infectées en fonction de l'importance de l'attaque et de la qualité des mesures de quarantaine instituées. Avec cent personnes initialement contaminées, il faudrait plus d'un an et plus de neuf millions de doses de vaccin pour stopper une épidémie de 4200 cas. De même à l'occasion de l'exercice fictif « Dark Winter », où 3000 personnes étaient contaminées un 1^{er} décembre lors de trois attaques simultanées dans des centres commerciaux de trois villes des Etats-Unis, le 22 décembre, 16000 cas étaient rapportés, et le 6 février suivant, on dénombrait trois millions de cas et un million de décès (O'Toole, Mair, et Inglesby, 2002). De plus, les craintes sont renforcées par les possibilités de manipulations génétiques sur le virus. Un exemple en a été récemment donné par une équipe australienne travaillant sur un poxvirus de souris (Jackson et al., 2001). Dans un but de contrôle des populations murines par un vaccin contraceptif, un gène codant pour une protéine embryonnaire de souris a été introduit dans le génome d'un *Poxvirus* recombinant, ainsi que le gène de l'interleukine 4 dans un but d'amélioration de la réponse immune. Le virus recombinant ainsi obtenu s'est montré particulièrement létal, décimant toutes les souris infectées, y compris celles préalablement vaccinées.

Plusieurs scénarios d'utilisation bioterroriste de la variole ont été imaginés, que ce soit le « vecteur humain kamikase » volontairement infecté, empruntant les transports en

commun d'une grande ville, ou la diffusion d'un aérosol du virus dans le système d'aération d'un bâtiment, ou encore la dispersion par un nébuliseur portable d'un aérosol contaminé dans un terminal d'aéroport ou un hall de gare (Bozzette et al., 2003). Le « Plan national de réponse à une menace variole » (MSJS, 2003b) prévoit et détermine les mesures pratiques qui seraient mises en œuvre face à la réapparition de cette maladie, ou qui sont d'ores et déjà prises en prévision d'une réapparition. Il s'agit des mesures de prévention, de renforcement de surveillance, d'élaboration d'un diagnostic rapide et fiable, et de la constitution de stocks de vaccins et du matériel nécessaire à la vaccination de la population française. Cinq niveaux d'alerte ont été définis, correspondant à une stratégie graduée, dite en « anneaux ».

Ainsi la première maladie infectieuse complètement éradiquée grâce à la vaccination, est redevenue une menace potentielle pour l'humanité (Henderson, 1999).

1.2.3 La clinique

En absence d'immunité induite par la vaccination, l'être humain semble universellement sensible au virus de la variole. Il n'existe aucun réservoir animal et les insectes ne jouent aucun rôle dans la transmission de cette maladie. Le virus pénètre dans l'organisme par voie respiratoire. La transmission se fait essentiellement par contact direct avec le malade à partir des gouttelettes émises depuis le rhinopharynx lors de la toux ou de l'éternuement. La contagiosité à partir des lésions cutanées est également possible soit suite à une aérosolisation de particules virales présentes sur les vêtements ou la literie, soit par contact direct, comme dans les cas rapportés de transmission du virus de la vaccine à l'entourage de personnes vaccinées (CDC, 2007a ; CDC, 2007b). La dernière possibilité consiste en une transmission directe par les mains ou des objets contaminés avec de la salive ou des sécrétions nasales infectées.

La variole se manifestait sous différentes formes cliniques (Rao et al., 1972) :

- La variole ordinaire (*ordinary type*), avec des lésions pustulaires, regroupait trois sous-types : la forme confluente (rash confluent sur tout le corps), la forme semi-confluente

(rash confluent sur le visage mais discret sur le reste du corps), et la forme discrète (présence de surfaces de peau intactes entre les pustules, même sur le visage) (**Figure 6**).

- La variole modifiée (*modified type*) qui ressemblait à la forme ordinaire mais qui a une évolution plus rapide.
- La variole sans éruption (*variola sine eruption*) où seule la fièvre est présente, nécessitant un diagnostic sérologique. Elle se manifestait principalement chez les individus vaccinés.
- La variole maligne (*flat type*), presque invariablement létale (taux de létalité de 97 %), se manifestait brutalement avec des lésions confluentes qui restaient molles et plates, contrairement aux pustules classiques qui devenaient dures et ombiliquées.
- La variole hémorragique (*hemorrhagic type*) engendrait des hémorragies de la peau et des muqueuses. Le sous-type rapide avec un rash purpurique était toujours fatal, contrairement au sous-type tardif avec des pustules hémorragiques. Cette forme représentait moins de 3 % des cas et était plus fréquente chez la femme enceinte.

D'un point de vue clinique, une période d'incubation de douze jours en moyenne suit l'infection. Pendant cette période, la personne contaminée apparaît en bonne santé et n'est pas contagieuse. En fait, le virus se réplique activement dans les cellules des muqueuses respiratoires et les ganglions thoraciques puis dissémine à travers le corps vers le foie, la rate, la moelle osseuse et les ganglions, en même temps que les réponses immunitaires cellulaires se mettent en place. Une seconde virémie a lieu vers le 8^{ème} jour à partir des nodules lymphatiques. A la fin de l'incubation, le virus intraleucocytaire envahit les vaisseaux capillaires du derme et de l'oropharynx. Les premiers symptômes apparaissent vers le 13^{ème} ou 14^{ème} jour et sont de type grippal à début brutal, avec de la fièvre associée de manière variable à des malaises, une prostration, des céphalées, des douleurs dorsales, des frissons, des vomissements, des diarrhées et des douleurs abdominales. La forte fièvre maintient en général le patient alité, et contribue ainsi à limiter la dissémination inter-humaine. Quelques jours plus tard (deux à quatre jours) la température chute et le patient se sent un peu mieux, alors que l'éruption cutanée apparaît (**Figure 7**).

En premier lieu, des lésions se développent sur les muqueuses buccales, oropharyngées et sur la langue, correspondant à la phase d'énanthème. Ces lésions

s'ulcèrent très rapidement, laissant place à de petites érosions limitées et permettant la dissémination du virus dans la bouche et la gorge. Ceci conduit à des symptômes au niveau des voies respiratoires supérieures tels que la toux, des troubles de la phonation et des expectorations. Le virus est alors présent dans les sécrétions oropharyngées et le patient peut contaminer des personnes par aérosolisation.

Ensuite, l'éruption cutanée caractéristique correspondant à la phase d'exanthème, apparaît tout d'abord sur le visage, les mains et les avant-bras, puis quelques jours plus tard sur le tronc, les pieds et les jambes. Cette distribution centrifuge des lésions peut conduire à une suspicion de variole plutôt que de varicelle pour un œil médical exercé. L'éruption cutanée évolue en une seule poussée : généralement, le rash apparaît sur toutes les parties du corps en vingt-quatre à quarante-huit heures après la phase d'incubation et des lésions supplémentaires peuvent survenir dans les deux ou trois jours qui suivent, après ce délai, il n'y a plus apparition de nouvelles lésions.

Entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour après le début de la fièvre, l'exanthème apparaît sous la forme d'un rash maculaire. Au 2^{ème} jour de l'éruption, les lésions font 2 à 3 millimètres de diamètre et sont enchâssées dans le derme, ce sont des papules. Ces dernières deviennent des vésicules entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour, en prenant un aspect de perle de verre, elles sont alors dures. Entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour, elles se transforment en pustules remplies d'un liquide trouble puis présentent une ombilication. Cette transformation est accompagnée d'une recrudescence de la fièvre. A partir du 11^{ème} jour, une dessiccation et une décrustation commencent et se poursuivent jusqu'au 30^{ème} jour, conduisant à la formation de cicatrices indélébiles chez 65 à 80 % des survivants (**Figure 8**).

La contagiosité s'étend de l'apparition de la fièvre à la chute des croûtes. Elle est maximale pendant les sept à vingt et un jours suivant l'éruption cutanée. A partir d'un premier cas d'infection, le nombre de cas secondaires est estimé à cinq, pouvant aller jusqu'à douze en fonction du terrain, des conditions socio-économiques, de la densité de la population.

Le taux de mortalité pour la variole a été estimé à 30 %. Cette mortalité est due à deux types de complications : le premier type est lié directement ou indirectement à la dissémination du virus dans l'organisme alors que le second est dû à une surinfection bactérienne relativement fréquente. De nombreux organes sont touchés: la peau, les yeux,

les articulations et les os, le système respiratoire, le système gastro-intestinal, ainsi que le système nerveux central (SNC) (Fenner et al., 1988). En absence de traitement antibiotique efficace, les lésions cutanées peuvent être infectées secondairement par une bactérie. Ceci peut conduire à une dermatite septique qui peut être fatale. Chez les patients qui n'ont pas succombé à la maladie, les séquelles consécutives à la variole sont par ordre de fréquence décroissante : les cicatrices, la cécité et des déformations des membres (Fenner et al., 1988).

1.2.4 Le diagnostic

Le diagnostic clinique de la variole repose essentiellement sur sa différenciation avec la varicelle. Effectivement, elle peut souvent être confondue avec la varicelle dont les lésions sont plus superficielles, plus petites et prédominantes sur le tronc (distribution centripète) plutôt que sur la face et les extrémités (distribution centrifuge) (**Figure 9**). De plus, dans les cas de varicelle, la fièvre est contemporaine de l'éruption dont l'évolution est rapide avec des poussées successives conduisant à des lésions à différents stades dans une même zone du corps. Dans les cas de variole, la fièvre et les prodromes précèdent de quelques jours l'éruption unique, qui évolue lentement, avec des lésions au même stade dans une même zone corporelle et dont l'évolution est lente.

A côté du diagnostic clinique, une confirmation en laboratoire est indispensable. Les prélèvements sont réalisés sur le plancher des pustules effondrées et sur le pharynx. Un diagnostic présomptif peut être réalisé par anatomo-pathologie en visualisant les corps éosinophiliques de Guarnieri à partir de frottis de lésions ou de biopsies. Il est possible d'identifier les particules virales en microscopie électronique, mais sans différenciation d'espèce. La distinction d'espèce était traditionnellement faite par inoculation de la membrane chorio-allantoïde de l'œuf de poule embryonné. L'aspect morphologique des lésions de la membrane chorio-allantoïde obtenues après quarante-huit heures donnait une indication de diagnostic positif autant que différentiel. Par ailleurs, la mise en culture sur cellules (Vero, MRC-5, BHK-21...) ne pose pas de problème technique particulier mais soulève de nombreux problèmes réglementaires puisque seuls deux laboratoires sont

autorisés à détenir et cultiver ce virus. Cependant en cas de suspicion avérée de variole, les laboratoires de type P4, voire P3, seraient autorisés par décret à réaliser ce type de technique.

Actuellement, la technique d'identification du VARV la plus rapide et la plus adaptée repose sur une analyse en biologie moléculaire. La difficulté est d'obtenir une identification d'espèce car les séquences nucléotidiques sont très conservées dans les zones amplifiables au sein des OPVs. Au laboratoire, une méthode de consensus de genre utilisant une technologie de PCR en temps réel (Taqman®), ciblant la protéine de fusion A27L, a été développée et diffusée aux différents laboratoires de virologie des hôpitaux civils et militaires du réseau « Biotox » (Scaramozzino et al., 2007). Cette technique quantitative permet un diagnostic du genre *Orthopoxvirus*, puis la distinction entre le VARV et les autres OPVs pathogènes chez l'homme.

1.2.5 Les traitements

A ce jour, aucun traitement n'a fait la preuve de son efficacité contre la variole chez l'homme. La méthisazone, de la famille des dérivés thiosemicarbazone, fût la première molécule antivirale à avoir été utilisée (Bauer, 1965 ; Driscoll, 2002). Son mode d'action est le blocage de la synthèse protéique durant la phase tardive de la maturation du virion (De Clercq, 2001). Malgré sa toxicité par administration systémique, elle a été utilisée pour traiter des cas d'*eczéma vaccinatorum* et de vaccine progressive.

Quelques molécules disposant d'AMM pour le traitement d'autres pathologies virales se sont révélées capables d'inhiber *in vitro* la réplication des *Poxvirus* (De Clercq, 2001). Parmi ces molécules, on peut citer :

La ribavirine, un inhibiteur enzymatique de l'IMP déshydrogénase, ce qui lui confère une activité antivirale à large spectre. Ainsi, elle inhibe la réplication de tous les OPVs (Baker, Bray, et Huggins, 2003), et se montre active sur un modèle lapin de kératite vaccinale (Sidwell et al., 1973). Néanmoins, elle n'est pas efficace contre les complications neurologiques car elle ne traverse pas la BHE.

Le cidofovir (HPMPC), un analogue de la cytosine. Il est encore plus efficace que la ribavirine contre les OPVs, mais présente une importante toxicité rénale lorsqu'il est

administré par voie intraveineuse. Actuellement, cette molécule possède uniquement une AMM pour le traitement de la rétinite à cytomégalovirus chez les patients atteints de SIDA. Son administration est accompagnée par celle de probénécide et demande une bonne hydratation pour diminuer la toxicité rénale. Chez la souris, une seule injection intraveineuse, réalisée jusqu'à quatre jours après infection intranasale par le CPXV, protège 90 % des animaux (Bray et al., 2000). Des résultats encourageants ont également été obtenus chez le modèle primate infecté par le MPXV (Stittelaar et al., 2006). Une autre étude, réalisée sur un modèle *eczema vaccinatum* cynomolgus, consistant à observer l'effet de l'administration de cidofovir et / ou d'immunoglobulines anti-vaccin (VIG), a montré que les deux thérapeutiques sont efficaces si elles sont administrées de façon concomitantes à l'infection (Crance Jean-Marc et Garin Daniel, communication personnelle). De plus, elles pourraient avoir une action synergique puisque le cidofovir a une action rapide pendant les cinq jours p.i., alors que les VIG sont actives plus tardivement et neutralisent la virémie à huit jours p.i. A ce jour, de nouvelles formes moins invasives et moins toxiques du composé sont en cours de développement : une forme orale (Kern et al., 2002) et une forme aérosol (Roy et al., 2003), même si des souches virales résistantes au cidofovir ont déjà été isolées (Smee et al., 2002).

Concernant les immuno-modulateurs, d'anciennes études ont montré que l'interféron est efficace sur les kératites vaccinales (Jones, Galbraith, et Al-Hussaini, 1962). Plus récemment, des essais réalisés avec un groupe de molécules de faible poids moléculaire, les imidazoquinolinamines (Stanley, 2002), montrent une activité antivirale *via* une éventuelle stimulation de la réponse immune innée.

Pour le traitement des complications infectieuses cutanées, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSaPS) a établi des recommandations d'utilisation des traitements antibiotiques. Pour les formes non sévères, elle préconise l'utilisation par voie orale de pristinamycine, d'oxacilline, de cloxacilline et d'amoxicilline/acide clavulanique. Pour les formes sévères, elle préconise l'utilisation de l'association par voie injectable de l'oxacilline et de la cloxacilline. Tous ces traitements devraient être administrés selon les schémas posologiques validés par l'autorisation de mise sur le marché (AMM). L'AFSSaPS rappelle également l'importance des soins locaux des lésions.

Aujourd'hui, de nombreuses autres molécules sont à l'étude. Les propriétés idéales recherchées pour une nouvelle drogue anti-*Poxvirus* sont : la conservation de l'activité lors d'une administration par voie orale, plus confortable que la voie intraveineuse ; une demi-vie intracellulaire relativement longue pour diminuer la fréquence de l'administration ; une bonne stabilité permettant une conservation au long court ; un faible coût de production et une innocuité même chez les enfants et les personnes immunodéprimées (Kern, 2003). Les principales molécules étudiées appartiennent à deux classes : les molécules inhibant la réplication virale et celles empêchant la dissémination systémique.

Les inhibiteurs de la réplication virale sont majoritairement des analogues nucléosidiques (De Clercq, 2001) ainsi que:

- les inhibiteurs de l'IMP deshydrogénase (dérivés de la ribavirine : FICAR, EICAR, tiazofurin, selenazole)
- les inhibiteurs de la SAH hydrolase (neplanocine et dérivés)
- les inhibiteurs de l'OMP décarboxylase et de la CTP synthetase (pyrazofurine et dérivés, carbodine et dérivés)
- les inhibiteurs de la thymidilate synthase (dérivés d'Urd 5-substitués)
- les analogues nucléosidiques ciblant la synthèse de l'ADN viral (vidarabine et dérivés de l'arabinoside, analogues de l'adénoside, S2242)
- les nucléosides phosphonates acycliques (dérivés de l'HPMPC ou cidofovir et de l'HPMPA ou adefovir).

Les molécules diminuant la dissémination virale en inhibant la production des formes virales EEV, ont été développées (Sliva et Schnierle, 2007). Le STI-571 ou Glivec inhibe la tyrosine kinase réalisant la phosphorylation de la protéine virale A36R permettant la formation de la queue d'actine (Yang et al., 2005). Deux autres molécules ont un effet similaire : U1026 et CI-1033. Le ST-246 quant à lui vise la protéine virale F13L (Yang et al., 2005). L'efficacité du ST-246 a été montré chez la souris et l'écureuil contre différents OPVs (Quenelle et al., 2007; Sbrana et al., 2007) et est maintenant testé en phase clinique. Cette molécule est la deuxième, avec le cidofovir, considérée comme pouvant être utilisée chez l'homme.

De plus, de nouvelles protéines virales ont été identifiées comme cibles potentielles :

- la topoisomérase virale H6R, inhibée par la novobiocine et la coumermycine (Bond, Reichert, et Stivers, 2006 ; Sekiguchi et al., 1996).
- les protéines B1R et F10L (protéines kinases 1 et 2 respectivement) car les protéines kinases sont en général de bonnes cibles antivirales.
- la thymidylate kinase (A48R) et la thymidine kinase (J2R), inhibées par des molécules utilisées dans le traitement des infections au virus Herpès (Kern, 2003).

Pour finir cette liste de cibles virales non exhaustive, on peut noter que la protéine H1L est essentielle à la réplication virale et qu'elle pourrait donc constituer une cible idéale (Liu, Lemon, et Traktman, 1995).

1.2.6 La vaccination

La vaccination reste le seul moyen de lutte efficace contre une réémergence de la maladie. D'après les observations faites lors de la campagne de vaccination, il semblerait que cette pratique protège de la variole même réalisée quatre jours après l'infection. La vaccination a néanmoins été arrêtée depuis 1980, date à laquelle l'éradication mondiale de la variole a été déclarée.

La vaccination se faisait auparavant par scarification à l'aide d'une aiguille, d'une lancette ou d'un petit couteau. Après dépôt du vaccin sur la peau, une égratignure d'environ cinq millimètres de long était faite. Aujourd'hui, elle est remplacée par la méthode de multi-puncture à l'aide d'une aiguille bifurquée qui consiste à prélever 1 μ L de vaccin avec l'aiguille et à réaliser plusieurs punctures avec cette aiguille sur la peau du sujet. Le site de vaccination le plus commun se situe sur le haut du bras, au niveau du muscle extenseur. Le but est d'introduire le virus dans la couche malpighienne de l'épiderme.

Les anticorps neutralisants (AcN) et l'immunité cellulaire sont détectables sept jours post-vaccination (Kennedy et al., 2004). Cette vaccination est très efficace dans la prévention de l'infection au VARV (95 % d'efficacité chez les personnes ayant développé une pustule Jennerienne), pour preuve, elle a permis l'éradication mondiale de la maladie.

En cas de reprise de la vaccination face à une menace, cette pratique sera contre-indiquée chez certains groupes de la population évalués à risques:

-
- les personnes atteintes d'affections cutanées risquant de développer un *eczema vaccinatum*:
 - eczéma ou dermatite atopique en évolution, antécédents d'eczéma ou de dermatite atopique
 - toxidermie grave (maladie de Lyell, syndrome de Stevens-Johnson), allergie connue à un des composés du vaccin (vert brillant, phénol, érythromycine)
 - psoriasis étendu en poussée, antécédent de psoriasis étendu quelle qu'en soit l'ancienneté
 - autres dermatoses potentiellement érythrodermiques en poussée : maladie de Darier, pityriasis rubra pilaire, pemphigus foliacé, lichen plan bulleux ; antécédents de ces maladies
 - contre-indications temporaires (vaccination possible après résolution de l'affection et en dehors de la zone lésée) : brûlures, impétigo, varicelle, zona, herpès, acné sévère, pyodermite, psoriasis, incision chirurgicale non cicatrisée, pathologie oculaire (conjonctivale et cornéenne) entraînant des lésions prurigineuses ou une inflammation.
 - les personnes atteintes de déficits immunitaires congénitaux ou acquis, de maladies du système immunitaire risquant de développer une vaccine généralisée dû au caractère répliatif du vaccin :
 - sujets séropositifs pour le VIH, patients atteints du SIDA
 - agammaglobulinémie
 - hypogammaglobulinémie
 - autres déficits immunitaires non iatrogènes
 - granulomatose septique chronique
 - antécédent de maladie de Hodgkin
 - maladies auto-immunes
 - les personnes atteintes d'affections malignes évolutives
 - lymphome
 - leucémie
 - toute affection maligne localisée ou généralisée
 - les personnes recevant des traitements susceptibles d'avoir un effet immunosuppresseur

-
- corticothérapie par voie systémique (orale ou parentérale), à dose élevée (> 1,5 mg/kg/jour) pendant plus de deux mois ou quelle que soit la dose pendant plus de six mois
 - anti-néoplasiques (agents alkylants, anti-métabolites, alcaloïdes, antibiotiques cytotoxiques...)
 - immunomodulateurs (cyclosporine, tacrolimus, mycophénolate...)
 - transplantation d'organes
 - transplantation médullaire datant de moins d'un an ou réaction du greffon contre l'hôte
- les personnes atteintes de maladies du SNC
 - maladies neurodégénératives
 - maladies infectieuses
 - maladies tumorales évolutives
 - les femmes enceintes par risque de transmission fœtale
 - les enfants de moins d'un an, particulièrement susceptibles de développer une encéphalite post-vaccinale
 - les personnes atteintes d'une maladie infectieuse aiguë en cours
 - les personnes atteintes de maladies cardiovasculaires, ischémie ou antécédents de myopéricardite, suite à la récente observation de myopéricardites post-vaccinales lors d'essais cliniques de nouveaux vaccins (Cassimatis et al., 2004 ; Halsell et al., 2003).

1.3 Les autres *Orthopoxvirus* infectant l'homme

Parmi les OPVs, quatre peuvent infecter l'homme, dont trois sont à l'origine de zoonoses. Le VARV, à l'origine de la variole, est un pathogène strictement humain, alors que le CPXV, le MPXV et le VACV ont des hôtes primaires non humains mais sont transmissibles à l'homme suite à un contact entre ce dernier et un animal infecté (hôte primaire ou intermédiaire).

1.3.1 Infection par le virus du monkeypox

Le MPXV sévit principalement en Afrique Centrale et en République Démocratique du Congo. Cependant, c'est à Copenhague au Danemark en 1958, que le MPXV a été identifié, suite à l'observation de singes en captivité, comme étant l'agent étiologique d'une maladie semblable à la variole. Le virus se propage naturellement au sein des populations d'écureuils, de rongeurs et de singes, au contact desquels l'homme peut être contaminé. En effet, la transmission inter-humaine est peu importante (9 % de cas secondaires relevés au cours de l'épidémie de 1996-1997). Néanmoins, cette zoonose est la poxvirose la plus préoccupante depuis l'éradication de la variole. En 1970, le premier cas humain d'infection par le MPXV a été décrit dans la région équatoriale de la République Démocratique du Congo, neuf mois après l'éradication de la variole dans ce pays. Jusqu'en 1979, une cinquantaine de cas ont été recensés, et en mai 2003, est apparue la première épidémie, hors Afrique équatoriale, aux Etats-Unis. Les manifestations cliniques d'une infection à MPXV sont similaires à celles de la variole : éruption pustuleuse, fièvre, symptômes respiratoires avec une issue fatale dans certains cas. Une différence clinique importante entre les deux pathologies est la présence d'une adénopathie prononcée chez une majorité de patients atteints par le MPXV. L'infection par le MPXV est considérée comme une zoonose émergente et l'importation d'espèces exotiques, telles que les rongeurs en provenance d'Afrique, pose un problème de santé publique majeur.

1.3.2 Infection par le virus du cowpox

Le CPXV, dont l'hôte primaire est un rongeur, peut infecter les bovins, les chats et occasionnellement l'homme. Il a été isolé pour la première fois par Edward Jenner au XVIII^e siècle. Le CPXV est présent dans quelques pays européens et de l'Asie de l'Ouest, où les hommes sont le plus souvent contaminés par un hôte intermédiaire, en particulier le chat domestique, malgré une transmission féline *a priori* rare (Vestey, Yirrell, et Norval, 1991). Par ailleurs, l'infection humaine est rare, souvent réduite à quelques pustules mais relativement sévère. D'un point de vue clinique, après une période d'incubation d'environ

sept jours, des papules douloureuses apparaissent puis se transforment en vésicules puis en pustules ombiliquées peu nécrotiques mais hémorragiques. Les lésions sont majoritairement présentes sur les mains et le visage, et disparaissent après trois à douze semaines. L'adénopathie est courante alors que la fièvre et les syndromes pseudo-grippaux sont rarement associés. Le diagnostic moléculaire permet de distinguer le CPXV des *Parapoxvirus*, avec lesquels le diagnostic clinique peut être confondu.

1.3.3 Infection par le virus de la vaccine

Le VACV a été utilisé pour la vaccination antivariolique pendant près de deux cents ans mais son origine reste inconnue (Gubser et al., 2004). En effet, en 1796, Edward Jenner a récupéré de la pulpe vaccinale sur une vache certainement atteinte d'une infection par le CPXV ; or au cours des années de pratique vaccinale, il s'est avéré que le virus inoculé n'était plus le CPXV mais le VACV. Différentes hypothèses suggèrent que le VACV pourrait dériver du CPXV ou provenir d'un *Poxvirus* équin, cependant ces hypothèses n'ont pas été validées. Ce virus est maintenant considéré comme un virus de laboratoire qui n'aurait pas de réservoir naturel. Le VACV peut infecter de nombreux vertébrés et l'infection humaine n'est que rarement observée en cas de complications post-vaccinales, de transmission accidentelle d'un individu vacciné récemment à un sujet non vacciné ou d'accident de laboratoire. Néanmoins, plusieurs épidémies de vaccine ont été recensées au Brésil depuis 1999 (Damaso et al., 2000 ; Leite et al., 2005 ; Trindade et al., 2006). Les symptômes cliniques sont ceux consécutifs à une vaccination antivariolique avec un vaccin de première génération et les complications consécutives à cette infection sont diverses comme nous le verrons dans le paragraphe traitant des vaccins antivarioliques de première génération (*se conférer à la page 39*).

1.3.4 Traitements et vaccination

Parmi les moyens thérapeutiques pour traiter ces zoonoses, seule l'utilisation du cidofovir (nucleoside phosphonate acyclic inhibant l'ADN polymérase virale) est envisagée. Cette molécule a une AMM pour le traitement de la rétinite à cytomegalovirus

chez les patients atteints de SIDA. Cette molécule a été testée chez l'homme uniquement sur les poxviroses dues au virus « orf » (*Parapoxvirus*) et au virus du *molluscum contagiosum* (*Molluscipoxvirus*) (Smee et Sidwell, 2003). Elle a montré une activité antivirale sur le MPXV *in vitro* et sur modèle primate (Zaucha et al., 2001). Par ailleurs, grâce à l'importante similarité antigénique entre les OPVs, l'injection de VIG est également envisagée. Bien que l'efficacité des VIG chez l'homme n'a jamais été scientifiquement démontrée, leur action est tout de même considérée comme bénéfique par la grande majorité des experts. En outre, leur effet prophylactique sur les complications post-vaccinales semble évident.

Le pourcentage de similarité entre les zones génomiques centrales des différents *Orthopoxvirus* étant très élevé (>90 %), la vaccination antivariolique offre une protection croisée avec les virus responsables de ces zoonoses (85 % de protection contre le MPXV) (Fine et al., 1988). Néanmoins, la contamination inter-humaine étant faible, la poursuite de la vaccination anti-variologique en prévention des infections humaines aux *Orthopoxvirus* ne se trouvait pas justifiée. Elle reste aujourd'hui simplement recommandée en pré-exposition pour les personnes travaillant sur le MPXV ou le personnel soignant en contact avec des patients infectés par le MPXV ; en post-exposition, elle est recommandée dans les cas d'infection au MPXV et au CPXV. Elle n'est bien évidemment d'aucun intérêt dans les cas d'infection par le VACV.

2. Les vaccins antivarioliques de première génération

Historiquement, la pratique de la vaccination a été découverte par Edward Jenner, qui au milieu du XVIII^e siècle, apprend en discutant avec ses patients, que les valets et les fermières dont les mains gardent des cicatrices d'une maladie transmise par le pis des vaches, ne contractent pas la variole ou présentent des formes peu sévères. Cette observation le poussa à s'intéresser à la variole et dès 1775, E. Jenner commença ses recherches sur le CPXV. Ainsi le 14 mai 1796, Jenner pratiqua la première vaccination contre la variole. Il inocula du pus prélevé dans une pustule contenant du CPXV sur la main d'une paysanne contaminée, Sarah Nelmes, à un garçon de huit ans, James Philips, qui n'avait jamais été en contact avec la variole. Au dixième jour l'enfant présenta une

pustule vaccinale au point d'inoculation, qui guérit sans incident. Au 1^{er} juillet de la même année, E. Jenner lui fit subir une variolisation par plusieurs piqûres, qui n'eut aucun effet après un délai d'observation de deux ans (Jenner, 1801). E. Jenner renouvela l'expérience une trentaine de fois par inoculation de la pulpe vaccinale à l'homme ou directement « de bras en bras » et publia ses résultats, en juin 1798 sous le titre d'*Enquête sur les causes et effets de la Variole-Vaccine, maladie découverte dans certains comtés occidentaux de l'Angleterre, notamment dans le Gloucestershire, et connue sous le nom de cowpox*. E. Jenner avait prédit que « la disparition de la variole, le plus épouvantable fléau de l'espèce humaine, serait le résultat final de cette pratique ». Trois quarts de siècle plus tard, Louis Pasteur prit comme point de départ les travaux de Jenner pour établir le principe de vaccination préventive, qui doit d'ailleurs son nom à la vaccine (du latin *vacca* : la vache). Le CPXV fut ensuite remplacé par le VACV, virus très proche, d'origine toujours inconnue malgré plusieurs hypothèses : il pourrait dériver du VARV, du CPXV, du HSPV ou bien être le résultat d'une hybridation entre eux, mais aucune de ces hypothèses n'a été confirmée.

2.1 Les différentes souches

Le vaccin de première génération est un vaccin vivant qui a été produit jusqu'en 1980. Depuis sa découverte par E. Jenner, il a été entretenu et multiplié dans des conditions très diverses selon chaque pays. Pour des raisons historiques, le veau fut le premier animal utilisé (**Figure 10**) (Fenner et al., 1988), puis, durant la première guerre mondiale, la chèvre fut utilisée, ainsi que le mouton, le lapin, etc... Il en résulta une grande diversité de souches présentant des pouvoirs pathogènes variables.

Une revue faite en 1968 par l'OMS, illustre cette diversité : 71 laboratoires de 49 pays ou régions utilisaient au moins 19 souches différentes. Au cours du programme d'éradication de la variole, quatre de ces souches ont été inoculées à près d'un tiers de la population mondiale (Fenner et al., 1988) : la souche *Lister* (VACV-List) a été utilisée dans 23 pays dont la France, la souche *New-York City Board of Health* (NYCBH) a été utilisée en Amérique et en Afrique de l'Ouest, la souche *EM63* (dérivée de la souche NYCBH) a été utilisée en ex-URSS et en Inde, la souche *Temple of Heaven* a été utilisée en Chine. D'autres

souches ont été plus rarement utilisées, telles que les souches *Western-Reserve* (VACV-WR), *Paris*, *Copenhagen* (VACV-COP) et *Bern*.

La souche *Lister* aurait été isolée au Vaccine Institute de Cologne en 1870 chez un soldat prussien. Elle a été utilisée au Royaume-Uni dès 1892 puis développée à l'Institut Lister en 1916. Cette souche est parfois appelée *Elstree* du nom de la ville où se trouvait l'institut. Ensuite, un stock a été établi aux Pays-Bas en collaboration avec l'OMS.

Les données épidémiologiques n'ont pas permis de mettre en évidence au sein des souches utilisées, l'existence d'une souche à la fois plus protectrice et moins pathogène. Néanmoins, des travaux ont montré des différences de pathogénicité, en particulier dans les tests de neurovirulence chez la souris (Kutinova et al., 1995). Effectivement la souche VACV-WR et une souche vaccinale hollandaise, utilisées dans les années 1950, étaient plus virulentes que les autres et ont entraîné de nombreux cas d'encéphalites post-vaccinales.

En France, à partir de la pulpe vaccinale récupérée d'une culture de VACV-List, deux types de vaccins ont été fabriqués : le vaccin lyophilisé Pourquier et le vaccin purifié, stabilisé et congelé sanofi-pasteur. Ces deux vaccins ne sont pas titulaires d'une AMM mais d'une ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) de cohorte. Cette ATU est régie par un décret ministériel qui autorise l'utilisation du produit dans des conditions précises concernant le vaccinateur, le lieu et la date de vaccination, ainsi que le nom des personnes vaccinées.

Depuis l'éradication de la maladie, la France possédait un stock de 5,5 millions de doses du vaccin Pourquier. Face à la menace émergente actuelle, la nécessité de posséder un nombre de doses suffisant pour vacciner l'ensemble de la population française a pu être satisfaite grâce à l'utilisation d'une aiguille bifurquée permettant l'utilisation de 1 μL de vaccin au lieu de 10 μL auparavant avec le vaccinostyle, multipliant ainsi ce stock par dix, soit 55 millions de doses (MSJS, 2003a). De plus, le stock vaccinal a été complété par 17 millions de doses provenant des laboratoires sanofi-pasteur, inoculables avec l'aiguille bifurquée.

2.2 Efficacité vaccinale

La prise du vaccin antivariolique est marquée par l'apparition d'une pustule « Jennerienne » typique au site d'inoculation (**Figure 11**). Cette pustule ressemble très fortement à celles de la variole et évolue selon les mêmes étapes. Elle peut s'accompagner fréquemment d'un enfllement des ganglions lymphatiques marquant le développement de la réponse immune, qui peut être associé à un état de fatigue et une forte fièvre. Au bout de douze à vingt jours après l'inoculation, une croûte brunâtre apparaît puis laisse place à une cicatrice blanche, déprimée et indélébile. L'absence d'apparition de cette réaction caractéristique peut indiquer soit la présence d'un taux d'AcN suffisant pour inhiber la réplication virale locale (dans le cas d'un rappel vaccinal), soit l'échec de la vaccination suite à une primo-vaccination non efficace.

Les AcN induits par la vaccination antivariolique sont spécifiques du genre et permettent une protection croisée avec les autres OPVs (VARV, MPXV, CPXV, etc...). Bien que l'efficacité de cette vaccination n'ait jamais été mesurée précisément, des études épidémiologiques ont montré qu'une protection élevée persisterait jusqu'à cinq ans après une primo-vaccination et qu'une immunité résiduelle pourrait persister au-delà de dix ans (Gallwitz et al., 2003). Suite au premier rappel, le taux d'anticorps reste élevé plus longtemps, permettant une protection vaccinale plus longue. Par ailleurs, le seuil d'AcN nécessaire à une protection efficace contre le VARV reste inconnu. Néanmoins, lors de la campagne d'éradication, 95 % des primo-vaccinés présentaient un titre en anticorps $\geq 1/10$ (Cherry et al., 1977). Ce titre persisterait pendant dix ans chez les personnes ayant reçu un rappel et jusqu'à trente ans chez celles ayant reçu deux rappels (el-Ad et al., 1990 ; Lublin-Tennenbaum et al., 1990). De plus, moins de 10 % des personnes ayant un titre $\geq 1/10$ présentaient une réaction caractéristique lors d'un rappel, contrairement aux 30 % de personnes ayant un titre $\leq 1/10$ (McIntosh et al., 1977).

Il semblerait que les AcN soient encore présents dans le sérum jusqu'à soixante quinze ans après vaccination, alors que la réponse cellulaire antivirale T-dépendante déclinerait doucement avec une demi-vie de huit à quinze ans (Hammarlund et al., 2003). La meilleure preuve de l'efficacité de ces vaccins antivarioliques de première génération

reste l'accomplissement de la campagne mondiale d'éradication de la variole avec la disparition de cette maladie.

2.3 Complications post-vaccinales et traitements

La plupart du temps, la vaccination n'a pas eu d'autres conséquences que celles décrites précédemment, mais elle n'était pas sans risque pour autant. Effectivement, différentes complications plus ou moins graves peuvent se déclarer. Elles sont de deux types : celles consécutives à une réplication excessive du VACV et les autres d'origines plus diverses.

Dans le premier cas, l'infection accidentelle est la plus commune. Il s'agit de la transmission du virus à partir du site de vaccination à une autre surface corporelle du sujet ou d'une personne à son contact. La vaccine généralisée, quant à elle, est consécutive à un passage du virus dans le flux sanguin permettant sa dissémination dans tout l'organisme. Dans ce cas, de multiples lésions apparaissent sur tout le corps durant les deuxième et troisième semaines post-vaccinales. Chez les personnes présentant un terrain de dermatite atypique, il peut apparaître un eczéma vaccinal (*eczema vaccinatum*) présentant des lésions enflammées et infectées. La vaccine progressive (*vaccinia necrosum*), quant à elle, est une complication beaucoup moins fréquente. Elle est due à une immunité cellulaire défectueuse. Elle est caractérisée par une plaie au site de vaccination qui s'étend inexorablement et devient ulcéreuse, accompagnée de l'apparition continue de lésions similaires sur la totalité du corps qui, elles aussi, prennent une forme ulcéreuse. Cette complication est souvent fatale. Enfin, la vaccine fœtale est une très rare complication. Elle survient lorsque la vaccination de la femme enceinte est suivie d'une dissémination virale interne atteignant le fœtus. Cette complication peut être responsable d'une fausse-couche ou de la naissance prématurée de l'enfant pouvant présenter des lésions cutanées caractéristiques.

Concernant les autres complications, la plus fréquente est la surinfection bactérienne au niveau du site de vaccination. Moins souvent, la vaccination peut engendrer un érythème généralisé, un urticaire ou un érythème multiforme. D'autre part, l'encéphalite post-vaccinale (EPV) est une complication rare mais dont l'issue peut être

mortelle. Les individus ayant souffert de cette complication, n'avaient *a priori* aucune prédisposition particulière et étaient majoritairement des jeunes enfants. A ce jour, en dehors d'une prédisposition individuelle, aucune cause concrète à ce phénomène n'a pu être déterminée. Effectivement, la relation hôte-pathogène est complexe et si l'hôte est déjà fragilisé au moment de la vaccination (BHE lésée, traitement médicamenteux en cours, co-infection par un autre pathogène, etc.), il peut être plus sensible au virus et développer des complications particulières.

Plus récemment, d'autres complications ont été répertoriées lors de la vaccination de militaires et civils américains en avril 2004 : des myocardites, des péricardites, des angines de poitrine, des crises cardiaques et des thrombocytopénies. Elles ont conduit à l'arrêt de ces essais. La causalité de la vaccination dans l'origine de ces complications n'a pas pu être démontrée. Néanmoins, sur 450000 militaires américains vaccinés, il a été rapporté un taux de myopéricardites de un pour 12819 primo-vaccinés (Cassimatis et al., 2004).

Finalement, quelle que soit la complication prise en considération, l'incidence est plus importante au cours de la primo-vaccination, qu'au cours des rappels. D'après une étude réalisée en 1968 aux Etats-Unis, le nombre de décès résultant des complications consécutives à la primo-vaccination est estimé à un pour un million de vaccinés, alors qu'il est de un pour quatre millions après un rappel (Lane et al., 1969). Par ailleurs, la fréquence de ces complications varie en fonction de la souche virale utilisée (Kretzschmar et al., 2006). Certaines souches, telle que la souche VACV-WR, sont responsables d'un plus grand nombre de complications et ont été abandonnées pour la vaccination.

A ce jour, en raison de la fréquence d'apparition des réactions indésirables, la vaccination n'est pas justifiée si le risque d'exposition est faible ou inexistant et de nombreuses contre-indications à cette vaccination ont maintenant été listées (MSJS, 2003a), telles que des affections cutanées, des déficits immunitaires, des maladies cardiovasculaires, etc.

En dehors du traitement des affections secondaires liées aux complications post-vaccinales, les VIG constituent la seule option d'intervention sur la réplication virale responsable de ces complications. Elles sont obtenues par concentration des

gammaglobulines présentes dans le sérum de personnes récemment vaccinées ou revaccinées. En dehors des équipes nationales dédiées, aucune vaccination n'est pratiquée, ce qui explique le faible volume des stocks disponibles. Elles sont disponibles sous forme de solution isotonique stérile avec une concentration en AcN anti-VACV de 500 UI/mL. Selon le type de préparation, les VIG peuvent être administrées par voie intramusculaire ou intraveineuse. Les VIG sont indiquées dans le traitement de l'*eczema vaccinatum* et de la vaccine progressive mais elles peuvent être également utiles dans les cas sévères de vaccine généralisée et de vaccine oculaire (excepté la kératite vaccinale pour laquelle elles sont contre-indiquées). Il a été rapporté qu'une injection intramusculaire de 0,6 mL/kg (ou 300 UI/kg) de VIG pouvait prévenir la formation de nouvelles lésions et permettre une amélioration clinique rapide dans les cas de vaccine généralisée et d'*eczema vaccinatum* (Goldstein et al., 1975 ; Kemp, Berge, et England, 1956 ; Sharp et Fletcher, 1973 ; Sussman et Grossman, 1965). Dans les cas de vaccine progressive, plusieurs injections hebdomadaires sont nécessaires. Les VIG sont également recommandées en prophylaxie à la dose de 0,3 mL/kg (ou 150 UI/kg) lorsque le sujet est contre-indiqué à cette vaccination. En effet, ce traitement ne semble pas empêcher la prise du vaccin (Kemp, Berge, et England, 1956). Cependant, les VIG sont inefficaces en prophylaxie ou en post-exposition contre la variole.

Alors que les VIG constituent le seul moyen thérapeutique disponible et autorisé pour le traitement des complications post-vaccinales, une nouvelle molécule développée par la société SIGA Technologies, le ST-246, a montré une forte potentialité thérapeutique chez un jeune enfant ayant développé un *eczema vaccinatum* et pour lequel le cidofovir et les VIG ont été inefficaces (Marris, 2007).

3. Les vaccins antivarioliques de deuxième génération

Les vaccins « historiques » de première génération ne remplissant pas les critères de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) actuellement requises pour produire un vaccin humain, un consensus s'est dégagé pour remplacer ces vaccins par des vaccins dits de deuxième génération. Pour palier aux risques liés à la contamination bactérienne et au prion, ces vaccins, développés à partir des souches utilisées avec succès lors de la

campagne d'éradication (VACV-List et NYCBH), sont produits sur cultures cellulaires. L'objectif est de produire le VACV sur des systèmes déjà autorisés pour la production de vaccins tels que les fibroblastes d'embryon de poulet, les cellules de rein de singe Vero ou les cellules fibroblastiques humaines MRC-5.

Deux stratégies ont été adoptées pour le développement de ces nouveaux vaccins : la production d'un vaccin monoclonal issu d'un clone sélectionné au sein de la population virale de la souche utilisée, ou la production d'un vaccin polyclonal sans sélection au sein de la population virale du vaccin de première génération.

3.1 Les vaccins monoclonaux

Un seul vaccin monoclonal à été produit à ce jour, il s'agit du vaccin ACAM 1000, qui a été élaboré par les laboratoires Acambis-Baxter à partir de la souche NYCBH (Weltzin et al., 2003). Pour ce faire, un clone viral a été sélectionné en raison de sa moindre neurovirulence et d'une immunogénicité équivalente sur des modèles murins et primates non-humains, et a été amplifié sur culture de cellules MRC-5. Après des essais cliniques concluants, pour des raisons de production industrielle, les laboratoires Acambis-Baxter ont mis au point le vaccin ACAM 2000, qui n'est autre que le même clone viral produit sur cellules Vero (Monath et al., 2004). Des essais cliniques de phase III, débutés en avril 2004, ont néanmoins été arrêtés suite à la survenue de myopéricardites, dans les mêmes proportions que le vaccin Dryvax (vaccin américain de première génération issu de la souche NYCBH) (Artenstein et al., 2005).

3.2 Les vaccins polyclonaux

Des vaccins polyclonaux de seconde génération ont d'ores et déjà été produits. Le vaccin des laboratoires sanofi-pasteur et celui développé par les laboratoires Bavarian Nordic ont été produits à partir de la souche vaccinale *Lister* amplifiée sur culture de cellules primaires d'embryon de poulet. Le vaccin sanofi-pasteur, non adapté et non cloné, a fait l'objet d'études chez la souris où il n'a montré aucune différence significative de pathogénicité et une immunogénicité similaire au vaccin de première génération (Ferrier-

Rembert *et al.*, sous presse). Des essais cliniques de phase II sont en cours chez l'homme. Le vaccin CCSV, quant à lui, a été développé par les laboratoires Connaught, à partir du vaccin américain Dryvax, par réplication sur cellules MRC-5 (Greenberg et al., 2005). Des essais cliniques de phase I menés sur une cohorte de 350 patients, n'ont montré aucune augmentation significative en terme d'effets secondaires en comparaison au vaccin traditionnel dont il est issu. Par ailleurs, ce vaccin présente une immunogénicité humorale et cellulaire similaire au vaccin Dryvax (Greenberg et al., 2005). En effet, des singes vaccinés avec la souche CCSV ont présenté une protection vaccinale complète contre une infection par aérosol avec le MPXV (Jarhrling, Zaucha, et Huggins, 2000).

3.3 Avantages et inconvénients

Les vaccins de deuxième génération offrent un sérieux avantage en comparaison à des vaccins de première génération dont ils sont issus : une meilleure qualité microbiologique. De plus, ils sont rigoureusement contrôlés tout au long de leur développement, en application aux exigences des BPF.

La stratégie d'un vaccin monoclonal, issu de la sélection d'un clone viral, a pour but de limiter les risques d'apparition des effets secondaires occasionnés par la vaccination antivariolique, ceci en éliminant les sous-populations virulentes émergentes. Le clone sélectionné ne doit pas être plus virulent que la souche de référence, mais présenter une immunogénicité et une protection égales ou supérieures à cette dernière. L'inconvénient d'un tel vaccin dont l'efficacité ne peut pas être testée chez l'homme à cause de l'éradication de la maladie, est de ne pas contenir tous les clones immunogènes du vaccin historique. Quant à l'approche polyclonale, elle permet de conserver la diversité antigénique des vaccins de première génération qui ont fait la preuve de leur efficacité lors de la campagne d'éradication de la variole. En conclusion, chaque stratégie a son avantage, les vaccins clonés devraient occasionner moins d'effets secondaires alors que les vaccins polyclonaux assureraient l'efficacité de protection historique.

4. Les vaccins antivarioliques de troisième et quatrième génération

Les problèmes sanitaires liés aux procédés de fabrication des vaccins antivarioliques de première génération ont été éliminés par le développement des vaccins de deuxième génération. Cependant, les problèmes liés aux effets secondaires et aux contre-indications demeurent avec ce type de vaccin. De nouvelles approches sont donc envisagées avec les vaccins de troisième et de quatrième génération. Les vaccins de troisième génération sont obtenus à partir de souches non répliquatives, génétiquement modifiées par délétions naturelles ou provoquées. Les délétions sont présentes sur des zones codant des gènes non essentiels à la multiplication du virus *in vitro* mais favorisant la propagation du virus *in vivo*. Les vaccins de quatrième génération sont des vaccins sous-unitaires composés soit de protéines antigéniques du VACV, soit d'ADN codant ces protéines.

4.1 Les différentes souches

Concernant les vaccins de troisième génération, des souches ont été développées par passages successifs en culture cellulaire (souches LC16m8 et MVA), par délétions ciblées d'un seul gène (souche dVV-L) ou de plusieurs gènes (souches NYVAC et HR).

Le candidat vaccin MVA a été atténué par plus de cinq cents passages de la souche *Ankara* sur cellules d'embryon de poulet (Mayr et al., 1978). Elle est délétée d'une vingtaine de gènes, et d'autres sont incomplets ou modifiés par mutations ponctuelles. Elle ne se multiplie pas dans les cellules humaines et dans la plupart des lignées de cellules mammifères (Antoine et al., 1998 ; Blanchard et al., 1998 ; Drexler et al., 1998 ; Meyer, Sutter, et Mayr, 1991). Elle a déjà été utilisée en Allemagne dans les années 1970 chez plus de 120000 personnes, en pré-vaccination avec les souches traditionnelles, afin de réduire les effets secondaires (Stickl et Hochstein-Mintzel, 1971). Cependant, de nombreuses études de protection réalisées sur différents modèles animaux ont montré une bonne efficacité à court terme mais une faible protection à long terme (Phelps et al., 2006) et une absence de protection en post-exposition (Staib et al., 2006). La société Bavarian Nordic a développé le vaccin IMVAMUNE, dérivé de la souche MVA. Des essais cliniques de phase I et II ont montré que le candidat vaccin entraînait uniquement des réactions

locales, et que la vaccination avec la souche MVA entraînait une réponse humorale spécifique dose-dépendante, avec un titre en AcN qui persiste pendant plus de cent jours (Vollmar et al., 2006).

La souche LC16m8, obtenue au Japon par plusieurs passages sur cellules de rein de lapin, est issue de la souche thermosensible LC16, elle même issue de la souche *Lister* (Morikawa et al., 2005). Elle a été administrée à 100000 enfants avant l'éradication de la variole, entre 1973 et 1975 (Yamaguchi, Kimura, et Hirayama, 1975). Le génome de la souche LC16m8 a conservé tous les cadres ouverts de lecture du VACV, excepté le gène *B5R* codant une protéine d'enveloppe responsable de la dissémination du virus dans l'organisme, qui a été rendu non fonctionnel par l'apparition d'une délétion d'une seule base (Kidokoro, Tashiro, et Shida, 2005 ; Morikawa et al., 2005). Lors de l'utilisation de cette souche, une diminution de la pathogénicité a été observée (Yamaguchi, Kimura, et Hirayama, 1975). De plus, différentes études ont montré que cette souche n'était pas neuroinvasive et avait une neurovirulence largement réduite par rapport à la souche parentale et à la souche NYCBH (Hashizume, Morita, et Takahashi, 1987 ; Lee et al., 1992). Concernant l'immunogénicité et la protection, le titre en AcN induit par la vaccination avec la souche LC16m8, était similaire à celui induit par la souche parentale (Hashizume, Morita, et Takahashi, 1987 ; Yamaguchi, Kimura, et Hirayama, 1975), alors que de nombreuses études de protection menées dans différents modèles animaux, ont montré une protection de 100 % à court terme contre une épreuve létale (Empig et al., 2006 ; Kidokoro, Tashiro, et Shida, 2005 ; Morikawa et al., 2005 ; Saijo et al., 2006).

La souche vaccinale expérimentale nommée dVV-L a été créée par délétion d'un gène essentiel codant l'uracil-ADN-glycosylase (UDG), à partir de la souche *Lister* (Holzer et Falkner, 1997). La seule lignée cellulaire permettant une répllication du virus est une lignée cellulaire génétiquement modifiée, produisant l'UDG virale. L'innocuité de cette souche a été testée sur un modèle murin et a montré qu'elle était moins pathogène que la souche parentale (Ober et al., 2002). Cependant, les réponses humorales induites par le candidat vaccin dVV-L sont inférieures à celles induites par la vaccination avec la souche *Lister* alors que la protection obtenue face à une épreuve létale est similaire à celle obtenue avec cette même souche (Coulibaly et al., 2005).

Le candidat vaccin NYVAC, développé aux Etats-Unis par la société Virogenetics, dérive de la souche *Copenhagen* par délétion ciblée de dix-huit cadres ouverts de lecture

(Tartaglia et al., 1992). L'étude de la réplication de cette souche sur six lignées cellulaires humaines a montré une réduction de sa réplication de 98,4 % à 99,9 % alors qu'elle conserve sa capacité de multiplication dans des cellules de rein de singe Vero. La vaccination de macaques immunodéprimés a montré une bonne innocuité du candidat vaccin (Edghill-Smith et al., 2003). Concernant la protection, il a récemment été montré sur un modèle murin que l'immunogénicité cellulaire induite par la vaccination avec la souche NYVAC était similaire à celle induite par la vaccination avec le vaccin de première génération souche *Lister* alors que la réponse humorale spécifique était plus faible (Ferrier-Rembert et al, soumis). Bien que la protection, face à une épreuve létale, soit efficace à court terme (Ferrier-Rembert *et al.*, soumis ; Belyakov et al., 2003), elle ne l'est plus cinq mois après la vaccination (Ferrier-Rembert *et al.*, soumis).

Concernant les vaccins de quatrième génération développés à partir de protéines virales produites par génie génétique, des expériences ont été réalisées sur le modèle murin. Ces études ont testé la vaccination avec des protéines d'enveloppe virale (B5R, A33R, L1R, A27L) qui sont des cibles identifiées pour l'action des AcN (Fogg et al., 2004 ; Xiao et al., 2007). L'inoculation simultanée de la protéine de membrane L1 associée à des protéines d'enveloppe B5R et A33R, induisait, à court terme, un titre en AcN et une protection contre une épreuve létale, supérieurs à ce qui était obtenu avec le vaccin de première génération ; mais six mois après vaccination, la protection était partielle (Fogg et al., 2004 ; Xiao et al., 2007). De plus, malgré sa forte immunogénicité, l'addition de la protéine de membrane A27L n'était pas responsable d'un effet plus protecteur.

La seconde stratégie envisagée est l'immunisation avec de l'ADN codant des protéines virales, qui sont en général les mêmes que celles utilisées dans les vaccins protéiques. Plusieurs études ont montré la possibilité de protéger la souris contre une infection létale, à un niveau comparable à celui des vaccins traditionnels, par la vaccination avec de l'ADN codant quatre protéines virales : A27L, A33R, L1R et B5R (Galmiche et al., 1999 ; Hooper et al., 2000 ; Hooper, Custer, et Thompson, 2003 ; Hooper et al., 2004). De plus, un essai de vaccination d'un modèle primate a mis en évidence une immunisation relativement efficace donnant lieu à une production d'anticorps spécifiques (Hooper, Custer, et Thompson, 2003). Une autre étude a

démontré la protection de la souris par la vaccination avec l'ADN codant une protéine d'enveloppe de ce virus (A33R), contre une infection létale avec l'ECTV (Fang et al., 2006).

4.2 Avantages et inconvénients

La variole ayant été éradiquée, l'évaluation de l'efficacité de tous ces vaccins n'est pas possible chez l'homme. D'autre part, les connaissances des mécanismes qui conduisent à la protection immunologique sont encore incomplètes. Ainsi, des études ont été réalisées sur des modèles animaux afin de caractériser le potentiel protecteur de ces vaccins. Elles ont montré en général une protection à court terme contre une épreuve virale létale mais une protection à long terme qui n'est que partielle (Belyakov et al., 2003 ; Coulibaly et al., 2005 ; Fogg et al., 2004 ; Meseda et al., 2005 ; Phelps et al., 2006 ; Wyatt et al., 2004 ; Xiao et al., 2007). Ces études reposent cependant sur des données empiriques et des observations réalisées sur des modèles murins imparfaits.

Le principal avantage des vaccins de troisième génération est leur innocuité. Ils pourraient ainsi être administrés à des sujets présentant des contre-indications aux vaccins de première ou deuxième génération (immunodéprimés, femmes enceintes, personnes souffrant de maladies de peau notamment). Ils pourraient également être utilisés en primo-vaccination avant des rappels avec un vaccin répliatif de première ou deuxième génération. Cependant si les virus délétés perdent, pour la majorité d'entre eux, leur pouvoir pathogène, ils perdent également une partie de leur pouvoir immunogène (Drillien, Spehner, et Garin, 2004).

Concernant les vaccins de quatrième génération, un des inconvénients théoriques de cette stratégie réside dans la difficulté d'induire une immunité cellulaire type lymphocytes T cytotoxiques, reconnus comme des éléments importants de la résistance à l'infection (Drillien, Spehner, et Garin, 2004). De plus, cette méthode nécessite plusieurs rappels et repose sur l'utilisation d'un nombre limité d'antigènes alors que le VACV code environ deux cents protéines.

5. L'encéphalite post-vaccinale et la barrière hémato-encéphalique

Comme précédemment cité, l'EPV est une complication rare mais potentiellement fatale, en particulier chez les jeunes enfants. Aucune explication n'ayant pu être avancée, seule une prédisposition individuelle a été suspectée comme élément majeur déclencheur des symptômes encéphalitiques observés consécutifs au développement d'une réaction inflammatoire dans le tissu cérébral. Les données présentées dans ce chapitre ont pour but de rappeler le tableau clinique de l'EPV et de décrire brièvement les différents mécanismes mis en causes dans les cas d'encéphalites infectieuses afin de mettre en place la problématique abordée lors de l'étude de l'interaction du VACV avec la BHE. Enfin, une rapide revue bibliographique évoque la physiologie de la BHE constituant un des points clés de cette pathologie.

5.1 L'encéphalite post-vaccinale

Le vaccin antivariolique est responsable de nombreuses complications post-vaccinales parmi lesquelles l'EPV. Cette complication est rare mais a été relatée comme « la plus sérieuse complication post-vaccinale lorsqu'il n'y a pas de contre-indication à la vaccination » (Fenner et al., 1988).

5.1.1 La clinique

Les EPVs ont été identifiées sous deux formes : l'encéphalopathie (EPPV) et l'encéphalomyélite (EMPV). Les EMPVs sont décrites chez les enfants de moins de deux ans alors que les EPPVs affectent l'ensemble de la population. Les symptômes neuronaux apparaissent en général subitement entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour après l'apparition très discrète d'une éruption cutanée et peuvent se poursuivre pendant deux à trente jours (Greenberg et Appelbaum, 1948). Les premiers signes sont en général une fièvre accompagnée de maux de tête, de somnolence, de vertiges, de désorientation, de confusion, de vomissements et de douleurs cervicales et dorsales. Des tremblements peuvent également apparaître et ont principalement été observés chez les enfants. Un à

deux jours plus tard, l'état de certains patients se dégrade avec l'apparition d'une très forte fièvre et de signes d'atteinte neuronale tels que des tremblements, une aphasie, une paralysie ou des états comateux (Booss et Davis, 2003 ; Roos et Eckerman, 2002). Des lésions du SNC et une augmentation de la pression du liquide céphalorachidien (LCR) ont pu être observées dans les cas d'EPPV ainsi que d'EMPV, alors qu'une augmentation de la numération lymphocytaire, monocytaire et de la protéinémie est spécifique d'une EPPV (Fenner et al., 1988 ; Lane et al., 1969). Par ailleurs, des essais d'isolement de VACV dans le LCR et dans le tissu cérébral ont fait l'objet de nombreuses controverses. En effet si dans la majorité des cas il a été impossible d'isoler le virus (Greenberg et Appelbaum, 1948 ; Terzin et al., 1974), il y a néanmoins eu quelques succès (Angulo, De Campos, et De Gomes, 1964 ; Gurvich et Vilesova, 1983).

La phase aiguë de l'EPV dure environ une semaine et peut conduire au décès du patient dans les deux à trois semaines suivantes. Le taux de mortalité est compris entre 10 et 50 % en fonction de la souche vaccinale utilisée et donc du pays considéré (Greenberg et Appelbaum, 1948 ; Lane et al., 1970). Les survivants se rétablissent après plusieurs semaines ou mois et peuvent conserver des séquelles importantes telles qu'une hémiplégie, des tremblements, un retard mental ou des symptômes psychiatriques (Booss et Davis, 2003). L'administration préventive de VIG au moment de la vaccination réduirait l'incidence d'EPV mais aucune preuve n'a été faite d'une possible action thérapeutique (Nanning, 1962).

5.1.2 L'origine

La physiopathologie de cette complication post-vaccinale reste aujourd'hui encore non clairement identifiée. L'EPV semble atteindre de façon aléatoire des individus ne présentant aucune prédisposition identifiée. D'après un rapport de l'EMA, il n'existe pas de modèle établi pour évaluer la neuroinvasion et la neurovirulence d'une souche vaccinale antivariolique, directement reliées aux encéphalites post-vaccinales (EMA, 2002). La neuropathogénicité associe la capacité du virus à traverser la BHE (neuroinvasion) et la réplication locale virale dans le cerveau (neurovirulence). Plusieurs études ont été réalisées afin d'essayer d'appréhender les phénomènes biologiques

responsables de cette complication. Ainsi il a été montré qu'une inoculation intracérébrale chez la souris pouvait entraîner l'apparition d'une EPV mortelle et que la survie, le taux de réplication virale, la sévérité de la pathologie ainsi que la persistance virale dans le tissu cérébral, étaient dépendants de la dose inoculée (Cassel, 1957 ; Ginsberg et Johnson, 1976). Une autre étude a établi une susceptibilité d'atteinte du SNC spécifique de la souche virale inoculée chez la souris (Briody, 1959). Néanmoins aucune étude n'a été réalisée afin d'appréhender l'entrée du VACV dans le SNC.

5.2 Les encéphalites infectieuses

5.2.1 Généralités

Le mot encéphalite provient du mot *enkephalos* associé au suffixe *-ite*, qui signifie une inflammation de l'encéphale. Les étiologies sont nombreuses et variées mais on distingue principalement deux types d'encéphalites : les encéphalites infectieuses et non infectieuses. Les premières sont consécutives à une multiplication bactérienne, virale, fongique ou parasitaire. Les encéphalites non infectieuses peuvent avoir une origine auto-immune ou cancéreuse, être reliées à une intoxication médicamenteuse ou au plomb (saturnisme), ou être le reflet symptomatique d'une maladie touchant les méninges.

Les symptômes de la maladie peuvent être peu parlants avec simplement une fatigue intense et de la fièvre isolée (en particulier dans les cas d'encéphalite virale) ; mais le plus souvent, le tableau clinique comprend des signes de dysfonctionnement cérébral (troubles de la conscience, modification du comportement, convulsions, paralysie et troubles de la sensibilité...) et des anomalies des nerfs crâniens (troubles oculaires, auditifs, paralysie faciale, troubles de la déglutition...). A ces signes s'associent des signes de méningite (maux de tête, vomissements, raideur de la nuque et difficulté à supporter la lumière) et d'infection (altération de l'état général, fièvre intense, frissons et sueurs).

Le bilan hospitalier doit être pratiqué en urgence et est basé sur une ponction lombaire, un scanner, un électroencéphalogramme et un bilan biologique.

Dans les cas d'encéphalites infectieuses, alors que la BHE est une structure à la perméabilité très restrictive, permettant seulement le passage sélectif de substances par des mécanismes actifs ou passifs, les pathogènes sont néanmoins capables de pénétrer dans le cerveau. Il y a deux types de voies d'entrée : l'entrée consécutive à une diffusion hématogène peut se faire au niveau de la BHE ou des plexus choroïdes, alors que certains pathogènes pénètrent le SNC par progression rétrograde le long des nerfs.

Les voies d'entrée dans le SNC au niveau de la BHE sont de plusieurs types (**Figure 15**) (Chaudhuri, 2000; Tuomanen, 1996). Le pathogène peut pénétrer dans la cellule endothéliale par une voie trans-cellulaire, soit en favorisant le phénomène naturel de pinocytose (cas du méningocoque) ou de transcytose, soit en induisant une endocytose après liaison avec un récepteur cellulaire spécifique (cas du pneumocoque et de la malaria). Le pathogène peut franchir la barrière par migration paracellulaire au niveau de jonctions serrées (JS) altérées (cas des spirochètes). Il peut également infecter les cellules sanguines de l'immunité qui vont naturellement pénétrer dans le SNC (modèle du « cheval de Troie », cas du streptocoque et du virus de l'immunodéficience humaine). Enfin, le pathogène peut conduire à la destruction de la BHE.

5.2.2 Les encéphalites virales

De façon générale, les encéphalites virales peuvent être classées en quatre catégories : l'encéphalite virale aiguë, l'encéphalomyélite post-infectieuse, les infections lentes du SNC et les maladies chroniques dégénératives du SNC.

Concernant les encéphalites aiguës, leur physiopathologie varie en fonction du virus responsable. Les virus peuvent pénétrer dans le SNC soit par dissémination rétrograde le long des nerfs, soit, le plus souvent, à partir d'une dissémination dans le sang de l'individu. Une fois le compartiment sanguin atteint par le virus, il y a multiplication virale et apparition d'une virémie. De là, le virus doit traverser la BHE pour atteindre les cellules du cerveau qui lui sont perméables, c'est à dire qui lui permettent de se multiplier. Certains virus ont des zones de réplication préférentielles au sein du tissu cérébral, comme le virus de l'herpès qui cible les lobes temporaux. Cette réplication virale conduit à des dommages cellulaires mais aussi au déclenchement de la réponse immune. Ainsi, les

cellules du système immunitaire (monocytes et lymphocytes) pénètrent dans le cerveau pour stopper l'infection, ce qui provoque un œdème cérébral caractéristique. Ce sont donc autant l'infection que la réponse immune pour combattre cette infection, qui sont responsables des symptômes de l'encéphalite virale.

La BHE joue un rôle décisif dans la pénétration des virus disséminant par voie hématogène et l'augmentation de sa perméabilité semble être impliquée dans la pathogénèse. En effet, des études ont montré que la mortalité associée à l'infection par une souche non neuroinvasive de virus West-Nile ou Sindbis pouvait être augmentée par l'administration préalable de lipopolysaccharide bactérien (LPS), connu pour augmenter la perméabilité de la BHE (Lustig et al., 1992). De plus, une étude a récemment montré la corrélation entre la perte d'intégrité de la BHE et les conséquences sur la pathogénicité des virus à encéphalite chez la souris (Olsen et al., 2007).

De nombreux virus peuvent engendrer des encéphalites dont une liste non exhaustive est établie dans le **Tableau 1**. Des études ont été menées sur certains d'entre eux afin d'appréhender les mécanismes mis en place et les phénomènes biologiques permettant leur entrée dans le SNC, en vue d'imaginer des possibilités thérapeutiques.

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est le virus pour lequel l'entrée dans le tissu cérébral est la plus étudiée. En effet une encéphalite se déclare chez plus d'un tiers des personnes infectées par ce virus et la BHE joue un rôle décisif (Banks et al., 1999). L'entrée du virus dans le SNC se fait au niveau des vaisseaux cérébraux ou des plexus choroïdes, soit par franchissement direct de la BHE, soit par le mécanisme du « cheval de Troie » en infectant des monocytes. Différents mécanismes participent au franchissement de la BHE : le virus peut infecter les cellules endothéliales (Moses et al., 1993 ; Moses et Nelson, 1994) mais il peut également traverser ces cellules par macropinocytose (Liu et al., 2002). Par ailleurs, les protéines virales tat et gp120 induisent l'apoptose des cellules endothéliales (Kim et al., 2003 ; Shi et al., 1996) et stimulent la sécrétion de TNF- α par les macrophages et les astrocytes infectés dans un phénomène d'amplification (Mayne et al., 1998), entraînant la perturbation des JS et permettant le franchissement de la BHE par les virions (Dallasta et al., 1999 ; Fiala et al., 1997). De plus, la protéine tat active la sécrétion de plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires (MCP-

1, ICAM-1 et VCAM-1) (Pu et al., 2003) alors que la liaison de la protéine gp120 à un récepteur entraîne une modification du cytosquelette cellulaire (Kanmogne et al., 2007), favorisant la migration intercellulaire des monocytes. En effet, une étude récente a montré que les lymphocytes infectés par un rétrovirus induisent une perturbation de la BHE observée par une augmentation de la perméabilité paracellulaire et de la migration lymphocytaire induite via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNF- α) (Afonso et al., 2007). Cette migration est également médiée par la protéine Rho (Persidsky et al., 2006). En plus de leur impact sur les monocytes, les cytokines pro-inflammatoires régulent l'expression du co-récepteur CXCR4 du VIH-1 à la surface des astrocytes (Wu et al., 2000).

Dans le cas du virus Herpes Simplex, le virus est initialement retrouvé au niveau du cortex limbique puis il dissémine aux lobes temporal et frontal adjacents. Plusieurs hypothèses d'entrée dans le SNC ont été élaborées : soit le virus pénètre dans le SNC à partir du compartiment sanguin, soit le virus utilise une voie directe le long des nerfs, depuis le nez jusqu'aux lobes olfactifs, soit le virus latent au niveau du ganglion trigéminal atteint la moelle épinière et remonte jusqu'au cerveau. L'hypothèse la mieux établie est l'infection de l'organe voméronasal présent au niveau de la cavité nasale suivie par une progression rétrograde le long des nerfs olfactifs et trijumeaux (Barnett et al., 1994 ; Mori et al., 2005 ; Tomlinson et Esiri, 1983). La dissémination se fait ensuite par voie trans-neuronale.

En ce qui concerne les encéphalites à *Arbovirus*, il a été montré que lors d'une virémie, le virus peut infecter l'épithélium olfactif à partir du compartiment sanguin puis progresse jusqu'au bulbe olfactif par transport axonal rétrograde (Monath, Cropp, et Harrison, 1983). Par ailleurs, le virus Semliki Forest peut infecter et endommager les cellules endothéliales de la BHE (Eralinna et al., 1996). Concernant plus particulièrement les *Flavivirus*, deux études récentes ont porté sur les voies d'entrée dans le SNC du virus de l'encéphalite de Murray Valley et du virus West-Nile. Il a été observé qu'une infection chez la souris par voie intraveineuse avec une faible dose virale du virus de l'encéphalite de Murray Valley conduit à l'infection des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, qui sont ensuite détruites par la réponse immune cytotoxique, produisant une brèche dans la BHE (Licon Luna et al., 2002). En revanche, lorsque l'infection est réalisée avec une

forte dose virale, l'entrée très rapide dans le SNC est possible soit suite à l'infection des nerfs olfactifs, soit par le franchissement direct de la BHE. Concernant le franchissement de la BHE par le virus West-Nile, il a été montré qu'il est modulé par la réponse inflammatoire dépendante du récepteur Toll-like 3 activé par l'ARN viral double brin (Wang et al., 2004). Cette reconnaissance entraîne la production de TNF- α par les macrophages, qui se lie ensuite à un récepteur présent à la surface des cellules endothéliales, conduisant à une modification de la physiologie de la BHE. La voie d'entrée du virus reste néanmoins indéterminée : est-ce les particules virales ou les monocytes infectés qui pénètrent dans le SNC ?

Les *Coronavirus* ont également été étudiés chez la souris. Perlman et ses collaborateurs ont montré que le virus de l'hépatite murine (MHV) gagne le SNC par voie trans-neuronale (Perlman, Evans, et Afifi, 1990). Le Coronavirus humain OC43 emprunte la même voie d'entrée chez la souris, conduisant à une pathologie qui n'est pas liée à la réponse immune (Jacomy et Talbot, 2003).

Le virus humain des leucémies à lymphocytes T de type 1 (HTLV-1), quant à lui, infecte les lymphocytes humains qui présentent alors une meilleure adhérence et migrent au travers des cellules endothéliales *in vitro*, induisant une augmentation d'un facteur deux de la perméabilité paracellulaire de ces cellules (Romero et al., 2000).

Dans les cas d'encéphalites à virus de la chorioméningite lymphocytaire murine, l'augmentation de la perméabilité de la BHE est médiée par les lymphocytes T CD8⁺ (Andersen, Marker, et Thomsen, 1991).

L'entrée du poliovirus et du polyomavirus dans le SNC n'est pas médiée par un récepteur spécifique à la surface des cellules endothéliales (Chapagain et al., 2007; Yang et al., 1997). Néanmoins, dans le cas du poliovirus, la voie axonale ne semble pas prédominante et les monocytes n'apparaissent pas être des transporteurs du virus (Yang et al., 1997). Ainsi, le virus doit probablement entrer dans le SNC par réplication lytique dans les cellules endothéliales.

Le cytomégalovirus n'entraîne pas de perturbation de la BHE chez la souris atteinte d'encéphalite, il doit donc probablement être transporté dans le tissu cérébral par les monocytes circulants infectés (Reuter et al., 2004).

5.2.3 Les encéphalites dues à d'autres pathogènes

En dehors des virus, les bactéries constituent la majorité des autres pathogènes étudiés pour identifier leur mode de pénétration dans le cerveau, sans oublier des parasites et des champignons et le prion puisque des études ont montré l'existence d'un transport axonal rétrograde le concernant (Aguzzi et al., 2003 ; Moya et al., 2004). Plusieurs revues traitant de l'invasion du SNC par ces différents pathogènes ont été publiées (Chaudhuri, 2000 ; Drevets, Leenen, et Greenfield, 2004 ; Kim, 2006 ; Nassif et al., 2002).

Concernant les encéphalites bactériennes, une majorité de bactéries pénètrent dans le SNC en traversant la BHE par voie transcellulaire. *Streptococcus pneumoniae* en est un bon exemple. Il se lie au récepteur du PAF (Platelet-Activating Factor) à la surface des cellules endothéliales activées par des cytokines pro-inflammatoires, pour ensuite les traverser par endocytose (Cundell et al., 1996). *Listeria monocytogenes*, quant à elle, utilise trois voies d'entrée possibles : la dissémination non hématogène (transport rétrograde le long des nerfs) (Cordy et Osebold, 1959), l'invasion directe des cellules endothéliales (Hertzog et al., 2003 ; Wilson et Drevets, 1998) et le passage associé aux leucocytes circulants (Drevets, Jelinek, et Freitag, 2001). De même *Micobacterium tuberculosis* peut traverser les cellules endothéliales sans altérer l'intégrité des JS (Jain et al., 2006 ; Menozzi et al., 2006) mais semble également pouvoir traverser la BHE via des phagocytes infectés (Drevets, Leenen, et Greenfield, 2004). Dans le cas de *Neisseria meningitidis* seule la voie transcellulaire semble être utilisée. Il a été observé que l'agent du méningocoque traverse les cellules endothéliales sans impact sur les JS (Pujol et al., 1997). Par la suite, il a été montré que l'adhérence de la bactérie à la cellule est médiée par le pilus de type IV, induisant la formation de projections membranaires permettant l'intégration de la bactérie dans la cellule (Lambotin et al., 2005 ; Nassif, 1999).

Des champignons utilisent également la voie transcellulaire pour atteindre le tissu cérébral. C'est le cas du *Candida albicans* qui adhère et traverse par transcytose les cellules endothéliales de BHE *in vitro* sans altérer leur intégrité (Jong et al., 2001). Il a également été montré que *Cryptococcus neoformans* adhère et traverse des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* afin d'atteindre le SNC (Chang et al., 2004).

Les études réalisées sur les parasites responsables d'encéphalite ont principalement mis en évidence l'utilisation de la voie paracellulaire par ces pathogènes. Par exemple, l'agent de la malaria et le trypanosome entraînent une altération de la BHE permettant leur traversée au niveau intercellulaire (Grab et al., 2004 ; Treeratanapiboon et al., 2005).

5.3 La barrière hémato-encéphalique

La BHE constitue une interface de régulation entre la circulation périphérique et le SNC et permet le maintien de l'homéostasie cérébrale. Bien que son existence ait été observée pour la première fois en 1885 par Paul Ehrlich, le terme de BHE a été utilisé pour la première fois par Lewandowsky en 1900 (Bechmann, Galea, et Perry, 2007). La BHE a fait l'objet de nombreux débats au cours du XX^e siècle et c'est seulement en 1961, avec les travaux d'Olszewski, qu'il a été suggéré que cette barrière n'était pas constituée d'un espace extracellulaire mais qu'elle reposait sur des propriétés particulières du système vasculaire du SNC (Hoffman et Olszewski, 1961). Ceci fut clairement confirmé en 1967 par Reese et Karnovsky qui mirent en évidence la présence de JS entre les cellules endothéliales, responsables d'une « imperméabilité » de l'endothélium vasculaire (Reese et Karnovsky, 1967).

D'un point de vue anatomique, la BHE est constituée de cellules endothéliales vasculaires spécifiques tapissant entièrement la face luminale des vaisseaux sanguins et interagissant avec les pieds astrocytaires environnants et les péricytes (**Figure 12**). La spécificité des cellules endothéliales de la BHE comparativement à celles du système périphérique repose entre autre sur un plus grand nombre de mitochondries, l'absence d'espace intercellulaire, une pinocytose réduite, la présence de JS, de systèmes d'efflux et de transporteurs spécifiques (Fenstermacher et al., 1988 ; Kniesel et Wolburg, 2000 ; Oldendorf, Cornford, et Brown, 1977 ; Sedlakova, Shivers, et Del Maestro, 1999). Ces cellules sont également polarisées car leur composition membranaire diffère selon leur pôle. Ces propriétés ne sont pas prédéterminées mais sont induites par le microenvironnement (Stewart et Wiley, 1981a ; Stewart et Wiley, 1981b).

Le rôle des astrocytes a été discuté mais plusieurs études ont montré qu'un environnement astrocytaire est nécessaire à la différenciation de l'endothélium vasculaire en BHE (Janzer et Raff, 1987 ; Neuhaus, Risau, et Wolburg, 1991 ; Willis et al., 2004). En effet, la culture de cellules endothéliales, soit en milieu conditionné par les astrocytes, soit en présence d'astrocytes, a mis en évidence l'induction de nombreuses caractéristiques des cellules de la BHE : la formation des JS (Wolburg et al., 1994), l'induction des transporteurs et des pompes d'efflux (Chishty et al., 2002 ; Dehouck et al., 1994 ; Hayashi et al., 1997 ; Kido et al., 2002) et l'induction d'activités enzymatiques (Beck, Roberts, et Olson, 1986 ; Pakaski et Kasa, 1992). Les astrocytes permettent également la régulation de la perméabilité aux monocytes entrant dans le SNC dans un contexte inflammatoire (Che et al., 2001 ; Song et Pachter, 2003 ; Stamatovic et al., 2005). De plus, les astrocytes jouent un rôle d'intermédiaire des neurones dans les régulations extemporanées de la perméabilité de la BHE (Ballabh, Braun, et Nedergaard, 2004).

Le rôle des péricytes est moins bien défini, mais ils seraient impliqués dans l'induction et le maintien des propriétés de la BHE via une de leurs protéines, l'angiopoïétine, qui induit l'expression endothéliale d'occludine, protéine majeure des JS de la BHE (Hori et al., 2004) et la surexpression d'une protéine de jonction intercellulaire, l'AHNAK (Gentil et al., 2005). Tout comme les astrocytes, les péricytes sont également impliqués dans l'expression des pompes à efflux (Dohgu et al., 2005). Par ailleurs, grâce à leur propriété de contractilité, les péricytes jouent un rôle dans la régulation du flux sanguin et peuvent développer une activité macrophagique au sein du SNC (Rucker, Wynder, et Thomas, 2000).

Les JS sont responsables de la faible perméabilité paracellulaire et de la haute résistivité électrique de la BHE (Romero et al., 2003). De nombreuses protéines en liaison avec les cytosquelettes d'actine des cellules adjacentes contribuent à la formation de ces jonctions (**Figure 13**).

Les protéines transmembranaires sont les protéines d'adhérence JAM (Junctional Adhesion Molecules), l'occludine et les claudines. La fonction des protéines JAM reste très peu connue en dehors de leur rôle structural, excepté qu'elles pourraient réguler la migration transendothéliale des leucocytes (Del Maschio et al., 1999). L'occludine, quant à elle, n'est pas essentielle à la formation des JS mais une diminution de son expression est

corrélée avec une perte de fonctionnalité de la BHE (Bolton, Anthony, et Perry, 1998). En effet, la partie C-terminale intracytoplasmique de cette protéine est associée au cytosquelette cellulaire via d'autres protéines cytosoliques, favorisant l'imperméabilité paracellulaire aux molécules de faible poids moléculaire (Balda et al., 1996 ; Fanning et al., 1998). Plus de vingt-quatre claudines ont été identifiées chez les mammifères (Van Itallie et Anderson, 2004) et ce sont les claudines -1, -3, -5 et -12 qui ont été localisées au niveau de l'endothélium vasculaire de la BHE (Morcos et al., 2001 ; Nitta et al., 2003 ; Wolburg et al., 2003). La présence d'occludine limitée aux seules jonctions où les claudines sont préalablement présentes montre que ces dernières sont à l'origine de la formation des JS et que l'occludine agit ensuite comme un support structural (Kubota et al., 1999).

En plus des protéines transmembranaires, plusieurs protéines cytosoliques sont associées au domaine cytoplasmique de ces dernières et jouent un rôle d'intermédiaire avec l'actine du cytosquelette. Les protéines *zonula occludens* (ZO)-1, -2 et -3 sont des protéines interagissant avec l'occludine et les claudines (Haskins et al., 1998 ; Itoh et al., 1999); mais au niveau de la BHE, seules ZO-1 et ZO-2 ont été mises en évidence. Les autres protéines sont : la cinguline, l'AF-6, l'antigène 7H6, la protéine JACOP et la protéine MUPP-1 (Multi-PZD domain protein 1). Des protéines MAGI (Membrane associated guanylate kinase protein with inverted domain structure) sont également associées aux JS mais aucune n'est présente au niveau des cellules endothéliales de vaisseaux (en dehors de MAGI-1 au niveau de la veine ombilicale (Wegmann et al., 2004)). Les protéines ZO sont indispensables à la stabilité et au maintien de la fonction des JS (Mark et Davis, 2002) mais jouent également un rôle dans la transmission du signal entre l'intérieur de la cellule et la JS ou vice versa (Balda et Matter, 2000 ; Gottardi et al., 1996).

La présence de JS au sein de la BHE réduit fortement la perméabilité paracellulaire et seules des molécules hydrophiles et de petite taille peuvent traverser cette barrière par diffusion paracellulaire, les autres molécules devant utiliser une voie transcellulaire (**Figure 14**). Lorsqu'une molécule traverse la cellule suivant un gradient de concentration, on parle de diffusion passive. Le caractère lipidique des membranes cellulaires n'autorise l'utilisation de cette voie que pour les molécules suffisamment lipophiles. Le transport de molécules peut également être médié par des transporteurs selon, soit un mécanisme de

diffusion facilitée suivant un gradient de concentration, soit un transport actif consommant de l'énergie. Enfin, les molécules peuvent franchir la BHE par transcytose composée d'une étape d'endocytose au niveau de la membrane luminale suivie d'un trafic vésiculaire au sein de la cellule, puis d'une étape d'exocytose au niveau de la membrane abluminale. Néanmoins, des systèmes d'efflux empêchent le franchissement de la BHE par certaines substances dont la lipophilie permet une diffusion transmembranaire. Les protéines participant à ce transport actif, telles que la P-glycoprotéine (Biedler et Riehm, 1970) assurent l'efflux de composés très variés dont de nombreuses molécules médicamenteuses.

Cette brève revue bibliographique, nous a permis d'élaborer notre problématique : face à une menace de résurgence de la variole, la possibilité de recours à la vaccination antivariolique est un élément capital. Les vaccins utilisés historiquement ont fait preuve de leur efficacité, permettant l'éradication mondiale de cette maladie, mais ont par ailleurs été responsables de nombreuses complications post-vaccinales pour lesquelles peu de traitements efficaces sont disponibles. Dans ce contexte, la recherche scientifique fait face à deux nouveaux enjeux : la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques inhibant efficacement la réplication virale des OPVs et la mise au point de nouveaux vaccins répondant d'une part aux exigences actuelles de BPF et présentant d'autre part moins de contre-indications et de complications post-vaccinales.

C'est dans cette perspective que nous avons réalisé les travaux dont la description suit. A partir du clonage du vaccin antivariolique historique, nous nous sommes dans un premier temps attachés à étudier la séquence génomique de la souche *Lister*, qui au début de ce travail de thèse ne l'avait pas été, et ce dans le but de permettre à la communauté scientifique de disposer d'une base de travail propre à cette souche. Dans un second temps, nous avons étudié la diversité phénotypique de la population virale pour évaluer l'intérêt du développement d'un vaccin monoclonal issu de cette souche et si possible identifier la présence de clones viraux expliquant l'apparition de certaines complications post-vaccinales. Dans un troisième temps nous avons approfondi la problématique de l'EPPV afin de comprendre l'origine de cette complication. Pour cela nous nous sommes interrogés sur les capacités de franchissement de la BHE par le VACV, et après avoir

étudié l'interaction *in vitro* du virus avec les cellules endothéliales de la BHE, nous avons observé les conditions d'entrée *in vivo* du virus dans le SNC.

CHAPITRE II :
RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Clonage du vaccin antivariolique de première génération

Ce travail de thèse a débuté par le clonage du vaccin antivariolique de première génération. Ce clonage avait pour but d'isoler au sein de la population vaccinale, un maximum de clones viraux différents, permettant par la suite l'étude de la diversité phénotypique et génétique de la population virale. A l'issue de leur caractérisation, un clone viral représentatif de la population dont il était issu, a été sélectionné et son génome a été séquencé.

Le clonage a été réalisé sur culture de cellules par carottage en agarose des plages de lyse. Dans un premier temps il a été nécessaire de choisir la lignée cellulaire la plus adaptée à l'étude. La première étape étant d'étudier le comportement phénotype *in vitro* des différents clones viraux afin d'évaluer leur virulence, le choix s'est porté sur des cellules d'origine humaine diploïdes MRC-5, autorisées pour la production de vaccins. Avant d'être cloné, le vaccin (lot X5533 sanofi-pasteur) a été titré par dilutions successives d'ordre 4 sur les cellules MRC-5 et les cellules simiennes BHK-21 utilisées pour la production des formes virales purifiées. En effet, les cellules MRC-5 sont des cellules qui ont un faible coefficient de division et qui sont difficiles à cultiver en grande quantité, contrairement aux cellules BHK-21. Le titre obtenu était de 8,6 log DICT₅₀/mL sur cellules MRC-5 et 7,4 log DICT₅₀/mL sur cellules BHK-21. Afin d'isoler des clones viraux, il a été nécessaire de définir une concentration à laquelle le vaccin devait être utilisé pour infecter les cellules. Pour cela, des essais d'infection de cellules MRC-5 en plaques 6 puits en milieu RPMI 1640 Glutamax contenant 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1,2 % agarose ont été réalisés avec des dilutions successives (10⁻⁴ à 10⁻⁸) du vaccin : la dilution de 5.10⁻⁷ était la plus favorable pour obtenir cinq à dix plages de lyses par puits de 35 mm².

Pour réaliser le clonage, cent boîtes de culture de 35 mm² ont été infectées puis incubées en milieu 1,2 % agarose à 37°C. Dans le but d'isoler des clones thermorésistants, vingt autres boîtes ont été infectées puis incubées à 39,5°C. Cinq jours p.i., cent clones ont été isolés à 37°C et vingt clones à 39,5°C. Chaque clone a ensuite été individuellement

sous-cloné trois fois afin d'assurer l'isolement de chaque virus. Au cours de ces trois sous-clonages, la pression de sélection a été maintenue pour les clones précédemment isolés à 39,5°C. A l'issue des sous-clonages, quatre vingt quatre clones viraux ont été obtenus. Un stock départ de chacun des clones a été produit et titré sur cellules MRC-5. Par la suite toutes les expérimentations ont été réalisées à partir de ce stock, ceci afin d'éviter toute mutation du virus par passages successifs sur culture de cellules.

Les caractéristiques phénotypiques de ces clones ont été étudiées afin d'évaluer la diversité de la population virale du vaccin et un clone a été sélectionné pour sa similitude avec le vaccin polyclonal comme référent de la souche *Lister* pour permettre le séquençage de son génome.

2. Séquence génomique du virus de la vaccine souche *Lister*

Les origines du VACV sont confuses à cause des nombreuses sources de virus et des différentes méthodes de propagation et de distribution durant les siècles d'utilisation (Bazin, 2000). De plus, la comparaison de l'efficacité et de la pathogénicité des différentes souches vaccinales, suggère une hétérogénéité significative. La connaissance des séquences génomiques de ces différentes souches devrait aider à la compréhension des spécificités de virulence et d'immunogénicité, à travers l'identification de modifications génomiques spontanées qui pourraient être responsables de l'expression de propriétés distinctes.

De nombreuses séquences génomiques de VACVs étaient déjà disponibles, dont la séquence d'une souche *Lister* japonaise (VACV-LO) (Morikawa et al., 2005). La souche *Lister* a été principalement utilisée en Europe lors de la campagne d'éradication de la variole mais a également été produite au Japon. Notre travail a porté sur le séquençage génomique d'un clone issu de la souche *Lister* française (VACV-List) afin de comparer cette séquence à celle de VACV-LO et d'autres OPVs. Ce travail a été mené dans le but de situer la souche française au sein des autres souches de VACVs et ainsi de caractériser ses spécificités.

Ce travail de séquençage a été réalisé sur l'ADN viral isolé du clone 107 qui avait préalablement été sélectionné comme clone de référence. En effet, l'étude des caractères

phénotypiques de ce clone, présentée dans la troisième partie intitulée « Diversité de la population virale du vaccin antivariolique de première génération » (*se conférer à la page 107*), a permis de distinguer ce clone dont le comportement est le moins éloigné de celui de la population vaccinale non clonée.

2.3 Résultats

Article 1

Genomic Sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparaison to other Orthopoxviruses
publié dans *Journal of General Virology*

Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses

Aude Garcel,¹ Jean-Marc Crance,¹ Robert Drillien,^{2,3} Daniel Garin¹ and Anne-Laure Favier¹

Correspondence

Daniel Garin
DanielGarin@wanadoo.fr

¹Laboratoire de Virologie, CRSSA Emile Pardé, La Tronche, France

²IGBMC, CNRS, UMR 7104, Inserm U 596, F-67400 Illkirch, France

³Université Louis Pasteur, F-67000 Strasbourg, France

Since 1980 there has been global eradication of smallpox due to the success of the vaccination programme using vaccinia virus (VACV). During the eradication period, distinct VACV strains circulated, the Lister strain being the most commonly employed in Europe. Analysis of the safety of smallpox vaccines has suggested that they display significant heterogeneity. To gain a more detailed understanding of the diversity of VACV strains it is important to determine their genomic sequences. Although the sequences of three isolates of the Japanese Lister original strain (VACV-LO) are available, no analysis of the relationship of any Lister sequence compared to other VACV genomes has been reported. Here, we describe the sequence of a representative clonal isolate of the Lister vaccine (VACV-List) used to inoculate the French population. The coding capacity of VACV-List was compared to other VACV strains. The 201 open reading frames (ORFs) were annotated in the VACV-List genome based on protein size, genomic localization and prior characterization of many ORFs. Eleven ORFs were recognized as pseudogenes as they were truncated or fragmented counterparts of larger ORFs in other orthopoxviruses (OPVs). The VACV-List genome also contains several ORFs that have not been annotated in other VACVs but were found in other OPVs. VACV-List and VACV-LO displayed a high level of nucleotide sequence similarity. Compared to the Copenhagen strain of VACV, the VACV-List sequence diverged in three main regions, one of them corresponding to a substitution in VACV-List with coxopox virus GRI-90 strain ORFs, suggestive of prior genetic exchanges. These studies highlight the heterogeneity between VACV strains and provide a basis to better understand differences in safety and efficacy of smallpox vaccines.

Received 13 November 2006

Accepted 5 March 2007

INTRODUCTION

In the past, smallpox was a deadly human disease because of infection by variola virus (VARV). Complete eradication of smallpox was announced in 1980 subsequent to the WHO sponsored global vaccination programme using vaccinia virus (VACV) (Breman & Arita, 1980; Fenner, 1982). VACV and VARV both belong to the genus *Orthopoxvirus* (OPV) within the family *Poxviridae* and encode numerous common antigens, a fact that accounts for the cross protection observed upon smallpox vaccination. In recent years, VACV has attracted renewed attention as it could once again be used in mass vaccination

against smallpox, due to the rise in bioterrorism threats around the world (Henderson, 1999a, b; Levy-Bruhl & Guerin, 2001; Mahalingam *et al.*, 2004).

OPVs are large double-stranded DNA viruses (~180–225 kbp) encompassing about 200 open reading frames (ORFs). Many OPV proteins are involved in transcription or replication of the viral genome, and assembly of viral particles in the cytoplasm. A number of other proteins are involved in the inhibition of the host antiviral defence. There still remain some ORFs whose functions in the viral life cycle are unknown. Due to the complexity of poxvirus genomes, their intricate life cycle and their ability to successfully disrupt strategic steps in the host antiviral response (McFadden *et al.*, 1995; Nash *et al.*, 1999), questions concerning immunogenicity, virulence and host range of VACV strains have only been partially answered.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the sequence reported in this paper is DQ121394.

Supplementary material is available with the online version of this paper.

Poxvirus genome sequences can help in understanding virulence and immunogenicity particularly through the identification of spontaneous genomic modifications such as gene deletions and mutations that may entail distinct properties.

Complete genomic sequences have been reported for a number of OPVs, which are available online both at www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank and www.poxvirus.org. So far the sequences of ten VACV strains are public: Copenhagen (VACV-COP) (Goebel *et al.*, 1990), two modified vaccinia Ankara isolates (VACV-MVA) (Antoine *et al.*, 1998), Western Reserve (VACV-WR) (J. J. Esposito and others, unpublished), Tan-Tian (VACV-TIA) (Q. Jin and others, unpublished), the Japanese Lister original strain (VACV-LO) and two thermosensitive clones of VACV-LO (LC16mO and LC16m8) (Morikawa *et al.*, 2005), the DryVax derived isolate VACV-3737 (R. K. Wilson and others, unpublished), the Acambis clone 2000 strain (J. J. Esposito and others, unpublished), the Duke strain (Li *et al.*, 2006) and the rabbitpox virus Utrecht strain (RPXV-UTR) whose sequence demonstrated that it is a genuine VACV strain (Li *et al.*, 2005). Very recently, the horsepox virus genome (horsepox virus MNR-76 strain, HSPV-MNR-76) was sequenced and found to be closely related to VACVs and RPXV (Tulman *et al.*, 2006). We also felt that it would be valuable to obtain the genomic sequence of the VACV Lister strain (VACV-List), commonly used in Europe during the smallpox eradication period. As this strain was initially produced at the Lister Institute located in Elstree in the UK it is also sometimes referred to as the Elstree strain. Available records document a VACV-List stock established in the UK in 1961 on sheep and then a master seed stock prepared by two passages on calves. A master seed stock of calf lymph was sent to centres in Paris, Tokyo, Atlanta and Moscow and was also provided to manufacturers worldwide. The VACV-List used in the work described here comes from a batch of vaccine prepared in 1978 at the Institut Mérieux in Marcy l'Étoile, France. This virus, obtained from the Lister Institute in 1965, was used for routine vaccine production by scarification of calves until manufacturing was stopped.

This study presents the genomic sequence and analysis of a clonal isolate of VACV-List. The data have enabled comparison of the ORFs of the VACV-List genome to that of other VACV strains including the Japanese Lister strains that have been previously sequenced and annotated (Morikawa *et al.*, 2005). The results highlight a number of major sequence differences within the isolates of the *Vaccinia virus* species and provide a better understanding of the relationship between VACV-List and other OPVs.

METHODS

Cells and viruses. MRC-5 cells (diploid human lung fibroblasts; Biomérieux Laboratories) were grown in RPMI 1640 medium (Gibco). BHK-21 cells (hamster kidney cells, ATCC CCL 10) were grown in Glasgow minimum essential medium (Gibco) supplemented

with 10% tryptose phosphate (Sigma) and 50 mM HEPES (Gibco). Vero cells (African green monkey kidney cells, ATCC CCL 81) were grown in minimal essential medium (Gibco). For cell culture, all media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), whereas virus infections were supplemented with 5% FBS and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). The French smallpox vaccine Lister strain (X55-33), provided by Sanofi-Pasteur-France, was cloned by five plaque purifications on the MRC-5 cell line. Clones were propagated and titrated on MRC-5 cell monolayers. Phenotypic studies (plaque size, replication kinetics and yield) were first performed *in vitro* on 120 clones. Ten of these clones that displayed phenotypes typical of the diversity in the 120 clones were then selected for virulence studies performed *in vivo* (neuropathogenesis and virus replication in the brains of suckling mice after intra-cranial injection) and finally one clone (VACV-List-107) was selected as the reference strain because of its similarity to the uncloned vaccine (A. Garcel, J. Perino, J.-M. Crance, R. Drillien, D. Garin and A.-L. Favier; unpublished data). VACV-List-107 was produced on BHK-21 cells and purified using standard procedures described previously by Lee *et al.* (2001).

DNA sequencing. DNA from VACV-List-107 was cleaved by Hydro-shear (GeneMachines). Using the Klenow and T4 DNA polymerases (Promega) blunt-ended DNA fragments were produced and cloned into pUC18 previously digested by *Sma*I. Plasmid DNA extractions were performed using 96-multiwell Multiscreen Plasmid (Millipore) by alkaline lysis followed by filtration. Fragments were sequenced by the Sanger method (Sanger *et al.*, 1977) on an Applied Biosystems model 3730 Sequencer, using plasmid, primers and BigDyeTerminators premix (Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol (Lee *et al.*, 1997). At the end of the acquisition, raw data were analysed automatically by the Sequencing Analysis 5.0 Applied Biosystems software. Primer walking was performed to fill gaps and to confirm the order of the pre-assembled contigs. The terminal hairpin loops have not been sequenced. A major sequence of 184 030 bp in length and two minor contigs of 3170 and 3771 bp around the left inverted terminal repeats (ITR) were obtained with a minimal fivefold redundancy for each base position, and were linked through their overlapping regions to obtain a final sequence of 189 421 bp.

DNA sequence analysis. Coding sequences (CDS) were identified with GenoAnnot software of the GenoStar platform (Chalifa-Caspi *et al.*, 2003, 2004). Two PROKOV matrixes were constructed with a complexity level (k-uptle) of 5 and a minimal CDS length of 90 and 120 bp. Then, the CDS were determined with a score threshold of 90.0. For confirmation, predicted CDS were compared to three databases (including the GenPept, SWISS-PROT, PIR, PDF, PDB and NCBI RefSeq 'nr' sequence database) using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLASTX (with an E-value $<1.10^{-5}$) (Altschul *et al.*, 1990). Annotation was performed by comparison with NCBI BLASTP results using five protein sequence databases, including the poxvirus database, SWISS-PROT database, 'cog' database and 'nr' database. The BLASTP analysis was performed on the total CDS. An ORF was annotated 'similar to' if it contained more than 98% identical amino acids; otherwise it was annotated 'related to'.

Dotplot analysis of OPV strains. Dotplots were created by the Dotter program with the GenBank nucleotide sequence of VACV-List plotted on the horizontal axis and the complete nucleotide sequences of either VACV-COP, variola virus India strain (VARV-IND), cowpox virus GRI-90 strain (CPXV-GRI) or monkeypox virus Zaire strain (MPXV-ZAI) plotted on the vertical axis (Sonnhammer & Durbin, 1995).

VACV-List comparison to VACV-LO. Orthologues of VACV-List ORFs were searched by nucleotide sequence alignment in the VACV-LO sequence. VACV-LO ORFs were translated using the

A. Garcel and others

Clone Manager program and compared to VACV-List orthologues. Amino acid differences found to lie within different amino acid groups are reported in Table 1 and Supplementary Table S2 (available in JGV Online). These amino acid groups are: hydrophobic amino acid (A, G, I, V and L), basic amino acid (R and K), acid amino acid (D and E), aromatic amino acid (T, F and W), neutral amino acid (S and T) and hydrophilic amino acid (N and Q).

Phylogenetic analyses of multiple OPV DNA sequences. Three phylogenetic analyses were performed. First, the nucleotide sequences

of 17 genes present in 15 OPVs were aligned (Gubser *et al.*, 2004). For each virus, genes were concatenated to form a single sequence with the following order: *E9L*, *I7L*, *I8R*, *G9R*, *J3R*, *J6R*, *H2R*, *H4L*, *H6R*, *D1R*, *D5R*, *D6R*, *D11L*, *D13L*, *A7L*, *A16L* and *A24R* according to the VACV-COP nomenclature. Secondly, nine full-length nucleotide sequences of different OPV genomes were aligned [VACV-List, VACV-LO, VACV-WR, VACV-3737, VACV-COP, CPXV-GRI, cowpox virus Brighton strain (CPXV-BR), RPXV-UTR and HSPV-MNR-76]. Third, the nucleotide sequence of genes involved in the interferon (IFN)-mediated response were concatenated to form a single

Table 1. Main amino acid differences between VACV-List and VACV-LO

Protein lengths in VACV-List (second column) and in VACV-LO (third column) are indicated. Amino acid substitutions are indicated by their position (fourth column). Peptide alignments containing amino acid deletions and mutations are in bold characters. Conserved mutations despite the VACV-LO nucleotide sequence polymorphism are in italics.

Protein	List aa	LO aa	VACV-List versus VACV-LO mutations	Comments	References
List009	140	140	S29L	The secreted protein is an O-glycosylated protein. The S29L change could entail a lack of one glycosylation site in VACV-LO.	Lin <i>et al.</i> (1990)
List023	512	512	<i>F99S</i> ; <i>K283E</i>	The VACV-LO protein contains a glutamic acid at position 283, as in VACV-COP, which is inside the kelch-domain (aa 261–307), whereas it is replaced by a lysine in List023.	Pires de Miranda <i>et al.</i> (2003)
List055	190	190	N11D	The mutation N11D observed appears in the first α -helix (11–68 aa), which is responsible for enzyme binding to Z-DNA.	Kahmann <i>et al.</i> (2004)
List091	333	333	G331S	The methyltransferase is modified (G331S) in the domain thought to bind to List098 (RAP94) in the RNA polymerase complex.	Mohamed <i>et al.</i> (2001)
List102	844	844	<i>L236P</i> ; N325S	The mRNA triphosphatase is not altered in the active site or in the GTP-binding domain but the substitution of a proline at position 236 (which is encoded in other OPVs) to a leucine for VACV-List, could have an impact on the structure of the protein.	Niles & Christen (1993)
List124	99	108	List 79-N————— <i>DGSNN-84</i> LO 79-NANTNNDNSNSNSNN-93	Three glycosylation sites were described in the intracellular mature virus membrane protein. The first site is deleted in the VACV-List protein, which is shorter than in VACV-LO, and the second site is absent due to an amino acid divergence with VACV-LO.	Yeh <i>et al.</i> (2000)
List152	221	221	N76D	The protein, corresponding to VACV-COP A36, was shown to be involved in CEV production, but D ⁷⁶ , common among A36 of VACVs is replaced by N in VACV-List.	Herrero-Martinez <i>et al.</i> (2005)
List175	313	315	LIST 248- <i>HDTY</i> -NDTVPSTT-259; 299- <i>ICNK</i> -302 LO 248- <i>YDTY</i> NDNDTVPPPTT-261; 301- <i>IYNK</i> -304 *LIST 244- <i>DDADLHD</i> -249; 257- <i>S</i> ; 300- <i>C</i> *LO 243- <i>D</i> ————— <i>D</i> -244; 252- <i>P</i> ; 295- <i>Y</i>	The haemagglutinin protein is modified in its palmitoyl-cysteine acceptor described by Grosenbach <i>et al.</i> (2000).	Grosenbach <i>et al.</i> (2000)

*Indicates that amino acid difference is found only with respect to the polymorphic sequence.

sequence with the following order: *C12L*, *N1L*, *K3L*, *E3L*, *B13R*, *A46R*, *A52R*, *B8R* and *B18R* according to the VACV-COP nomenclature, and were aligned for the same nine viruses. Sequence alignment was performed by the BioEdit program using Blossum62 similarity matrix. Pairwise gap removal or global gap removal were performed to exclude gaps from alignments and construct the two concatenated trees and the full-length genome tree, respectively. For alignments, neighbour-joining and maximum-likelihood trees were constructed using the program Phylo-Win (Galtier *et al.*, 1996) with a Kimura model. The robustness of trees was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. As VACV-LO was not annotated, gene sequences were extracted from the complete GenBank genome using VACV-List start and stop sequences.

Sequence availability. The VACV-List genome sequence has been deposited in the GenBank database under the accession no. DQ121394. The other OPV genomes used for comparison or for phylogenetic analysis were obtained from GenBank: VACV-COP, M35027 (Goebel *et al.*, 1990); VACV-LO, AY678276 (Morikawa *et al.*, 2005); VACV-WR, AY243312; VACV-3737, DQ377945; VACV-DUKE, DQ439815 (Li *et al.*, 2006); variola virus Bangladesh strain (VARV-BSH), L22579 (Massung *et al.*, 1994); VARV-IND, X69198 (Shchelkunov *et al.*, 1995); variola virus Garcia strain (VARV-GAR), Y16780 (Shchelkunov *et al.*, 2000); RPXV-UTR, AY484669 (Li *et al.*, 2005); MPXV-ZAI, AF380138 (Shchelkunov *et al.*, 2002); ectromelia virus Moscow strain (ECTV-MOS), AF012825 (Chen *et al.*, 2003); camelpox virus CMS strain (CMLV-CMS), AY009089 (Gubser & Smith, 2002); camelpox virus M-96 strain (CMLV-M-96), AF438165 (Afonso *et al.*, 2002); CPXV-BR, AF482758; CPXV-GRI, X94355; HSPV-MNR-76, DQ792504 (Tulman *et al.*, 2006).

RESULTS AND DISCUSSION

VACV-List genome content and topography

The VACV genome is a double-stranded DNA molecule with covalently joined termini (Geshelin & Berns, 1974) and telomeric regions that are identical but inverted in sequence, designated ITRs. For our analysis, the VACV-List strain, employed as a smallpox vaccine in France, was first cloned by several rounds of plaque purification in MRC-5 cells. Viral DNA was then extracted from one isolate phenotypically characteristic of the parental population. The sequence deposited in GenBank is 189 421 bp in length (33.8% G + C residues) and the leftmost nucleotide was arbitrarily set to base 1. Upon initial analysis of the CDS, all ORFs longer than 30 codons were considered to potentially encode proteins (Tulman *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2005). This analysis yielded 285 CDS from which only 201 were actually annotated for their coding potential after taking into account their size and genome localization (Supplementary Table S1 available in JGV Online). Thus, the 285 CDS initially identified were first classified into 'expressed genes' ($n=156$) known from the literature to generate specific proteins and 'putative' genes ($n=62$) for which no evidence of expression was available. Comparison of the amino acid size of the 'expressed' gene population (mean \pm SEM: 297.3 ± 17.4 aa) to the 'putative' gene population (mean \pm SEM: 127.7 ± 9.6 aa) showed that genes in the former group are significantly larger than those in the latter ($P < 0.0001$, Unpaired *t*-test) (Supplementary

Fig. S1). In this way, 84 CDS were rejected if their size was smaller than the smallest size of expressed proteins and/or if they were entirely localized within a larger ORF known to be expressed. As any set of criteria carries a degree of arbitrariness, some real genes might have been missed. Each of the 201 annotated ORFs was subjected to similarity searches by BLASTX analysis. ORFs were numbered from 001 at the left end to 201 at the right end and are listed in Supplementary Table S1 (available in JGV Online). The best BLASTP alignment result was selected to annotate the ORFs. The vast majority of ORFs, annotated 'similar to' ($n=192$), displayed more than 98% amino acid sequence identity to previously identified ORFs. All other ORFs, annotated 'related to' ($n=9$), displayed between 70 and 98% amino acid sequence conservation as compared to known ORFs. Proteins were classified by function and those with undefined functions were annotated 'unknown', whereas 53 ORFs for which there is no proof of protein expression were annotated 'putative'. It could not be excluded that some ORFs classified in the putative gene group do not encode any protein, however this group, by definition, included ORFs larger in size than the smallest 'expressed' ORFs. Historically, since the first VACV-COP genome annotation, some additional ORFs have been annotated (i.e. VACV-COP *A-ORF-A*). For the majority of these ORFs there is no evidence that they are expressed, and using the criteria defined above many of them have been rejected. The organization of VACV-List ORFs is the same as that described for other poxviruses (Gubser *et al.*, 2004): ORF orientation in the ITR is generally directed towards the hairpin ends and central ORFs are directed in both orientations.

At least nine ORFs could be recognized throughout the VACV-List genome as pseudogenes (ITR genes were counted only once) because their coding regions were truncated or fragmented by deletions and stop codons in a manner such that they were smaller than orthologous ORFs found in other OPVs. Except for a few exceptions, these pseudogenes (labelled with an asterisk in Supplementary Table S1 and hereafter) are also pseudogenes in other VACV strains. Of the three pseudogenes localized in the ITR, *List002** (*List200**) encodes a severely truncated version of the tumour necrosis factor (TNF) receptor of CPXV (*CrmB*), whereas *List003*A-B-C-D* (*List199*A-B-C-D*) and *List004*A-B* (*List198*A-B*) encode smaller versions of proteins of unknown function in VARV and CPXV, respectively. *List014*A-B-C-D-E* encodes a fragmented version of a CPXV host range gene (*V025*) that is entirely deleted in one VACV strain (VACV-COP) and fragmented in a different manner in others. *List141*A-B-C-D-E* corresponds to an A-type inclusion protein (ATI) similar to *A26L* of CPXV-GRI (160 kDa protein) but truncated as in all VACV strains, as well as in VARV, CMLV and MPXV strains (Amegadzie *et al.*, 1992; Meyer & Rziha, 1993). Nevertheless, the 725 aa N-terminal fragment could be expressed as an intracellular 94 kDa protein (de Carlos & Paez, 1991). *List171** lacks an initiation codon that is

A. Garcel and others

found in its VACV-COP *A54L* counterpart although it is uncertain whether the latter is actually expressed in the virus life cycle. *List190**A-B** corresponds to a serine protease inhibitor (SPI-2) and its sequence, including one stop codon, is similar to the entire *VACWR195* gene of VACV-WR or to the sum of VACV-COP *B13R* and *B14R*. *In vitro*, SPI-2 prevents the cleavage of pro-interleukin (IL)-1 β into mature interleukin-1 β by inhibiting interleukin-1 β converting enzyme (Kettle *et al.*, 1997). In the murine dermal ear model this protein influences the outcome of infection (Tscharke *et al.*, 2002), while it has no effect in the murine intranasal model (Kettle *et al.*, 1995). *List194** encodes a shortened version of a type I IFN-binding protein found in most OPVs including some VACV strains. It should be mentioned that even if a gene is fragmented, the N-terminal portion of the protein may be expressed as

described for *VACWR148* of VACV-WR by Chung *et al.* (2006) and for a portion of the ATI protein of some VACV strains that can cross-react with antiserum (Patel *et al.*, 1986) but in most cases these truncated versions are no longer functional.

The organization of the VACV-List genome is overall the same as other VACVs (Fig. 1). ORFs within the ITRs are of course in duplicate, while all others are unique. ORFs within the middle of the VACV-List genome are highly conserved among poxviruses with most of them being involved in essential replication and structural functions, whereas host-range genes responsible for virulence and immunomodulation are localized in the variable regions at both ends. This variability is most likely related to adaptation of each OPV species to its natural host.

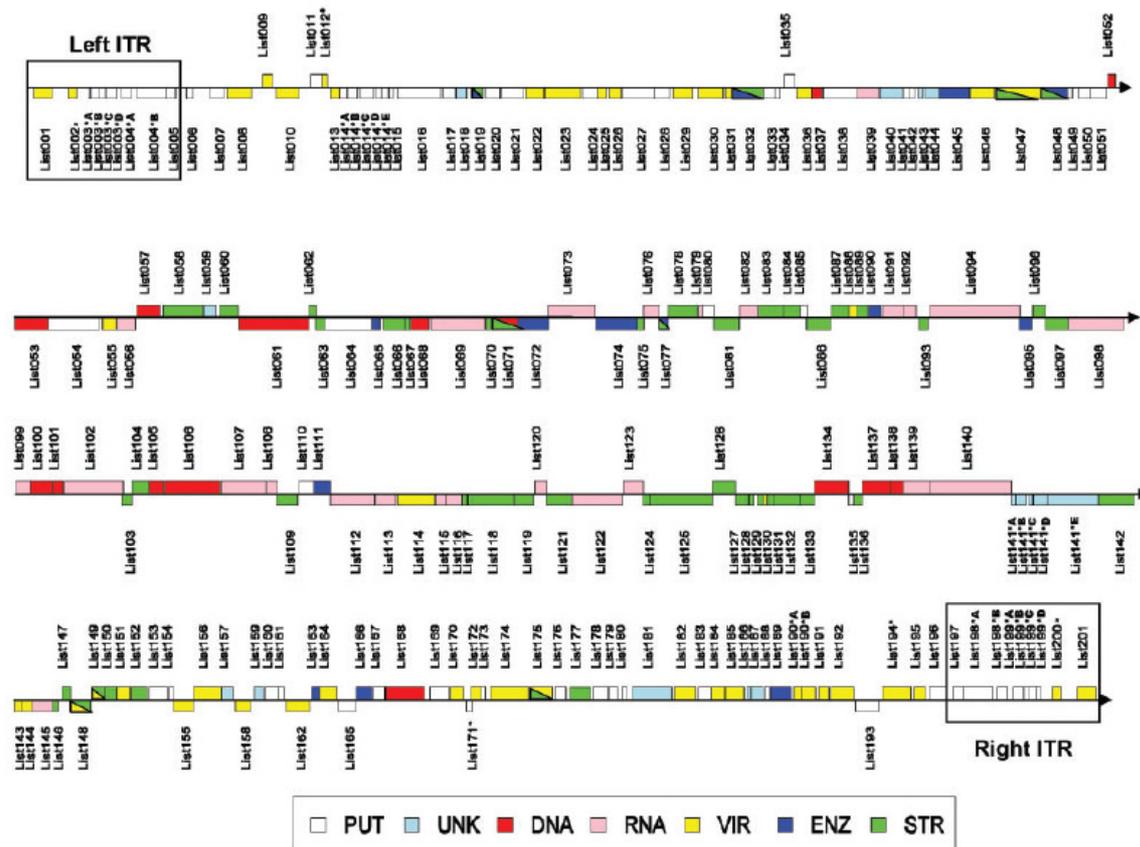


Fig. 1. ORF map of the VACV-List strain. The ORFs transcribed rightward and leftward are presented above and below the horizontal centreline, respectively. ORF functions were predicted using BLASTP searches in several databases and are represented in differently coloured boxes: PUT, putative gene; UNK, unknown function; DNA, replication and nucleotide metabolism; RNA, transcription and modification; VIR, virulence, host-range and immunomodulation; ENZ, other enzyme; STR, structure and assembly.

Comparison of VACV-List to OPVs

The nucleotide sequence of VACV-List was aligned with the consensus sequence of VACV-LO. Alignment with this strain was performed preferentially because the nucleotide sequence of the clones derived from it, namely LC16mO and LC16m8, had changed after being selected for their thermosensitivity and low virulence (Morikawa *et al.*, 2005). The sequence of VACV-LO is highly polymorphic since it is not a clonal isolate and it consists of quasi-species of at least eight genotypes (Morikawa *et al.*, 2005). Our analysis showed that VACV-List is more closely related to the VACV-LO consensus sequence than to LC16mO or LC16m8. VACV-LO was used as the main smallpox vaccine in Japan during the eradication period but LC16m8, which forms pockmarks at the site of inoculation and displays temperature sensitivity, was used in children during the 1970s because of its more favourable safety profile (Sugimoto *et al.*, 1985). One hundred and forty three ORFs of LC16mO (the parental strain of LC16m8) showed differences with VACV-List (data not shown), while there are fewer (57 ORFs) differences between VACV-List and VACV-LO (Table 1). One striking example is *List012** which is truncated in the majority of VACV strains except in LC16mO, LC16m8 and RPXV-UTR. The counterpart of *List012** in ectromelia virus is a virulence factor that displays E3 ubiquitin ligase activity (Huang *et al.*, 2004). DNA sequence identity between VACV-List and VACV-LO was found to be 99.6%. Deletions and mutations were not only detected within CDS but also within promoter sequences where they could alter transcription entailing different protein levels. The majority of the nucleotide differences in CDS resulted in no amino acid change. Those nucleotide changes or deletions responsible for amino acid differences, deletions or truncated proteins are reported in Supplementary Table S2 (available in JGV Online). Because of the nucleotide sequence polymorphism of VACV-LO, some of these differences with respect to the consensus sequence are of course not relevant with respect to minor viral populations of VACV-LO. Eight mutations reported in Table 1 are in a structural or functional domain that could potentially be responsible for a protein dysfunction. Insufficient information is available on the other proteins affected by amino acid changes to speculate on their potential consequence. Activity and structural studies would have to be performed to assess the potential role of any of the amino acid substitutions in the virus cycle.

BLASTP comparisons were performed during VACV-List genome annotation to identify the closest poxvirus protein to each ORF. The majority of VACV-List proteins are similar to VACV-COP proteins, but some proteins have a higher similarity with VACV-WR or with other OPV (CPXV, CMLV or RPXV) proteins (Supplementary Table S1 available in JGV Online). Many of the latter ORFs encode putative proteins, whereas some of them belong to virulence and immunomodulation protein families (*List009*, *List013*, *List162*, *List164*, *List172*, *List185*, *List190*A-B*, *List194**, *List195* and *List201*). Two of them

are implicated in the replication complex (*List106* and *List138*) and three are involved in virus assembly (*List109*, *List125* and *List142*).

Recently, a new type of virokinase has been identified by Alejo *et al.* (2006) that contains a smallpox virus-encoded chemokine receptor domain (SECRET domain). This SECRET domain is an independent chemokine-binding site found in both TNF receptor orthologues CrmB, CrmD and in other SECRET domain-containing proteins (SCP). As for other VACV isolates, the VACV-List genome contains CrmB (*List002** or *List200**) but not CrmD. Among the SCP genes, the VACV-List genome contains SCP-1 and SCP-3 genes (*List007* and *List184*), found in other full-length VACV genomes. The gene encoding the SCP-2 protein (*V014* of CPXV-BR) is not present in the VACV-List genome nor in other VACV isolates.

Dotplots were performed to study ORF deletions and rearrangements and obtain a large-scale comparison between VACV sequences and other OPVs. The VACV-List versus VACV-COP dotplot highlights three gaps (Fig. 2a): two are due to ORFs present in VACV-List that are lacking in the VACV-COP genome. The first gap (12 000–15 500 bp) occurs because VACV-List contains five supplementary ORFs: *List011*, *List012** and *List015* encoding putative proteins, *List013* encoding an IL-18-binding protein and *List014** encoding a pseudogene similar to the *V025* gene of CPXV-BR. The second gap (137 000–142 000 bp) corresponds to the pseudogene of the ATI protein (*List141*A-B-C-D-E*) for which only two out of five ORFs have been found in VACV-COP. The third gap (179 000–183 000 bp) corresponds to a short sequence encoding different proteins in VACV-List and VACV-COP: *List195* and *List196* replace VACV-COP *B19R*, *B20R* and *B21R*, respectively. Moreover, the right end of *List194** and the left end of *List199*A-B-C-D* are lacking, indicating that this region is the result of recombination. The *List195* gene is similar to *K3R* of CPXV-GRI and encodes the CrmE TNF receptor that contributes to virulence (Saraiva & Alcami, 2001; Reading *et al.*, 2002). This gene is present in the European and Japanese Lister strains as well as in the USSR and Evans strains (Reading *et al.*, 2002) but is not found in any other sequenced VACV strain, nor in the RPXV genome. The *List196* ORF is similar to *CMP6L* of CMLV-CMS. This ORF is also present in CPXV-GRI (as T1R) and no potential function has been described for the putative protein. Surprisingly, BLASTP alignment underlines a high amino acid similarity (more than 70% identity and more than 80% similarity) over the entire length of the 237 aa *List196* sequence with a transmembrane Bax inhibitor motif-containing protein (238 aa) found in the genomes of several mammalian species including *Homo sapiens*. Such high sequence similarity with cellular genes suggests that the viral gene was captured from the cell genome more recently in the evolution of OPVs than other viral genes. This hypothesis is further supported by the presence of an upstream G+C rich sequence unusual in an OPV promoter. A VACV-List recombinant with a green fluor-

A. Garcel and others

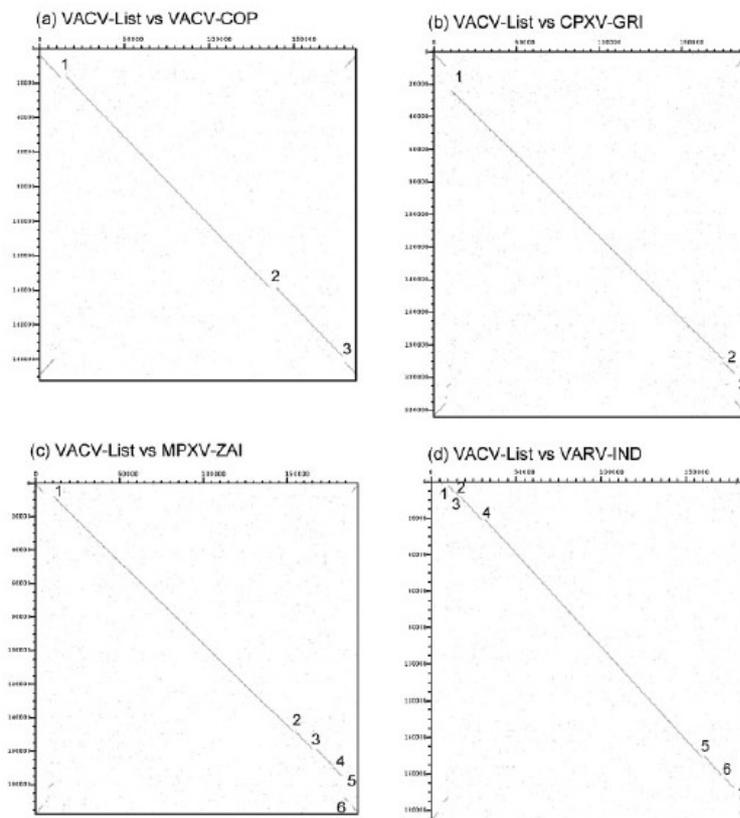


Fig. 2. Dotplot depicting a comparison between VACV-List and other OPV strains. The VACV-List sequence submitted to GenBank (DQ121394) is given on the horizontal axis and compared to the full-length genomes of (a) VACV-COP; (b) CPXV-GRI; (c) MPXV-ZAI; and (d) VARV-IND. Dotplot analysis was performed as described in Methods. Matching sequence includes both left and right hands ITRs. Axes indicate the number of base pairs.

escent protein tag at the 3' end of *List196* failed to display fluorescence in infected cells suggesting that *List196* is a pseudogene (Matthias Hebben, personal communication). Very recently, it has been shown that *List196* encodes an apoptosis inhibitor (Gubser *et al.*, 2007). The *List013* and *List195* ORFs encode proteins that play a role in virulence (an IL-18-binding protein for *List013* and a TNF receptor for *List195*) (Smith *et al.*, 2000; Reading *et al.*, 2002) that are not found in the VACV-COP genome, whereas VACV-COP encodes an IFN-binding protein (B19) not found in VACV-List genome. In addition, a similar gap (corresponding to 179 000–183 000 bp of VACV-List) was detected using the VACV-List versus the VACV-WR dotplot (data not shown). Comparison of this region (from *List194** to *List199*A-B-C-D*) between OPVs is presented in Fig. 3. Overall, VACV-List displays unique features in this region as compared with other OPV genome sequences. In particular, it is the only VACV strain containing orthologues of both the CPXV-GRI *K3R* gene (*List195*) and the CMLV-CMS *CMP6L* gene (*List196*). This observation could reflect either recombination events between VACV-List and the other OPVs or a distinct genealogical filiation.

VACV-COP is most closely related to VACV-List except for two ORFs (*List195* and *List196*) that replace VACV-

COP *B19R*, *B20R* and *B21R* as has already been noted from the dotplot comparison. The dotplot alignment performed between VACV-List and VACV-LO (data not shown) showed that no ORFs were missing between the two genomes.

Dotplots comparing VACV-List to CPXV-GRI, which is more closely related to VACV than CPXV-BR, revealed three major gaps, whereas in the case of MPXV-ZAI and VARV-IND six and seven major gaps were detected, respectively (Fig. 2b, c, d). A more detailed examination of the gap regions is presented as Supplementary material (available in JGV Online).

In conclusion, differences observed among the OPVs analysed result in clusters of ORF rearrangements corresponding to approximately 8% of the VACV-List genome. Ultimately, the distinction between OPV genomes should also be documented by differences in their proteomes.

Phylogenetic relationships

To establish the phylogenetic relationship of VACV-List with other OPVs, we have compared multiple nucleotide sequences conserved in several genomes. Seventeen conserved genes were selected as described by Gubser *et al.* (2004) and alignments were made from concatenated

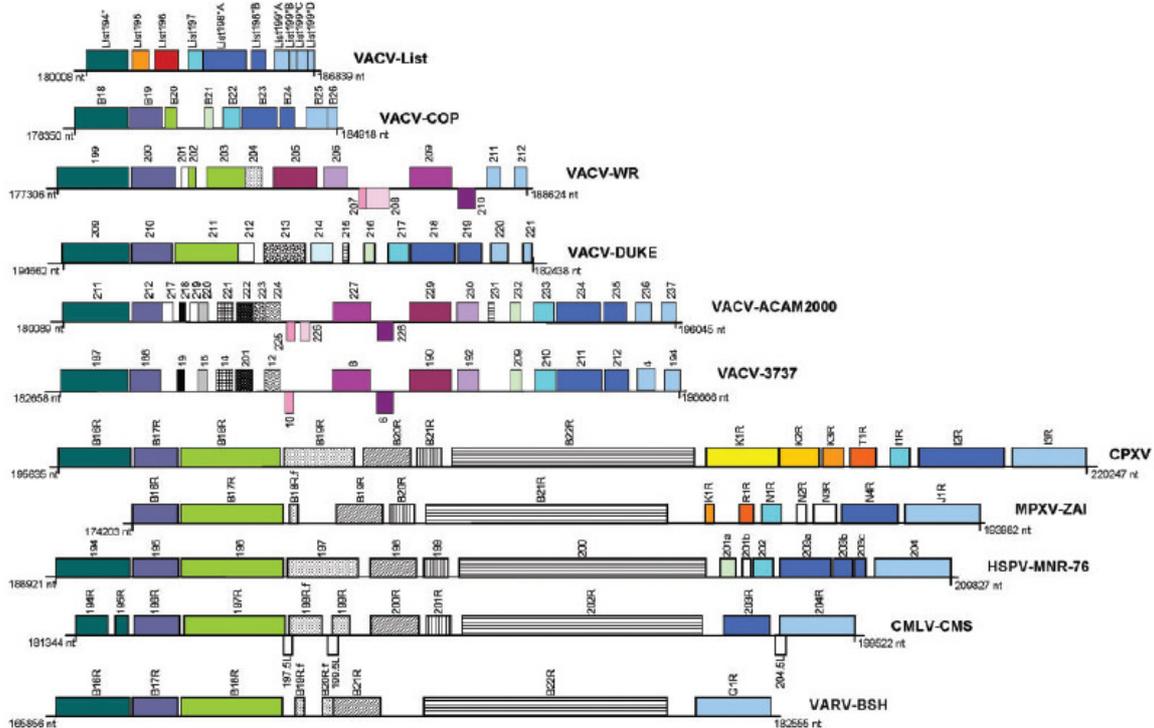


Fig. 3. Comparison of OPVs in the region from *List194** to *List199A-B-C-D*. The ORFs transcribed rightward and leftward are presented above and below the horizontal centreline, respectively. Boxes are coloured identically when the ORFs match. Uncoloured boxes correspond to ORFs that do not match with any VACV ORF in the region described. ORFs are named according to the nomenclature adopted for each virus strain (www.poxvirus.org).

sequences (Fig. 4a). Three clusters are apparent in the genus *Orthopoxvirus*. VARVs (VARV-IND, VARV-BSH and VARV-GAR) are clustered and closely related to CMLVs (CMLV-CMS and CMLV-M-96). ECTV-MOS, CPXV-BR and MPXV-ZAI have diverged and form an ancestral OPV cluster. As described by Gubser *et al.* (2004), the two strains of CPXVs, CPXV-GRI and CPXV-BR, are not closely clustered. The last cluster contains VACV strains such as VACV-List and VACV-LO and includes HSPV-MNR in the same branch.

Among virokines involved in immune evasion, proteins that interfere with the interferon pathway are the most representative in VACVs. To perform a phylogenetic analysis using this family of genes, the nine IFN virokinine genes were selected to produce a nucleotide concatemer: IFN soluble-binding proteins (B8 and B18) (Alcami & Smith, 1995; Alcami *et al.*, 2000), inhibitors of Toll-like receptor signalling (A46 and A52) (McCoy *et al.*, 2005; Stack *et al.*, 2005), an inhibitor of I- κ B degradation (N1) (DiPerna *et al.*, 2004), inhibitors of IL-18 (C12 and presumably B13) (Kettle *et al.*, 1997; Tone *et al.*, 1997; Reading & Smith, 2003) and inhibitors of IFN-induced protein activity (E3 and K3) (Langland & Jacobs, 2002). Distinct

branches were obtained for CPXVs and VACVs, while VACV-COP and VACV-3737 deviated from the other VACV strains (Supplementary Fig. S2 available in JGV Online). As found in the previous alignment, HSPV-MNR-76 was associated with the group containing VACV strains. Although VACVs are clustered together according to this analysis, it has been reported that these strains do not all express the virokines at the same level (Alcami *et al.*, 2000; Symons *et al.*, 2002). To confirm actual differences in IFN-related responses among VACVs strains, comparative proteome analyses and activity profiles would be required.

The full genomic sequences of several VACVs (including RPXV-UTR), HSPV and CPXVs were more closely compared to examine the relationship between CPXV, HSPV and VACV strains (Fig. 4b). This is particularly interesting in view of the fact that during the 19th century VACV is thought to have replaced CPXV or possibly HSPV as a smallpox vaccine. Two major groups are distinguished in this analysis. The first one encompasses CPXV strains and the HSPV strain, while the second one comprises VACV strains (including RPXV strain). VACVs are separated into three branches: one branch groups VACV-List, VACV-LO, VACV-COP and RPXV-UTR; a second branch

A. Garcel and others

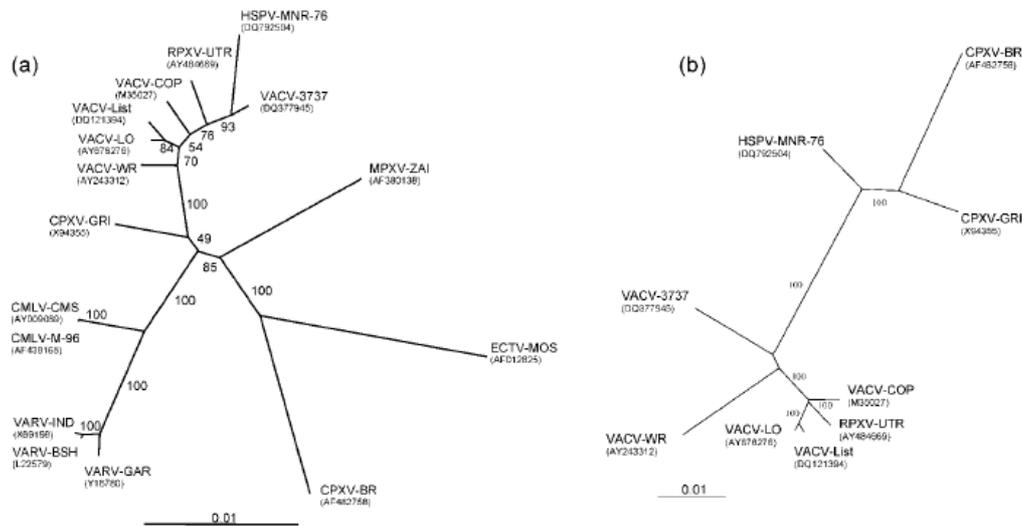


Fig. 4. OPV phylogenetic relationship. Phylogenetic analysis of OPV strains obtained by the maximum-likelihood (a) and the neighbour-joining (b) methods comparing nucleotide sequences, using a global gap removal distance method option. The bootstrap values from 1000 replica samplings and the divergence scale (substitution per site) are indicated. (a) The tree was applied on a concatenated sequence of 17 genes. (b) Phylogenetic analysis of VACV, HSPV and CPXV strains performed on the complete nucleotide genome sequence.

is composed of VACV-WR; and the third composed of VACV-3737, is the closest to the CPXV branch. The relationship described by Li *et al.* (2005) between the RPXV-UTR and VACVs is confirmed. HSPV-MNR-76 shares a closer relationship with CPXV-GRI than CPXV-BR the latter being clearly distinct as previously mentioned. Interestingly, comparison of full-length genomes indicates that HSPV is not as closely related to VACVs as previously suggested by comparison of the 17 conserved genes (Fig. 4a) and the central conserved genomic regions (Tulman *et al.*, 2006). Recombination events occurring with different OPVs (VACV and CPXV strains) and involving not only the core region but also the variable regions, may account for these findings. Whatever the mechanisms involved, the different methods employed suggest that HSPV constitutes an OPV clade at the crossroads between VACV and CPXV clades. Finally, our phylogenetic analysis also confirms that the two Lister strains, VACV-LO and VACV-List, are very similar.

Conclusion

In this report we have analysed and compared the genome structure and the potential coding regions of VACV-List to other VACV strains previously used as smallpox vaccines during the eradication period. The VACV-List genome is of course a typical OPV, including a central conserved region, variable left and right end regions and ITRs with tandem repeats. At least eight VACV-List genes contain stop codons in their CDS as compared with larger ORFs in other OPVs and were considered as pseudogenes. It would

nevertheless be worthwhile for some of the larger pseudogenes to confirm that the truncated versions they encode are no longer functional and possibly correlate this with attenuation. The comparison of the two VACV Lister strains, VACV-List and VACV-LO, demonstrated a high nucleotide sequence similarity even if it cannot be excluded that single amino acid differences in some of their proteins may distinguish the two strains in precise properties. LC16mO and LC16m8, both clonal isolates derived from VACV-LO, appeared to be more distant from VACV-List than VACV-LO. Interestingly, the VACV-List genome contains several ORFs that have not been annotated in other VACVs: both *List180* and *List196* are found in CMLV-CMS; one ORF (*List173*) is also found in CPXV-BR and one ORF (*List195*) is also found in CPXV-GRI (*K3R*). Among these ORFs, *List196* is suspected to be a gene of cellular origin that could have been incorporated into VACV-List or a parental CPXV relatively recently upon divergence of OPVs. In fact, the 4 kbp region overlapping *List194** to *List199*A-B-C-D* is distinct in VACV-List compared to the other VACV strains so far sequenced and appears to correspond to a substitution with CPXV-GRI or CMLV-CMS ORFs suggesting prior genetic exchanges as previously postulated by Reading *et al.* (2002). This region accounts for one distinctive feature of VACV-List, in common with the USSR and Evans strains, namely that it encodes two active TNF receptors (*List172* and *List195*), while it lacks an IFN inhibitor (VACV-COP *B19R*) found in other VACV strains. In this way, the Lister strain is better armed against the host TNF response, a property

that could potentially have an impact on Lister strain virulence and immune evasion. A recent reappraisal of historical data suggests that the frequency of adverse events after vaccination with the Lister strain was considerably higher than for the NYCBH strain (Kretzschmar *et al.*, 2006). Differences between VACV genomes, particularly strategies adopted to escape the immune response, could explain these observations although it cannot be excluded that biases in the data may account for apparent variations in strain safety. Despite some notable differences, phylogenetic analysis of the VACV isolates underlines their particularly close relationship but does not allow the precise definition of a genealogical tree.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by grants from Sanofi-Pasteur, the Service de Santé des Armées (SSA), the Délégation Générale pour l'Armement (DGA) and from the association ARAMI. We thank D. Dimova and T. Vermat for assistance with annotation, E. Pellegrini for creation of the genome map figure, M. Hebben, B. and M. Souberbielle for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Sandybaev, N. T., Kerembekova, U. Z., Zaitsev, V. L., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2002). The genome of camelpox virus. *Virology* **295**, 1–9.

Afonso, C. L., Delhon, G., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, A., Becerra, V. M., Zsak, L., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2005). Genome of deerpox virus. *J Virol* **79**, 966–977.

Alcami, A. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* **69**, 4633–4639.

Alcami, A., Symons, J. A. & Smith, G. L. (2000). The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J Virol* **74**, 11230–11239.

Alejo, A., Ruiz-Arguello, M. B., Ho, Y., Smith, V. P., Saraiva, M. & Alcami, A. (2006). A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5995–6000.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.

Amegadzie, B. Y., Ahn, B. Y. & Moss, B. (1992). Characterization of a 7-kilodalton subunit of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase with structural similarities to the smallest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *J Virol* **66**, 3003–3010.

Antoine, G., Scheifflinger, F., Dörner, F. & Falkner, F. G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**, 365–396.

Breman, J. G. & Arita, I. (1980). The confirmation and maintenance of smallpox eradication. *N Engl J Med* **303**, 1263–1273.

Chalifa-Caspi, V., Shmueli, O., Benjamin-Rodrig, H., Rosen, N., Shmoish, M., Yanai, I., Ophir, R., Kats, P., Safran, M. & Lancet, D. (2003). GeneAnnot: interfacing GeneCards with high-throughput gene expression compendia. *Brief Bioinform* **4**, 349–360.

Chalifa-Caspi, V., Yanai, I., Ophir, R., Rosen, N., Shmoish, M., Benjamin-Rodrig, H., Shklar, M., Stein, T. I., Shmueli, O. & other

authors (2004). GeneAnnot: comprehensive two-way linking between oligonucleotide array probesets and GeneCards genes. *Bioinformatics* **20**, 1457–1458.

Chen, N., Danila, M. I., Feng, Z., Buller, R. M., Wang, C., Han, X., Lefkowitz, E. J. & Upton, C. (2003). The genomic sequence of ectromelia virus, the causative agent of mousepox. *Virology* **317**, 165–186.

Chung, C. S., Chen, C. H., Ho, M. Y., Huang, C. Y., Liao, C. L. & Chang, W. (2006). Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *J Virol* **80**, 2127–2140.

de Carlos, A. & Paez, E. (1991). Isolation and characterization of mutants of vaccinia virus with a modified 94-kDa inclusion protein. *Virology* **185**, 768–778.

DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Marshall, W. L. (2004). Poxvirus protein NIL targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 36570–36578.

Fenner, F. (1982). A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev Infect Dis* **4**, 916–930.

Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* **12**, 543–548.

Geshelin, P. & Berns, K. I. (1974). Characterization and localization of the naturally occurring cross-links in vaccinia virus DNA. *J Mol Biol* **88**, 785–796.

Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P. & Paoletti, E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**, 247–266, 517–563.

Grosenbach, D. W., Hansen, S. G. & Hruby, D. E. (2000). Identification and analysis of vaccinia virus palmitoylproteins. *Virology* **275**, 193–206.

Gubser, C. & Smith, G. L. (2002). The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J Gen Virol* **83**, 855–872.

Gubser, C., Hue, S., Kellam, P. & Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* **85**, 105–117.

Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F. J. & Smith, G. L. (2007). A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog* **3**, e17.

Henderson, D. A. (1999a). The looming threat of bioterrorism. *Science* **283**, 1279–1282.

Henderson, D. A. (1999b). Weapons for the future. *Lancet* **354**, SIV64.

Herrero-Martinez, E., Roberts, K. L., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2005). Vaccinia virus intracellular enveloped virions move to the cell periphery on microtubules in the absence of the A36R protein. *J Gen Virol* **86**, 2961–2968.

Huang, J., Huang, Q., Zhou, X., Shen, M. M., Yen, A., Yu, S. X., Dong, G., Qu, K., Huang, P. & other authors (2004). The poxvirus p28 virulence factor Is an E3 Ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **279**, 54110–54116.

Kahmann, J. D., Wecking, D. A., Putter, V., Lowenhaupt, K., Kim, Y. G., Schmieder, P., Oschkinat, H., Rich, A. & Schade, M. (2004). The solution structure of the N-terminal domain of E3L shows a tyrosine conformation that may explain its reduced affinity to Z-DNA *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2712–2717.

Kettle, S., Blake, N. W., Law, K. M. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia virus serpins B13R (SPI-2) and B22R (SPI-1) encode M(r) 38.5 and 40K, intracellular polypeptides that do not affect virus virulence in a murine intranasal model. *Virology* **206**, 136–147.

Kettle, S., Alcami, A., Khanna, A., Ehret, R., Jassoy, C. & Smith, G. L. (1997). Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1β-

A. Garcel and others

- converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1 β -induced fever. *J Gen Virol* **78**, 677–685.
- Kretzschmar, M., Wallinga, J., Teunis, P., Xing, S. & Mikolajczyk, R. (2006). Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med* **3**, e272.
- Langland, J. O. & Jacobs, B. L. (2002). The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* **299**, 133–141.
- Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Heiner, C. R., Benson, S. C., Rosenblum, B. B., Menchen, S. M., Graham, R. J., Constantinescu, A., Upadhy, K. G. & Cassel, J. M. (1997). New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* **25**, 2816–2822.
- Lee, H. J., Essani, K. & Smith, G. L. (2001). The genome sequence of Yaba-like disease virus, a yatapoxvirus. *Virology* **281**, 170–192.
- Levy-Bruhl, D. & Guerin, N. (2001). The use of smallpox virus as a biological weapon: the vaccination situation in France. *Euro Surveill* **6**, 171–178.
- Li, G., Chen, N., Roper, R. L., Feng, Z., Hunter, A., Danila, M., Lefkowitz, E. J., Buller, R. M. & Upton, C. (2005). Complete coding sequences of the rabbitpox virus genome. *J Gen Virol* **86**, 2969–2977.
- Li, G., Chen, N., Feng, Z., Buller, R. M., Osborne, J., Harms, T., Damon, I., Upton, C. & Esteban, D. J. (2006). Genomic sequence and analysis of a vaccinia virus isolate from a patient with a smallpox vaccine-related complication. *Virol J* **3**, 88.
- Lin, Y. Z., Ke, X. H. & Tam, J. P. (1990). Growth inhibition by vaccinia virus growth factor. *J Biol Chem* **265**, 18884–18890.
- Mahalingam, S., Damon, I. K. & Lidbury, B. A. (2004). 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant. *Trends Immunol* **25**, 636–639.
- Massung, R. F., Liu, L. I., Qi, J., Knight, J. C., Yuran, T. E., Kerlavage, A. R., Parsons, J. M., Venter, J. C. & Esposito, J. J. (1994). Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. *Virology* **201**, 215–240.
- McCoy, S. L., Kurtz, S. E., Macarthur, C. J., Trune, D. R. & Hefeneider, S. H. (2005). Identification of a peptide derived from vaccinia virus A52R protein that inhibits cytokine secretion in response to TLR-dependent signaling and reduces in vivo bacterial-induced inflammation. *J Immunol* **174**, 3006–3014.
- McFadden, G., Graham, K., Ellison, K., Barry, M., Macen, J., Schreiber, M., Mossman, K., Nash, P., Lalani, A. & Everett, H. (1995). Interruption of cytokine networks by poxviruses: lessons from myxoma virus. *J Leukoc Biol* **57**, 731–738.
- Meyer, H. & Rziha, H. J. (1993). Characterization of the gene encoding the A-type inclusion protein of camelpox virus and sequence comparison with other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **74**, 1679–1684.
- Mohamed, M. R., Latner, D. R., Condit, R. C. & Niles, E. G. (2001). Interaction between the J3R subunit of vaccinia virus poly(A) polymerase and the H4L subunit of the viral RNA polymerase. *Virology* **280**, 143–152.
- Morikawa, S., Sakiyama, T., Hasegawa, H., Saijo, M., Maeda, A., Kurane, I., Maeno, G., Kimura, J., Hirama, C. & other authors (2005). An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* **79**, 11873–11891.
- Nash, P., Barrett, J., Cao, J. X., Hota-Mitchell, S., Lalani, A. S., Everett, H., Xu, X. M., Robichaud, J., Hnatiuk, S. & other authors (1999). Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story. *Immunol Rev* **168**, 103–120.
- Niles, E. G. & Christen, L. (1993). Identification of the vaccinia virus mRNA guanylyltransferase active site lysine. *J Biol Chem* **268**, 24986–24989.
- Patel, D. D., Pickup, D. J. & Joklik, W. K. (1986). Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component. *Virology* **149**, 174–189.
- Pires de Miranda, M., Reading, P. C., Tschärke, D. C., Murphy, B. J. & Smith, G. L. (2003). The vaccinia virus kelch-like protein C2L affects calcium-independent adhesion to the extracellular matrix and inflammation in a murine intradermal model. *J Gen Virol* **84**, 2459–2471.
- Reading, P. C. & Smith, G. L. (2003). Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. *J Virol* **77**, 9960–9968.
- Reading, P. C., Khanna, A. & Smith, G. L. (2002). Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology* **292**, 285–298.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463–5467.
- Saraiva, M. & Alcami, A. (2001). CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J Virol* **75**, 226–233.
- Shchelkunov, S. N., Massung, R. F. & Esposito, J. J. (1995). Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses. *Virus Res* **36**, 107–118.
- Shchelkunov, S. N., Totmenin, A. V., Loparev, V. N., Safronov, P. F., Gutorov, V. V., Chizhikov, V. E., Knight, J. C., Parsons, J. M., Massung, R. F. & Esposito, J. J. (2000). Alastrim smallpox variola minor virus genome DNA sequences. *Virology* **266**, 361–386.
- Shchelkunov, S. N., Totmenin, A. V., Safronov, P. F., Mikheev, M. V., Gutorov, V. V., Ryazankina, O. I., Petrov, N. A., Babkin, I. V., Uvarova, E. A. & other authors (2002). Analysis of the monkeypox virus genome. *Virology* **297**, 172–194.
- Smith, V. P., Bryant, N. A. & Alcami, A. (2000). Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *J Gen Virol* **81**, 1223–1230.
- Sonnhammer, E. L. & Durbin, R. (1995). A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. *Gene* **167**, GC1–GC10.
- Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2005). Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* **201**, 1007–1018.
- Sugimoto, M., Yasuda, A., Miki, K., Morita, M., Suzuki, K., Uchida, N. & Hashizume, S. (1985). Gene structures of low-neurovirulent vaccinia virus LC16m0, LC16m8, and their Lister original (LO) strains. *Microbiol Immunol* **29**, 421–428.
- Symons, J. A., Tschärke, D. C., Price, N. & Smith, G. L. (2002). A study of the vaccinia virus interferon-gamma receptor and its contribution to virus virulence. *J Gen Virol* **83**, 1953–1964.
- Tone, M., Thompson, S. A., Tone, Y., Fairchild, P. J. & Waldmann, H. (1997). Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol* **159**, 6156–6163.
- Tschärke, D. C., Reading, P. C. & Smith, G. L. (2002). Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. *J Gen Virol* **83**, 1977–1986.
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2004). The genome of canarypox virus. *J Virol* **78**, 353–366.
- Tulman, E. R., Delhon, G., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Sandybaev, N. T., Kerembekova, U. Z., Zaitsev, V. L., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2006). Genome of horsepox virus. *J Virol* **80**, 9244–9258.
- Yeh, W. W., Moss, B. & Wolfe, E. J. (2000). The vaccinia virus A9L gene encodes a membrane protein required for an early step in virion morphogenesis. *J Virol* **74**, 9701–9711.

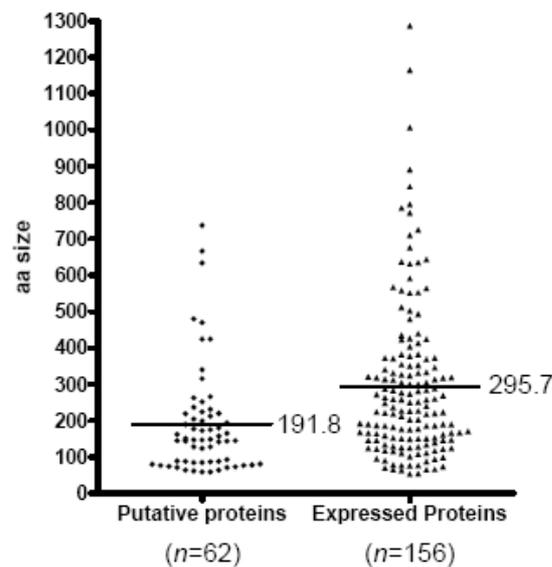
Supplementary Table S1. List of VACV-List ORFs. Start and stop designate the first and the last nucleotide of the ORF, stop codon included. L/R indicates the left or right orientation of gene transcription. aa, Number of deduced amino acids encoded within the ORF. Predicted functions of ORFs are classified in several families: UNK, unknown protein; DNA, DNA replication and nucleotide metabolism; RNA, RNA transcription and modification; ENZ, other enzymes; STR, structure and assembly; VIR, virulence, host-range and immunomodulation. Relation/ Reference/ Organism describe the match between the closest poxvirus protein and the ORF annotated 'similar to' (S) if the amino acid identity was more than 98 %, while an inferior rate corresponds to a 'related to' annotation (R). Note reported protein information. *, Pseudogenes.

ORF number	Start	Stop	L/R	aa	Function	Relation / Reference/ Organism	Note	Citation PMID
List001	226	1002	R	258	VIR	S <i>RPXV-UTR_184 # RPXV-UTR_001</i>	RPXV-UTR 35kDa major secreted protein; not essential for growth in tissue culture	
List002*	1714	2082	R	122	VIR	S <i>VV-Cop-C22L # VV-Cop-B28R</i>	VACV-COP truncated TNF receptor; TNFR/NGFR family cysteine-rich region domain (PS50050); prevents the binding of TNF to cellular receptors; homologous to CPXV CmiB	
List003*A	2583	2777	R	64	PUT	S <i>VACWR213 # VACWR006</i>	VACV-COP partial cds; pseudogene of <i>G3R</i> (VARV-IND)	
List003*B	2710	3096	R	128	PUT	S <i>VV-Cop-C20L # VV-Cop-B26R</i>	VACV-COP Partial cds; pseudogene of <i>G3R</i> (VARV-IND)	
List003*C	3041	3307	R	88	PUT	R <i>VV-Cop-C19L # VV-Cop-B25R</i>	VACV-COP partial cds; pseudogene of <i>G3R</i> (VARV-IND)	
List003*D	3346	3780	R	144	PUT	R <i>VV-Cop-C19L # VV-Cop-B25R</i>	VACV-COP partial cds; pseudogene of <i>G3R</i> (VARV-IND)	
List004*A	4022	4459	R	145	PUT	R <i>D4L # I2R</i>	CPXV-GRI partial cds; C-terminal part; putative protein; pseudogene of <i>D4L# I2R</i> (CPXV-GRI)	
List004*B	4629	5902	R	424	PUT	R <i>D4L # I2R</i>	CPXV-GRI partial cds; N-terminal part; putative protein; pseudogene of <i>D4L# I2R</i> (CPXV-GRI)	
List005	5913	6356	L	147	VIR	S <i>VV-Cop-C16L # VV-Cop-B22R</i>	VACV-COP putative protein	
List006	6789	7058	L	89	PUT	R <i>VV-Cop-C15L</i>	VACV-COP putative protein	
List007	7829	8401	L	190	PUT	S <i>VACWR206</i>	VACV-WR putative protein	
List008	8565	9626	L	353	VIR	S <i>VV-Cop-C12L</i>	VACV-COP serine protease inhibitor (SPI-1); Serpins signature (PS00284)	Kotwal & Moss, 1989; Smith <i>et al.</i> , 1989a; Blake <i>et al.</i> , 1995; Kettle <i>et al.</i> , 1995)
List009	10071	10493	R	140	VIR	S <i>MVA005R</i>	VACV-MVA EGF-like domain (PS50026); secreted Growth factor	Twardzik <i>et al.</i> , 1985; Buller <i>et al.</i> , 1988b; Buller <i>et al.</i> , 1988c)
List010	10646	11641	L	331	VIR	S <i>VV-Cop-C10L</i>	VACV-COP blocks IL-1 receptor	Kluczyk <i>et al.</i> , 2002)
List011	12153	12695	R	180	PUT	R <i>VACWR208 # VACWR011</i>	VACV-WR putative protein	
List012*	12658	12858	R	66	VIR	S <i>VACWR207</i>	VACV-WR Truncated, homologous to Ectromelia Virus p28 Ubiquitin E3 ligase	Huang <i>et al.</i> , 2004)
List013	13011	13391	L	126	VIR	S <i>EV-N-19</i>	ENCI-NAV interleukin 18 binding protein	Smith <i>et al.</i> , 2000; Esteban <i>et al.</i> , 2004)
List014*A	13450	13731	L	93	PUT	S <i>F025</i>	CPXV-BR partial cds; hypothetical ankyrin-like protein (PS50088); pseudogene of <i>F025</i>	Spelmer <i>et al.</i> , 1988; Fang <i>et al.</i> , 2005)
List014*B	13735	14163	L	142	PUT	S <i>F025</i>	CPXV-BR partial cds; hypothetical ankyrin-like protein (PS50088); pseudogene of <i>F025</i>	Spelmer <i>et al.</i> , 1988; Fang <i>et al.</i> , 2005)
List014*C	14252	14851	L	199	PUT	S <i>F025</i>	CPXV-BR partial cds; hypothetical ankyrin-like protein (PS50088); pseudogene of <i>F025</i>	Spelmer <i>et al.</i> , 1988; Fang <i>et al.</i> , 2005)
List014*D	14932	15165	L	77	PUT	S <i>F025</i>	CPXV-BR partial cds; hypothetical ankyrin-like protein (PS50088); pseudogene of <i>F025</i>	Spelmer <i>et al.</i> , 1988; Fang <i>et al.</i> , 2005)
List014*E	15187	15444	L	85	PUT	S <i>F025</i>	CPXV-BR partial cds; hypothetical ankyrin-like protein (PS50088); pseudogene of <i>F025</i>	Spelmer <i>et al.</i> , 1988; Fang <i>et al.</i> , 2005)
List015	15506	15685	L	59	PUT	S <i>RPXV-UTR_010</i>	RPXV-UTR putative protein	
List016	15858	17762	L	634	PUT	S <i>VV-Cop-C9L</i>	VACV-COP ankyrin-repeat (PS50088); putative protein	
List017	17805	18338	L	177	PUT	S <i>VV-Cop-C8L</i>	VACV-COP putative protein	
List018	18410	18862	L	150	UNK	S <i>VV-Cop-C7L</i>	VACV-COP host range protein	Perkins <i>et al.</i> , 1990 ; Ogunniyi <i>et al.</i> , 1993 ; Najera <i>et al.</i> , 2006)
List019	19089	19544	L	151	STR	S <i>VV-Cop-C6L</i>	VACV-COP IMV protein	Chung <i>et al.</i> , 2006)

List020	19671	20285	L	204	PUT	S	<i>VV.Cop-C5L</i>	VACV-COP	putative protein	
List021	20348	21298	L	316	PUT	S	<i>VV.Cop-C4L</i>	VACV-COP	putative protein	
List022	21365	22156	L	263	VIR	S	<i>VV.Cop-C3L</i>	VACV-COP	lipoprotein lipid attachment site (PS00013); complement binding protein (C3bC4b)	Rosengand <i>et al.</i> , 1999; Ganesh <i>et al.</i> , 2004)
List023	22223	23761	L	512	VIR	S	<i>VV.Cop-C2L</i>	VACV-COP	kelch-like (PS50097); affects calcium-independent adhesion to the extracellular matrix;	Pires de Miranda <i>et al.</i> , 2003)
List024	23828	24502	L	224	PUT	S	<i>VV.Cop-C1L</i>	VACV-COP	putative protein	
List025	24489	24842	L	117	VIR	S	<i>VV.Cop-N1L</i>	VACV-COP	inhibitor of NF-Kappa-B pathway	DiPerna <i>et al.</i> , 2004)
List026	24962	25489	L	175	VIR	S	<i>VV.Cop-N2L</i>	VACV-COP	alpha-amanitin-resistant and temperature-sensitive phenotypes	Tarmin <i>et al.</i> , 1991)
List027	25531	26943	L	470	PUT	S	<i>VV.Cop-M1L</i>	VACV-COP	ankyrin-like	Tarmin <i>et al.</i> , 1991)
List028	26921	27583	L	220	PUT	S	<i>VV.Cop-M2L</i>	VACV-COP	putative protein	
List029	27718	28572	L	284	VIR	S	<i>VV.Cop-K1L</i>	VACV-COP	host-range protein; ankyrin-like protein (PS50088)	Gillard <i>et al.</i> , 1986; Bradley & Terajima, 2005)
List030	28794	29803	L	369	VIR	S	<i>VV.Cop-K2L</i>	VACV-COP	serine protease inhibitor 3 SPI-3 (PS00284)	Zhou <i>et al.</i> , 1992; Turner & Moyer, 1995)
List031	29955	30221	L	88	VIR	S	<i>VV.Cop-K3L</i>	VACV-COP	eIF-2 alpha protein homologue; inhibitor of the ds-RNA-dependent protein kinase (PKR)	Sharp <i>et al.</i> , 1997; Langland & Jacobs, 2002)
List032	30282	31556	L	424	STR; ENZ	S	<i>VV.Cop-K4L</i>	VACV-COP	BMV protein; diacylglycerol lipase D-like protein; extracellular enveloped virion (EEV) formation	Blasco & Moss, 1991; Eckert <i>et al.</i> , 2005; Chung <i>et al.</i> , 2006)
List033	31583	32110	L	175	PUT	S	<i>AMFA028</i>	VACV-AMVA	putative monoacylglyceride lipase	
List034	32120	32365	L	81	PUT	S	<i>VV.Cop-K6L</i>	VACV-COP	putative lipase	
List035	32504	32953	R	149	PUT	S	<i>VV.Cop-K7R</i>	VACV-COP	putative lipase	
List036	33018	33698	L	226	VIR	S	<i>VV.Cop-F1L</i>	VACV-COP	mitochondria tail-anchored; apoptosis inhibitor	Fischer <i>et al.</i> , 2005; Stewart <i>et al.</i> , 2005)
List037	33710	34153	L	147	DNA	S	<i>VV.Cop-F2L</i>	VACV-COP	dUTP pyrophosphatase	Brovles, 1993)
List038	34177	35619	L	480	PUT	S	<i>VV.Cop-F3L</i>	VACV-COP	kelch-like (PS50097)	
List039	35630	36589	L	319	RNA	S	<i>VV.Cop-F4L</i>	VACV-COP	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit	Howell <i>et al.</i> , 1992; Beard, 1995)
List040	36621	37586	L	321	UNK	S	<i>VV.Cop-F5L</i>	VACV-COP	lipoprotein lipid attachment site (PS00013); putative major membrane protein	
List041	37616	37840	L	74	PUT	S	<i>VV.Cop-F6L</i>	VACV-COP	putative protein	
List042	37856	38098	L	80	PUT	S	<i>VACWR046</i>	VACV-WR	putative protein	
List043	38266	38463	L	65	UNK	S	<i>VV.Cop-F8L</i>	VACV-COP	putative 8 kDa early protein	Hipley & Way, 1997)
List044	38523	39161	L	212	UNK	S	<i>VV.Cop-F9L</i>	VACV-COP	putative membrane protein	Senkevich <i>et al.</i> , 2002a)
List045	39148	40467	L	439	ENZ	S	<i>VV.Cop-F10L</i>	VACV-COP	ser/thr protein kinase (PS50011)	Lin & Broyles, 1994; Wang & Shuman, 1995)
List046	40490	41554	L	354	VIR	S	<i>VV.Cop-F11L</i>	VACV-COP	putative protein	
List047	41597	43504	L	635	VIR; STR	S	<i>VV.Cop-F12L</i>	VACV-COP	required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence; early and late protein	Zhang <i>et al.</i> , 2000; van Eijl <i>et al.</i> , 2002)
List048	43546	44664	L	372	ENZ; STR	S	<i>VV.Cop-F13L</i>	VACV-COP	palmitoylated on cys185 and 186; a major membrane protein of extracellular outer membrane	Husain & Moss, 2001; Husain <i>et al.</i> , 2003)
List049	44682	44903	L	73	PUT	S	<i>VV.Cop-F14L</i>	VACV-COP	putative protein	
List050	45177	45653	L	158	PUT	S	<i>VV.Cop-F15L</i>	VACV-COP	putative protein	
List051	45660	46355	L	231	PUT	S	<i>VV.Cop-F16L</i>	VACV-COP	putative protein	
List052	46418	46723	R	101	DNA	S	<i>VV.Cop-F17R</i>	VACV-COP	putative DNA-binding protein; interacts with actin; major putative DNA-binding protein p11	Reckmann <i>et al.</i> , 1997; Pedersen <i>et al.</i> , 2000; D'Costa <i>et al.</i> , 2004)
List053	46720	48159	L	479	DNA	S	<i>VV.Cop-E1L</i>	VACV-COP	poly(A) polymerase large subunit (VP55); catalytic subunit	Gershon <i>et al.</i> , 1991; Gershon & Moss, 1993)
List054	48156	50369	L	737	PUT	S	<i>VV.Cop-E2L</i>	VACV-COP	putative protein	
List055	50496	51068	L	190	VIR	S	<i>VV.Cop-E3L</i>	VACV-COP	double-stranded RNA-specific adenosine deaminase-like protein; inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR); Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (PS00013); interferon resistance	Chang <i>et al.</i> , 1992; Davies <i>et al.</i> , 1993)
List056	51123	51902	L	259	RNA	S	<i>VV.Cop-E4L</i>	VACV-COP	DNA-directed RNA polymerase subunit (rho30); Zinc finger TFIIIS-type signature (PS51133)	Alm <i>et al.</i> , 1990; Broyles & Pennington, 1990; Rosales <i>et al.</i> , 1994)
List057	51979	52974	R	331	DNA	S	<i>VV.Cop-E5R</i>	VACV-COP	viroplasm component (cytoplasmic sites of replication of vaccinia virus DNA)	Murcia-Nicolas <i>et al.</i> , 1999)
List058	53111	54814	R	567	STR	S	<i>VV.Cop-E6R</i>	VACV-COP	BMV protein	Chung <i>et al.</i> , 2006)
List059	54881	55381	R	166	UNK	S	<i>VV.Cop-E7R</i>	VACV-COP	putative myristylated protein (PS00008); nonessential gene	Chemco <i>et al.</i> , 1993; Martin <i>et al.</i> , 1999)
List060	55506	56327	R	273	STR	S	<i>VV.Cop-E8R</i>	VACV-COP	E8 phosphorylated in vitro by the viral kinase F10; membrane protein	Doshio <i>et al.</i> , 2002)
List061	56334	59354	L	1006	DNA	S	<i>VV.Cop-E9L</i>	VACV-COP	DNA-directed DNA polymerase; DNA polymerase family B signature (PS00116)	Traktman <i>et al.</i> , 1984; Jones & Moss, 1985; McDonald & Traktman, 1994)

List062	59386	59673	R	95	STR	S	<i>VV-Cop-E10R</i>	VACV-COP	putative redox protein; IMV structural protein; putative redox motif (cys43 and 46)	Senkevich <i>et al.</i> , 2000
List063	59668	60057	L	129	STR	S	<i>VV-Cop-E11L</i>	VACV-COP	15kDa core protein	Wang & Shuman, 1996
List064	60044	62044	L	666	PUT	S	<i>VV-Cop-O1L</i>	VACV-COP	putative membrane protein	
List065	62092	62418	L	108	ENZ	S	<i>VV-Cop-O2L</i>	VACV-COP	Glutaredoxin active site (PS00195)	Ahn & Moss, 1992a)
List066	62564	63502	L	312	STR	S	<i>VV-Cop-I1L</i>	VACV-COP	DNA-binding virion core protein	Klemperer <i>et al.</i> , 1997)
List067	63509	63730	L	73	STR	S	<i>VV-Cop-I2L</i>	VACV-COP	putative membrane protein	
List068	63731	64540	L	269	DNA	S	<i>VV-Cop-I3L</i>	VACV-COP	ss-DNA-binding phosphoprotein protein; localized in ER-associated structure	Tserng <i>et al.</i> , 1999; Welsch <i>et al.</i> , 2003)
List069	64623	66938	L	771	RNA	S	<i>VV-Cop-I4L</i>	VACV-COP	ribonucleotide reductase large subunit (M1) (PS00089)	Ternsgen <i>et al.</i> , 1988)
List070	66965	67204	L	79	STR	S	<i>VV-Cop-I5L</i>	VACV-COP	nucleoprotein; putative membrane protein	Ichihashi <i>et al.</i> , 1984)
List071	67223	68371	L	382	DNA; STR	S	<i>VV-Cop-I6L</i>	VACV-COP	viral telomere binding; putative genome encapsidation protein into the virus particle	DeMasi <i>et al.</i> , 2001 ; Grubisic & Traktman, 2003)
List072	68364	69635	L	423	ENZ	S	<i>VV-Cop-I7L</i>	VACV-COP	core protein proteinase; putative topoisomerase II	Kane & Shumra, 1993; Byrd <i>et al.</i> , 2002; Anasrah-Sobrinho & Moss, 2004b)
List073	69641	71671	R	676	RNA	S	<i>VV-Cop-I8R</i>	VACV-COP	implications for vaccinia virus transcription; R human RNA helicase A and to nuclear DNA helicase II; DEAD and DEAH box families ATP-dependent helicases (PS00039)	Bayliss & Smith, 1996; Bardiss <i>et al.</i> , 1996)
List074	71675	73450	L	591	ENZ	S	<i>VV-Cop-G1L</i>	VACV-COP	putative metalloprotease	Whitehead & Hruby, 1994b; Anasrah-Sobrinho & Moss, 2004a; Hedemagen-Cicott <i>et al.</i> , 2004)
List075	73447	73782	L	111	STR	S	<i>VV-Cop-G3L</i>	VACV-COP	IMV protein part of entry-fusion complex	Senkevich <i>et al.</i> , 2005; Chung <i>et al.</i> , 2006)
List076	73776	74438	R	220	RNA	S	<i>VV-Cop-G2R</i>	VACV-COP	putative transcriptional elongation factor	Black & Couch, 1996)
List077	74408	74782	L	124	ENZ; STR	S	<i>VV-Cop-G4L</i>	VACV-COP	essential morphogenesis protein; glutaredoxin (PS00195)	Geokharit <i>et al.</i> , 1996; White <i>et al.</i> , 2000)
List078	74785	76089	R	434	STR; ENZ	S	<i>VV-Cop-G5R</i>	VACV-COP	IMV core protein ; putative endonuclease	da Fonseca <i>et al.</i> , 2004 ; Da Silva <i>et al.</i> , 2006)
List079	76097	76288	R	63	RNA	S	<i>VV-Cop-G5_5R</i>	VACV-COP	DNA-dependent RNA polymerase subunit rpo7	Amegadzie <i>et al.</i> , 1992)
List080	76290	76787	R	165	PUT	S	<i>VV-Cop-G6R</i>	VACV-COP	putative protein	
List081	76752	77867	L	371	STR	S	<i>VV-Cop-G7L</i>	VACV-COP	putative virion core protein; essential role in early morphogenesis; F10 kinase-dependent phosphorylation in vivo	Szajner <i>et al.</i> , 2004 ; Mercer & Traktman, 2005)
List082	77898	78680	R	260	RNA	S	<i>VV-Cop-G8R</i>	VACV-COP	late transcription factor VLTf-1 (Trans-activator protein GK1)	Wright <i>et al.</i> , 1991; Zhang <i>et al.</i> , 1992; Delis <i>et al.</i> , 2004)
List083	78700	79722	R	340	STR	S	<i>VV-Cop-G9R</i>	VACV-COP	IMV protein part of entry-fusion complex; myristylprotein (PS00008)	Martin <i>et al.</i> , 1997; Martin <i>et al.</i> , 1999; Senkevich <i>et al.</i> , 2005; Chung <i>et al.</i> , 2006; Cjeda <i>et al.</i> , 2006)
List084	79723	80475	R	250	STR	S	<i>VV-Cop-L1R</i>	VACV-COP	myristylated membrane protein (PS00008); intracellular virion (IMV) envelope protein	Franko <i>et al.</i> , 1990; Ravanello & Hruby, 1994a, b)
List085	80507	80770	R	87	PUT	S	<i>VV-Cop-L2R</i>	VACV-COP	putative membrane protein	
List086	80760	81812	L	350	STR	S	<i>VV-Cop-L3L</i>	VACV-COP	IMV protein	Chung <i>et al.</i> , 2006)
List087	81837	82592	R	251	STR	S	<i>VV-Cop-L4R</i>	VACV-COP	binds single-stranded (ss) and double-stranded (ds) DNA; major core protein	Yang & Bauer, 1988; VanSlyke <i>et al.</i> , 1991; Bayliss & Smith, 1997)
List088	82602	82988	R	128	VIR; STR	S	<i>VV-Cop-L5R</i>	VACV-COP	IMV protein part of entry-fusion complex	Senkevich <i>et al.</i> , 2005; Townsley <i>et al.</i> , 2005b)
List089	82945	83406	R	153	STR	S	<i>VV-Cop-J1R</i>	VACV-COP	dimeric virion protein; coimmunoprecipitated with A45; morphogenesis protein	Chiu & Chang, 2002; Chin <i>et al.</i> , 2005)
List090	83422	83955	R	177	ENZ	S	<i>VV-Cop-J2R</i>	VACV-COP	thymidine kinase (PS00603)	Hruby <i>et al.</i> , 1983; Esposito & Knight, 1984)
List091	84021	85022	R	333	RNA	S	<i>VV-Cop-J3R</i>	VACV-COP	mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase; poly(A) polymerase subunit; interacts with H4 subunit (VACV-COP)	Latner <i>et al.</i> , 2000; Xiang <i>et al.</i> , 2000; Mohamed <i>et al.</i> , 2001; Latner <i>et al.</i> , 2002)
List092	84937	85494	R	185	RNA	S	<i>VV-Cop-J4R</i>	VACV-COP	cDNA-directed RNA polymerase rpo22 subunit	Katsufurus & Moss, 1999)
List093	85569	85970	L	133	STR	S	<i>VV-Cop-J5L</i>	VACV-COP	IMV protein part of entry-fusion complex	Zajac <i>et al.</i> , 1995; Senkevich <i>et al.</i> , 2005)
List094	86077	86937	R	1286	RNA	S	<i>VV-Cop-J6R</i>	VACV-COP	DNA-directed RNA polymerase rpo147 subunit	Hood-Dhingra <i>et al.</i> , 1990; Gross & Shuman, 1996)
List095	86934	90449	L	171	ENZ	S	<i>VV-Cop-H1L</i>	VACV-COP	tyrosine phosphatase 2C signature (PS01032)	Guan <i>et al.</i> , 1991; Liu <i>et al.</i> , 1995)
List096	90463	91032	R	189	STR	S	<i>VV-Cop-H2R</i>	VACV-COP	IMV protein part of entry-fusion complex; interacts with A28	Senkevich & Moss, 2005; Senkevich <i>et al.</i> , 2005)
List097	91035	92009	L	324	STR	S	<i>VV-Cop-H3L</i>	VACV-COP	IMV associated protein; binds to cell surface heparan sulfate; intracellular mature virion morphogenesis protein; posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail; immunodominant antigen, p35	Takahashi <i>et al.</i> , 1994; da Fonseca <i>et al.</i> , 2000; Lin <i>et al.</i> , 2000)
List098	92010	94397	L	795	RNA	S	<i>VV-Cop-H4L</i>	VACV-COP	RNA polymerase-associated transcription specificity factor (RAP34); H4L N-terminal end subunit binds the C-terminal end of NP11; required for transcription termination and transcript release	Ahn & Moss, 1992b; Mohamed & Niles, 2000; Pincotte <i>et al.</i> , 2003)
List099	94583	95194	R	203	RNA	S	<i>VV-Cop-H5R</i>	VACV-COP	viral late gene transcription factor 4 (VLTf-4); phosphorylated by the B1 kinase	Beard <i>et al.</i> , 1995; Kovacs & Moss, 1996; Brown <i>et al.</i> ,

List138	132152	132715	R	187	DNA	S	VACWR142	VACV-WR	palmitoylprotein Holliday junction endonuclease; involved in replication and processing of viral DNA into unit-length genomes; Site-specific recombinase active site (PS00397)	Grosenbach <i>et al.</i> , 2000; Garcia & Moss, 2001)
List139	132735	133883	R	382	RNA	S	VV-Cop-A23R	VACV-COP	intermediate transcription factor large subunit VITF-3; regulates the intermediate stage of viral gene expression	Sanz & Moss, 1999; Katsafanas & Moss, 2004)
List140	133880	137374	R	1164	RNA	S	VV-Cop-A24R	VACV-COP	DNA-directed RNA polymerase subunit rpo132; RNA polymerases beta chain (PS01166)	Patel & Pickup, 1989; Condit <i>et al.</i> , 1991; Prins <i>et al.</i> , 2004
List141*A	137379	137576	L	65	UNK	S	A26L	CPXV-GRI	partial cds A-type inclusion protein; pseudogene of A26L (CPXV-GRI)	Furukashi <i>et al.</i> , 1988; Czerny <i>et al.</i> , 1994; Meyer <i>et al.</i> , 1997)
List141*B	137545	138006	L	153	UNK	S	A26L	CPXV-GRI	partial cds A-type inclusion protein; pseudogene of A26L (CPXV-GRI)	Snyder <i>et al.</i> , 2004)
List141*C	138108	138272	L	54	UNK	R	A26L	CPXV-GRI	partial cds A-type inclusion protein; pseudogene of A26L (CPXV-GRI)	
List141*D	138278	138961	L	227	UNK	S	A26L	CPXV-GRI	partial cds A-type inclusion protein; pseudogene of A26L (CPXV-GRI)	
List141*E	138921	141098	L	725	UNK	S	A26L	CPXV-GRI	partial cds A-type inclusion protein; pseudogene of A26L (CPXV-GRI)	
List142	141142	142650	L	502	STR	S	VACWR149	VACV-WR	intracellular mature virus (IMV) protein p4c	McKelvey <i>et al.</i> , 2002)
List143	142700	143032	L	110	VIR	S	VV-Cop-A27L	VACV-COP	cell fusion protein; interacts with cell surface heparan sulfate; interacts with A17 (VACV-COP)	Takahashi <i>et al.</i> , 1994; Chung <i>et al.</i> , 1998; Vazquez <i>et al.</i> , 1998)
List144	143033	143473	L	146	VIR	S	VV-Cop-A28L	VACV-COP	IMV protein; involved in cell penetration mechanism	Senkevich <i>et al.</i> , 2004a; b)
List145	143474	144391	L	305	RNA	S	VV-Cop-A29L	VACV-COP	DNA-directed RNA polymerase subunit rpo35	Amesault <i>et al.</i> , 1991; Gross & Shuman, 1996)
List146	144354	144587	L	77	STR	S	VV-Cop-A30L	VACV-COP	morphogenesis protein; interacts with G7 (VACV-COP)	Szajner <i>et al.</i> , 2001; Szajner <i>et al.</i> , 2003)
List147	144747	145121	R	124	STR	S	VV-Cop-A31R	VACV-COP	IMV protein; putative eukaryotic RNA recombination motif signature (PS50102)	Chung <i>et al.</i> , 2006)
List148	145088	145990	L	300	STR; VIR	S	VV-Cop-A32L	VACV-COP	putative DNA packaging protein A32; interacts with A11 (VACV-COP)	Koonin <i>et al.</i> , 1993; Cassetti <i>et al.</i> , 1998; Resch <i>et al.</i> , 2005)
List149	146018	146575	R	185	STR; VIR	S	VV-Cop-A33R	VACV-COP	EEV glycoprotein; required for efficient cell-to-cell spread of vaccinia virus	Roper <i>et al.</i> , 1996; Roper <i>et al.</i> , 1998; Katz <i>et al.</i> , 2003; Fogg <i>et al.</i> , 2004)
List150	146599	147105	R	168	STR	S	VV-Cop-A34R	VACV-COP	EEV glycoprotein; lectin homology domain (PS50041); type II membrane topology	Duncan & Smith, 1992; Blasco <i>et al.</i> , 1993; Melnikosh & Smith, 1996)
List151	147149	147679	R	176	VIR	S	VV-Cop-A35R	VACV-COP	putative protein	
List152	147746	148411	R	221	STR	S	VV-Cop-A36R	VACV-COP	required for nucleation of actin tails; type Ib membrane protein present on intracellular but not EEV particles; interacts directly with the microtubule motor protein kinesin	Parkinson & Smith, 1994; Wolfe <i>et al.</i> , 1998; van Eijl <i>et al.</i> , 2000; Ward & Moss, 2004; Husain & Moss, 2005)
List153	148475	149266	R	263	PUT	S	VACWR160	VACV-WR	putative protein. Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (PS00013)	
List154	149356	149544	R	62	PUT	S	VACWR161	VACV-WR	putative protein	
List155	149541	150374	L	277	VIR	S	VV-Cop-A38L	VACV-COP	CD47 antigen/integrin-associated protein; Ig-like domain profile (PS50835); 33-kDa integral membrane glycoprotein; directly or indirectly promotes the influx of extracellular Ca ²⁺	Parkinson <i>et al.</i> , 1995; Sanderson <i>et al.</i> , 1996)
List156	150391	151602	R	403	VIR	S	VV-Cop-A39R	VACV-COP	semaphorin protein (A39R.Fc) (PS51094); putative immunomodulator protein; Ig-like C2-type (immunoglobulin-like) domain (PS50835)	Corneau <i>et al.</i> , 1998; Gardner <i>et al.</i> , 2001)
List157	151628	152107	R	159	UNK	S	VACWR165	VACV-WR	C-type lectin domain profile (PS50041); influences the outcome of dermal infection; SUMO-1 modified protein; sumoylated protein	Witcock <i>et al.</i> , 1999; Tschirke <i>et al.</i> , 2002; Palacios <i>et al.</i> , 2005)
List158	152205	152864	L	219	VIR	S	VV-Cop-A41L	VACV-COP	soluble 30 kDa glycoprotein; putative immunomodulator protein	Ng <i>et al.</i> , 2001)
List159	153028	153429	R	133	UNK	S	VV-Cop-A42R	VACV-COP	putative profilin-like protein (PS00414)	
List160	153467	154051	R	194	PUT	S	VV-Cop-A43R	VACV-COP	putative membrane glycoprotein	
List161	154059	154295	R	78	PUT	S	VACWR169	VACV-WR	putative protein	
List162	154393	155433	L	346	VIR	S	VACWR170	VACV-WR	putative prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site (PS00013); SALF7Lorf; 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD)	Blasco <i>et al.</i> , 1991; Moore & Smith, 1992; Skinner <i>et al.</i> , 1994)
List163	155480	155857	R	125	ENZ	S	VACWR171	VACV-WR	superoxide dismutase (Cu-Zn); core protein	Almazan <i>et al.</i> , 2001)
List164	155847	156569	R	240	VIR	S	VACWR172	VACV-WR	TollIL1-receptor	Bowie <i>et al.</i> , 2000; Stack <i>et al.</i> , 2005)
List165	156617	157375	L	252	PUT	S	VACWR173	VACV-WR	putative protein	
List166	157406	158089	R	227	ENZ	S	VV-Cop-A48R	VACV-COP	thymidylate kinase (PS01331)	Smith <i>et al.</i> , 1989b; Smith <i>et al.</i> , 1991)
List167	158137	158625	R	162	PUT	S	VV-Cop-A49R	VACV-COP	putative protein	
List168	158658	160316	R	552	DNA	S	VV-Cop-A50R	VACV-COP	ATP-dependent DNA ligase (Polycycoxyribonucleotide synthase) (PS50160)	Colinas <i>et al.</i> , 1990; Beaud, 1995)
List169	160569	161369	R	266	PUT	S	VACWR177	VACV-WR	putative protein	
List170	161439	162011	R	190	VIR	S	VV-Cop-A52R	VACV-COP	suppressing TollIL-1 receptor (TIR) domain-dependent intracellular signaling; inhibits the activation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway	Bowie <i>et al.</i> , 2000; Harte <i>et al.</i> , 2003; Maloney <i>et al.</i> , 2005; McCoy <i>et al.</i> , 2005)
List171*	162154	162441	L	95	PUT	S	VV-Cop-A54L	VACV-COP	putative protein; pseudogene	
List172	162334	162894	R	186	VIR	S	A56R	CPXV-GRI	express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors (PS00652; PS50050)homologous to	Alcami <i>et al.</i> , 1999)



Supplementary Fig. S1. Range in protein size among putative genes and genes known to encode functional proteins. Size is expressed in amino acid length. Bar indicates the mean size of the population: mean±SEM=191.8±18.97 amino acid for putative proteins, mean±SEM=295.7±17.4 amino acid for functional proteins. n, ORF number making up each population.

Garcel, A., Crance, J.-M., Drillien, R., Garin, D. and Favier, A.-L. (2007). Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **88**, 1905–1916.

Protein	List aa	LO aa	VACV-List vs VACV-LO mutations
List005	147	147	S3F; K7Q
List008	353	353	P12T
List009	140	140	S29L
List010	331	331	<i>N6D ; N283D</i>
List019	65	65	
List023	512	512	<i>F99S ; K283E</i>
List030	369	369	E215K
List037	147	147	F61I
List046	354	354	C344S
List047	635	635	T7I ; N538D
List055	190	190	N11D
List056	259	259	T20A
List057	331	331	T50I ; R88M
List061	1006	1006	S780N
List068	269	269	S157A
List069	771	771	<i>N576D</i>
List074	591	591	<i>K78E</i>
List076	220	220	S64Y
List077	124	124	<i>A22S ; N115T</i>
List078	434	434	S411N
List086	350	350	<i>N181D</i>
List090	177	177	L72S
List091	333	333	G331S
List094	1286	1286	N1006D
List096	189	189	L178S
List102	844	844	<i>L236P ; N325S</i>
List104	237	237	N159D
List114	551	551	G85S
List117	76	76	H35N
List119	281	281	A122E
List124	99	108	<i>List 79-N-----DGSNI-84</i> <i>LO 79-NANTINNDNSNSNNSNI-93</i>
List126	318	318	<i>N91D</i>
List134	493	493	<i>N811D ; F337L</i>

Protein	List aa	LO aa	VACV-List vs VACV-LO mutations
List136	117	117	N86D
List140	1164	1164	I819M ; S1099G
List141*	65	18	<i>Homology from 1 to 6; truncated protein</i>
List141*	153	210	<i>Homology from 1 to 150 of List197* ;</i> <i>List 110-I-EVAP-114 List 136-I-SDV-139</i> <i>LO 110-IKNVSP-115 LO 137-ISSGV-141</i> <i>‡ List 118-E--ATGSV-123; 136-I-SDV-139</i> <i>‡ LO 118-EDKZPEPV-125; 138-ISSGV-142</i> <i>‡ List 110-I-EVAP-114</i> <i>‡ LO 110-IKNVSP-115</i>
List142	502	502	<i>Y92H ; E156K</i>
List143	110	110	E40G
List148	300	300	<i>A277T ; K282F</i>
List149	185	185	T141I
List152	221	221	N76D
List155	277	277	G100E
List156	403	403	K306Q
List158	219	219	T178A
List162	346	346	G181R
List164	240	240	K218E
List174	564	564	N112K
List175	313	315	<i>LIST 248-HDTY--NDTVPSTT-259; 299-ICNK-302</i> <i>LO 248-YDTYNINDTVPPTT-261; 301-IYNK-304</i> <i>‡ LIST 244-DDADLHD-249; 257-S ; 300-C</i> <i>‡ LO 243-D-----D-244; 252-P ; 295-Y</i>
List177	300	300	E265A
List181	558	558	P527A
List182	317	317	M153I
List185	272	272	K242T
List187	166	166	E31G ; R148W
List189	283	283	L104S
List190*	116	116	<i>I55M ; F68S ; G72R</i>
List190*	222	222	L151S
List194*	413	413	<i>D84N ; L123S ; H342Q</i>
List197	147	147	S3F ; K7Q

Supplementary Table S2. List of VACV-List versus VACV-LO amino acid differences. Comparison of the ORFs of the two viruses was performed and the main differences are highlighted. Protein lengths in VACV-List (second column) and in VACV-LO (third column) are indicated. Last column: amino acid substitutions are indicated by their position. Peptide alignments containing amino acid deletions and mutations are in bold characters. Conserved mutations despite the VACV-LO nucleotide sequence polymorphism are in italics. ‡, Indicates that amino acid difference is found only with respect to the polymorphic sequence.

Garcel, A., Crance, J.-M., Drillien, R., Garin, D. and Favier, A.-L. (2007). Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **88**, 1905–1916.

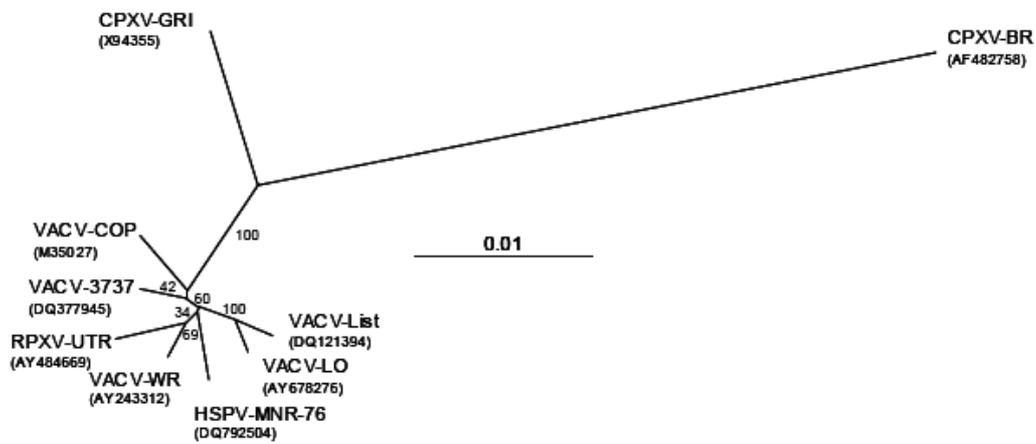
Supplementary material. Dotplot analysis between VACV-List and CPXV-GRI, MPXV-ZRE and VARV-IND. To obtain an overview of the VACV-List genome compared to other OPVs, dotplots were also performed with the cowpox virus strain CPXV-GRI, which is more closely related to VACV than CPXV-BR, with a monkeypox virus strain (MPXV-ZRE) and with a variola virus strain (VARV-IND). Three major gaps were found when comparing VACV-List versus CPXV-GRI by dotplot analysis (Fig. 2b). The first gap (located near position 6000 bp in VACV-List) includes the CPXV-GRI *D6L*, *D7L*, *D8L*, *D9L*, *D10L*, *D11L*, *D12L*, *D13L*, *D14L*, *C1L*, *C2L*, *C3L* and *C4L* ORFs, which are also lacking in other OPVs. The second gap (located near position 175 000 bp in VACV-List) corresponds to a non-coding region in CPXV-GRI, which is not contained in the VACV-List genome. The third one (spanning roughly position 181 000 to 183 000 bp) corresponds to eight additional CPXV-GRI ORFs: *K2R*, *K1R*, *B22R*, *B19R*, *B18R* and *B17R*. As for both *B21R* and *B20R*, annotated *List007* and *List008*, they are localised at the left end of VACV-List genome. Except for CPXV-GRI *B18R* and *B17R*, these ORFs are not found at all in VACV species. As the CPXV-GRI genome is approximately 224 000 bp long, whereas VACV-List is 189 421 bp long, the gaps are mainly due to additional genes in CPXV-GRI.

The VACV-List versus MPXV-ZRE dotplot identified six gaps (Fig. 2c). The first is due to the MPXV-ZRE *D2L* ORF, which is lacking in other VACV strains. The second gap (around position 150 000 bp in VACV-List) corresponds to the absence of a part of *List156* and *List157* in the MPXV-ZRE genome. The third one (spanning roughly the region from 159 500 to 164 500 bp) is due to the absence of *List171**, *List172*, *List173* and *List174* in MPXV-ZRE. The fourth gap (around position 175 000 bp) is the consequence of the absence of *List187* and an adjacent non-coding region. The fifth gap (178 000 to 181 000 bp matching with 175 000 to 190 000 bp in MPXV-ZRE) corresponds on one hand to the absence of *List193* and *List194* in MPXV-ZRE and on the other hand to the presence of MPXV-ZRE *B18R*, *B21R* genes, while MPXV-ZRE *B19R*, *B20R* are localised at the left end of the VACV-List genome. The last gap (184 500 to 186 000 bp) corresponds to *List198** and an adjacent non-coding region, which are deleted in the MPXV-ZRE genome.

When VACV-List versus VARV-IND dotplot analysis was performed, seven gaps were detected (Fig. 2d). The first gap (6400 to 7500 bp) is due to the lack of *List006* and a non-coding sequence in the VARV-IND genome. The second one (13 000 bp to 15 000 bp) is due to the

absence of a block containing *List014** ORF in the VARV-IND genome. The third one (around 15 500 bp) corresponds to the lack of *List016* and *List017*. The fourth gap (30 000 to 32 500 bp) corresponds to the absence of four VACV-List ORFs (*List032*, *List033* and *List034*) in the VARV-IND genome and does not include *Lis050*. The fifth one (162 000 to 164 000 bp) matches with the missing *List171** to *List174* region in the VARV-IND genome. The sixth one (174 000 to 175 500 bp of VACV-List corresponding to 158 000 to 161 000 bp of VARV-IND) is due to the absence of *List186*, *List187*, *List188* and a part of *List189* and the presence of variola specific ORFs VARV-IND *B10R* and *B11R*. The last gap (181 000 to 185 000 bp of VACV-List corresponding to 165 000 to 177 000 bp of VARV-IND) is the most divergent region. This region corresponds in VACV-List to the absence of *List195* to *List198** while the VARV-IND region contains three VARV-IND-specific *B23R*, *B24R* and *B26R* ORFs. As for VARV-IND, *B25R* is localised at the left end of the VACV-List genome. Although the majority of these ORFs have not yet been studied, it is likely that some of them are involved in virulence. *List013*, *List164*, *List170*, *List172* and *List195* proteins participate in IL-18, Toll-like and TNF receptor pathways. Among them, *List013*, *List172* and *List195* are not encoded in the VARV-IND virus. As expected, the different dotplot analyses confirm that the divergent regions are contained in the variable ITR parts of the genome.

Garcel, A., Crance, J.-M., Drillien, R., Garin, D. and Favier, A.-L. (2007). Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **88**, 1905–1916.



Supplementary Fig. S2. OPV phylogenetic relationship based on IFN virokinase genes. Phylogenetic analysis of OPV strains obtained by the neighbour-joining method comparing nucleotide concatemers produced from nine IFN virokinase genes, using a global gap removal distance method option.

Garcel, A., Crance, J.-M., Drillien, R., Garin, D. and Favier, A.-L. (2007). Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **88**, 1905–1916.

References

- Ahn, B. Y. & Moss, B. (1992a). Glutaredoxin homolog encoded by vaccinia virus is a virion-associated enzyme with thioltransferase and dehydroascorbate reductase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7060-7064.
- Ahn, B. Y. & Moss, B. (1992b). RNA polymerase-associated transcription specificity factor encoded by vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3536-3540.
- Ahn, B. Y., Jones, E. V. & Moss, B. (1990). Identification of the vaccinia virus gene encoding an 18-kilodalton subunit of RNA polymerase and demonstration of a 5' poly(A) leader on its early transcript. *J Virol* **64**, 3019-3024.
- Ahn, B. Y., Rosel, J., Cole, N. B. & Moss, B. (1992). Identification and expression of rpo19, a vaccinia virus gene encoding a 19-kilodalton DNA-dependent RNA polymerase subunit. *J Virol* **66**, 971-982.
- Alcami, A. & Smith, G. L. (1992). A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* **71**, 153-167.
- Alcami, A. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* **69**, 4633-4639.
- Alcami, A., Symons, J. A. & Smith, G. L. (2000). The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J Virol* **74**, 11230-11239.
- Alcami, A., Khanna, A., Paul, N. L. & Smith, G. L. (1999). Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors. *J Gen Virol* **80**, 949-959.
- Aldaz-Carroll, L., Whitbeck, J. C., Ponce de Leon, M., Lou, H., Hirao, L., Isaacs, S. N., Moss, B., Eisenberg, R. J. & Cohen, G. H. (2005). Epitope-mapping studies define two major neutralization sites on the vaccinia virus extracellular enveloped virus glycoprotein B5R. *J Virol* **79**, 6260-6271.
- Almazan, F., Tschärke, D. C. & Smith, G. L. (2001). The vaccinia virus superoxide dismutase-like protein (A45R) is a virion component that is nonessential for virus replication. *J Virol* **75**, 7018-7029.
- Amegadzie, B. Y., Ahn, B. Y. & Moss, B. (1991). Identification, sequence, and expression of the gene encoding a Mr 35,000 subunit of the vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **266**, 13712-13718.
- Amegadzie, B. Y., Ahn, B. Y. & Moss, B. (1992). Characterization of a 7-kilodalton subunit of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase with structural similarities to the smallest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *J Virol* **66**, 3003-3010.
- Ansarah-Sobrinho, C. & Moss, B. (2004a). Vaccinia virus G1 protein, a predicted metalloprotease, is essential for morphogenesis of infectious virions but not for cleavage of major core proteins. *J Virol* **78**, 6855-6863.
- Ansarah-Sobrinho, C. & Moss, B. (2004b). Role of the I7 protein in proteolytic processing of vaccinia virus membrane and core components. *J Virol* **78**, 6335-6343.
- Banham, A. H. & Smith, G. L. (1993). Characterization of vaccinia virus gene B12R. *J Gen Virol* **74**, 2807-2812.
- Banham, A. H., Leader, D. P. & Smith, G. L. (1993). Phosphorylation of ribosomal proteins by the vaccinia virus B1R protein kinase. *FEBS Lett* **321**, 27-31.
- Bayliss, C. D. & Condit, R. C. (1995). The vaccinia virus A18R gene product is a DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem* **270**, 1550-1556.
- Bayliss, C. D. & Smith, G. L. (1996). Vaccinia virion protein I8R has both DNA and RNA helicase activities: implications for vaccinia virus transcription. *J Virol* **70**, 794-800.
- Bayliss, C. D. & Smith, G. L. (1997). Vaccinia virion protein VP8, the 25 kDa product of the L4R gene, binds single-stranded DNA and RNA with similar affinity. *Nucleic Acids Res* **25**, 3984-3990.
- Bayliss, C. D., Wilcock, D. & Smith, G. L. (1996). Stimulation of vaccinia virion DNA helicase I8R, but not A18R, by a vaccinia core protein L4R, an ssDNA binding protein. *J Gen Virol* **77**, 2827-2831.
- Beaud, G. (1995). Vaccinia virus DNA replication: a short review. *Biochimie* **77**, 774-779.
- Beaud, G., Beaud, R. & Leader, D. P. (1995). Vaccinia virus gene H5R encodes a protein that is phosphorylated by the multisubstrate vaccinia virus B1R protein kinase. *J Virol* **69**, 1819-1826.
- Betakova, T., Wolffe, E. J. & Moss, B. (2000). The vaccinia virus A14.5L gene encodes a hydrophobic 53-amino-acid virion membrane protein that enhances virulence in mice and is conserved among vertebrate poxviruses. *J Virol* **74**, 4085-4092.
- Black, E. P. & Condit, R. C. (1996). Phenotypic characterization of mutants in vaccinia virus gene G2R, a putative transcription elongation factor. *J Virol* **70**, 47-54.
- Blake, N. W., Kettle, S., Law, K. M., Gould, K., Bastin, J., Townsend, A. R. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia virus serpins B13R and B22R do not inhibit antigen presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* **76**, 2393-2398.

- Blasco, R. & Moss, B. (1991). Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J Virol* **65**, 5910-5920.
- Blasco, R., Cole, N. B. & Moss, B. (1991). Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *J Virol* **65**, 4598-4608.
- Blasco, R., Sisler, J. R. & Moss, B. (1993). Dissociation of progeny vaccinia virus from the cell membrane is regulated by a viral envelope glycoprotein: effect of a point mutation in the lectin homology domain of the A34R gene. *J Virol* **67**, 3319-3325.
- Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K. & O'Neill, L. A. (2000). A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10162-10167.
- Bradley, R. R. & Terajima, M. (2005). Vaccinia virus K1L protein mediates host-range function in RK-13 cells via ankyrin repeat and may interact with a cellular GTPase-activating protein. *Virus Res* **114**, 104-112.
- Brown, N. G., Nick Morrice, D., Beaud, G., Hardie, G. & Leader, D. P. (2000). Identification of sites phosphorylated by the vaccinia virus B1R kinase in viral protein H5R. *BMC Biochem* **1**, 2.
- Broyles, S. S. (1993). Vaccinia virus encodes a functional dUTPase. *Virology* **195**, 863-865.
- Broyles, S. S. & Fesler, B. S. (1990). Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor. *J Virol* **64**, 1523-1529.
- Broyles, S. S. & Pennington, M. J. (1990). Vaccinia virus gene encoding a 30-kilodalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **64**, 5376-5382.
- Buller, R. M., Chakrabarti, S., Moss, B. & Fredrickson, T. (1988a). Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology* **164**, 182-192.
- Buller, R. M., Chakrabarti, S., Cooper, J. A., Twardzik, D. R. & Moss, B. (1988b). Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *J Virol* **62**, 866-874.
- Byrd, C. M., Bolken, T. C. & Hruby, D. E. (2002). The vaccinia virus I7L gene product is the core protein proteinase. *J Virol* **76**, 8973-8976.
- Carpenter, M. S. & DeLange, A. M. (1992). Identification of a temperature-sensitive mutant of vaccinia virus defective in late but not intermediate gene expression. *Virology* **188**, 233-244.
- Cassetti, M. C., Merchlinsky, M., Wolffe, E. J., Weisberg, A. S. & Moss, B. (1998). DNA packaging mutant: repression of the vaccinia virus A32 gene results in noninfectious, DNA-deficient, spherical, enveloped particles. *J Virol* **72**, 5769-5780.
- Chang, H. W., Watson, J. C. & Jacobs, B. L. (1992). The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4825-4829.
- Chernos, V. I., Vovk, T. S., Ivanova, O. N., Antonova, T. P. & Loparev, V. N. (1993). [Insertion mutants of the vaccinia virus. The effect of inactivating E7R and D8L genes on the biological properties of the virus]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 30-34.
- Chiu, W. L. & Chang, W. (2002). Vaccinia virus J1R protein: a viral membrane protein that is essential for virion morphogenesis. *J Virol* **76**, 9575-9587.
- Chiu, W. L., Szajner, P., Moss, B. & Chang, W. (2005). Effects of a temperature sensitivity mutation in the J1R protein component of a complex required for vaccinia virus assembly. *J Virol* **79**, 8046-8056.
- Christen, L. M., Sanders, M., Wiler, C. & Niles, E. G. (1998). Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I is an essential viral early gene transcription termination factor. *Virology* **245**, 360-371.
- Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S. & Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* **72**, 1577-1585.
- Chung, C. S., Chen, C. H., Ho, M. Y., Huang, C. Y., Liao, C. L. & Chang, W. (2006). Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *J Virol* **80**, 2127-2140.
- Colamonici, O. R., Domanski, P., Sweitzer, S. M., Larner, A. & Buller, R. M. (1995). Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *J Biol Chem* **270**, 15974-15978.
- Colinas, R. J., Goebel, S. J., Davis, S. W., Johnson, G. P., Norton, E. K. & Paoletti, E. (1990). A DNA ligase gene in the Copenhagen strain of vaccinia virus is nonessential for viral replication and recombination. *Virology* **179**, 267-275.
- Comeau, M. R., Johnson, R., DuBose, R. F., Petersen, M., Gearing, P., VandenBos, T., Park, L., Farrah, T., Buller, R. M. & other authors. (1998). A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* **8**, 473-482.
- Condit, R. C., Easterly, R., Pacha, R. F., Fathi, Z. & Meis, R. J. (1991). A vaccinia virus isatin-beta-thiosemicarbazone resistance mutation maps in the viral gene encoding the 132-kDa subunit of RNA polymerase. *Virology* **185**, 857-861.

- Cudmore, S., Blasco, R., Vincentelli, R., Esteban, M., Sodeik, B., Griffiths, G. & Krijnse Locker, J. (1996). A vaccinia virus core protein, p39, is membrane associated. *J Virol* **70**, 6909-6921.
- Czerny, C. P., Johann, S., Holzle, L. & Meyer, H. (1994). Epitope detection in the envelope of intracellular naked orthopox viruses and identification of encoding genes. *Virology* **200**, 764-777.
- D'Costa, S. M., Antczak, J. B., Pickup, D. J. & Condit, R. C. (2004). Post-transcription cleavage generates the 3' end of F17R transcripts in vaccinia virus. *Virology* **319**, 1-11.
- da Fonseca, F. G., Wolffe, E. J., Weisberg, A. & Moss, B. (2000). Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. *J Virol* **74**, 7508-7517.
- da Fonseca, F. G., Weisberg, A. S., Caeiro, M. F. & Moss, B. (2004). Vaccinia virus mutants with alanine substitutions in the conserved G5R gene fail to initiate morphogenesis at the nonpermissive temperature. *J Virol* **78**, 10238-10248.
- Da Silva, M., Shen, L., Tcherepanov, V., Watson, C. & Upton, C. (2006). Predicted function of the vaccinia virus G5R protein. *Bioinformatics*.
- Davies, M. V., Chang, H. W., Jacobs, B. L. & Kaufman, R. J. (1993). The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J Virol* **67**, 1688-1692.
- Dellis, S., Strickland, K. C., McCrary, W. J., Patel, A., Stocum, E. & Wright, C. F. (2004). Protein interactions among the vaccinia virus late transcription factors. *Virology* **329**, 328-336.
- DeMasi, J., Du, S., Lennon, D. & Traktman, P. (2001). Vaccinia virus telomeres: interaction with the viral I1, I6, and K4 proteins. *J Virol* **75**, 10090-10105.
- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A. & Marshall, W. L. (2004). Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 36570-36578.
- Doglio, L., De Marco, A., Schleich, S., Roos, N. & Krijnse Locker, J. (2002). The Vaccinia virus E8R gene product: a viral membrane protein that is made early in infection and packaged into the virions' core. *J Virol* **76**, 9773-9786.
- Duncan, S. A. & Smith, G. L. (1992). Identification and characterization of an extracellular envelope glycoprotein affecting vaccinia virus egress. *J Virol* **66**, 1610-1621.
- Dyster, L. M. & Niles, E. G. (1991). Genetic and biochemical characterization of vaccinia virus genes D2L and D3R which encode virion structural proteins. *Virology* **182**, 455-467.
- Eckert, D., Williams, O., Meseda, C. A. & Merchlinsky, M. (2005). Vaccinia virus nicking-joining enzyme is encoded by K4L (VACWR035). *J Virol* **79**, 15084-15090.
- Ellison, K. S., Peng, W. & McFadden, G. (1996). Mutations in active-site residues of the uracil-DNA glycosylase encoded by vaccinia virus are incompatible with virus viability. *J Virol* **70**, 7965-7973.
- Engelstad, M., Howard, S. T. & Smith, G. L. (1992). A constitutively expressed vaccinia gene encodes a 42-kDa glycoprotein related to complement control factors that forms part of the extracellular virus envelope. *Virology* **188**, 801-810.
- Esposito, J. J. & Knight, J. C. (1984). Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene region of monkeypox and variola viruses. *Virology* **135**, 561-567.
- Esteban, D. J., Nuara, A. A. & Buller, R. M. (2004). Interleukin-18 and glycosaminoglycan binding by a protein encoded by Variola virus. *J Gen Virol* **85**, 1291-1299.
- Evans, E., Klemperer, N., Ghosh, R. & Traktman, P. (1995). The vaccinia virus D5 protein, which is required for DNA replication, is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *J Virol* **69**, 5353-5361.
- Fang, Q., Yang, L., Zhu, W., Liu, L., Wang, H., Yu, W., Xiao, G., Tien, P., Zhang, L. & Chen, Z. (2005). Host range, growth property, and virulence of the smallpox vaccine: vaccinia virus Tian Tan strain. *Virology* **335**, 242-251.
- Fischer, S. F., Ludwig, H., Holzappel, J., Kvensakul, M., Chen, L., Huang, D. C., Sutter, G., Knese, M. & Hacker, G. (2005). Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis. *Cell Death Differ*.
- Fleming, S. B., Blok, J., Fraser, K. M., Mercer, A. A. & Robinson, A. J. (1993). Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and orf virus. *Virology* **195**, 175-184.
- Fogg, C., Lustig, S., Whitbeck, J. C., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. & Moss, B. (2004). Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *J Virol* **78**, 10230-10237.
- Franke, C. A., Wilson, E. M. & Hruby, D. E. (1990). Use of a cell-free system to identify the vaccinia virus L1R gene product as the major late myristylated virion protein M25. *J Virol* **64**, 5988-5996.

- Funahashi, S., Sato, T. & Shida, H. (1988). Cloning and characterization of the gene encoding the major protein of the A-type inclusion body of cowpox virus. *J Gen Virol* **69**, 35-47.
- Ganesh, V. K., Smith, S. A., Kotwal, G. J. & Murthy, K. H. (2004). Structure of vaccinia complement protein in complex with heparin and potential implications for complement regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8924-8929.
- Garcia, A. D. & Moss, B. (2001). Repression of vaccinia virus Holliday junction resolvase inhibits processing of viral DNA into unit-length genomes. *J Virol* **75**, 6460-6471.
- Gardner, J. D., Tschärke, D. C., Reading, P. C. & Smith, G. L. (2001). Vaccinia virus semaphorin A39R is a 50-55 kDa secreted glycoprotein that affects the outcome of infection in a murine intradermal model. *J Gen Virol* **82**, 2083-2093.
- Gershon, P. D. & Moss, B. (1990). Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4401-4405.
- Gershon, P. D. & Moss, B. (1993). Uridylate-containing RNA sequences determine specificity for binding and polyadenylation by the catalytic subunit of vaccinia virus poly(A) polymerase. *Embo J* **12**, 4705-4714.
- Gershon, P. D., Ahn, B. Y., Garfield, M. & Moss, B. (1991). Poly(A) polymerase and a dissociable polyadenylation stimulatory factor encoded by vaccinia virus. *Cell* **66**, 1269-1278.
- Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R. & Kirn, A. (1986). Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5573-5577.
- Grosenbach, D. W., Hansen, S. G. & Hruby, D. E. (2000). Identification and analysis of vaccinia virus palmitylproteins. *Virology* **275**, 193-206.
- Gross, C. H. & Shuman, S. (1996). Vaccinia virions lacking the RNA helicase nucleoside triphosphate phosphohydrolase II are defective in early transcription. *J Virol* **70**, 8549-8557.
- Grubisha, O. & Traktman, P. (2003). Genetic analysis of the vaccinia virus I6 telomere-binding protein uncovers a key role in genome encapsidation. *J Virol* **77**, 10929-10942.
- Guan, K. L., Broyles, S. S. & Dixon, J. E. (1991). A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**, 359-362.
- Gvakharia, B. O., Koonin, E. K. & Mathews, C. K. (1996). Vaccinia virus G4L gene encodes a second glutaredoxin. *Virology* **226**, 408-411.
- Harris, N., Rosales, R. & Moss, B. (1993). Transcription initiation factor activity of vaccinia virus capping enzyme is independent of mRNA guanylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2860-2864.
- Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., Smith, G. L., Bowie, A. & O'Neill, L. A. (2003). The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* **197**, 343-351.
- Hedengren-Olcott, M., Byrd, C. M., Watson, J. & Hruby, D. E. (2004). The vaccinia virus G1L putative metalloproteinase is essential for viral replication in vivo. *J Virol* **78**, 9947-9953.
- Heljasvaara, R., Rodriguez, D., Risco, C., Carrascosa, J. L., Esteban, M. & Rodriguez, J. R. (2001). The major core protein P4a (A10L gene) of vaccinia virus is essential for correct assembly of viral DNA into the nucleoprotein complex to form immature viral particles. *J Virol* **75**, 5778-5795.
- Higley, S. & Way, M. (1997). Characterization of the vaccinia virus F8L protein. *J Gen Virol* **78**, 2633-2637.
- Higman, M. A., Bourgeois, N. & Niles, E. G. (1992). The vaccinia virus mRNA (guanine-N7)-methyltransferase requires both subunits of the mRNA capping enzyme for activity. *J Biol Chem* **267**, 16430-16437.
- Higman, M. A., Christen, L. A. & Niles, E. G. (1994). The mRNA (guanine-7)-methyltransferase domain of the vaccinia virus mRNA capping enzyme. Expression in *Escherichia coli* and structural and kinetic comparison to the intact capping enzyme. *J Biol Chem* **269**, 14974-14981.
- Hooda-Dhingra, U., Patel, D. D., Pickup, D. J. & Condit, R. C. (1990). Fine structure mapping and phenotypic analysis of five temperature-sensitive mutations in the second largest subunit of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **174**, 60-69.
- Howard, S. T. & Smith, G. L. (1989). Two early vaccinia virus genes encode polypeptides related to protein kinases. *J Gen Virol* **70**, 3187-3201.
- Howell, M. L., Sanders-Loehr, J., Loehr, T. M., Roseman, N. A., Mathews, C. K. & Slabaugh, M. B. (1992). Cloning of the vaccinia virus ribonucleotide reductase small subunit gene. Characterization of the gene product expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 1705-1711.
- Hruby, D. E., Maki, R. A., Miller, D. B. & Ball, L. A. (1983). Fine structure analysis and nucleotide sequence of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3411-3415.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S. & Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* **73**, 8750-8761.

- Huang, J., Huang, Q., Zhou, X., Shen, M. M., Yen, A., Yu, S. X., Dong, G., Qu, K., Huang, P. & other authors. (2004). The poxvirus p28 virulence factor Is An E3 Ubiquitin ligase. *J Biol Chem*.
- Hubbs, A. E. & Wright, C. F. (1996). The A2L intermediate gene product is required for in vitro transcription from a vaccinia virus late promoter. *J Virol* 70, 327-331.
- Husain, M. & Moss, B. (2001). Vaccinia virus F13L protein with a conserved phospholipase catalytic motif induces colocalization of the B5R envelope glycoprotein in post-Golgi vesicles. *J Virol* 75, 7528-7542.
- Husain, M. & Moss, B. (2005). Role of receptor-mediated endocytosis in the formation of vaccinia virus extracellular enveloped particles. *J Virol* 79, 4080-4089.
- Husain, M., Weisberg, A. & Moss, B. (2003). Topology of epitope-tagged F13L protein, a major membrane component of extracellular vaccinia virions. *Virology* 308, 233-242.
- Ichihashi, Y., Oie, M. & Tsuruhara, T. (1984). Location of DNA-binding proteins and disulfide-linked proteins in vaccinia virus structural elements. *J Virol* 50, 929-938.
- Isaacs, S. N., Wolffe, E. J., Payne, L. G. & Moss, B. (1992). Characterization of a vaccinia virus-encoded 42-kilodalton class I membrane glycoprotein component of the extracellular virus envelope. *J Virol* 66, 7217-7224.
- Ishii, K. & Moss, B. (2001). Role of vaccinia virus A20R protein in DNA replication: construction and characterization of temperature-sensitive mutants. *J Virol* 75, 1656-1663.
- Jackson, R. J., Hall, D. F. & Kerr, P. J. (1999). Myxoma virus encodes an alpha2,3-sialyltransferase that enhances virulence. *J Virol* 73, 2376-2384.
- Jackson, S. S., Ilyinskii, P., Philippon, V., Gritz, L., Yafal, A. G., Zinnack, K., Beaudry, K. R., Manson, K. H., Lifton, M. A. & other authors. (2005). Role of genes that modulate host immune responses in the immunogenicity and pathogenicity of vaccinia virus. *J Virol* 79, 6554-6559.
- Jones, E. V. & Moss, B. (1985). Transcriptional mapping of the vaccinia virus DNA polymerase gene. *J Virol* 53, 312-315.
- Kane, E. M. & Shuman, S. (1993). Vaccinia virus morphogenesis is blocked by a temperature-sensitive mutation in the I7 gene that encodes a virion component. *J Virol* 67, 2689-2698.
- Kato, S. E., Strahl, A. L., Moussatche, N. & Condit, R. C. (2004). Temperature-sensitive mutants in the vaccinia virus 4b virion structural protein assemble malformed, transcriptionally inactive intracellular mature virions. *Virology* 330, 127-146.
- Katsafanas, G. C. & Moss, B. (1999). Histidine codons appended to the gene encoding the RPO22 subunit of vaccinia virus RNA polymerase facilitate the isolation and purification of functional enzyme and associated proteins from virus-infected cells. *Virology* 258, 469-479.
- Katsafanas, G. C. & Moss, B. (2004). Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer. *J Biol Chem* 279, 52210-52217.
- Katz, E., Ward, B. M., Weisberg, A. S. & Moss, B. (2003). Mutations in the vaccinia virus A33R and B5R envelope proteins that enhance release of extracellular virions and eliminate formation of actin-containing microvilli without preventing tyrosine phosphorylation of the A36R protein. *J Virol* 77, 12266-12275.
- Kettle, S., Blake, N. W., Law, K. M. & Smith, G. L. (1995). Vaccinia virus serpins B13R (SPI-2) and B22R (SPI-1) encode M(r) 38.5 and 40K, intracellular polypeptides that do not affect virus virulence in a murine intranasal model. *Virology* 206, 136-147.
- Kettle, S., Alcamí, A., Khanna, A., Ehret, R., Jassoy, C. & Smith, G. L. (1997). Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1beta-converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1beta-induced fever. *J Gen Virol* 78, 677-685.
- Klemperer, N., Ward, J., Evans, E. & Traktman, P. (1997). The vaccinia virus I1 protein is essential for the assembly of mature virions. *J Virol* 71, 9285-9294.
- Klemperer, N., McDonald, W., Boyle, K., Unger, B. & Traktman, P. (2001). The A20R protein is a stoichiometric component of the processive form of vaccinia virus DNA polymerase. *J Virol* 75, 12298-12307.
- Kluczyk, A., Siemion, I. Z., Szewczuk, Z. & Wiczorek, Z. (2002). The immunosuppressive activity of peptide fragments of vaccinia virus C10L protein and a hypothesis on the role of this protein in the viral invasion. *Peptides* 23, 823-834.
- Koonin, E. V., Senkevich, T. G. & Chernos, V. I. (1993). Gene A32 product of vaccinia virus may be an ATPase involved in viral DNA packaging as indicated by sequence comparisons with other putative viral ATPases. *Virus Genes* 7, 89-94.
- Kotwal, G. J. & Moss, B. (1989). Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily. *J Virol* 63, 600-606.
- Kovacs, G. R. & Moss, B. (1996). The vaccinia virus H5R gene encodes late gene transcription factor 4: purification, cloning, and overexpression. *J Virol* 70, 6796-6802.

- Langland, J. O. & Jacobs, B. L. (2002). The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* **299**, 133-141.
- Latner, D. R., Xiang, Y., Lewis, J. I., Condit, J. & Condit, R. C. (2000). The vaccinia virus bifunctional gene J3 (nucleoside-2'-O)-methyltransferase and poly(A) polymerase stimulatory factor is implicated as a positive transcription elongation factor by two genetic approaches. *Virology* **269**, 345-355.
- Latner, D. R., Thompson, J. M., Gershon, P. D., Storrs, C. & Condit, R. C. (2002). The positive transcription elongation factor activity of the vaccinia virus J3 protein is independent from its (nucleoside-2'-O)-methyltransferase and poly(A) polymerase stimulatory functions. *Virology* **301**, 64-80.
- Lin, C. L., Chung, C. S., Heine, H. G. & Chang, W. (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* **74**, 3353-3365.
- Lin, S. & Broyles, S. S. (1994). Vaccinia protein kinase 2: a second essential serine/threonine protein kinase encoded by vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7653-7657.
- Lin, S., Chen, W. & Broyles, S. S. (1992). The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase. *J Virol* **66**, 2717-2723.
- Liu, K., Lemon, B. & Traktman, P. (1995). The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro. *J Virol* **69**, 7823-7834.
- Maloney, G., Schroder, M. & Bowie, A. G. (2005). Vaccinia virus protein A52R activates p38 mitogen-activated protein kinase and potentiates lipopolysaccharide-induced interleukin-10. *J Biol Chem* **280**, 30838-30844.
- Martin, K. H., Franke, C. A. & Hruby, D. E. (1999). Novel acylation of poxvirus A-type inclusion proteins. *Virus Res* **60**, 147-157.
- Martin, K. H., Grosenbach, D. W., Franke, C. A. & Hruby, D. E. (1997). Identification and analysis of three myristylated vaccinia virus late proteins. *J Virol* **71**, 5218-5226.
- Martinez-Pomares, L., Thompson, J. P. & Moyer, R. W. (1995). Mapping and investigation of the role in pathogenesis of the major unique secreted 35-kDa protein of rabbitpox virus. *Virology* **206**, 591-600.
- McCoy, S. L., Kurtz, S. E., Macarthur, C. J., Trune, D. R. & Hefeneider, S. H. (2005). Identification of a peptide derived from vaccinia virus A52R protein that inhibits cytokine secretion in response to TLR-dependent signaling and reduces in vivo bacterial-induced inflammation. *J Immunol* **174**, 3006-3014.
- McDonald, W. F. & Traktman, P. (1994). Vaccinia virus DNA polymerase. In vitro analysis of parameters affecting processivity. *J Biol Chem* **269**, 31190-31197.
- McIntosh, A. A. & Smith, G. L. (1996). Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *J Virol* **70**, 272-281.
- McKelvey, T. A., Andrews, S. C., Miller, S. E., Ray, C. A. & Pickup, D. J. (2002). Identification of the orthopoxvirus p4c gene, which encodes a structural protein that directs intracellular mature virus particles into A-type inclusions. *J Virol* **76**, 11216-11225.
- Mercer, J. & Traktman, P. (2005). Genetic and cell biological characterization of the vaccinia virus A30 and G7 phosphoproteins. *J Virol* **79**, 7146-7161.
- Meyer, H., Ropp, S. L. & Esposito, J. J. (1997). Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *J Virol Methods* **64**, 217-221.
- Mohamed, M. R. & Niles, E. G. (2000). Interaction between nucleoside triphosphate phosphohydrolase I and the H4L subunit of the viral RNA polymerase is required for vaccinia virus early gene transcript release. *J Biol Chem* **275**, 25798-25804.
- Mohamed, M. R., Latner, D. R., Condit, R. C. & Niles, E. G. (2001). Interaction between the J3R subunit of vaccinia virus poly(A) polymerase and the H4L subunit of the viral RNA polymerase. *Virology* **280**, 143-152.
- Mohandas, A. R. & Dales, S. (1995). Involvement of spicules in the formation of vaccinia virus envelopes elucidated by a conditional lethal mutant. *Virology* **214**, 494-502.
- Moore, J. B. & Smith, G. L. (1992). Steroid hormone synthesis by a vaccinia enzyme: a new type of virus virulence factor. *Embo J* **11**, 1973-1980.
- Murcia-Nicolas, A., Bolbach, G., Blais, J. C. & Beaud, G. (1999). Identification by mass spectroscopy of three major early proteins associated with viroosomes in vaccinia virus-infected cells. *Virus Res* **59**, 1-12.
- Najera, J. L., Gomez, C. E., Domingo-Gil, E., Gherardi, M. M. & Esteban, M. (2006). Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J Virol* **80**, 6033-6047.
- Ng, A., Tschärke, D. C., Reading, P. C. & Smith, G. L. (2001). The vaccinia virus A41L protein is a soluble 30 kDa glycoprotein that affects virus virulence. *J Gen Virol* **82**, 2095-2105.
- Niles, E. G. & Seto, J. (1988). Vaccinia virus gene D8 encodes a virion transmembrane protein. *J Virol* **62**, 3772-3778.

- Niles, E. G. & Christen, L. (1993). Identification of the vaccinia virus mRNA guanylyltransferase active site lysine. *J Biol Chem* **268**, 24986-24989.
- Niles, E. G., Lee-Chen, G. J., Shuman, S., Moss, B. & Broyles, S. S. (1989). Vaccinia virus gene D12L encodes the small subunit of the viral mRNA capping enzyme. *Virology* **172**, 513-522.
- Niles, E. G., Condit, R. C., Caro, P., Davidson, K., Matusick, L. & Seto, J. (1986). Nucleotide sequence and genetic map of the 16-kb vaccinia virus HindIII D fragment. *Virology* **153**, 96-112.
- Oguiura, N., Spehner, D. & Drillien, R. (1993). Detection of a protein encoded by the vaccinia virus C7L open reading frame and study of its effect on virus multiplication in different cell lines. *J Gen Virol* **74**, 1409-1413.
- Ojeda, S., Domi, A. & Moss, B. (2006). Vaccinia virus G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex. *J Virol* **80**, 9822-9830.
- Palacios, S., Perez, L. H., Welsch, S., Schleich, S., Chmielarska, K., Melchior, F. & Locker, J. K. (2005). Quantitative SUMO-1 modification of a vaccinia virus protein is required for its specific localization and prevents its self-association. *Mol Biol Cell* **16**, 2822-2835.
- Parkinson, J. E. & Smith, G. L. (1994). Vaccinia virus gene A36R encodes a M(r) 43-50 K protein on the surface of extracellular enveloped virus. *Virology* **204**, 376-390.
- Parkinson, J. E., Sanderson, C. M. & Smith, G. L. (1995). The vaccinia virus A38L gene product is a 33-kDa integral membrane glycoprotein. *Virology* **214**, 177-188.
- Parrish, S. & Moss, B. (2006). Characterization of a vaccinia virus mutant with a deletion of the D10R gene encoding a putative negative regulator of gene expression. *J Virol* **80**, 553-561.
- Patel, A. H., Gaffney, D. F., Subak-Sharpe, J. H. & Stow, N. D. (1990). DNA sequence of the gene encoding a major secreted protein of vaccinia virus, strain Lister. *J Gen Virol* **71**, 2013-2021.
- Patel, D. D. & Pickup, D. J. (1989). The second-largest subunit of the poxvirus RNA polymerase is similar to the corresponding subunits of procaryotic and eucaryotic RNA polymerases. *J Virol* **63**, 1076-1086.
- Pedersen, K., Snijder, E. J., Schleich, S., Roos, N., Griffiths, G. & Locker, J. K. (2000). Characterization of vaccinia virus intracellular cores: implications for viral uncoating and core structure. *J Virol* **74**, 3525-3536.
- Perkus, M. E., Goebel, S. J., Davis, S. W., Johnson, G. P., Limbach, K., Norton, E. K. & Paoletti, E. (1990). Vaccinia virus host range genes. *Virology* **179**, 276-286.
- Piacente, S. C., Christen, L. A., Mohamed, M. R. & Niles, E. G. (2003). Effect of selected mutations in the C-terminal region of the vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I on binding to the H4L subunit of the viral RNA polymerase and early gene transcription termination in vitro. *Virology* **310**, 109-117.
- Pires de Miranda, M., Reading, P. C., Tschärke, D. C., Murphy, B. J. & Smith, G. L. (2003). The vaccinia virus kelch-like protein C2L affects calcium-independent adhesion to the extracellular matrix and inflammation in a murine intradermal model. *J Gen Virol* **84**, 2459-2471.
- Price, N., Tschärke, D. C. & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus B9R protein is a 6 kDa intracellular protein that is non-essential for virus replication and virulence. *J Gen Virol* **83**, 873-878.
- Price, N., Tschärke, D. C., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2000). Vaccinia virus gene B7R encodes an 18-kDa protein that is resident in the endoplasmic reticulum and affects virus virulence. *Virology* **267**, 65-79.
- Prins, C., Cresawn, S. G. & Condit, R. C. (2004). An isatin-beta-thiosemicarbazone-resistant vaccinia virus containing a mutation in the second largest subunit of the viral RNA polymerase is defective in transcription elongation. *J Biol Chem* **279**, 44858-44871.
- Puehler, F., Weining, K. C., Symons, J. A., Smith, G. L. & Staeheli, P. (1998). Vaccinia virus-encoded cytokine receptor binds and neutralizes chicken interferon-gamma. *Virology* **248**, 231-240.
- Quick, S. D. & Broyles, S. S. (1990). Vaccinia virus gene D7R encodes a 20,000-dalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **178**, 603-605.
- Ravanello, M. P. & Hruby, D. E. (1994a). Conditional lethal expression of the vaccinia virus L1R myristylated protein reveals a role in virion assembly. *J Virol* **68**, 6401-6410.
- Ravanello, M. P. & Hruby, D. E. (1994b). Characterization of the vaccinia virus L1R myristylprotein as a component of the intracellular virion envelope. *J Gen Virol* **75**, 1479-1483.
- Reading, P. C., Khanna, A. & Smith, G. L. (2002). Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology* **292**, 285-298.
- Reading, P. C., Symons, J. A. & Smith, G. L. (2003). A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus virulence and the inflammatory response to infection. *J Immunol* **170**, 1435-1442.
- Reckmann, I., Higley, S. & Way, M. (1997). The vaccinia virus F17R protein interacts with actin. *FEBS Lett* **409**, 141-146.
- Resch, W., Weisberg, A. S. & Moss, B. (2005). Vaccinia virus nonstructural protein encoded by the A11R gene is required for formation of the virion membrane. *J Virol* **79**, 6598-6609.

- Risco, C., Rodriguez, J. R., Demkowicz, W., Heljasvaara, R., Carrascosa, J. L., Esteban, M. & Rodriguez, D. (1999). The vaccinia virus 39-kDa protein forms a stable complex with the p4a/4a major core protein early in morphogenesis. *Virology* **265**, 375-386.
- Rodriguez, D., Rodriguez, J. R. & Esteban, M. (1993). The vaccinia virus 14-kilodalton fusion protein forms a stable complex with the processed protein encoded by the vaccinia virus A17L gene. *J Virol* **67**, 3435-3440.
- Rodriguez, D., Esteban, M. & Rodriguez, J. R. (1995). Vaccinia virus A17L gene product is essential for an early step in virion morphogenesis. *J Virol* **69**, 4640-4648.
- Roper, R. L., Payne, L. G. & Moss, B. (1996). Extracellular vaccinia virus envelope glycoprotein encoded by the A33R gene. *J Virol* **70**, 3753-3762.
- Roper, R. L., Wolffe, E. J., Weisberg, A. & Moss, B. (1998). The envelope protein encoded by the A33R gene is required for formation of actin-containing microvilli and efficient cell-to-cell spread of vaccinia virus. *J Virol* **72**, 4192-4204.
- Rosales, R., Harris, N., Ahn, B. Y. & Moss, B. (1994). Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit. *J Biol Chem* **269**, 14260-14267.
- Rosengard, A. M., Alonso, L. C., Korb, L. C., Baldwin, W. M., 3rd, Sanfilippo, F., Turka, L. A. & Ahearn, J. M. (1999). Functional characterization of soluble and membrane-bound forms of vaccinia virus complement control protein (VCP). *Mol Immunol* **36**, 685-697.
- Salmons, T., Kuhn, A., Wylie, F., Schleich, S., Rodriguez, J. R., Rodriguez, D., Esteban, M., Griffiths, G. & Locker, J. K. (1997). Vaccinia virus membrane proteins p8 and p16 are cotranslationally inserted into the rough endoplasmic reticulum and retained in the intermediate compartment. *J Virol* **71**, 7404-7420.
- Sanderson, C. M., Parkinson, J. E., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (1996). Overexpression of the vaccinia virus A38L integral membrane protein promotes Ca²⁺ influx into infected cells. *J Virol* **70**, 905-914.
- Sanderson, C. M., Frischknecht, F., Way, M., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (1998). Roles of vaccinia virus EEV-specific proteins in intracellular actin tail formation and low pH-induced cell-cell fusion. *J Gen Virol* **79**, 1415-1425.
- Santos, C. R., Vega, F. M., Blanco, S., Barcia, R. & Lazo, P. A. (2004). The vaccinia virus B1R kinase induces p53 downregulation by an Mdm2-dependent mechanism. *Virology* **328**, 254-265.
- Sanz, P. & Moss, B. (1999). Identification of a transcription factor, encoded by two vaccinia virus early genes, that regulates the intermediate stage of viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2692-2697.
- Saraiva, M. & Alcami, A. (2001). CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J Virol* **75**, 226-233.
- Senkevich, T. G. & Moss, B. (2005). Vaccinia virus H2 protein is an essential component of a complex involved in virus entry and cell-cell fusion. *J Virol* **79**, 4744-4754.
- Senkevich, T. G., Weisberg, A. S. & Moss, B. (2000). Vaccinia virus E10R protein is associated with the membranes of intracellular mature virions and has a role in morphogenesis. *Virology* **278**, 244-252.
- Senkevich, T. G., Ward, B. M. & Moss, B. (2004a). Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *J Virol* **78**, 2357-2366.
- Senkevich, T. G., Ward, B. M. & Moss, B. (2004b). Vaccinia virus A28L gene encodes an essential protein component of the virion membrane with intramolecular disulfide bonds formed by the viral cytoplasmic redox pathway. *J Virol* **78**, 2348-2356.
- Senkevich, T. G., White, C. L., Koonin, E. V. & Moss, B. (2002a). Complete pathway for protein disulfide bond formation encoded by poxviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6667-6672.
- Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E. & Moss, B. (2005). Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18572-18577.
- Senkevich, T. G., White, C. L., Weisberg, A., Granek, J. A., Wolffe, E. J., Koonin, E. V. & Moss, B. (2002b). Expression of the vaccinia virus A2.5L redox protein is required for virion morphogenesis. *Virology* **300**, 296-303.
- Sharp, T. V., Witzel, J. E. & Jagus, R. (1997). Homologous regions of the alpha subunit of eukaryotic translational initiation factor 2 (eIF2alpha) and the vaccinia virus K3L gene product interact with the same domain within the dsRNA-activated protein kinase (PKR). *Eur J Biochem* **250**, 85-91.
- Shors, T., Keck, J. G. & Moss, B. (1999). Down regulation of gene expression by the vaccinia virus D10 protein. *J Virol* **73**, 791-796.
- Shuman, S. & Moss, B. (1987). Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7478-7482.

- Simpson, D. A. & Condit, R. C. (1995). Vaccinia virus gene A18R encodes an essential DNA helicase. *J Virol* **69**, 6131-6139.
- Skinner, M. A., Moore, J. B., Binns, M. M., Smith, G. L. & Boursnell, M. E. (1994). Deletion of fowlpox virus homologues of vaccinia virus genes between the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (A44L) and DNA ligase (A50R) genes. *J Gen Virol* **75**, 2495-2498.
- Smith, G. L. & Chan, Y. S. (1991). Two vaccinia virus proteins structurally related to the interleukin-1 receptor and the immunoglobulin superfamily. *J Gen Virol* **72**, 511-518.
- Smith, G. L., Howard, S. T. & Chan, Y. S. (1989a). Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine proteinase inhibitors. *J Gen Virol* **70**, 2333-2343.
- Smith, G. L., de Carlos, A. & Chan, Y. S. (1989b). Vaccinia virus encodes a thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *Nucleic Acids Res* **17**, 7581-7590.
- Smith, G. L., Chan, Y. S. & Howard, S. T. (1991). Nucleotide sequence of 42 kbp of vaccinia virus strain WR from near the right inverted terminal repeat. *J Gen Virol* **72**, 1349-1376.
- Smith, V. P., Bryant, N. A. & Alcami, A. (2000). Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *J Gen Virol* **81**, 1223-1230.
- Snyder, J. T., Belyakov, I. M., Dzutsev, A., Lemonnier, F. & Berzofsky, J. A. (2004). Protection against lethal vaccinia virus challenge in HLA-A2 transgenic mice by immunization with a single CD8+ T-cell peptide epitope of vaccinia and variola viruses. *J Virol* **78**, 7052-7060.
- Sodeik, B., Griffiths, G., Ericsson, M., Moss, B. & Doms, R. W. (1994). Assembly of vaccinia virus: effects of rifampin on the intracellular distribution of viral protein p65. *J Virol* **68**, 1103-1114.
- Spelner, D., Gillard, S., Drillien, R. & Kirn, A. (1988). A cowpox virus gene required for multiplication in Chinese hamster ovary cells. *J Virol* **62**, 1297-1304.
- Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2005). Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* **201**, 1007-1018.
- Stewart, T. L., Wasilenko, S. T. & Barry, M. (2005). Vaccinia virus F1L protein is a tail-anchored protein that functions at the mitochondria to inhibit apoptosis. *J Virol* **79**, 1084-1098.
- Stuart, D. T., Upton, C., Higman, M. A., Niles, E. G. & McFadden, G. (1993). A poxvirus-encoded uracil DNA glycosylase is essential for virus viability. *J Virol* **67**, 2503-2512.
- Szajner, P., Weisberg, A. S., Wolffe, E. J. & Moss, B. (2001). Vaccinia virus A30L protein is required for association of viral membranes with dense viroplasm to form immature virions. *J Virol* **75**, 5752-5761.
- Szajner, P., Jaffe, H., Weisberg, A. S. & Moss, B. (2003). Vaccinia virus G7L protein interacts with the A30L protein and is required for association of viral membranes with dense viroplasm to form immature virions. *J Virol* **77**, 3418-3429.
- Szajner, P., Jaffe, H., Weisberg, A. S. & Moss, B. (2004). A complex of seven vaccinia virus proteins conserved in all chordopoxviruses is required for the association of membranes and viroplasm to form immature virions. *Virology* **330**, 447-459.
- Takahashi, T., Oie, M. & Ichihashi, Y. (1994). N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins. *Virology* **202**, 844-852.
- Tamin, A., Esposito, J. & Hruba, D. (1991). A single nucleotide substitution in the 5'-untranslated region of the vaccinia N2L gene is responsible for both alpha-amanitin-resistant and temperature-sensitive phenotypes. *Virology* **182**, 393-396.
- Tengelsen, L. A., Slabaugh, M. B., Bibler, J. K. & Hruba, D. E. (1988). Nucleotide sequence and molecular genetic analysis of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by vaccinia virus. *Virology* **164**, 121-131.
- Townsley, A. C., Senkevich, T. G. & Moss, B. (2005a). Vaccinia virus A21 virion membrane protein is required for cell entry and fusion. *J Virol* **79**, 9458-9469.
- Townsley, A. C., Senkevich, T. G. & Moss, B. (2005b). The product of the vaccinia virus L5R gene is a fourth membrane protein encoded by all poxviruses that is required for cell entry and cell-cell fusion. *J Virol* **79**, 10988-10998.
- Traktman, P., Sridhar, P., Condit, R. C. & Roberts, B. E. (1984). Transcriptional mapping of the DNA polymerase gene of vaccinia virus. *J Virol* **49**, 125-131.
- Tscharke, D. C., Reading, P. C. & Smith, G. L. (2002). Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. *J Gen Virol* **83**, 1977-1986.
- Tseng, M., Palaniyar, N., Zhang, W. & Evans, D. H. (1999). DNA binding and aggregation properties of the vaccinia virus I3L gene product. *J Biol Chem* **274**, 21637-21644.
- Turner, P. C. & Moyer, R. W. (1995). Orthopoxvirus fusion inhibitor glycoprotein SPI-3 (open reading frame K2L) contains motifs characteristic of serine proteinase inhibitors that are not required for control of cell fusion. *J Virol* **69**, 5978-5987.

- Twardzik, D. R., Brown, J. P., Ranchalis, J. E., Todaro, G. J. & Moss, B. (1985). Vaccinia virus-infected cells release a novel polypeptide functionally related to transforming and epidermal growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5300-5304.
- Upton, C., Stuart, D. T. & McFadden, G. (1993). Identification of a poxvirus gene encoding a uracil DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4518-4522.
- van Eijl, H., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2000). The vaccinia virus A36R protein is a type Ib membrane protein present on intracellular but not extracellular enveloped virus particles. *Virology* **271**, 26-36.
- van Eijl, H., Hollinshead, M., Rodger, G., Zhang, W. H. & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. *J Gen Virol* **83**, 195-207.
- Vancova, I., La Bonnardiere, C. & Kontsek, P. (1998). Vaccinia virus protein B18R inhibits the activity and cellular binding of the novel type interferon-delta. *J Gen Virol* **79**, 1647-1649.
- Vanderplasschen, A., Mathew, E., Hollinshead, M., Sim, R. B. & Smith, G. L. (1998). Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7544-7549.
- VanSlyke, J. K., Franke, C. A. & Hruby, D. E. (1991). Proteolytic maturation of vaccinia virus core proteins: identification of a conserved motif at the N termini of the 4b and 25K virion proteins. *J Gen Virol* **72**, 411-416.
- Vazquez, M. I., Rivas, G., Cregut, D., Serrano, L. & Esteban, M. (1998). The vaccinia virus 14-kilodalton (A27L) fusion protein forms a triple coiled-coil structure and interacts with the 21-kilodalton (A17L) virus membrane protein through a C-terminal alpha-helix. *J Virol* **72**, 10126-10137.
- Verardi, P. H., Jones, L. A., Aziz, F. H., Ahmad, S. & Yilma, T. D. (2001). Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated in vivo without a concomitant reduction in immunogenicity. *J Virol* **75**, 11-18.
- Wang, S. & Shuman, S. (1995). Vaccinia virus morphogenesis is blocked by temperature-sensitive mutations in the F10 gene, which encodes protein kinase 2. *J Virol* **69**, 6376-6388.
- Wang, S. P. & Shuman, S. (1996). A temperature-sensitive mutation of the vaccinia virus E11 gene encoding a 15-kDa virion component. *Virology* **216**, 252-257.
- Ward, B. M. & Moss, B. (2004). Vaccinia virus A36R membrane protein provides a direct link between intracellular enveloped virions and the microtubule motor kinesin. *J Virol* **78**, 2486-2493.
- Welsch, S., Doglio, L., Schleich, S. & Krijnse Locker, J. (2003). The vaccinia virus I3L gene product is localized to a complex endoplasmic reticulum-associated structure that contains the viral parental DNA. *J Virol* **77**, 6014-6028.
- White, C. L., Weisberg, A. S. & Moss, B. (2000). A glutaredoxin, encoded by the G4L gene of vaccinia virus, is essential for virion morphogenesis. *J Virol* **74**, 9175-9183.
- Whitehead, S. S. & Hruby, D. E. (1994a). Differential utilization of a conserved motif for the proteolytic maturation of vaccinia virus proteins. *Virology* **200**, 154-161.
- Whitehead, S. S. & Hruby, D. E. (1994b). A transcriptionally controlled trans-processing assay: putative identification of a vaccinia virus-encoded proteinase which cleaves precursor protein P25K. *J Virol* **68**, 7603-7608.
- Wilcock, D., Duncan, S. A., Traktman, P., Zhang, W. H. & Smith, G. L. (1999). The vaccinia virus A4OR gene product is a nonstructural, type II membrane glycoprotein that is expressed at the cell surface. *J Gen Virol* **80**, 2137-2148.
- Wolffe, E. J., Isaacs, S. N. & Moss, B. (1993). Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination. *J Virol* **67**, 4732-4741.
- Wolffe, E. J., Weisberg, A. S. & Moss, B. (1998). Role for the vaccinia virus A36R outer envelope protein in the formation of virus-tipped actin-containing microvilli and cell-to-cell virus spread. *Virology* **244**, 20-26.
- Wolffe, E. J., Moore, D. M., Peters, P. J. & Moss, B. (1996). Vaccinia virus A17L open reading frame encodes an essential component of nascent viral membranes that is required to initiate morphogenesis. *J Virol* **70**, 2797-2808.
- Wright, C. F., Keck, J. G., Tsai, M. M. & Moss, B. (1991). A transcription factor for expression of vaccinia virus late genes is encoded by an intermediate gene. *J Virol* **65**, 3715-3720.
- Xiang, Y., Latner, D. R., Niles, E. G. & Condit, R. C. (2000). Transcription elongation activity of the vaccinia virus J3 protein in vivo is independent of poly(A) polymerase stimulation. *Virology* **269**, 356-369.
- Yang, W. P. & Bauer, W. R. (1988). Purification and characterization of vaccinia virus structural protein VP8. *Virology* **167**, 578-584.
- Yeh, W. W., Moss, B. & Wolffe, E. J. (2000). The vaccinia virus A9L gene encodes a membrane protein required for an early step in virion morphogenesis. *J Virol* **74**, 9701-9711.

-
- Zajac, P., Spehner, D. & Drillien, R. (1995). The vaccinia virus J5L open reading frame encodes a polypeptide expressed late during infection and required for viral multiplication. *Virus Res* **37**, 163-173.
- Zhang, W. & Evans, D. H. (1993). DNA strand exchange catalyzed by proteins from vaccinia virus-infected cells. *J Virol* **67**, 204-212.
- Zhang, W. H., Wilcock, D. & Smith, G. L. (2000). Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence. *J Virol* **74**, 11654-11662.
- Zhang, Y. & Moss, B. (1992). Immature viral envelope formation is interrupted at the same stage by lac operator-mediated repression of the vaccinia virus D13L gene and by the drug rifampicin. *Virology* **187**, 643-653.
- Zhang, Y., Keck, J. G. & Moss, B. (1992). Transcription of viral late genes is dependent on expression of the viral intermediate gene G8R in cells infected with an inducible conditional-lethal mutant vaccinia virus. *J Virol* **66**, 6470-6479.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Fernando, G. J. & Frazer, I. H. (1992). The vaccinia virus K2L gene encodes a serine protease inhibitor which inhibits cell-cell fusion. *Virology* **189**, 678-686.

Garcel, A., Crance, J.-M., Drillien, R., Garin, D. and Favier, A.-L. (2007). Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **88**, 1905-1916.

2.4 Conclusions

Le séquençage du génome d'un clone viral sélectionné au sein du vaccin antivariolique de première génération utilisé en France, a permis de comparer ses séquences codantes à celles des autres souches de VACVs et autres OPVs. Ainsi 201 cadres de lecture ouverts ont été annotés, dont 9 ont été identifiés comme pseudogènes correspondant à des fragments ou des versions tronquées de gènes présents dans leur intégralité au sein des séquences génomiques d'autres OPVs. A part quelques exceptions, ces pseudogènes sont également présents au sein des autres souches de VACVs, néanmoins, il reste à confirmer que les protéines tronquées qu'ils codent perdent leur fonctionnalité et pourraient être corrélées à une atténuation de virulence comparativement à d'autres OPVs. Les comparaisons de séquences ont également mis en évidence la présence dans le génome de VACV-List, de 4 gènes absents ou non annotés dans toutes les autres séquences génomiques de VACVs lesquels sont similaires à deux gènes du CMLV (CMLV-CMS), un gène du CPXV souche Brighton (CPXV-BR) et à un gène du CPXV souche GRI-90 (CPXV-GRI). Un de ces gènes, récemment identifié comme inhibiteur de l'apoptose (Gubser et al., 2007), semble avoir des origines cellulaires et aurait été incorporé dans le génome de VACV-List ou d'un CPXV parental relativement récemment au cours de la divergence des OPVs. Par ailleurs, une région longue de 4 kpb, absente des autres souches de VACVs, a été rapprochée à des gènes de CMLV-CMS et de CPXV-GRI, suggérant des échanges génétiques antérieurs entre ces virus. Au sein du génome de VACV-List, deux gènes codant des récepteurs au TNF- α ont remplacé un gène codant un inhibiteur de la voie de l'interféron, présent dans la plupart des autres souches de VACVs. Ainsi, il semblerait que la souche *Lister* soit mieux armée contre la réponse immune au TNF- α , ce qui pourrait avoir un impact sur sa virulence et être relié aux résultats d'un rapport historique soulignant la plus forte fréquence de complications post-vaccinales avec la souche *Lister* comparativement avec la souche NYCBH (Kretzschmar et al., 2006). Finalement, bien que les analyses phylogénétiques soulignent le fort rapprochement existant entre les différentes souches de VACVs, cette étude a mis en évidence une hétérogénéité permettant de mieux appréhender les différences d'innocuité et d'efficacité entre les vaccins anti-varioliques.

3. Diversité de la population virale du vaccin antivariolique de première génération

Dans un contexte d'utilisation bioterroriste du virus de la variole, de nombreux pays ont conservé des stocks de vaccins antivarioliques de première génération, mais ces stocks de vaccins produits chez l'animal ne répondent plus aux normes de fabrication actuelles et doivent être remplacés. Les nouveaux vaccins de deuxième génération sont des vaccins réplicatifs produits sur culture de cellules à partir des mêmes souches vaccinales et répondant mieux aux BPF. Deux types de vaccins de deuxième génération sont développés : des vaccins non clonés issus de la souche vaccinale de première génération ou des vaccins clonés produits après sélection d'un clone viral issu de la souche de départ.

L'absence de connaissances concernant les origines de nombreuses souches de VACVs et les remaniements génétiques qui sont apparus après croisements des souches entre elles au cours du temps, suggèrent la présence d'une diversité au sein des populations virales, qui doit être prise en considération pour l'élaboration de nouveaux vaccins. Nous avons donc étudié la diversité phénotypique et génétique des différents clones viraux, lesquels ont été isolés à partir du vaccin antivariolique souche *Lister* de première génération. Dans un premier temps, les caractéristiques *in vitro* de tous les clones ont été étudiées, en comparant la taille des plages de lyse, le taux de réplication, le rendement de production et la thermosensibilité. Cette étude a permis la sélection de dix clones représentatifs de la diversité de la population virale. Dans un second temps, ces clones ont été comparés *in vivo* pour leur capacités de réplication dans les tissus pulmonaire et cérébral de souris, ainsi que leur potentiel protecteur contre une infection par le CPXV. Enfin un panel de quatorze gènes a été étudié confirmant une relative diversité au travers de leurs caractéristiques génétiques.

3.1 Résultats publiés

Article 2

Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine

soumis dans *Journal of Virology*

Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine

Aude Garcel, Julien Perino, Jean-Marc Crance, Robert Drillien¹, Daniel Garin* & Anne-Laure Favier

Laboratoire de Virologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA)
Emile Pardé, Grenoble, France.

¹IGBMC; CNRS, UMR 7104; Inserm U 596; Illkirch, F-67400 France; Université Louis Pasteur, Strasbourg, F-67000 France.

*corresponding author:

Pr. D. Garin, CRSSA, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, BP87; 38702 La Tronche cedex, France.

Phone: +33-476-63-68-44.

Fax : +33-476-63-69-06.

E-mail : Daniel.Garin@wanadoo.fr

Running title : Diversity of the historical smallpox vaccine

Abstract

Although smallpox has been eradicated, there is concern that the causative agent of this disease, variola virus, could be used as a biological weapon. To be prepared for such a threat, an effective smallpox vaccine should be available, especially because the majority of the world's population has little or no immunity against smallpox. Smallpox vaccines such as the vaccinia virus (VACV) Lister and NYCBH strains, were traditionally produced by collection of skin lymph from animals scarified with VACV. To comply with current good manufacturing practices the smallpox vaccine should now be produced in cell culture from a well characterized clonal isolate. As an initial step in the development of a second generation smallpox vaccine derived from the Lister strain, we have examined the diversity of the traditional vaccine by characterizing a series of 10 viral clones.

In vitro and *in vivo* phenotypic studies showed that the biological behavior of the clones diverged from each other and in most cases diverged from the VACV-List parental population. In addition, sequence analysis showed an intra-strain genetic variation among clones. Taken together, these results demonstrate the heterogeneity of the viral population within the smallpox vaccine and highlight the difficulty in choosing one clone which would meet the current requirements for a safe and effective vaccine candidate.

Introduction

Smallpox was considered “the most dreadful scourge of the human species” (7) and claimed hundreds of millions of victims for centuries. Variola virus (VARV), its causative agent, spreads easily and exclusively from one human being to another by the respiratory route. It causes fever, severe rash and in about 30% of cases, death (7). The disease was eradicated through a worldwide effort coordinated by the World Health Organization’s global vaccination campaign in the second half of the last century but there has been concern for more than twenty years that smallpox could be used as a biological weapon because of its clinical and epidemiological properties (18, 26). Evidence indicating that large quantities of VARV were produced in ex-USSR and allegations from a soviet expert in 1999 that they were developed for military purposes (1), heightened the perception of such risks and prompted the development of pro-active strategies against a potential smallpox outbreak, should it occur. With the success of the eradication campaign declared in 1980 and the subsequent discontinuation of vaccination, a large proportion of the population has low or no immunity against smallpox (5) despite the fact that vaccination is the only currently effective means of containing a smallpox epidemic.

During the last century, vaccinia virus (VACV), which provides cross-protection against VARV, was used throughout the world to produce smallpox vaccines from a large array of infectious VACV strains. Some of the more commonly used strains were the Lister strain, the New York City Board of Health strain (NYCBH) and the Tian Tan strain in Europe, the United States of America (USA) and Asia, respectively. Both the NYCBH strain and the Lister strain are considered to be two of the safest and most effective strains (13, 37). Generally, vaccination with VACV by intra-dermal inoculation caused a relatively localized lesion, resulting in a strong and long lasting immunological response (7). However, adverse reactions can result from vaccination, the most severe being progressive vaccinia (*vaccinia necrosum*), *eczema vaccinatum* disease and encephalitis (6, 10, 16).

In view of the smallpox threat, a number of countries have maintained stockpiles of these first generation smallpox vaccines. Others have recognized a need to replace the existing stockpiles, produced mostly from the skins of live animals (usually calves or sheep) infected with VACV, as this manufacturing process is no longer acceptable. Indeed, this is a poorly controlled process and it is fraught with the risk of contamination with infectious adventitious agents (bacteria, viruses or prions). This has therefore stimulated interest in

developing second generation vaccines using replicative VACV produced in cell cultures according to good manufacturing practices.

The exact origin and lineage of many strains used during the smallpox eradication campaign and their relation to each other are not well characterized. The genotypic diversity of the Dryvax (NYCBH strain) virus population has recently been highlighted (27, 40) . Such diversity should be taken into consideration when developing new vaccines derived from the historical vaccine strains.

Here, we report the diversity of the virus population within the first-generation Lister smallpox vaccine (VACV-List) stored in France. Ten clones were isolated from VACV-List and characterized. First, phenotypic analysis was performed *in vitro* by comparing viral plaque size, rate of replication, yield and thermosensitivity. The clones examined displayed heterogeneity with respect to each of these biological characteristics. The clones selected were then compared *in vivo* for their ability to replicate in the lungs and brains of mice, as well as their capacity to induce protection against an intranasal infection of a cowpox virus (CPXV). Finally, sequence comparisons based on 14 genes confirmed the genetic diversity of the viral population.

Material and methods

Cells and virus strains

The human diploid lung fibroblast MRC-5 cell line (bioMérieux), the rabbit kidney RK₁₃ cell line (ATCC CCL 37) and the African green monkey kidney Vero cell line (ATCC CCL 81) were cultured in RPMI 1640 Glutamax medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The hamster kidney BHK-21 cell line (ATCC CCL 10) was grown in GMEM-Glutamine medium supplemented with 10% FBS, 2.95 g/L tryptose phosphate (Sigma) and 50 mM HEPES. Cell culture was performed at 37°C under 5% CO₂. Infections were performed on confluent cells grown in culture medium supplemented with 5% FBS, and 100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (Invitrogen). Before infection, cells were rinsed and infected with virus in culture medium supplemented with 0.5% FBS and 1% antibiotics. Experiments were always performed with MRC-5 cells cultured within six passages.

The first-generation Lister smallpox vaccine (VACV-List, X55-33), provided by Sanofi Pasteur, was used directly with no additional passage. Infectious titers obtained in MRC-5, BHK-21 and Vero cells were 8.6 log TCID₅₀/mL, 7.4 log TCID₅₀/mL and 8.3 log TCID₅₀/mL, respectively. The vaccinia virus Western Reserve strain (VACV-WR), obtained from the ATCC (ATCC VR-119) was amplified in BHK-21 cells and titered 7.1 log TCID₅₀/mL in MRC-5 cells. The vaccinia virus IHD strain obtained from the ATCC (ATCC VR-156) was amplified in Vero cells and titered 6.6 log TCID₅₀/mL in Vero cells. The cowpox virus Brighton strain (CPXV-BR), obtained from the ATCC (ATCC VR-302) was amplified in Vero cells and titered 7.8 log TCID₅₀/mL in Vero cells.

Animals

BALB/c ByJ mice (female, four to six weeks old) and SWISS OF1 newborn mice (three days old) were purchased from Charles River Laboratories (Arbresle, France). BALB/c ByJ mice were quarantined one week before use. General anesthesia was performed by intraperitoneal injection with a mix of ketamin (100 mg/kg) and atropin (1.5 mg/kg). Animals were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital (330 mg/kg). Each group of animals was housed in filtered boxes. Experiments were performed in accordance with national guidelines governing use of laboratory animals and were approved by the local ethical committee (protocol numbers 2004/20.0 and 2005/18.0).

Virus plaque isolation

Viral clones were obtained by plaque purification of the Sanofi Pasteur smallpox vaccine. Confluent monolayers of MRC-5 cells in six-well dishes were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 2×10^{-4} TCID₅₀ per cell and incubated 1 hour at 37°C. After removal of the inoculum, cells were overlaid with culture medium containing 1.2% agarose (SeaPlaque agarose, Cambrex). One set of dishes was incubated at 37°C and another set at 39.5°C for 5 days. Viral plaques were then isolated by picking one hundred clones at 37°C (numbered 1 to 100) and twenty clones at 39.5°C (numbered 101 to 120). Three sequential rounds of plaque purification were carried out on the 120 clones picked. A stock of each clone was produced on MRC-5 cells at 37°C. Titers expressed as TCID₅₀, 1 TCID₅₀ previously shown to correspond to 1 plaque-forming unit, were determined by serial dilution titration on MRC-5 cells at 37°C five days post-infection (p.i.).

Virus plaque size

For each clone, MRC-5 cells were infected at 5×10^{-3} and 1×10^{-3} TCID₅₀/cell, to obtain about ten plaques per culture dish. After one hour incubation at 37°C or 39.5°C, the inoculum was removed and cells were overlaid with medium containing 1.2% agarose (SeaPlaque agarose, Cambrex). Seventy hours p.i., plaque sizes were measured with an ocular micrometer.

Virus replication, yield and thermosensitivity

To study viral replication, three identical culture dishes containing MRC-5 cells were infected with each clone at 0.01 TCID₅₀/cell and incubated at 34.5°C, 37°C, or 39.5°C for 29 hours. Viral replication was measured by real time PCR, as follows. After 3 cycles of freezing and thawing, DNA was extracted from 200 µL tissue culture supernatant using the automat MagNA Pure LC® (Roche Diagnostics) and the DNA isolation kit I (Roche Diagnostics) according to the manufacturers' instructions. DNA was solubilized in a 100 µL final volume and the amount of viral DNA in 5 µL samples was quantified by real time PCR through amplification of the *List143* gene (A27L in VACV Copenhagen strain) on ABI PRISM® (Applied Biosystem) with the two *Orthopoxvirus* consensus primers GF (5'-GCCAGAGATATCATAGCCGCTC-3') and GR (5'-CAACGACTAACTAATTTGGAAAA AAAGAT-3') and the A27L probe POX (5'-TTTTCCAACCTAAATAGAACTTCATCGTT

GCGTT-3') as published by Scaramozzino *et al.* (38). The average number of DNA copies from triplicate samples was used to compare the different clones. Ten representative clones of the viral population were subsequently selected to perform a second virus replication experiment, also in MRC-5 cell cultures using real time PCR. To examine virus yields directly, MRC-5 cells were infected for 45 hours at 37°C and the infected cultures were titrated by the plaque assay.

Virus multiplication in the lungs of mice

Six week old BALB/c ByJ mice were inoculated intranasally under general anesthesia, with 5×10^4 TCID₅₀ of each selected clone (6 mice per clone), VACV-List (12 mice) or VACV-WR (6 mice). A group of 6 mock-infected mice was inoculated with culture medium. For each group, three of the six mice were sacrificed on the day of inoculation, and the remaining 3 mice were sacrificed three days later, to remove lungs. Tissue was diluted in 1 ml of culture medium and crushed by two 20 second treatments with the Fastprep® instrument. After 3 cycles of freezing and thawing, DNA was extracted from 200 µL supernatant using the automat MagNA Pure LC® and DNA isolation kit I (Roche Diagnostics) then viral DNA was quantified by real time PCR as previously described.

Pathogenesis and kinetics of viral multiplication in the brains of mice

In a preliminary dose-finding experiment, three day old SWISS OF1 newborn mice (n = 10 for each group) were inoculated intracranially (IC) with VACV-List at different viral doses (5, 15, 50, 150, 500, 1500 and 5000 TCID₅₀) in a final volume of 50 µL. Control mice were inoculated IC with an equivalent volume of culture medium (n = 10). In subsequent experiments, to test neuropathogenicity of the virus clones, newborn mice were inoculated IC with 50 TCID₅₀ of each clone (10 mice per clone), VACV-List (20 mice) and VACV-WR (10 mice). Control mice were inoculated IC with an equivalent volume of culture medium (10 mice). The amount of virus in each inoculum was confirmed by titration in cell culture. Neurological disorder and death were observed over a twenty one day period. Virus titers in brain tissue of dead mice were determined on Vero cell cultures. To determine the kinetics of viral multiplication in the brains, a similar experiment was performed with newborn mice sacrificed on days 0, 1, 2 and 4 p.i. To titer the virus, brains were collected, weighed and crushed in medium at a final concentration of 100 mg/mL. After 3 cycles of freezing and

thawing, supernatants were titrated on Vero cells except clone 56 that failed to multiply on Vero cells, so titrations were performed on MRC-5 cells.

Protection against cowpox virus challenge and immunity

Four week old BALB/c ByJ mice were vaccinated with each viral clone (6 mice per clone) or VACV-List (12 mice), under general anesthesia, by scarification of the tail base with 3 μ L of ten-fold viral dilutions from 10^2 to 10^7 TCID₅₀/mL. To examine morbidity, the study was performed in two separate experiments testing five out of ten clones per experiment in parallel with a VACV-List group (6 mice). Between the second and third week after scarification, a “take” was observed by appearance of a characteristic lesion. Mice were challenged 28 days later by intranasal inoculation under general anesthesia with a lethal dose (10^6 TCID₅₀) of cowpox virus (CPXV) corresponding to 30 lethal dose 50% (LD₅₀s) (4, 8, 32). Two control groups (6 mice) were scarified with culture medium and one group was challenged with CPXV whereas the other group was challenged with medium. Mice were observed for signs of CPXV infection, individually weighed every 2-3 days and deaths recorded for a 21 day period after challenge.

To determine VACV-specific neutralizing antibody (Nab) titers, groups of 6 mice were vaccinated with the virus clones or VACV-List at 10^5 TCID₅₀/mL. They were then sacrificed 28 days later and blood was collected by intra-cardiac sampling. The neutralization assay was performed as previously described (25). Briefly, heat-inactivated sera were serially diluted two-fold and added to an equal volume of VACV suspension (15-55 TCID₅₀/100 μ L). The mixtures were incubated at 37°C for one hour before being plated on Vero cells cultured in 24-well plates (200 μ L/well). Each dilution was tested in quadruplicate. After 2 days incubation at 37°C, cells were fixed by adding 400 μ L/well of fixing and staining solution (4.5% formaldehyde, 0.2% crystal violet and 7.5% ethanol in PBS). Nab titers were calculated as the reciprocal serum dilution entailing for 50% VACV plaque reduction compared to the number of VACV plaques obtained with a control negative serum.

Genetic comparisons

Virus clones were amplified on BHK-21 cells and purified using standard procedures described previously (22). Purified virus was digested for 1 hour at 55°C in 1 mL buffer containing 100mM Tris HCl pH 7.8, 2mM EDTA, 54% saccharose, 2% SDS, 200 mM β -mercaptoethanol and 250 μ g/ml proteinase K. DNA was extracted from the digested virus

using a standard phenol/chloroform protocol. PCR products were amplified with the platinum®Taq high fidelity DNA polymerase (Invitrogen) in accordance with technical instructions with an annealing temperature of 55°C. PCR amplicons were sequenced using primers listed in the **Supplementary data 1**. Sequence alignments were performed using the BioEdit program using BLOSUM62 similarity matrix. Phylogenetic analyses were performed from the BioEdit alignment with a global gap removal to exclude gaps from alignments. Neighbor-joining trees were constructed using the program MEGA3 (20) with a Tamura-Nei substitution model. The robustness of trees was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. The fourteen selected genes were concatenated to form a single sequence with the following order: *List124*, *List143*, *List152*, *List156*, *List197*, *List090*, *List056*, *List055*, *List175*, *List009*, *List182*, *List190*B*, *List114* and *List185* (in accordance with VACV-List annotation, (12)).

Statistical analysis

For *in vitro* phenotypic studies, the unpaired t-test and the ANOVA Newmann-Keuls test were performed. Animal survival in neuropathogenicity and protection studies was analyzed with the Log-Rank test while morbidity was analyzed with an unpaired t-test. Tests were performed with an α risk of 5%. Fifty percent protective doses were determined by the Reed-Muench calculation. The Spearman test was used to perform correlation studies.

Sequence availability

All gene sequences were obtained from the GenBank database under the following accession numbers: VACV-List, DQ121394 (12); VACV-COP, M35027 (15); VACV-LO, AY678276; LC16mO, AY678277; LC16m8, AY678275 (34); VACV-WR, AY243312; VACV-3737, DQ377945; RPXV-UTR, AY484669 (28); CPXV-BR, AF482758; CPXV-GRI, X94355; VACV-Wyeth Acambis clone 3, AY313848.

Results

In vitro phenotypic studies

Plaque phenotype of VACV-List clones

The VACV-List smallpox vaccine was cloned by plaque isolation on MRC-5 cells and one hundred and twenty clones were picked and submitted to two additional rounds of plaque purification. Eighty-four of these clones were retained for further analysis. The mean plaque size of each clone was determined by microscopy with an ocular micrometer after infection of MRC-5 cells and found to vary between 2 and 5 mm, with an overall mean of 3.0 ± 0.5 mm in diameter (mean \pm standard deviation) (**Fig. 1**). Clones 25 and 38 were selected for further study as they produced the smallest plaques compared to other selected clones, with an average size of 2 mm in diameter (Newman-Keuls test, $p < 0.05$). At the other end of the spectrum, clone 59 formed the largest plaques with an average size of 5 mm in diameter (Newman-Keuls test, $p < 0.01$). Thus the VACV-List population was clearly heterogeneous with respect to plaque size.

Replication of VACV-List clones in MRC-5 cells

In an initial experiment MRC-5 cells were infected with VACV-List at 0.01 TCID₅₀/cell and the increase in virus titer was determined over a 45 hour period (**Supplementary data 2**). At 29 hours p.i., the virus titer was at an intermediary level within the period of exponential increase in titer so that this time period was chosen in further studies as a reflection of the rate of virus multiplication. At 45 hours p.i., the titer corresponded to the maximum level of virus produced and this time period was chosen to measure virus yield. The rate of replication of eighty four isolated clones was then assayed after infection of MRC-5 cells by determining the genomic titer 29 hours p.i. (data not shown). Ten viral clones (25, 38, 47, 56, 59, 62, 67, 73, 84, and 107) were subsequently selected from the initial 84 clones because they represented the broadest range of phenotypes with respect to both the genomic titer at 29 hours p.i. and plaque size in MRC-5 cells.

Cells were then infected with each of the ten clones to determine the infectious titer at 29 and 45 hours p.i. (**Fig. 2**). At 29 hours p.i., clones 62, 73, 84 and 107 reached higher infectious titers than six other clones (clones 25, 38, 47, 56, 59 and 67) (Newman-Keuls test, $p < 0.05$). In addition, clone 25 replicated significantly more slowly ($3.5 \log$ TCID₅₀/mL) than six of the other clones (clones 56, 62, 67, 73, 84 and 107) (Newman-Keuls test, $p < 0.05$). Compared to VACV-List, clones 62, 73, 84 and 107 replicated significantly faster (Newman-

Keuls test, $p < 0.0001$ for 62, 73, 84 and $p < 0.05$ for 107), while no clone replicated more slowly (Newman-Keuls test, $p > 0.05$). Thus, compared to VACV-List, two phenotypes were apparent : (1) an identical phenotype with a comparable replication rate at 29 hours p.i. (clones 25, 38, 47, 56, 59 and 67) and (2) a phenotype with a higher rate of virus replication (clones 62, 73, 84 and 107).

A slightly different picture emerged when 45 hours p.i. titers were compared, at the plateau phase of VACV-List replication. Clones 62, 73, 84 and 107 replicated to average peak titers of 7.0 to 8.1 log TCID₅₀/mL, which were higher than at least five other clones. Clones 38 and 25 produced less infectious virus (5.2 and 5.3 log TCID₅₀/mL virus titers respectively) compared to the other eight clones (Newman-Keuls test, $p < 0.05$) (**Fig. 2**). The virus yields from clones 62 and 73 were similar to that of VACV-List (Newman-Keuls test, $p > 0.05$), whereas all the other clones produced a significantly lower virus yield (Newman-Keuls test, $p < 0.05$ for 84 and $p < 0.0001$ for all the others). Therefore, two phenotypes were apparent as compared to VACV-List: clones that led to a similar virus yield (clones 62 and 73) and clones that led to a lower lower yield (clones 25, 38, 47, 56, 59, 67, 84 and 107).

Temperature sensitivity, defined as a significant reduction in virus titer at 39.5°C compared to that at 37°C (**Supplementary data 3**) was studied at 29 hours p.i. (**Fig. 2**). Clones 56, 62 and 107 were slightly temperature sensitive phenotype in a similar manner to VACV-List, whereas clones 38 and 47 were more thermosensitive (Unpaired t-test, $p < 0.005$), and clones 25, 59, 67, 73 and 84 displayed no temperature sensitivity.

In summary, analysis of the *in vitro* properties of the various clones showed that each of them could be distinguished phenotypically from one another (**Table 1**) thereby demonstrating the heterogeneity of the initial VACV-List population.

In vivo phenotypic studies

Replication of the different viral clones in mice lungs after intranasal inoculation

The replication of selected viral clones was studied in a well-characterized mouse intranasal model of infection (8). Six week old BALB/c mice were infected with 5×10^4 TCID₅₀ of each clone, VACV-List or VACV-WR. The VACV-WR strain was employed as a control due to its high replication capacity in the lungs of mice (30, 39). At day 0 (4 hours p.i.), no virus was detectable by Real Time-PCR in the lungs of any of the animals, the detection threshold being 2,500 DNA copies/organ (data not shown). At day 3 p.i., the VACV-WR genome was detected (4.2×10^7 DNA copies/organ) suggesting, as expected, an

efficient replication of VACV-WR in the lungs (**Fig.3**). By day 3, clones 25, 38, 47 and 84 were detected at a level between 6.6×10^4 to 3.0×10^5 DNA copies/organ, corresponding to an increase of the genomic titer between 26 and 122 fold from day 0 and suggesting low but significant virus replication (Newman-Keuls test, $p < 0.05$ for clones 25, 38 and 47). Clones 56, 59, 62, 67, 73, 107 and VACV-List were also detected in the lungs but only slightly above the threshold level suggesting very low virus replication. The replication of each of the viral clones as well as VACV-List was not sufficient to induce pathogenesis in the animals after an intranasal inoculation, whereas VACV-WR was responsible for severe weight loss and 100% death 4 days p.i. (data not shown). In summary, two phenotypes were observed with respect to replication in the lungs: one group of viruses replicated to a level similar to VACV-List (clones 56, 59, 62, 67, 73, 84, 107), and the other group of clones replicated more efficiently (25, 38 and 47).

Neurovirulence of the virus clones in newborn mice

To investigate the neurovirulence of the viral clones, litters of newborn mice, more sensitive than adults (31), were infected IC with seven graded doses of VACV-List from 5 to 5000 TCID₅₀ (data not shown). The lowest dose that induced 100% mortality (50 TCID₅₀), was chosen for further studies. Newborn mice were then inoculated IC with each viral clone, VACV-List or VACV-WR and observed for 21 days (the experiment was performed twice with comparable results). As described previously (14), neurological disorders (tonic seizures and lethargy) occurred before animal death. As expected (29), VACV-WR was responsible for 100% death at day 7 p.i., whereas all uninfected animals survived (**Fig. 4**). VACV-List infection caused progressive neuropathogenicity with animal death occurring between day 6 to 11 p.i. and ultimately 100% lethality. Significant survival differences were observed after infection with the different viral clones defining three distinct *in vivo* phenotypes. The first phenotype was characterized by viral clones that displayed no significant difference in virulence from VACV-List: clones 38, 56, 59, 62, 84 and 107, with survival curves (Log-rank test; $p > 0.05$) and average survival times (AST) (Newman-Keuls test, $p > 0.05$) similar to VACV-List (**Fig 4; Table 2**). The second phenotype was characterized by clones 47 and 67, which caused death more rapidly than VACV-List and the other clones (Log-rank test; $p < 0.005$ and $p < 0.0005$, respectively) with AST of 5.6 and 5.3 days respectively, significantly lower than VACV-List AST (7.4 days) for clone 67 but not significant for clone 47 (Newman-Keuls test, $p < 0.05$) (**Fig 4; Table 2**). The third phenotype, a more attenuated

phenotype, was characterized by two clones (25 and 73) which were more attenuated. Clone 73 caused only 50% mortality and clone 25 caused delayed death compared to VACV-List (Log-rank test; $p < 0.0005$), with an AST value (10.3 days) significantly longer than the AST of VACV-List (7.4 days) or the other clones (Newman-Keuls, $p < 0.01$).

Virus titers in the brains of dead mice were determined by titration in cell cultures (data not shown). No difference in titer was observed between the viral clones, VACV-List or VACV-WR (Student's *t*-test, $p > 0.05$), suggesting that death occurs once a fatal threshold of virus is reached in the brain (6.0 ± 0.5 log TCID₅₀/100 mg of brain).

These results again highlight the phenotypic diversity: high neurovirulence for clones 47 and 67, intermediate neurovirulence for clones 38, 56, 59, 62, 84 and 107, and finally low neurovirulence for clones 25 and 73 compared to VACV-List.

Protection of mice after immunization with the different clones

In order to determine the efficacy of the different clones in protecting mice against a poxvirus infection, six week old BALB/c mice were scarified at the base of the tail with ten-fold serial dilutions of each clone. Mice were challenged 30 days later with 30 LD₅₀ of CPXV virus. Protective dose 50% (PD₅₀) values were calculated using survival results obtained after immunization with doses from 10⁴ to 10⁷ TCID₅₀/mL (**Table 3**). All sham-immunized mice died, with an AST of 7.3 ± 1.0 days. A dose of 2.7×10^5 of VACV-List induced 50% protection of immunized mice. The most protective clones were clones 62 and 47 with a PD₅₀ of 3.8×10^4 TCID₅₀/mL and 5.0×10^4 TCID₅₀/mL, respectively. In contrast, clones 56, 73, 67 and 38 were less protective with PD₅₀ values greater than 1×10^6 TCID₅₀/mL.

When 10⁶ and 10⁷ TCID₅₀/mL were used to vaccinate animals, no significant difference was observed except with clone 56 (**Supplementary data 4**). With 10⁵ TCID₅₀/mL, the differences between the protective capacity of the clones against CPXV infection was the most striking. Immunization with this dose induced 83.3 % and 100 % protection with clones 47 and 62, respectively, values which were significantly higher than those for the other clones (Log-rank test; $p < 0.05$), whereas clones 38 and 56 were less protective at this dose with none of the 6 mice surviving (Log-rank test; $p < 0.005$) (**Fig 5**). No difference was observed with the other clones (Log-rank test; $p > 0.05$). Using 10⁵ TCID₅₀/mL, clones 38, 56 and 62 were significantly different in inducing protection (Log-rank test; $p < 0.005$) when compared to VACV-List.

Morbidity of the mice was also compared in the protection study performed with 10^7 TCID₅₀/mL, a dose entailing at least 75% survival in each group. Mean weight loss after challenge infection was used as a measure of the severity of disease (**Fig. 6**). Mice immunized with clone 62 lost significantly less weight compared to mice immunized with VACV-List (Mann-Whitney *t*-test; $p < 0.005$) while mice immunized with clone 56 showed the most significant weight loss (Mann-Whitney *t*-test; $p < 0.05$). At day 7 post challenge, clones 62, 84 and 107 were more protective than VACV-List (Unpaired *t*-test; $p < 0.005$ for clone 62 and $p < 0.05$ for clones 84 and 107).

Humoral immunity was assessed by titrating NAb after vaccination with the viral clones at the dose of 10^5 TCID₅₀/mL (**Table 3**). All mice immunized with clones 47 and 84 seroconverted 28 days after immunization and 83 % of the animals seroconverted with clone 62 (seroconversion was documented as a reciprocal NAb titer > 10) whereas no specific NAb were detected in mice after immunization with clones 67 and 73. Comparison between the percentage of mice which seroconverted and the PD₅₀ values demonstrated a positive correlation between protection against the CPXV infection and humoral immunity (Spearman correlation test, $r^2 = 0.7103$; $p < 0.005$).

In conclusion, with respect to protection induced by immunization, the clones could be separated into three groups: the first group representing the most protective clones 62, 47, 107 and 84, with a PD₅₀ value between 0.4 to 1.3×10^5 TCID₅₀/mL; the second group contained less protective clones 38, 67, 73 and 56 with a PD₅₀ values $\geq 1 \times 10^6$ TCID₅₀/mL; and the third group contained the clones conferring intermediate protection, characterized by clones 25 and 59, which protected mice in a manner similar to VACV-List (PD₅₀ of 2.7×10^5 to 6.1×10^5 TCID₅₀/mL).

Genetic study

To understand the genetic basis of the phenotypic variation within the VACV-List viral population, DNA sequence alignments and phylogenetic analysis were performed on the ten selected clones. To ensure that any observed differences were not produced by the gene amplification method, the PCR products of clone 107 were compared to its previously sequenced genome (VACV-List) (12). Some PCR products were sequenced several times to ensure the reliability of the sequencing method (data not shown). Out of the 9,986 bp sequenced, only one nucleotide diverged from the deposited sequence of VACV-List (0.01% error).

Comparisons were then performed on the predicted translation products of fourteen genes chosen to constitute a panel of proteins known to influence virus multiplication: structural proteins of both the intracellular mature virus (List124, List143, List175, List114) or extracellular enveloped virus (List152, List182), virokines (List156, List185, List190*B, List197, List009, List055) and viral enzymes (List056, List090) (**Table 4**). The percentage of variation as compared to the VACV-List ORFs was between 0.18%, which can be considered as background experimental error (clone 107), to 1.57% (clone 62). The protein encoded by List124 displayed the highest level of variation (7.4%). No nucleotide changes resulted in a stop codon. We noticed one mutation that could potentially be responsible for a List175 dysfunction : the C302Y mutation, observed in clones 25, 47, 56, 59, 67 and 84, is responsible for the loss of a palmitoyl-cysteine acceptor described by Grosenbach *et al.* (17).

Phylogenetic analysis based on the highly conserved thymidine kinase (List090) (11) and hemagglutinin (List175) (36) genes, previously used by Leite *et al.* (24), was performed to compare the variations within the VACV-List population as well as within *Orthopoxviruses* (data not shown). As expected, all clones clustered with the Lister strains VACV-List, VACV-LO and VACV-LC16mO, which were separated from the other VACV strains and CPXV strains. This was confirmed by establishing a second phylogenetic tree based on the alignment of the fourteen concatenated genes (**Fig. 7**).

Discussion

It has long been recognized that in the absence of cloning, virus stocks contain heterogeneous populations and this has been documented in particular for several first generation smallpox vaccines by Weltzin et al. (40) and Kutinova *et al.* (21). The latter authors demonstrated that the clones derived from the vaccine differed in plaque size, reproductive capability at elevated temperature and residual virulence in mice, with no correlation between these three phenotypes, while a negative correlation was observed between immune reactivity and the degree of safety of different viral clones. They also showed that Dryvax contains viral subpopulations that are more neurovirulent than the vaccine itself, a finding that was confirmed by Weltzin et al. (40).

Two principal strategies have been adopted to develop second-generation smallpox vaccines. In one method the historical first-generation vaccine is cloned in order to select a viral clone that matches or exceeds the global viral population in immunogenicity and protection but displays equivalent or lower virulence that may produce less adverse reactions upon human vaccination (19, 33, 40). In another method, the heterogeneous viral population of the polyclonal field-proven vaccine strain is maintained through a limited number of cell culture passages (8, 35). To date, several second-generation smallpox vaccine candidates have been studied. In the USA, Acambis laboratories have selected, in MRC-5 cells, a clone from the VACV first-generation vaccine Dryvax (NYCBH strain), to produce the monoclonal candidate vaccine ACAM1000 (40), leading to the production of the second-generation candidate vaccine ACAM2000 (33). In Japan, the LC16m8 strain was isolated from the polyclonal Japanese Lister original strain (LO) (34). In Europe, Sanofi-Pasteur laboratories have developed an uncloned second-generation vaccine candidate from the first-generation Lister vaccine, by producing the vaccine on primary chicken embryo cells. This production process is likely to maintain vaccine heterogeneity and this vaccine candidate would be expected to have essentially the same properties as the first-generation vaccine it was derived from. This vaccine candidate proved to be as safe, immunogenic and protective as the historical smallpox vaccine in mice (9).

In this study, the phenotypic and genetic diversity of the first-generation smallpox vaccine, VACV-List, has been addressed. Although similar work has been carried out on the NYCBH strain it is no doubt wise to gain a better understanding of other smallpox vaccines particularly because the NYCBH strain turned out to have unexpected side effects (2) that may or may not be characteristic of any smallpox vaccine. *In vitro*, the polyclonal nature of

the VACV-List population was demonstrated by the variability in plaque size, replication capacity and temperature sensitivity of the selected clones. Pathogenicity studies in mice, (virus replication in the lungs and neuropathogenicity), and immunogenicity and protection studies confirmed the heterogeneity of the VACV-List population. Finally, genome analysis showed an uneven degree of variation between clones and demonstrated that some genes are preferential targets of diversity. As observed with other first-generation smallpox vaccines by Kutinova *et al.* (21), the *in vitro* phenotypic features of the clones did not correlate with the *in vivo* features. For example, clone 73 rapidly replicated in MRC-5 cells and displayed little thermosensitivity but was one of the less virulent clones in mice following intracranial inoculation. In contrast, clones 25 and 38, which had an attenuated profile *in vitro* (small plaques, low virus yield, thermosensitive in the case of clone 38), were the most virulent in mice. Furthermore, there was no correlation between immunogenicity/protection and the degree of neurovirulence in newborn mice in contrast to previous studies with the standard intracranial test (21, 23) (Spearman correlation test between AST and PD₅₀, $r^2 = 0.0004$ with $p > 0.05$). For instance, clones 47 and 67 were the most neurovirulent clones, but clone 47 was highly immunogenic and protective whereas clone 67 was not. Nor could any correlation be found between the two pathogenesis studies we carried out suggesting a specific biological behavior for each viral clone specific to the pathogenesis test performed. For example, clones 25 and 38 were the most replicative in the lungs of mice, whereas they were among the least virulent when inoculated in the brain. The only correlation observed was between the level of humoral immunity and the level of protection against poxvirus infection as previously described (3, 41).

In our experiments, none of the viral clones could be discriminated from the parental smallpox vaccine with respect to their virulence after intranasal inoculation. The neurovirulence study however allowed us to identify clones 25 and 73 as significantly less neurovirulent than the parental vaccine. Such data would favor these clones as candidates for further investigations into the development of a clonal smallpox vaccine. However, clone 73 was poorly immunogenic and was significantly less protective against the CPXV intranasal challenge as compared with VACV-List but had a virulent profile *in vitro*. Clone 25 induced an immune response equivalent to the parental strain but was one of the most virulent in the lungs and replicated at 39.5°C. On the other hand, clones 47, 62 and 84 surpassed the parental vaccine in immunogenicity and protection. However, clone 47 is more neurovirulent than VACV-List and although clones 62 and 84 are similar to VACV-List in neuropathogenicity,

both clones replicate better in cell culture. Therefore, none of the clones appeared to display a more advantageous protection and safety profile than the parental polyclonal vaccine VACV-List. Although it replicated somewhat more rapidly in cell culture, clone 107, which displayed equivalent immunogenicity and similar virulence in the lung and brain as compared with VACV-List, was considered the most representative of the Lister strain and its genome has been sequenced (12).

In the absence of plaque purification, cell-cultured smallpox vaccines maintain vaccine heterogeneity and they are thought to be as effective as the historical vaccine but may also be prone to produce similar severe side effects. A cloned second-generation smallpox vaccine candidate, like ACAM2000, may prove to be safer than the uncloned vaccines because of removal of more virulent viral clones in the population and possible adventitious viral contaminants. However, vaccine candidates which have lost the heterogeneity characteristic of the original smallpox vaccine may have also lost viral clones important for their efficacy in man.

In conclusion, we have shown that the Lister smallpox vaccine is comprised of a heterogeneous viral population. Each of the viral clones studied so far has a distinct phenotype in cell culture and a distinct biological behavior in mice. Some viral clones proved less neurovirulent than the vaccine itself, but had a lower immunogenicity or multiplied to higher titers in the lungs. Other clones were more immunogenic or protective, but had a virulent profile. These data underline the need to screen a sufficient panel of clones and the difficulty in choosing one viral clone that meets the current standards of safety and efficacy for the development of a future clonal smallpox vaccine. Finally, further characterization of the Lister strain population would help the development of an additional second generation vaccine.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Sanofi-Pasteur, the Service de Santé des Armées (SSA), the Délégation Générale pour l'Armement (DGA) and from the association ARAMI. We thank D. Gratier, H. Blanquaert for technical support, Y. Gauthier for animal facilities and B. and M. Souberbielle for critical reading of the manuscript.

References

1. **Alibek, K.** 2004. Smallpox: a disease and a weapon. *Int J Infect Dis* **8 Suppl 2**:3-8.
2. **Artenstein, A. W., C. Johnson, T. C. Marbury, D. Morrison, P. S. Blum, T. Kemp, R. Nichols, J. P. Balsler, M. Currie, and T. P. Monath.** 2005. A novel, cell culture-derived smallpox vaccine in vaccinia-naïve adults. *Vaccine* **23**:3301-9.
3. **Belyakov, I. M., P. Earl, A. Dzutsev, V. A. Kuznetsov, M. Lemon, L. S. Wyatt, J. T. Snyder, J. D. Ahlers, G. Franchini, B. Moss, and J. A. Berzofsky.** 2003. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9458-9463.
4. **Bray, M., M. Martinez, D. F. Smee, D. Kefauver, E. Thompson, and J. W. Huggins.** 2000. Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *J Infect Dis* **181**:10-9.
5. **Bricaire, F., B. Combadiere, E. Rouleau, P. Bossi, D. Garin, B. Lebrun-Vignes, and B. Autran.** 2006. [Evaluation of residual immune response against human pox virus before and after revaccination in healthy volunteers]. *Bull Acad Natl Med* **190**:1035-46; discussion 1046-9.
6. **Cono, J., C. G. Casey, and D. M. Bell.** 2003. Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians. *MMWR Recomm Rep* **52**:1-28.
7. **Fenner, F.** 1989. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res Virol* **140**:465-6; discussion 487-91.
8. **Ferrier-Rembert, A., R. Drillien, J. N. Tournier, D. Garin, and J. M. Crance.** 2007. Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine* **25**:4809-17.
9. **Ferrier-Rembert A., D. R., Meignier B., Garin D. and Crance J-M.** 2007. Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate. *Vaccine* **In press**.
10. **Ferry, B. J.** 1977. Adverse reactions after smallpox vaccination. *Med. J. Aust.* **6**:180-183.
11. **Fonseca, F. G., M. C. Lanna, M. A. Campos, E. W. Kitajima, J. N. Peres, R. R. Golgher, P. C. Ferreira, and E. G. Kroon.** 1998. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol* **143**:1171-86.
12. **Garcel, A., J. M. Crance, R. Drillien, D. Garin, and A. L. Favier.** 2007. Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *J Gen Virol* **88**:1906-16.
13. **Garin, D., J. M. Crance, F. Fuchs, B. Autran, and R. Drillien.** 2004. Actualites sur la vaccination antivariolique. Update on smallpox vaccines. *Médecine et maladies infectieuses* **34**:20-27.
14. **Ginsberg, A. H., and K. P. Johnson.** 1976. Vaccinia virus meningitis in mice after intracerebral inoculation. *Infect Immun* **13**:1221-7.
15. **Goebel, S. J., G. P. Johnson, M. E. Perkus, S. W. Davis, J. P. Winslow, and E. Paoletti.** 1990. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**:247-66, 517-63.
16. **Greenberg, M.** 1948. Complications of vaccination against smallpox. *Am. J. Dis. Child.* **76**:492-502.
17. **Grosenbach, D. W., S. G. Hansen, and D. E. Hruby.** 2000. Identification and analysis of vaccinia virus palmitoylproteins. *Virology* **275**:193-206.
18. **Henderson, D. A., T. V. Inglesby, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, P. B. Jahrling, J. Hauer, M. Layton, J. McDade, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G.**

- Parker, T. Perl, P. K. Russell, and K. Tonat.** 1999. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama* **281**:2127-37.
19. **Kenner, J., F. Cameron, C. Empig, D. V. Jobes, and M. Gurwith.** 2006. LC16m8: An attenuated smallpox vaccine. *Vaccine*.
20. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**:150-63.
21. **Kutinova, L., V. Ludvikova, V. Simonova, M. Otavova, J. Krystofova, P. Hainz, M. Press, D. Kunke, and V. Vonka.** 1995. Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* **13**:487-93.
22. **Lee, H. J., K. Essani, and G. L. Smith.** 2001. The genome sequence of Yaba-like disease virus, a yatapoxvirus. *Virology* **281**:170-92.
23. **Lee, M. S., J. M. Roos, L. C. McGuigan, K. A. Smith, N. Cormier, L. K. Cohen, B. E. Roberts, and L. G. Payne.** 1992. Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol* **66**:2617-30.
24. **Leite, J. A., B. P. Drumond, G. S. Trindade, Z. I. Lobato, F. G. da Fonseca, S. J. dos, M. C. Madureira, M. I. Guedes, J. M. Ferreira, C. A. Bonjardim, P. C. Ferreira, and E. G. Kroon.** 2005. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis* **11**:1935-8.
25. **Leparc-Goffart, I., B. Poirier, D. Garin, M. H. Tissier, F. Fuchs, and J. M. Crance.** 2005. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J Clin Virol* **32**:47-52.
26. **Levy-Bruhl, D., and N. Guerin.** 2001. The use of smallpox virus as a biological weapon: the vaccination situation in France. *Euro Surveill* **6**:171-8.
27. **Li, G., N. Chen, Z. Feng, R. M. Buller, J. Osborne, T. Harms, I. Damon, C. Upton, and D. J. Esteban.** 2006. Genomic sequence and analysis of a vaccinia virus isolate from a patient with a smallpox vaccine-related complication. *Virol J* **3**:88.
28. **Li, G., N. Chen, R. L. Roper, Z. Feng, A. Hunter, M. Danila, E. J. Lefkowitz, R. M. Buller, and C. Upton.** 2005. Complete coding sequences of the rabbitpox virus genome. *J Gen Virol* **86**:2969-77.
29. **Li, Z., S. A. Rubin, R. E. Taffs, M. Merchlinsky, Z. Ye, and K. M. Carbone.** 2004. Mouse neurotoxicity test for vaccinia-based smallpox vaccines. *Vaccine* **22**:1486-93.
30. **Lin, C. L., C. S. Chung, H. G. Heine, and W. Chang.** 2000. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* **74**:3353-65.
31. **Ludvikova, V., L. Kutinova, V. Simonova, and M. Otavova.** 1994. Evaluation of various virulence tests with low virulence vaccinia virus in mice. *Biologicals* **22**:187-90.
32. **Martinez, M. J., M. P. Bray, and J. W. Huggins.** 2000. A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus-BALB/c mouse system. *Arch Pathol Lab Med* **124**:362-77.
33. **Monath, T. P., J. R. Caldwell, W. Mundt, J. Fusco, C. S. Johnson, M. Buller, J. Liu, B. Gardner, G. Downing, P. S. Blum, T. Kemp, R. Nichols, and R. Weltzin.** 2004. ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of

- Health strain) - a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int J Infect Dis* **8 Suppl 2**:31-44.
34. **Morikawa, S., T. Sakiyama, H. Hasegawa, M. Saijo, A. Maeda, I. Kurane, G. Maeno, J. Kimura, C. Hiramata, T. Yoshida, Y. Asahi-Ozaki, T. Sata, T. Kurata, and A. Kojima.** 2005. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* **79**:11873-91.
 35. **Phelps, A., A. J. Gates, M. Hillier, L. Eastaugh, and D. O. Ulaeto.** 2005. Comparative efficacy of replicating smallpox vaccine strains in a Murine Challenge Model. *Vaccine* **23**:3500-7.
 36. **Ropp, S. L., Q. Jin, J. C. Knight, R. F. Massung, and J. J. Esposito.** 1995. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *J Clin Microbiol* **33**:2069-76.
 37. **Rosenthal, S. R., M. Merchlinsky, C. Kleppinger, and K. L. Goldenthal.** 2001. Developing new smallpox vaccines. *Emerg Infect Dis* **7**:920-6.
 38. **Scaramozzino, N., A. Ferrier-Rembert, A. L. Favier, C. Rothlisberger, S. Richard, J. M. Crance, H. Meyer, and D. Garin.** 2007. Real-Time PCR to Identify Variola Virus or Other Human Pathogenic Orthopox Viruses. *Clin Chem*.
 39. **Turner, G. S.** 1967. Respiratory infection of mice with vaccinia virus. *J Gen Virol* **1**:399-402.
 40. **Weltzin, R., J. Liu, K. V. Pugachev, G. A. Myers, B. Coughlin, P. S. Blum, R. Nichols, C. Johnson, J. Cruz, J. S. Kennedy, F. A. Ennis, and T. P. Monath.** 2003. Clonal vaccinia virus grown in cell culture as a new smallpox vaccine. *Nat Med* **9**:1125-30.
 41. **Xu, R., A. J. Johnson, D. Liggitt, and M. J. Bevan.** 2004. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *J Immunol* **172**:6265-71.

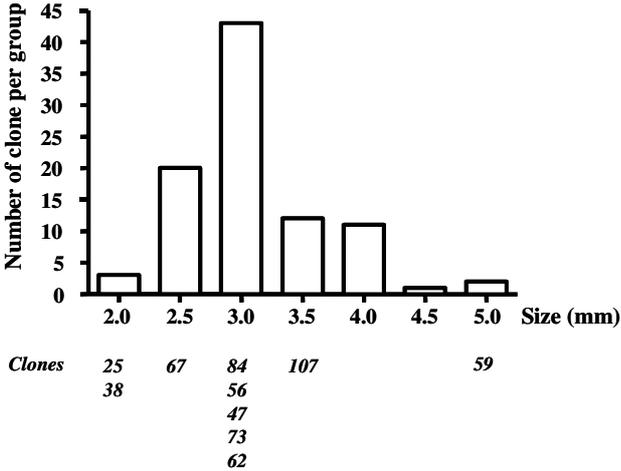


Figure 1 : Plaque phenotype. Distribution of the mean plaque size of eighty-four clones at 70 hours p.i. in MRC-5 cells. The mean size of ten clones selected for further study is indicated under the graph.

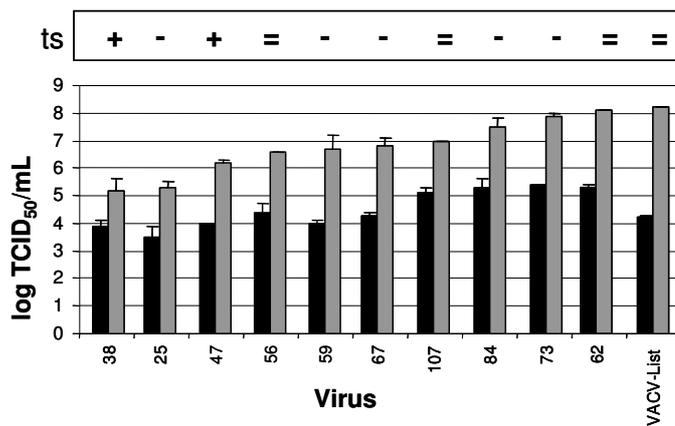


Figure 2 : Replication of the 10 selected clones in MRC-5 cells compared to VACV-List.

Viral titers at 29 hours p.i. (black bars) and 45 hours p.i. (grey bars) with 1.10^{-2} TCID₅₀/cell at 37°C. Viral titers are given in TCID₅₀/ml of infected cell culture. Temperature sensitivity (ts) scores measured 29 hours p.i. for viruses grown at 37°C and 39.5°C are shown above the graph. The symbols + and - indicate clones with respectively the highest level and lowest level of thermosensitivity compared to VACV-List; = indicates clones with similar thermosensitivity.

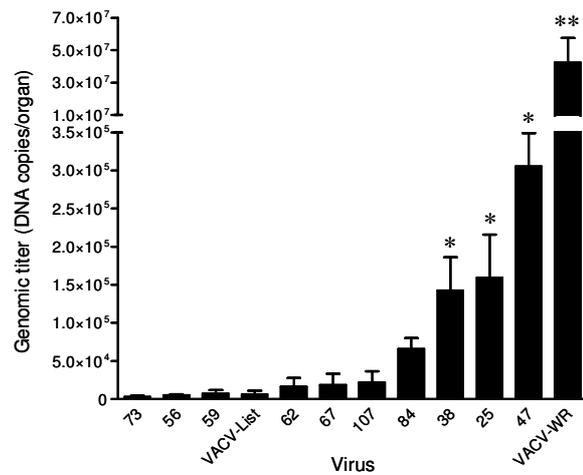


Figure 3 : Virus replication in the lungs of Balb/c mice.

Viral genomic titers in mice lungs were determined 3 days after intranasal inoculation with 5×10^4 TCID₅₀. * and ** indicate statistical differences between the clone and VACV-List titers with $p < 0.05$ and with $p < 0.001$, respectively.

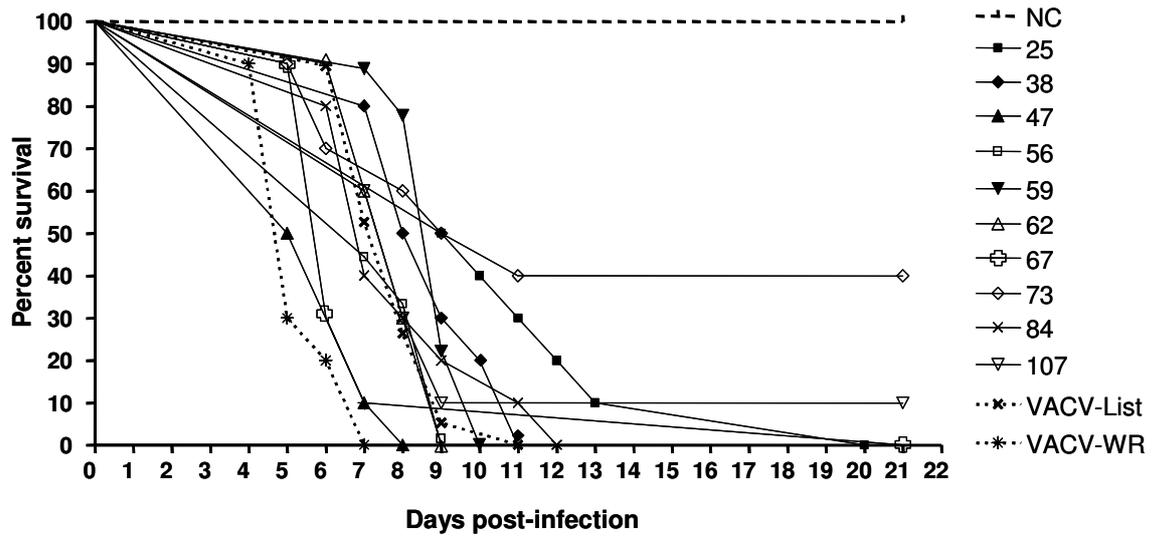


Figure 4 : Neuropathogenicity of the virus clones in newborn Swiss mice.

Three day old mice were inoculated IC with 50 TCID₅₀ per mouse and survival of the animals was monitored. NC, Negative control inoculated with cell culture medium.

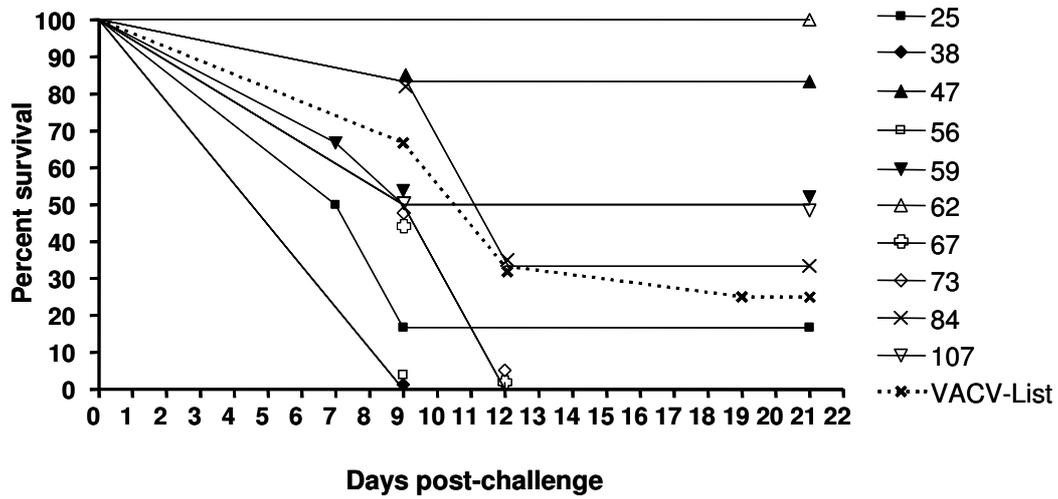


Figure 5 : Survival of vaccinated mice after challenge with CPXV.

Six week old BALB/c mice were scarified at the base of the tail with each clone at 10^5 PFU/ml. Mice were challenged 30 days later with 30 LD₅₀ of CPXV and survival of the animals was monitored thereafter.

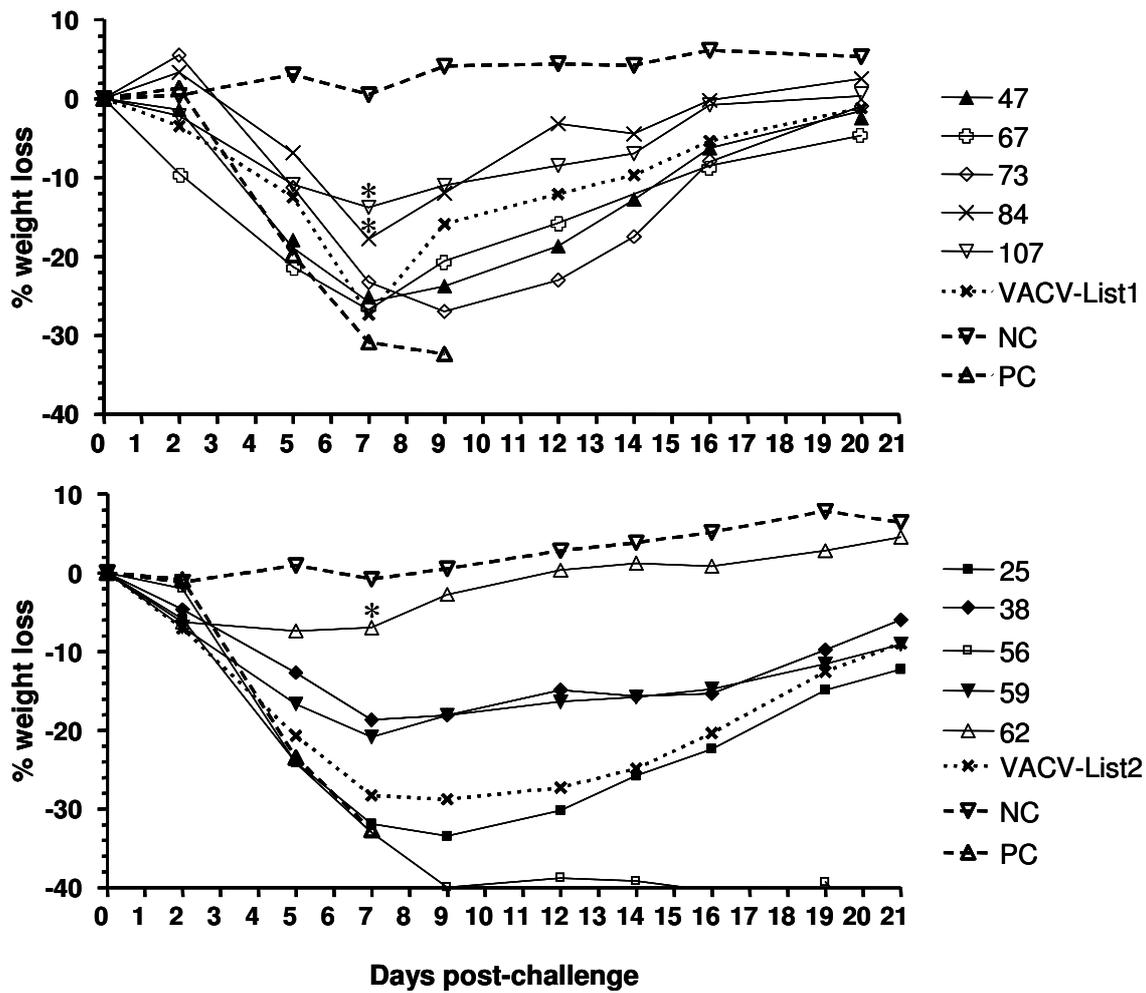


Figure 6 : Morbidity of vaccinated mice after challenge with CPXV.

Six week old BALB/c mice were scarified at the base of the tail with each clone at 10^7 TCID₅₀/ml. Mice were challenged 30 days later with 30 LD₅₀ of CPXV virus and weight loss was monitored thereafter. The experiment was performed on clones separated into two groups and each group was compared to a different VACV-List control group (top and bottom panels). PC, Positive control inoculated with cell culture medium before challenge. NC, Negative control inoculated with cell culture medium. * clones significantly distinct from VACV-List (Unpaired t-test).

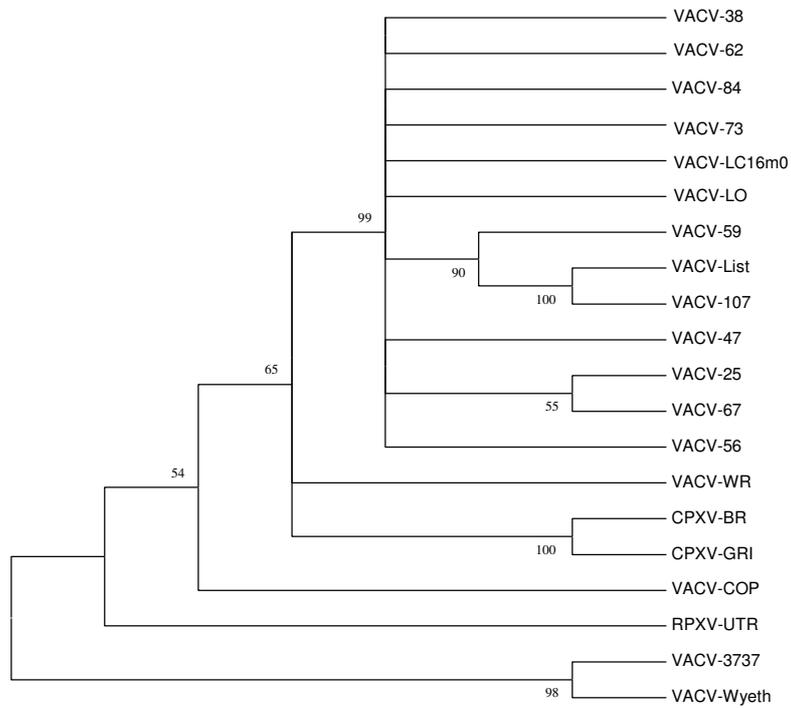


Figure 7 : Phylogenetic analysis on fourteen concatenated VACV genes.

Neighbor-joining tree with 1000 rounds of replication. Bootstrap values are expressed in percentage when they are higher than 50%.

Virus	Plaque phenotype	Replication titer at 29 hours p.i.	Replication titer at 45 hours p.i.	Temperature sensitivity
25	-	=	--	-
38	-	=	--	+
47	#	=	--	+
56	#	=	--	=
59	+	=	--	-
62	#	++	=	=
67	#	=	--	-
73	#	++	=	-
84	#	++	-	-
107	#	+	--	=

Table 1 : Summary of the *in vitro* phenotype of viral clones derived from VACV-List.

Plaque phenotypes: - ; + and # indicate clones that have a significantly smaller, larger or median plaque size as compared to the VACV-List parental virus. Replication titers at 29 hours p.i.: + and ++ indicate clones that have significantly higher titers compared to VACV-List with $p < 0.05$ and $p < 0.0001$, respectively; =, indicates clones similar to VACV-List. Replication titers at 45 hours p.i.: - and -- indicate clones that have significantly lower titers compared to VACV-List with $p < 0.05$ and $p < 0.0001$; = indicates clones similar to VACV-List. Temperature sensitivity: + and - indicate clones that display the highest (+) and lowest (-) level of temperature sensitivity compared to VACV-List; =, indicates clones with a similar level of thermosensitivity.

Virus	Average survival times ± standard deviation
VACV-WR	4.9 ± 1.0
67	5.3 ± 1.1
47	5.6 ± 1.2
73 ^(a)	7.0 ± 2.3
107 ^(b)	7.3 ± 0.8
56	7.3 ± 1.0
62	7.3 ± 1.0
VACV-List	7.4 ± 1.3
84	7.5 ± 2.1
38	8.3 ± 1.5
59	8.4 ± 0.9
25	10.3 ± 2.6

Table 2 : Neuropathogenicity of selected viral clones.

Average survival times of deceased newborn mice in each respective group inoculated IC with 50 TCID₅₀ per mouse. All mice were dead at day 21 except for clone 73 (a) 50% survival at day 21 p.i. and clone 107 (b) 10% survival at day 21 p.i.

<i>Virus</i>	<i>PD₅₀ (PFU/mL)</i>	<i>% Seroconversion</i>	<i>Reciprocal Nab titer/seroconverted mice</i>
62	3.83 x 10 ⁴	83.3	307.8 ± 40.9
47	5.01 x 10 ⁴	100	173.5 ± 158
107	1 x 10 ⁵	66.6	243.7 ± 72.4
84	1.32 x 10 ⁵	100	160.8 ± 95.3
VACV-List	2.74 x 10 ⁵	16.6	140
25	3.36 x 10 ⁵	50	10.6 ± 0.6
59	6.11 x 10 ⁵	33.3	70 ± 69.3
38	1 x 10 ⁶	66.6	199.2 ± 151.6
67	1 x 10 ⁶	0	< 10
73	2.31 x 10 ⁶	0	< 10
56	> 1 x 10 ⁷	16.6	10

Table 3 : Protection and immunity afforded by selected viral clones.

For each viral clone the values indicate the dose needed to protect 50% of the mice against a CPXV challenge (PD₅₀), the percentage of seroconversion of each group of six mice immunized with 10⁵ TCID₅₀/mL and the mean Nab titers (± standard deviation) calculated only for mice that seroconverted.

	25	38	47	56	59	62	67	73	84	107
List009	0	0.71	0.71	1.43	0.71	0.71	0.71	1.43	0.71	0
List055	0	0	0.53	0.53	0.53	1.05	1.05	1.58	0.53	0
List056	0	0	0.39	0.39	0	0.39	0	0.39	0.39	0
List090	1.13	1.13	0.56	2.26	0.56	2.26	1.13	1.13	0	0
List114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
List124	9.26	9.26	9.26	9.26	9.26	9.26	9.26	0	9.26	0
List143	1.30	0	0.65	0.65	0	0.65	0.65	0	0	0
List152	0.45	0.90	0.90	0.90	0.45	0.90	0.45	0.45	0.45	0
List156	0.25	0	0.50	0.25	0.50	0.25	0.50	0.25	0	0
List175	3.83	3.19	6.71	5.11	3.51	7.35	4.15	2.88	4.15	1.92
List182	0.95	0.63	0.63	0.63	0.32	0.63	1.26	0.63	0.95	0
List185	0.37	0.37	0.37	1.10	0.74	0.37	0.37	0.37	0.37	0
List190*B	3.45	3.45	3.45	3.45	0	2.59	3.45	3.45	3.45	0
List197	0.68	1.36	1.36	0	1.36	1.36	1.36	0.68	1.36	0
Total	1.10%	1.01%	1.45%	1.40%	0.95%	1.57%	1.28%	0.80%	1.10%	0.18%

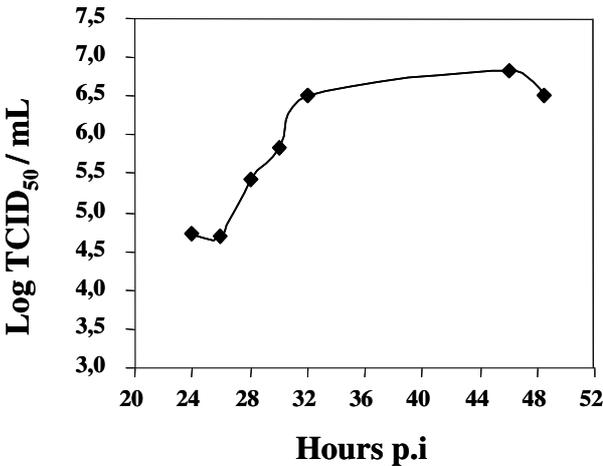
Table 4 : Genetic diversity in a subset of VACV proteins.

The variation in the amino acid sequence of 14 distinct ORFs as compared to the VACV-List sequence is indicated as a percentage of the total number of amino acids in each ORF. The mean variation of the 14 ORFs as compared to VACV-List is given at the bottom of the columns.

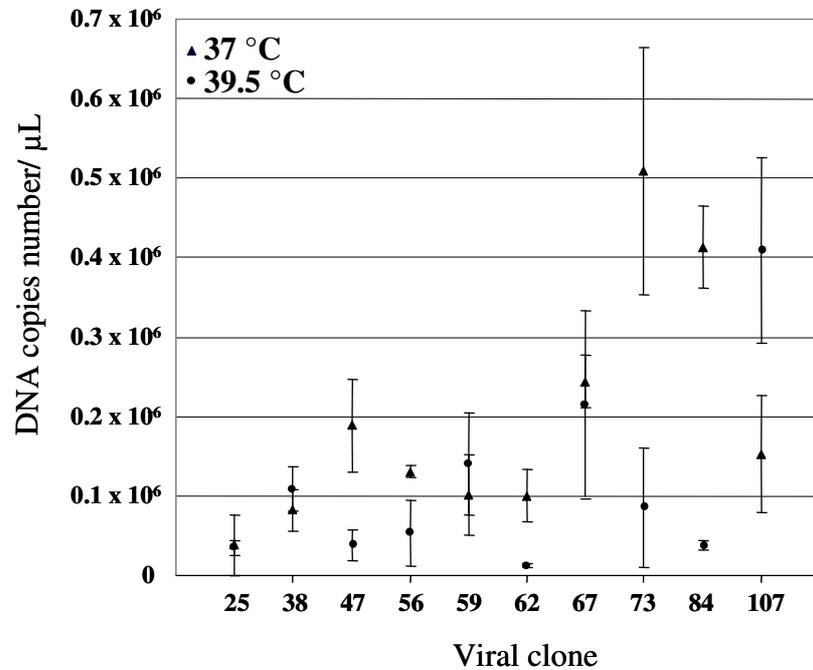
VACV-List	VACV-COP	Forward primer	Reverse primer
<i>List009</i>	C11R	GGTATTGCGTACACAATC	CTAGAGGTAGAGGTATTG
<i>List055</i>	E3L	CTCGTGCAGATATCCAAACG	CGATAGGAACGACGAACCAC
<i>List056</i>	E4L	CATCGGACACTGACTTTC	CTCTGCGTTAGAACGTTTCG
<i>List090</i>	J2R	GATACATAGATCCTCGTCGC	GCGACCTCATTTGCACTTTC
<i>List114</i>	D13L	GATAAAGACGGCGTTTACGG	GAAGAAGGACATGCGTTCC
<i>List124</i>	A9L	CTTACTCATTGATCCGTCC	CAAACGCGATAAGGATACG
<i>List143</i>	A27L	GGATTTCAAGGCAGAAGTTG	GAACCGTTGGTACAATTCC
<i>List152</i>	A36R	GAAATGCCGAATACAGGG	CATATCAGACGGCAAAGGA
<i>List156</i>	A39R	GAAGTCTAGCACTAGTATGCC	CAATTAGACCGCATATTACGC
<i>List175</i>	A56R	GCTGTCTTTCCTAAACCAG	GATAATGGTCACGTGTTACC
<i>List182</i>	B5R	CCACTGAAGAAGACATCTC	GTGCTCGACAGTGTATAC
<i>List185</i>	B8R	CTATTCAACGCAGAGGTCAC	GGACTATAATCAGGGACCTC
<i>List190*B</i>	B13R	GAGTGTGGTAGTGTTACGG	CATTCCGTCGGAGATACG
<i>List197</i>	B22R	CCATAGCTATTCTGGTGC	CATGGATTGGAAACCAAGG

Supplementary data 1 : PCR primers used to sequence VACV-List genes for genetic comparisons of the clones.

VACV-COP: vaccinia virus Copenhagen strain homologous genes.

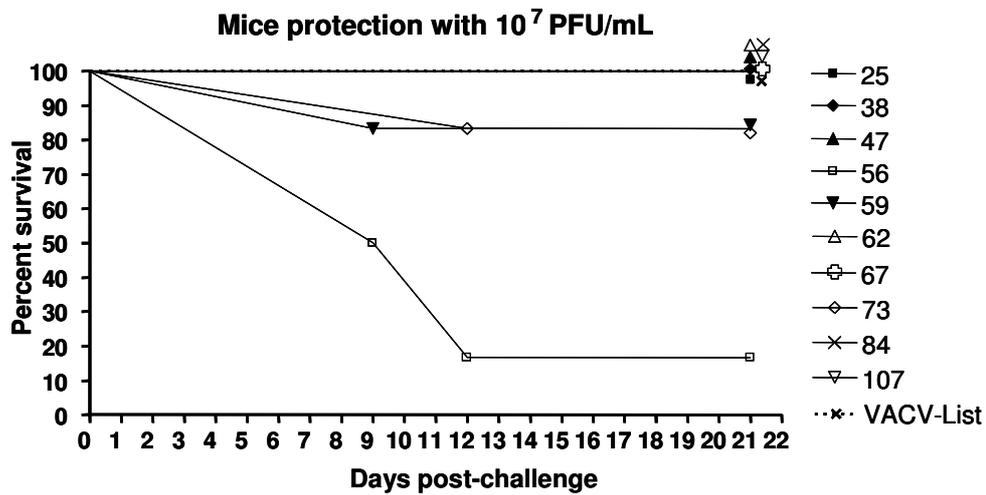
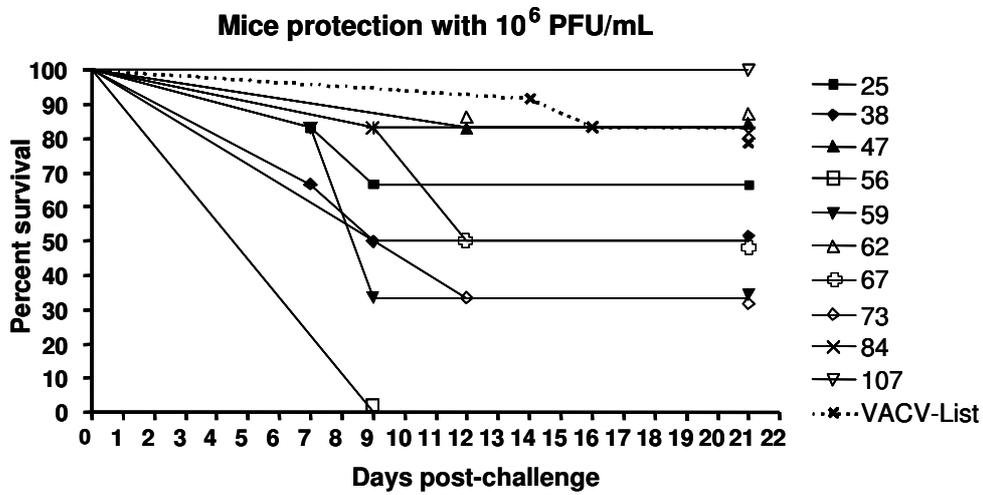


Supplementary data 2 : Kinetic of VACV-List multiplication on MRC-5 cells after infection with 0.01 PFU/cell.



Supplementary data 3 : Thermosensitivity of the 10 viral clones.

MRC-5 cells were infected with 0.01 TCID₅₀/cell and incubated at 37°C and 39.5°C. Virus yields were measured 45 hours p.i. by real-time PCR.



Supplementary data 4 : Survival of vaccinated mice after challenge with CPXV. Six week old BALB/c mice were scarified at the base of the tail with each clone at 10^6 TCID₅₀/ml (top panel) or 10^7 TCID₅₀/ml (bottom panel). Mice were challenged 30 days later with 30 LD₅₀ of CPXV and survival of the animals was monitored thereafter.

3.2 Résultats non publiés

Au cours de cette étude, d'autres expérimentations ont été menées mais n'ont pas été intégrées dans l'article. Les résultats que nous avons obtenus sont présentés ci-dessous.

Lors de l'étude de la réplication virale des clones dans les poumons de souris, suite à une inoculation par voie intranasale, la souche *Western-Reserve* s'est avérée plus pathogène que la souche *Lister*. Cette observation s'est confirmée avec les deux doses inoculées de VACV-List (5.10^5 et 5.10^6 PFU / animal) et VACV-WR (5.10^5 et 5.10^6 PFU / animal) à des groupes de six souris BALB/c de six semaines. Les animaux ont été observés et pesés pendant quatorze jours. Alors que les souris inoculées avec VACV-List ont continué à prendre du poids selon la même progression que des souris non infectées, celles inoculées avec VACV-WR ont perdu jusqu'à 29 % de leur poids initial, ce qui a entraîné leur mort (**Figure 16**).

Dans l'article présenté, la pathogénicité des clones viraux a également été comparée sur un modèle souriceau SWISS OF1 nouveau-né inoculé par voie intracérébrale. Pour mener à bien cette étude, il a préalablement fallu déterminer la dose la plus discriminante de virus à injecter. En effet, une dose trop importante aurait conduit au décès très rapide de 100 % des animaux, ce qui n'aurait pas permis de comparer convenablement l'effet des clones viraux en tenant compte de la pathogénicité propre à chaque clone viral tandis qu'une dose trop faible aurait entraîné une pathogénicité trop faible ou nulle chez l'animal ne permettant aucune distinction. Pour cela, sept doses croissantes (de 5 à 5000 PFU) de vaccin (VACV-List) ont été inoculées par voie intracérébrale à des groupes de dix ou onze souriceaux de trois jours. La pathogénicité a été observée et la mortalité a été relevée quotidiennement pendant quinze jours (**Figure 17**). La dose de 50 PFU étant la dose la plus faible ayant entraîné 100 % de mortalité le plus lentement, elle a été sélectionnée pour procéder à la comparaison des clones dont les résultats sont présentés dans l'article précédent.

Par ailleurs, au sein de cette étude, l'évolution du titre viral dans le tissu cérébral des souriceaux a également été étudiée. Pour cela, quatre souriceaux ont été sacrifiés un, deux et quatre jours après inoculation de 50 PFU par voie intracérébrale. Le tissu cérébral a été prélevé puis broyé dans du milieu de culture cellulaire. Le broyat obtenu a été titré par dilutions successives sur cellules Vero. Les titres obtenus montrent un profil de réplication identique pour tous les groupes sauf pour le clone 38 à deux jours p.i. et le clone 59 (**Figure 18**). Néanmoins, il est très probable que l'absence de titre pour le clone 38 à deux jours p.i., soit aberrant car l'inoculation de ce clone dans le cerveau de souriceaux nouveau-nés entraîne leur mort dans un délai comparable à celui observé avec les autres clones. Concernant le clone 59, il semblerait qu'il y ai eu un problème lors du titrage car ce clone a entraîné 100 % de mortalité (*se conférer aux résultats de l'article*) et le titre viral, obtenu dans le tissu cérébral de ces souris mortes, est similaire à ceux obtenus pour les autres clones (**Figure 19**). En effet, les titres viraux dans les tissus cérébraux des animaux morts sont non significativement distincts entre les clones viraux, VACV-List et VACV-WR (**Figure 19**).

L'étude de la production de « comètes » en culture cellulaire a été réalisée pour tenter de différencier les clones viraux en fonction de leur capacité à produire des formes virales EEV. L'infection de cellules RK₁₃ permet l'observation de plages lyse particulières dites « comètes » due à la production d'EEV responsables d'une dissémination à longue distance contrairement aux autres formes virales disséminant entre les cellules adjacentes. Pour cette étude, des cellules RK₁₃ (ATCC CCL 37) ont été cultivées en plaques 12 puits avec du milieu RPMI 1640 Glutamax complémenté de 5 % de SVF. Le caractère infectieux de chaque clone a été contrôlé en parallèle sur cellules Vero. Chaque puits de cellules a été infecté avec 200 PFU pendant deux heures à 37°C dans du milieu avec 2 % de SVF. L'inoculum a ensuite été retiré, les cellules ont été rincées puis incubées avec du milieu 5 % SVF. Deux jours p.i., les cellules ont été fixées par addition de 750 µL d'une solution de fixation et de coloration (0,2 % cristal violet, 4,5 % formaldéhyde et 7,5 % éthanol dans un tampon phosphate salin). Contrairement au virus de la vaccine souche IHD (VACV-156) décrit pour être un bon producteur de « comètes » sur les cellules RK₁₃, la souche *Lister* (VACV-List) quant à elle n'en produit pas (Payne, 1980) (**Figure 20**). Concernant les clones issus de la souche *Lister*, seul le clone 84 semble produire quelques

formes EEV exprimées par l'apparition de petites comètes dont la forme est peu distinctive. Ainsi, ce critère d'étude n'a pas apporté d'information pertinente permettant de distinguer les clones.

3.3 Conclusions

Au cours de cette étude, la diversité phénotypique et génétique du vaccin antivariolique de souche *Lister* a été étudiée. La nature polyclonale du vaccin a été démontrée *in vitro* avec la mise en évidence d'une variabilité de taille de plages de lyse, de capacité de réplication en culture cellulaire et de thermosensibilité. De plus, les études de pathogénicité, de protection et d'immunogénicité sur modèle souris ont confirmé cette hétérogénéité. Par ailleurs, l'analyse de la diversité génétique a mis en évidence l'existence de gènes cibles préférentielles de l'expression de la diversité mais n'a pas permis de déterminer le rapprochement de certains clones viraux à une autre souche vaccinale.

L'absence de corrélation entre les caractéristiques phénotypiques observées *in vitro* et celles observées *in vivo*, déjà observée par Kutinova *et al.* (Kutinova *et al.*, 1995), a été confirmée au cours de cette étude, ainsi que l'absence de corrélation entre la virulence d'un clone et sa capacité de protection contre une infection à OPV. Les résultats obtenus indiquent également que les clones viraux ont des comportements distincts suivant les différents modèles de pathogénicité utilisés. Ainsi, l'utilisation d'un seul modèle animal n'est pas suffisant pour appréhender le comportement d'un clone et encore moins pour estimer sa virulence après inoculation à l'homme.

Les candidats vaccins non clonés sont produits afin de maintenir l'hétérogénéité du vaccin historique dont ils sont issus. Ils sont susceptibles d'être aussi efficaces que les vaccins historiques mais peuvent potentiellement être responsables des mêmes effets secondaires. Un candidat vaccin produit à partir d'un clone isolé pourrait faire preuve d'une meilleure innocuité suite à l'élimination de tous les autres clones de la population virale lors de la sélection, dont les plus virulents. Néanmoins ce dernier pourrait avoir une moindre efficacité due à l'absence de clones importants pour la protection. Ainsi les avantages et les inconvénients de chacune des stratégies doivent être pris en compte lors

de la décision de leur utilisation en cas de résurgence du VARV, d'autant plus qu'aucun résultat observé sur un modèle animal ne peut être raisonnablement transposé à l'homme.

En conclusion, cette étude a montré que le vaccin historique *Lister* est composé d'une population virale hétérogène tel qu'il l'avait été montré avec la souche NYCBH (Weltzin et al., 2003). Chacun des clones étudiés a présenté des caractéristiques phénotypiques distinctes *in vitro* et *in vivo*, certains étant moins neurovirulents que la souche vaccinale elle-même mais se multipliant plus efficacement dans les poumons ou étant moins immunogènes, alors que d'autres se montrant plus immunogènes mais également plus virulents. Ces résultats soulignent la nécessité de tester un nombre suffisant de clones ainsi que divers modèles de pathogénicité et la difficulté à faire un choix pour sélectionner un candidat vaccin répondant aux meilleurs critères d'innocuité et d'efficacité.

4. Interaction du virus de la vaccine avec la BHE

L'usage du vaccin antivariolique historique constitué de VACV "vivant" a été à l'origine d'une complication post-vaccinale rare mais sérieuse, atteignant le SNC : l'EPV (Rockoff et al., 1979). Cette complication a été reconnue comme « la plus sérieuse complication [resultant de la vaccination antivariolique] lorsqu'il n'y a pas de contre-indication à cette pratique » (Fenner et al., 1988). Cette complication touche environ 12,5 personnes sur 1000000 primo-vaccinés (Bricaire et Bossi, 2003) mais est la plus grave avec un taux de mortalité pouvant aller de 25 à 50 % (Greenberg et Appelbaum, 1948 ; Lane et al., 1970).

La possibilité de réintroduction de la vaccination antivariolique face à une résurgence du VARV, fait craindre cette complication dont l'origine est inconnue et dont le développement est imprévisible. En effet la physiopathologie de cette complication a très peu été étudiée et n'est pas clairement résolue (Briody, 1959 ; Cassel, 1957 ; Ginsberg et Johnson, 1976). A l'occasion de prélèvements ou d'autopsies réalisées sur des personnes atteintes d'EPV, le VACV a parfois été isolé dans le LCR ou dans le tissu cérébral (Angulo, De Campos, et De Gomes, 1964 ; Gurvich et Vilesova, 1983). Néanmoins, aucune étude n'a été menée pour déterminer la (les) voie(s) d'entrée du virus

dans le SNC. Par ailleurs, il a récemment été montré que jusqu'à 1000 copies/mL d'ADN viral peuvent être détectées dans le sang d'individus récemment vaccinés (Savona et al., 2006). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le virus présent dans le compartiment sanguin pourrait atteindre le SNC par franchissement de la BHE et que la perte d'intégrité de cette dernière pourrait potentiellement jouer un rôle crucial dans le développement de la pathologie.

Dans un premier temps, afin d'appréhender le mode de franchissement de la BHE par le VACV, l'interaction du virus avec les cellules endothéliales de la BHE a été étudiée sur un modèle *in vitro*.

Plusieurs modèles *in vitro* ont été développés et testés pour étudier le franchissement de la BHE par plusieurs molécules et les mécanismes de régulation de la BHE, chacun essayant de reproduire au mieux les propriétés de la BHE *in vivo*, sans jamais constituer pour autant un modèle complet et parfait (Deli et al., 2005 ; Garberg et al., 2005). Ces modèles reposent tous sur des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux issus d'espèces différentes (souris, rat, porc, bœuf, homme). Dans un premier temps, les cellules endothéliales ont été cultivées en monoculture (Abbott et al., 1992 ; Ichikawa et al., 1996 ; Rubin et al., 1991 ; Shah, Audus, et Borchardt, 1989). Néanmoins, les valeurs de perméabilité mesurées sur ces modèles étaient surestimées par rapport aux perméabilités mesurées *in vivo* (Pardridge et al., 1990). En effet, les cellules endothéliales de BHE perdent très rapidement leurs caractéristiques lorsqu'elles sont isolées de leur environnement cérébral (Risau et Wolburg, 1990). Des études ont été réalisées sur l'influence des conditions de culture sur le développement de cellules endothéliales caractéristiques de la BHE montrant une augmentation de la résistivité électrique et une diminution de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales dans certaines conditions. En effet, ces valeurs sont améliorées si la culture est réalisée dans un milieu conditionné par des astrocytes et de façon plus significative en présence des astocytes (Didier et al., 2003 ; Megard et al., 2002 ; Perriere et al., 2005 ; Rubin et al., 1991 ; Wolburg et al., 1994). L'addition d'AMP cyclique dans le milieu est un facteur favorisant supplémentaire, indiquant que la phosphorylation des protéines associées aux JS jouent un rôle prédominant dans la perméabilité de la BHE (Rubin et al., 1991). L'addition de glucocorticoïdes et d'hydrocortisone en particulier, permet également d'augmenter

l'expression de certains marqueurs spécifiques (Antonetti et al., 2002 ; Calabria et al., 2006 ; Cucullo et al., 2004 ; Hoheisel et al., 1998 ; Romero et al., 2003).

D'autres modèles ont été développés à partir de cultures de cellules endothéliales immortalisées, facilitant leur utilisation et leur approvisionnement (Cucullo et al., 2007a ; Durieu-Trautmann et al., 1991 ; Ketabi-Kiyanvash et al., 2007 ; Kusch-Poddar et al., 2005 ; Muruganandam et al., 1997 ; Roux et al., 1994 ; Weksler et al., 2005). L'inconvénient majeur de ces modèles est l'absence ou la faible expression de protéines de JS au niveau membranaire ce qui entraîne une perméabilité para-cellulaire supérieure à celle des cultures primaires correspondantes (Deli et al., 2005).

Des modèles ont été développés en co-culture de cellules endothéliales avec des astrocytes ou des cellules gliales de différentes espèces afin de palier à l'absence de certains marqueurs spécifiques de la BHE dans les modèles précédemment décrits (Cecchelli et al., 1999 ; Cucullo et al., 2007b ; Dehouck et al., 1990 ; Fletcher et al., 2006 ; Jeliazkova-Mecheva et Bobilya, 2003 ; Perriere et al., 2007 ; Stanness, Guatteo, et Janigro, 1996). Dans un souci de développement de modèles *in vitro* de plus en plus proches de la BHE *in vivo*, des nouveaux modèles sont à présent basés sur la culture de cellules endothéliales primaires en présence d'astrocytes mais également d'un troisième type cellulaire tel que des neurones (Schiera et al., 2005) ou de péricytes (Nakagawa et al., 2007), chacun favorisant un peu plus la différenciation et la spécialisation des cellules endothéliales.

L'étude de l'interaction du VACV avec la BHE a été réalisée sur un modèle de co-culture, de part et d'autre d'un filtre, de cellules endothéliales cérébrales issues de capillaires de bœuf et de cellules gliales issus de cerveau de raton (Cecchelli et al., 1999) (**Figure 21**). Ce modèle a été choisi car il présente l'avantage d'exprimer des JS fonctionnelles assurant une très bonne étanchéité, notamment en terme de perméabilité paracellulaire. Par ailleurs, il existe une excellente corrélation entre les valeurs de perméabilité d'un grand nombre de molécules déterminées *in vivo* et *in vitro* sur ce modèle (Garberg et al., 2005). Le but de notre étude est d'évaluer si l'interaction du virus avec les cellules endothéliales peut perturber la perméabilité paracellulaire et ainsi favoriser le passage du virus à travers la BHE. Ce modèle permet notamment l'évaluation de l'action d'une molécule ou d'un micro-organisme sur la perméabilité de la BHE, par la mise en œuvre d'un test de transport (Cecchelli et al., 1999). Des tests de transport au ^{14}C -

saccharose ont été réalisés sur ce modèle de BHE infecté au préalable par le VACV. Ce test est fondé sur le principe de la clairance et repose sur la quantification du passage d'une molécule radiomarquée (le ^{14}C -saccharose) à travers la monocouche de cellules endothéliales sur une durée déterminée. La clairance renseigne sur l'épuration d'un compartiment donneur de la molécule marquée selon un mécanisme de transport qui lui est spécifique. Elle est calculée pour obtenir un coefficient de perméabilité (P_e). Si la voie de transport empruntée n'est pas dépendante d'un gradient de concentration, ce coefficient est indépendant de la concentration en molécules, tout en restant spécifique pour chaque molécule. Ainsi, si une augmentation de la clairance et du P_e apparaît au cours du test, elle est corrélée à une augmentation de la perméabilité de la BHE (**Figure 22**). Ce modèle a permis de montrer la perméabilité des cellules endothéliales à l'infection virale et la perte d'intégrité cellulaire successive à cette infection, ceci étant confirmé par immunofluorescence.

Dans un second temps, le franchissement de la BHE et la réplication virale dans le tissu cérébral ont été évalués sur un modèle murin C57BL/6 plus sensible que la souche BALB/c (Thach, Kimura, et Griffin, 2000), utilisé pour observer l'effet de certains pathogènes sur la BHE (Lee et al., 2006 ; Phares et al., 2006 ; Wang et al., 2004 ; Wiranowska et al., 1988). Lors de cette étude, nous avons émis l'hypothèse que l'infection de l'animal par voie intraveineuse, provoquant artificiellement une virémie forte et contrôlée, pourrait ensuite permettre dans certains cas le franchissement de la BHE suivi d'une réplication virale dans le tissu cérébral, entraînant une symptomatologie spécifique. Par ailleurs, afin d'étudier l'impact d'une altération préalable de la BHE, un pré-traitement avec un LPS, décrit pour entraîner une augmentation de la perméabilité de la BHE chez la souris et l'apparition d'une atteinte cérébrale consécutive (Lustig et al., 1992 ; Wispelwey et al., 1988), a été appliqué.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Cellules et virus

Les cellules endothéliales issues des capillaires cérébraux de bœuf généreusement fournies par R. Cecchelli (Laboratoire de la barrière hémato-encéphalique, Université d'Artois, Lens, France), ont été mises en culture dans des boîtes de Pétri préalablement recouvertes d'une préparation à façon de gélatine à 0,2 %. Elles ont été cultivées dans du milieu D-MEM (Gibco) supplémenté par 10 % de sérum de veau (SV), 10 % de sérum de cheval (SC) et du facteur de croissance fibroblastique (bFGF) à 1 ng/mL en concentration finale. Le milieu de culture a été changé trois fois par semaine.

Les cellules primaires gliales ont été isolées de cortex cérébraux de rats. Après séparation des méninges, le cortex a été broyé dans du milieu de culture D-MEM supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) afin d'obtenir une suspension cellulaire d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de cellules microgliales. La suspension a ensuite été ensemencée dans des plaques six puits (Nunclon®, Nunc). Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine, pendant trois semaines minimum, avant d'être utilisées en co-culture avec les cellules endothéliales.

Les cellules Vero, issues d'une lignée de cellules de foie de singe vert africain (ATCC CCL 81), ont été cultivées dans du milieu M199 (Gibco) supplémenté par 10 % de SVF, sauf lors de leur utilisation pour les titrages viraux où le milieu de culture était supplémenté par 5 % de SVF et 1 % d'une solution de pénicilline et streptomycine (10000 UI/mL et 10000 mg/mL, respectivement).

Les cellules BHK-21, issues d'une lignée de cellules de rein d'hamster (ATCC CCL 10), ont été cultivées dans du milieu G-MEM contenant de la L-glutamine (Gibco) et supplémenté par 50 mM HEPES et 10 % de tryptose phosphate (29,5 g/L), sauf lors des infections virales où le milieu de culture était supplémenté par 0,5 % de SVF.

Toutes les cultures ont été réalisées à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

Le virus de la vaccine souche *Lister* isolé du vaccin antivariolique (VACV-List) et le virus de la vaccine souche *Western-Reserve* (VACV-WR), généreusement fournis par les

laboratoires sanofi-pasteur (Marcy l'Etoile, France) et par R. Drillien (INSERM, Strasbourg, France), ont été produits sur cultures de cellules BHK-21 et purifiés dans du milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 2,5 M Hepes par ultracentrifugation sur gradient de saccharose (Lee, Essani, et Smith, 2001). Les titres des productions obtenus sur cultures de cellules Vero étaient de $1,5 \cdot 10^8$ PFU/mL et $2 \cdot 10^8$ PFU/mL, respectivement, alors que les titres obtenus sur cellules endothéliales de capillaires cérébraux de bœuf étaient de $1 \cdot 10^6$ PFU/mL pour VACV-List et $3 \cdot 10^7$ PFU/mL pour VACV-WR. Les études *in vivo* ont par ailleurs été réalisées avec une production de VACV-WR titrant à $1 \cdot 10^{10}$ PFU/mL sur cellules Vero.

4.1.2 Animaux

Les souriceaux nouveaux-nés SWISS OF-1 (agés de trois jours) et les souris C57BL/6 (femelles âgées de six semaines) ont été fournis par les laboratoires Charles River (Arbresle, France). Les souris adultes ont été mise en stabulation pendant une semaine avant d'être manipulées. Pour les injections intracérébrales chez les souriceaux et pour les injections intraveineuses au niveau de la veine caudale, les animaux n'ont pas été anesthésiés. Par contre une anesthésie générale par voie intrapéritonéale avec $10 \mu\text{L/g}$ d'un mélange 1/3 de kétamine (10 %) et 2/3 de xylazine (2 %) a été réalisée sur les animaux avant perfusion intracardiaque. Chaque groupe de douze souriceaux accompagnés d'une mère porteuse et chaque groupe de six souris adultes a été hébergé dans des cages à couvercle filtrant. Les expériences ont été réalisées en accord avec les instructions nationales concernant l'utilisation d'animaux de laboratoire et ont été approuvée par le comité d'éthique consultatif local (protocoles numérotés 2006/25.9, 2007/01.0 et 2007/01.1).

4.1.3 Préparation du modèle de BHE *in vitro*

Le collagène utilisé pour recouvrir les inserts a été extrait à partir des tendons de queues de rat stérilisées dans une solution d'alcool à 70° puis réhydratées dans de l'eau stérile. Les tendons ont ensuite été dissouts dans une solution à 0,1 % d'acide acétique à 4°C ,

laquelle a ensuite été centrifugée une heure à 4°C à 2500 g. Le surnageant a été récupéré et dosé afin d'obtenir une solution de concentration comprise entre 1,8 et 2,5 mg/mL. La solution de collagène a été maintenue à 4°C avant de mélanger extemporanément 9 volumes de cette solution à 2 volumes de milieu D-MEM 10X et un volume de NaOH 0,34 M stérile.

Des inserts de culture de 30 mm de diamètre (Millicell, Millipore) en polycarbonate (PC) ou en méthylcellulose (CM) de 3 µm et 0,4 µm de porosité, respectivement, ont été recouverts sur leur face supérieure avec 150 µL de la solution de collagène puis ont été placés pendant une heure à 37°C. Après deux rinçages à l'eau stérile et un au PBS (Phosphate Buffer Saline), les inserts ont été replacés en présence de PBS à 37°C pendant quinze minutes avant d'être placés dans les boîtes 6 puits contenant les cellules primaires gliales préparées comme décrit ci-dessus et dont le milieu a été remplacé par 1,5 mL de milieu D-MEM 10 % SC/SV.

Les cellules endothéliales ont ensuite été déposées sur le collagène à la concentration de 6.10^4 cellules dans 1,5 mL de milieu D-MEM 10 % SC/SV supplémenté par 1 ng/mL de bFGF. La co-culture a été maintenue douze jours à 37°C sous une atmosphère à 5 % de CO₂, avec un changement de milieu tous les deux jours, afin d'obtenir un tapis confluent de cellules endothéliales différenciées.

Les cellules endothéliales présentes sur un insert ont été comptées après fixation au paraformaldéhyde 2 % et coloration à l'hématoxiline. Un micromètre oculaire a été utilisé afin d'évaluer le nombre de cellules présentes sur 1 cm².

4.1.4 Infection des cellules endothéliales

Après rinçage des cellules endothéliales différenciées présentes sur les inserts avec du milieu D-MEM contenant 0,5 % SV/SC et supplémenté par 1 ng/mL de bFGF (D-MEM bFGF 0,5 % sérum), les cellules ont été infectées avec 7.10^5 PFU de VACV-WR ou VACV-List dans 1,5 mL de D-MEM bFGF 0,5 % sérum, correspondant à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 particule virale/cellule. Après trente minutes d'incubation à 37°C sous 5 % de CO₂, les solutions virales ont été retirées et les inserts rincés deux fois avec du D-MEM bFGF 0,5 % sérum avant d'être replacés en co-culture

avec les cellules gliales en milieu complet. Les tests de transport ont ensuite été réalisés après 1h30, 2h30 ou 24h d'infection.

Pour évaluer le franchissement de la BHE *in vitro* par le VACV, le milieu de co-culture présent dans les compartiments supérieur et inférieur a été récupéré lors de l'utilisation des inserts pour les tests de transport, et a été titré par dilution successives en cultures de cellules Vero.

4.1.5 Test de transport au saccharose

La solution de saccharose radiomarqué au ^{14}C a été préparée à 0,05 $\mu\text{Curie/mL}$ dans du tampon HBSS à partir d'une solution mère à 35 $\mu\text{Curie/mL}$.

Au début du test de transport, les inserts ont été placés dans des plaques de culture six puits contenant 2,5 mL d'HBSS. A T_0 du test, les inserts ont été recouverts par 1,5 mL de la solution de saccharose radioarqué. Les plaques ont ensuite été placées à 37°C sous une atmosphère sans CO_2 . Après 10, 20, 30, 45 et 60 minutes, les inserts ont à chaque fois été transférés dans un nouveau puits contenant 2,5 mL d'HBSS. Pour chaque période d'incubation, le passage paracellulaire du saccharose a été quantifié en mesurant la radioactivité contenue dans 500 μL prélevés dans le compartiment inférieur. Les quantités initiales et finales de radioactivité présentes dans le compartiment supérieur sont mesurées en prélevant 100 μL de solution à T_0 et à la fin du test, respectivement. Toutes les études ont été réalisées en triplicate. Le P_e exprimé en cm/min , a ensuite été calculé selon la formule $1/P_e = 1/P_{st} - 1/P_{sf}$, où le P_{st} correspond à la perméabilité totale (filtre + cellules) mesurée pendant le test, et le P_{sf} à la perméabilité de l'insert seul obtenue sur des filtres sans cellules recouverts de collagène (Dehouck et al., 1992).

Des contrôles d'augmentation de perméabilité du modèle de BHE utilisé ont été réalisés par addition de 10mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans la solution de saccharose radiomarqué.

4.1.6 Microscopie immunofluorescente

Après l'infection ou à la fin des test de transport, les cellules endothéliales présentes sur les inserts ont été rincées à deux reprises avec de l'HBSS à 37°C puis à 4°C. Elles ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde 2 % préparé dans du PBS 0,1 M pendant dix minutes à température ambiante (TA). Après deux rinçages au PBS (5 min à TA), les inserts ont été découpés en six morceaux et les cellules ont été perméabilisées dans du PBS 0,1 % triton 100 X (10 min à TA) avant d'être à nouveau rincées au PBS (2 x 5 min à TA). Les cellules ont ensuite été saturées dans une solution de Tris 20 mM NaCl 0,5 M pH 7 (TN) supplémenté par 0,1 % de BSA (Bovine Serum Albumin) et 10 % de sérum de chèvre (SCh) (20 min à TA). Les cellules ont été immunomarquées par un anticorps primaire de lapin anti-ZO1 (Zymed) et un anticorps polyclonal anti-VACV directement couplé au FITC (Interchim N91680) dilués dans le tampon TN 0,1 % BSA 2 % SCh (90 min à 37°C). Après trois lavages avec du tampon TN 0,1 % BSA (5 min à TA), les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa 488 (émission dans le vert, Invitrogen A11070) ou 546 (émission dans le rouge, Invitrogen A11030) dilué dans le tampon TN 0,1 % BSA 2 % SCh (60 min à 37°C). Après cette étape, les cellules ont été rincées avec du TN 0,1 % BSA (5 min à TA) puis contre-colorées avec une solution de Dapi à 0,1 µg/mL dans du PBS (10 min à TA). Pour finir, les cellules ont été à nouveau rincées dans du PBS (2 x 5 min à TA) avant d'être montées entre lame et lamelle avec du Fluoromount-G (Clinisciences) pour être observées au microscope à fluorescence.

4.1.7 Etude de la neurovirulence

Des groupes de douze souriceaux nouveaux-nés SWISS OF-1 âgés de trois jours ont été inoculés par voie intracérébrale avec 50 PFU de VACV-List, VACV-WR ainsi que du milieu de culture pour le groupe contrôle. L'apparition de symptômes d'atteinte cérébrale et la mortalité ont été relevées quotidiennement pendant quinze jours.

4.1.8 Etude de la neuroinvasion

Des groupes de six souris femelles C57BL/6 âgées de six semaines ont été inoculées par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale avec 10^8 PFU de VACV-WR préparés dans 100 μ L de PBS. Des souris ont également été pré-traitées par trois injections (0, 6 et 24 heures) de LPS issu d'*E. Coli* (O55:B5, Sevibio) dix-huit heures avant l'infection. Pour chaque expérience un groupe contrôle non traité et non infecté et un groupe témoin pré-traité au LPS mais non infecté, ont été réalisés.

Une injection intrapéritonéale de 600 μ L d'une solution de bleu Evans à 1 % préparée dans du sérum physiologique a été réalisée dix-huit heures après la dernière injection de LPS afin de tester l'effet de cette molécule sur la perméabilité de la BHE. Deux heures après l'injection du colorant, les souris ont été anesthésiées pour être perfusées par voie intracardiaque avec de la solution de Ringer-Lactate héparinée (0,01 % v/v) à un débit de 5 mL/min jusqu'à disparition complète d'une coloration de l'exsudat (soit approximativement dix minutes). Le tissu cérébral a alors été isolé et sa coloration observée.

Le test d'agrippement a été réalisé quotidiennement (sauf le week-end) à quatre reprises pour chaque souris. Ce test consiste à mesurer la force d'agrippement de l'animal par ses pattes avant à une grille inclinée d'environ 10 % vers le bas par rapport à l'horizontale. Une diminution de cette force est le reflet d'une atteinte du SNC (Bharal, Pillai, et Vohora, 2006).

Pour l'étude de la morbidité les souris ont été pesées individuellement tous les jours (sauf le week-end) pendant neuf jours. La mortalité a été relevée selon la même fréquence pendant douze jours.

4.1.9 Titrage du virus dans le cerveau, la rate et le sang

Les souris infectées et pré-traitées ou non au LPS ont été anesthésiées. Un prélèvement de sang a été réalisé par prélèvement intracardiaque à différents temps p.i. (2 heures puis 2, 4, 5, 6, 10 et 12 jours p.i.) puis les animaux ont été perfusés par voie intracardiaque avec la solution de Ringer-Lactate héparinée (0,01 % v/v) à un débit de 5

mL/min jusqu'à disparition complète d'une coloration de l'exsudat (soit approximativement dix minutes). Le cerveau et la rate ont ensuite été isolés et placés dans un tube contenant 1 mL de milieu de culture M199 0,5 % SVF. Les organes ont ensuite été broyés mécaniquement et après trois cycles de congélation/décongélation, ils ont été centrifugés pendant dix minutes à 200 g. L'ADN viral présent dans un échantillon de 200 μ L des surnageants ainsi obtenus a été extrait par la technologie MagNa Pure LC® et le kit DNA isolation kit I (Roche Diagnostics) puis élué dans 100 μ L. L'ADN a ensuite été quantifié dans 5 μ L d'éluat par PCR en temps réel par amplification du gène *A27L* sur ABI PRISM® (Applied Biosystem) avec les deux amorces consensus chez les OPVs 5'-GCCAGAGATATCATAGCCGCTC-3' et 5'-CAACGACTAACTAATTTGGAAAAAAGAT-3' et la sonde 5'-TTTTCACCAACCTAAATAGAACTTCATCGTTGCGTT-3' (Scaramozzino et al., 2007).

4.1.10 Statistiques

Les résultats obtenus au cours des tests de transport au saccharose et d'agrippement ont été traités statistiquement avec ANOVA et soumis au test de Duncan. Les courbes de survie des animaux ont été comparées par un test du Log-rank, alors que les courbes de morbidité ont été analysées par un test non-paramétrique de Mann et Whitney. Enfin les résultats des titrages obtenus dans le sang et les organes des animaux ont été comparés par un test de Student. Pour tous les tests statistiques utilisés, le risque d'erreur α a été fixé à 5 %.

4.2 Résultats

4.2.1 Etudes *in vitro*

4.2.1.1 Mise au point d'un modèle d'infection de BHE *in vitro*

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de choisir le type d'inserts à utiliser pour la culture des cellules endothéliales, ceci dans le but de vérifier la possibilité

pour le virus de traverser la membrane constituant l'insert et recouverte de collagène (celui-ci est nécessaire pour permettre l'adhérence des cellules endothéliales). Deux types d'inserts ont été testés : des inserts en PC avec une porosité de 3 μm et des inserts en CM avec une porosité de 0,4 μm . Pour cela une solution de chacune des deux souches virales étudiées a été déposée sur chaque type d'insert recouvert ou non de collagène. Le franchissement par le virus a été évalué par titrage du virus présent dans le milieu des compartiments supérieur et inférieur (**Figure 23**). Alors que les titres viraux obtenus avec les inserts en PC ont mis en évidence la possibilité pour le virus de traverser ce type d'insert à la porosité indiquée, même en présence de collagène, le virus est entièrement retenu sur les inserts en CM. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette incapacité de franchissement : soit la nature de l'insert en méthylcellulose entraîne l'adhérence du virus (adsorption), soit la porosité est trop petite entraînant un encombrement stérique. La première idée semble néanmoins la plus plausible sachant que l'adhérence du virus à la cellulose avait déjà été rapportée et que le virus mesure généralement moins de 400 nm dans sa partie la plus large. Le choix s'est donc porté sur les inserts en PC afin d'être en possibilité d'observer le franchissement du virus à travers les cellules endothéliales du modèle de BHE *in vitro*.

Par ailleurs, les deux souches virales purifiées ayant été titrées sur des cellules endothéliales en solo-culture, il était nécessaire de déterminer le nombre de cellules endothéliales présentes sur un insert dans le cadre d'une co-culture en présence des cellules gliales, permettant de travailler à une MOI constante pour une meilleure reproductibilité des résultats. Pour cela les cellules ont été colorées à l'hématoxilline et le nombre de cellules présentes sur le filtre a été compté par microscopie grâce à un micromètre oculaire. Ce nombre a été estimé à 7.10^5 cellules.

De plus, ne connaissant pas le temps d'infection nécessaire pour potentiellement observer une modification de la perméabilité de la BHE *in vitro* après interaction avec le VACV, il était nécessaire de pouvoir réaliser le test de transport au saccharose sur la durée la plus longue possible tout en permettant l'interprétation des résultats. En effet, les cellules endothéliales voient leur perméabilité augmenter au cours du temps lorsque les tests de transport sont réalisés dans un tampon salin (HBSS) et non pas dans un milieu de culture physiologique. Le modèle de BHE *in vitro* a été testé au cours d'un test de quatre

heures. Le Pe moyen sur trois inserts était de $0,67 \pm 0,05 \cdot 10^{-3}$ cm/min à une heure, de $0,74 \pm 0,07 \cdot 10^{-3}$ cm/min à deux heures, de $1,32 \pm 0,19 \cdot 10^{-3}$ cm/min à trois heures et de $2,67 \pm 0,53 \cdot 10^{-3}$ cm/min à quatre heures de test. Ainsi après deux heures de test, le Pe avait plus que doublé ($0,67 \cdot 10^{-3}$ cm/min à une heure contre $1,32 \cdot 10^{-3}$ cm/min à trois heures), rendant très délicate une interprétation d'augmentation de perméabilité indépendamment de l'état des cellules endothéliales. De plus, le nombre de repiquages que les cellules ont subi avant d'être mises en co-culture avec les cellules gliales, influence ce phénomène. Les cellules ayant été repiquées un faible nombre de fois sont plus résistantes aux changements de milieu que celles repiquées un plus grand nombre de fois. Il a donc été décidé de ne considérer comme interprétables que les valeurs de Pe obtenues sur une heure de test de transport avec des cellules à un nombre de passages inférieur ou égal à huit pour le clone de cellules endothéliales utilisé.

4.2.1.2 Etude de la permissivité des cellules endothéliales au VACV

Le degré de permissivité de cellules à un virus est corrélé à la capacité de réplication du virus dans ces cellules. Afin d'identifier si le VACV pouvait infecter les cellules endothéliales, la permissivité de ces cellules en solo et en co-culture a été comparée à la permissivité des cellules Vero couramment utilisées pour la production de VACV (**Figure 24**). Le nombre de plaque de lyse sur les cellules Vero était supérieur de 4 log à celui observé sur les cellules endothéliales en solo-culture. Les cellules endothéliales sont donc beaucoup moins permissives au VACV que les cellules Vero, néanmoins la réplication virale est possible. Ceci peut être corrélé à l'état de quiescence des cellules endothéliales alors que la lignée cellulaire Vero est proliférative. Par ailleurs, une différence a également été observée entre les cellules endothéliales en co-culture et en solo-culture avec VACV-List, à la faveur de ces dernières. La différenciation des cellules endothéliales en co-culture peut peut-être expliquer cette différence, néanmoins celle-ci n'a pas été observée avec VACV-WR.

La cinétique de réplication des deux souches virales dans les cellules endothéliales a également été étudiée (**Figure 25**). Contrairement à ce qui avait été observé précédemment, il n'y avait pas de différence de réplication pour un même virus entre les

cellules endothéliales en solo et en co-culture. Une différence d'un log a été maintenue tout au long de la courbe de réplique entre le VACV-WR et le VACV-List, confirmant la plus forte virulence de la souche *Western-Reserve* comparativement à la souche *Lister*.

4.2.1.3 Etude des effets de l'infection virale sur la BHE

L'effet de l'interaction du VACV sur la perméabilité de la BHE *in vitro* a été étudié en réalisant un test de transport au saccharose. Ce test a été réalisé une heure et demie ou deux heures et demi après l'infection des cellules endothéliales par les virus VACV-WR et VACV-List (**Figure 26**). Le P_e mesuré après une heure de test n'était pas significativement plus élevé dans les conditions où les cellules endothéliales ont été infectées, comparativement au contrôle non infecté, alors que les cellules traitées avec le peroxyde d'hydrogène n'étaient plus du tout perméables (Test de Duncan, $p < 0,005$). La perméabilité de la BHE n'a donc pas été altérée au début de l'infection des cellules endothéliales.

Afin d'observer l'état des JS au cours des premières heures de l'infection, des cellules endothéliales en co-culture avec les cellules gliales ont été infectées puis fixées au paraformaldéhyde deux et huit heures p.i. (**Figure 27**). La protéine de JS, ZO-1 a ensuite été révélée par immunomarquage. Des cellules témoins traitées au peroxyde d'hydrogène, utilisé comme contrôle positif d'ouverture, ont également été observées. Alors que le marquage des JS était discontinu au niveau des cellules traitées avec le peroxyde d'hydrogène, les JS n'étaient pas altérées deux heures après infection par les deux virus. Par contre, huit heures p.i., un marquage ZO-1 discontinu concomitant à l'apparition de trous dans le tapis cellulaire a été observé avec les deux virus. De plus, un immunomarquage du VACV réalisé sur les cellules infectées par VACV-List, a mis en évidence la présence de cellules isolées infectées. L'infection, a pu être corrélée avec la perte d'intégrité des JS de ces cellules. Par ailleurs, cette observation a mis en évidence une très faible proportion de cellules endothéliales infectées au début de l'infection, estimée à moins de 10 %.

Aucun changement de perméabilité de la BHE n'ayant été observé après une infection courte, une nouvelle étude a été réalisée après vingt-quatre heures d'infection,

correspondant à environ quatre cycles de réplication virale. Un test de transport au saccharose a été réalisé dans ces conditions (**Figure 28**) et a mis en évidence une très importante augmentation de perméabilité de la BHE *in vitro* pour les cellules endothéliales infectées par les deux virus, indiquée par une augmentation significative du Pe mesuré sur une heure. Cette perte d'intégrité est aussi importante que celle observée avec le témoin traité avec le peroxyde d'hydrogène. Afin de corrélérer ces résultats à l'état des cellules endothéliales et de leurs JS, des immunomarquages ont été réalisés à la suite du test de transport (**Figure 29**). A vingt-quatre heures p.i., des îlots de cellules endothéliales étaient infectés et avaient perdu leur intégrité membranaire comme l'attestait l'absence de marquage de la protéine ZO-1, comparable au témoin traité avec le peroxyde d'hydrogène. Comparativement à l'observation faite deux heures ou huit heures p.i., un plus grand nombre de cellules étaient infectées après vingt-quatre heures. De plus, ce ne sont plus des cellules infectées isolées qui ont été observées mais des îlots de cellules adjacentes.

Ainsi après avoir observé une augmentation de la perméabilité de la BHE *in vitro* suite à l'infection par le VACV, due à une perte d'intégrité des cellules endothéliales infectées, des titrages ont été réalisés afin de déterminer si le virus était ainsi en capacité de franchir cette barrière. Pour cela, le milieu de co-culture présent dans chacun des compartiments du modèle de BHE *in vitro* vingt-quatre heures après infection des cellules endothéliales présentes dans le compartiment supérieur, a été titré en culture cellulaire. Alors que 5,8 log PFU de VACV avaient été mis en contact pendant une heure avec les cellules endothéliales avant d'être remises en co-culture, vingt-quatre heures plus tard $4,78 \pm 0,61$ log PFU étaient présents dans les 1,5 mL de milieu du compartiment supérieur et $5,51 \pm 0,55$ log PFU au niveau du compartiment inférieur. La présence de virus en quantité comparable entre le compartiment supérieur et le compartiment inférieur atteste de la traversée du VACV à travers la barrière et de la réplication virale dans les cellules endothéliales.

4.2.2 Etudes *in vivo*

4.2.2.1 Etude de la neurovirulence du VACV

Dans un premier temps, une étude de la neurovirulence des deux souches virales de VACV a été réalisée sur un modèle souriceau nouveau-né. Des souriceaux Swiss-OF1 âgés de trois jours ont été inoculés par voie intracérébrale avec 50 PFU de VACV-WR, de VACV-List ou de milieu pour le groupe contrôle. La survie a ensuite été observée quotidiennement pendant deux semaines (**Figure 30**). Alors que les souriceaux du groupe contrôle ont survécu à l'injection, les souriceaux inoculés avec le VACV-WR ou le VACV-List ont développé des signes d'atteinte cérébrale (tremblements et léthargie) dès le 3^{ème} jour p.i., preuve d'une répllication virale dans le tissu cérébral. De plus, 100 % des animaux infectés avec VACV-WR et 95 % de ceux infectés avec VACV-List ont succombé (Test du Log-rank, $p < 0,0005$). Alors que la mort des animaux est apparue entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour p.i. suite à l'infection avec VACV-WR, les animaux inoculés avec le VACV-List ont succombé à l'infection entre le 6^{ème} et le 10^{ème} jour p.i. Le délai observé est la conséquence d'une plus forte virulence de la souche *Western-Reserve* comparativement à la souche *Lister*. Néanmoins les deux souches sont neurovirulentes et par conséquent responsables d'atteintes cérébrales conduisant à la mort de l'animal après inoculation intracérébrale.

4.2.2.2 Etude de la pathogénicité du VACV inoculé par voie intraveineuse

Afin d'étudier la pathogénicité et les capacités neuroinvasives du VACV *in vivo*, après observation du franchissement de la BHE *in vitro*, un modèle murin a été développé. Des souris C57BL/6 ont été infectées par injection intraveineuse de 10^8 PFU de VACV-WR. Un groupe de souris pré-traitées par trois injections de LPS a été infecté en parallèle, en vue d'observer l'effet d'une altération préalable de la BHE sur la neuroinvasion du VACV. Plusieurs critères ont ensuite été étudiés sur ce modèle murin.

Dans un premier temps, afin de vérifier l'efficacité du protocole d'injection du LPS sur la perméabilité de la BHE des animaux, des essais de visualisation de l'entrée d'un

traceur, le bleu Evans dans le tissu cérébral ont été réalisés. En effet lorsqu'il est injecté chez l'animal, ce colorant se fixe à l'albumine plasmatique dont l'importante taille (60 kDa) limite son franchissement au travers de la BHE. Après traitement, la coloration bleue du tissu cérébral est donc le témoin d'une perte d'intégrité importante de cette barrière. Des souris ont donc été injectées dix-huit heures après la dernière administration de LPS par voie intrapéritonéale avec une solution de bleu Evans à 1 %. Une très faible coloration du tissu cérébral a été observée mais elle n'était pas suffisante pour conclure à une altération majeure de la BHE (résultats non montrés).

Différents critères de pathogénicité ont été étudiés : l'atteinte cérébrale, la morbidité et la mortalité. L'atteinte cérébrale a été évaluée par la réalisation quotidienne d'un test d'agrippement (**Figure 31**). La courbe de résistance a diminué au cours du temps, indiquant que les animaux se sont habitués au test et ont parfois même refusé de s'accrocher à la grille. Néanmoins la comparaison des résultats obtenus avec le groupe contrôle et ceux obtenus avec les différents groupes traités, a montré une différence significative (Test de Duncan, $P < 0,05$) avec le groupe pré-traité par le LPS puis infecté par VACV-WR. De plus, des signes d'atteinte cérébrale ont été observés pour quelques souris infectées et pour toutes les souris pré-traitées au LPS avant l'infection.

Par ailleurs la morbidité et la mortalité des animaux ont été relevées (**Figure 32 et 33**). Les souris pré-traitées avec le LPS avant l'infection par VACV-WR ont toutes succombé entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jours alors que les souris seulement infectées ont toutes survécu, tout comme celles qui n'ont pas été infectées (Test du Log-rank, $p < 0,0005$). Concernant le critère de morbidité, les souris ayant reçu le traitement avec le LPS ont perdu jusqu'à 25 % de leur poids initial après traitement mais celles qui n'ont pas été infectées ont par la suite récupéré un poids similaire à celui des souris du groupe contrôle. A l'opposé, les souris qui ont ensuite été infectées ont continué à perdre du poids atteignant une perte de poids morbide de 30 % (Test de Mann et Whitney, $p < 0,0005$). De même, les souris non pré-traitées avec le LPS mais infectées ont perdu jusqu'à 20 % de leur poids initial à sept jours post-traitement mais ont à la fin de l'étude amorcé une reprise de poids corrélée avec l'absence de mortalité observée dans ce groupe (Test de Mann et Whitney, $p < 0,0005$).

4.2.2.3 Etude de la neuroinvasion du VACV

Pour observer la neuroinvasion du VACV à partir du compartiment sanguin, l'étude précédente a été répétée mais les animaux ont été sacrifiés à différents temps post-traitement. Le virus présent dans le sang prélevé avant perfusion intracardiaque, dans le cerveau et dans la rate des animaux euthanasiés, a été titré par PCR en temps réel (**Figure 34**). Un groupe témoin d'infection a été euthanasié deux heures p.i. sans perfusion intracardiaque afin de déterminer la charge virale présente dans le compartiment sanguin des différents organes étudiés. Les résultats des titrages ont montré que deux heures après injection par voie intraveineuse de 10^8 PFU de VACV-WR, environ 10^3 copies d'ADN viral/mL étaient présentes dans le sang de la souris. Le virus n'a pas pu être détecté dans le tissu cérébral des souris non perfusées alors qu'une importante charge virale était présente dans la rate, qui est un organe où la réplication virale est détectée très rapidement après infection par un OPV (Ferrier-Rembert et al., 2007 ; Karupiah et al., 1993). En effet, le volume sanguin cérébral chez la souris est d'environ 10 μ L ($2,3 \pm 0,4$ mL/100 g), or la charge virale dosée dans le sang étant d'environ 1000 copies d'ADN/mL, les 10 copies d'ADN viral estimées dans le sang cérébral total sont en dessous du seuil de détection de la technique (25 copies d'ADN dans l'échantillon total). Concernant les groupes infectés par VACV-WR, le titre viral dans le sang était légèrement supérieur à quatre jours p.i. en comparaison au titre obtenu deux heures p.i. puis il a diminué les jours suivants. Au niveau du tissu cérébral, l'ADN génomique viral était détecté en quantité importante les premiers jours suivant l'infection et la charge virale était significativement plus importante dans le tissu des animaux qui avaient été pré-traités avec le LPS (Test de Student, $p < 0,005$). Cette charge virale a par la suite diminué à partir du 5^{ème} jour p.i. Concernant les titres viraux détectés au niveau de la rate, la différence observée à quatre jours p.i. entre les souris pré-traitées au LPS et les souris directement infectées, est similaire à celle observée au niveau du cerveau (Test de Student, $p < 0,005$). De même, l'évolution de la charge virale suit le même profil que dans le tissu cérébral, avec une diminution du titre à partir du 5^{ème} jour p.i.

4.3 Discussion et conclusions

Le but de l'étude était d'évaluer la possibilité de franchissement de la BHE par le VACV à partir du compartiment sanguin dans un contexte d'encéphalite consécutive à une vaccination antivariolique.

Dans un premier temps un modèle *in vitro* de BHE réalisé par co-culture de cellules endothéliales isolées de capillaires cérébraux de bœuf avec des cellules primaires gliales, a été utilisé pour étudier l'effet d'une infection virale sur la perméabilité des cellules endothéliales de la BHE. Il a été montré que les cellules endothéliales sont des cellules permissives au VACV même si la réplication virale est plus limitée que dans des cellules Vero, cellules couramment utilisés pour la production de ce virus. L'étude de la cinétique de réplication virale a confirmé l'absence de différence de réplication virale entre des cellules endothéliales cultivées en solo-culture et des cellules endothéliales différenciées par co-culture avec des cellules gliales. Par ailleurs, cette même étude a mis en évidence une différence de titre d'un log tout au long de la cinétique entre la souche vaccinale, VACV-List, et une souche décrite comme plus virulente, VACV-WR, confirmant cette différence de virulence.

Les effets de l'infection virale sur la BHE *in vitro* ont été étudiés par la réalisation de tests de transport au saccharose. Ainsi, il a été montré qu'aux premières heures de l'infection (jusqu'à deux heures trente p.i.), la perméabilité de la BHE *in vitro* semble inchangée. En conséquence, l'hypothèse d'un déclenchement d'une cascade de signalisation consécutif à l'interaction du VACV avec la cellule endothéliale, conduisant à une modification des JS, peut être exclue. Le franchissement de la BHE par le VACV ne se fait donc pas par voie paracellulaire. A huit heures p.i. des cellules endothéliales isolées infectées ont été observées par immunomarquage. La perte d'un marquage continu de la protéine de JS, ZO-1, a mis en évidence la perte d'intégrité membranaire spécifique de ces cellules.

Par ailleurs la faible proportion de cellules infectées observées au début d'une infection réalisée à une multiplicité d'infection correspondant à un virus apporté par cellule, montre que toutes les cellules endothéliales ne sont pas permissives au VACV.

Ainsi, moins de 10 % des cellules endothéliales en co-culture présenteraient une spécificité non identifiée pouvant expliquer cette différence. La capacité du VACV d'infecter de nombreuses lignées cellulaires a suggéré un large tropisme cellulaire et la possible existence d'un récepteur ubiquitaire (Hruby, 1990 ; McFadden, 2005). Inversement une étude montrant le tropisme exclusif du VACV pour des cellules T activées, suggère la présence d'un récepteur spécifique (Chahroudi et al., 2005). De plus, des études ont montré que le VACV infecte plus efficacement la membrane baso-latérale que la membrane apicale de cellules épithéliales, confirmant la présence d'un ou de plusieurs récepteurs spécifiques localisés préférentiellement à la surface baso-latérale (Rodriguez et al., 1991 ; Vermeer et al., 2007). Concernant les cellules endothéliales, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette spécificité. Les cellules permissives pourraient ne pas être des cellules endothéliales mais des cellules contaminantes telles que des péricytes. Cependant, les cellules permissives sont morphologiquement identiques aux cellules endothéliales. Par ailleurs, il n'a jamais été rapporté la présence de péricytes contaminants au sein du clone de cellules endothéliales utilisé et les péricytes n'ont pas la capacité de se multiplier dans nos conditions de co-cultures sur filtre (Dehouck Marie-Pierre, communication personnelle). La seconde hypothèse serait que ces cellules ne se soient pas encore différenciées, c'est à dire qu'elles ne seraient pas quiescentes et permettraient l'entrée du virus au cours de leur division. Pour vérifier cela il serait nécessaire de faire un dosage de la quantité d'ADN présente dans ces cellules. Une troisième hypothèse serait que les cellules permissives soient à un stade de différenciation différent des autres cellules, permettant la présentation à leur surface de protéines spécifiques ou entraînant une différence de proportion des lipides membranaires ou glycosaminoglycanes favorisant la fusion du virus avec la membrane cytoplasmique.

Après vingt-quatre heures d'infection, correspondant à environ quatre cycles viraux, la perméabilité de la BHE *in vitro* est très fortement augmentée, comme l'atteste le P_e mesuré lors d'un test de transport au saccharose d'une heure. Ce P_e est similaire à celui obtenu après une heure de traitement avec 10 mM de peroxyde d'hydrogène dont l'effet a été préalablement démontré sur un modèle de BHE *in vitro* (Fischer et al., 2005 ; Lee et al., 2004). Cette augmentation de perméabilité est identique pour les deux souches virales étudiées et est concordante avec l'observation par immunomarquage d'îlots de cellules

endothéliales adjacentes infectées et ayant perdu leur intégrité cellulaire, conduisant à la formation de trous dans le tapis cellulaire. De plus l'observation des ces îlots de cellules infectées vingt-quatre heures p.i. indique une probable transmission intercellulaire du VACV majoritaire.

Par ailleurs, les titrages effectués vingt-quatre heures p.i. dans le milieu de co-culture des compartiments supérieur et inférieur ont mis en évidence la réplication du VACV dans les cellules endothéliales, par augmentation de la quantité de virus dans le volume total, et sa capacité de franchissement de la BHE *in vitro* suite à la lyse des cellules endothéliales.

L'étude de l'interaction du VACV avec la BHE réalisée *in vitro* suggère le mécanisme de pénétration du VACV dans le tissu cérébral suivant : dans un premier temps le virus adhère à l'endothélium vasculaire puis il infecte un faible nombre de cellules permissives où il se réplique. Ensuite les virions néoformés atteignent les cellules adjacentes par passage au niveau des jonctions cellulaires, ce phénomène étant la particularité des formes virales CEV. L'infection de ces cellules est responsable de la perte de leur intégrité qui se traduit finalement par la mort cellulaire, entraînant la formation de trous au sein de l'endothélium vasculaire, permettant le franchissement de la BHE par le virus et son entrée en contact avec les cellules du SNC.

La seconde partie de l'étude a été menée sur des modèles murins. La neurovirulence des deux souches virales étudiées a été évaluée par injection intracérébrale chez des souriceaux nouveaux-nés. L'infection avec chacune des deux souches a entraîné l'apparition de symptômes d'atteinte cérébrale puis la mort des animaux. Néanmoins la réplication plus intense du VACV-WR dans le tissu cérébral comparativement à celle du VACV-List, a entraîné une mortalité plus rapide, attestant d'une neurovirulence plus importante, comme décrit précédemment (Li et al., 2004).

La neuroinvasion du VACV quant à elle n'a été étudiée qu'avec la souche la plus virulente, le VACV-WR, sur un modèle de souris adultes infectées par voie intraveineuse afin de reproduire artificiellement une forte virémie. En parallèle, des souris ont été pré-traitées avec du LPS pour augmenter la perméabilité de la BHE *in vivo* (Lustig et al., 1992 ; Wispelwey et al., 1988). Dans un premier temps, des essais ont été réalisés

afin de mettre en évidence ce phénomène. L'utilisation du bleu Evans comme traceur n'a pas permis la démonstration incontestable de cette augmentation de perméabilité, néanmoins les différences observées lors des études de la mortalité et de la morbidité suite à l'infection virale, attestent d'un effet du traitement au LPS. Par ailleurs l'effet du LPS pourrait être mis en évidence par l'utilisation d'un traceur de plus petite taille car le bleu Evans se fixe à l'albumine dont la taille relativement importante (60 kDa) peut limiter son passage paracellulaire. Ce traceur pourrait être la fluorescéine, couramment utilisée dans les études de perméabilité *in vivo* malgré sa sensibilité au pH (Hawkins et Egleton, 2006 ; Kozler et Pokorny, 2003) ou une molécule radiomarquée. Il serait également intéressant de réaliser un immunomarquage du fibrinogène, protéine sérique retrouvée au niveau intracérébral lorsque les cellules endothéliales perdent leur imperméabilité (Dallasta et al., 1999 ; Inoue et al., 1997 ; Kirk et al., 2003 ; Leech et al., 2007), sur des coupes de tissu cérébral de souris traitées au LPS.

L'infection intraveineuse de souris est pathogène et entraîne une morbidité importante comparativement aux souris non infectées. Un pré-traitement des animaux au LPS entraîne néanmoins une plus importante pathogénicité, telle que les résultats du test d'agrippement, la morbidité, la mortalité et les signes d'atteinte cérébrale observés, l'attestent. Ainsi une atteinte préalable de la BHE favorise la pathogénicité du virus en facilitant son entrée dans le SNC. En effet, les titrages réalisés dans le tissu cérébral ont montré la présence d'une charge virale significativement plus importante aux premiers jours de l'infection dans les cerveaux des souris pré-traitées au LPS.

Le titrage de l'ADN génomique viral dans le sang des animaux infectés a mis en évidence une augmentation de la virémie entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour p.i. (le titre au 4^{ème} jour étant 1,5 log plus élevé que le titre mesuré deux heures p.i.). Cette augmentation est le reflet d'une réplication virale au sein de l'organisme. Par ailleurs, l'importante quantité de virus détectée dans la rate deux heures après infection par voie intraveineuse suggère que cet organe est très rapidement infecté par le virus présent dans le compartiment sanguin. La différence de titres génomiques observée au sein de la rate et du cerveau ainsi que du sang dans une moindre mesure, entre les souris ayant reçu des injections de LPS et les autres, démontre l'effet du LPS sur la neuroinvasion : le LPS facilite l'entrée du virus dans le SNC au sein duquel il peut se répliquer car il est neurovirulent, ce qui entraîne un maintien voire une augmentation de la virémie. Ainsi, plus la quantité de virus pénétrant

dans le tissu cérébral est importante, plus la production de virions néoformés est importante, plus la virémie augmente, permettant l'atteinte d'autres organes et le développement d'une pathologie accompagnée d'une morbidité plus conséquente.

La diminution de la charge virale observée pour les deux groupes de souris dans les organes étudiés à partir du 5^{ème} jour p.i. pourrait-être corrélée à la mise en place de la réponse immune cellulaire. En effet, il a été montré que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques anti-CPXV sont détectables dès le 6^{ème} jour suite à une infection intranasale (Ferrier-Rembert et al., 2007). L'action d'une importante réponse immune médiée par les monocytes et les macrophages peut également être corrélée à la pathogénicité observée. Ces cellules ne sont normalement pas présentes dans le SNC et l'augmentation de la perméabilité induite par le franchissement viral de la BHE par le virus, ou de manière beaucoup plus importante par l'interaction du LPS bactérien avec les cellules endothéliales, favorise leur pénétration. La réponse immune qui se déroule ensuite dans le tissu cérébral entraîne une forte inflammation qui est à l'origine de l'encéphalite infectieuse.

Les résultats obtenus *in vivo* suggèrent donc la possibilité pour le VACV de franchir la BHE à partir du compartiment sanguin et d'atteindre le tissu cérébral. Néanmoins la quantité de virus semble être suffisamment faible pour que la réponse immune puisse abolir la réplication virale et permettre la survie de l'animal. Par contre si l'intégrité de la BHE est préalablement atteinte, ce qui a été mimé par l'inoculation de LPS bactérien, le virus pénètre en plus grande quantité dans le tissu cérébral où il se réplique efficacement, entraînant une intense réponse inflammatoire immune favorisant l'atteinte cérébrale responsable de la mort de l'animal.

La mise en évidence et la localisation du VACV par immunomarquage sur coupe de cerveau de souris et par microscopie électronique sont en cours de réalisation. Les autres perspectives de ce travail sont, outre la démonstration de l'atteinte de la BHE par l'inoculation de LPS, l'identification des cellules du SNC atteintes par l'infection virale, de la protéine partenaire virale et l'essai de traitement par l'administration d'une molécule anti-virale.

En conclusion, dans le contexte d'EPV abordé au travers de ce travail, les résultats obtenus ont permis de montrer la potentialité pour le VACV de franchir la BHE *in vivo* suite à une importante virémie. Ce franchissement est facilité par une atteinte préalable de l'intégrité de la BHE. Cette atteinte pourrait être consécutive à une co-infection par un pathogène neuroinvasif ou à un traitement thérapeutique avec une molécule ayant une influence sur la perméabilité de la BHE. D'un point de vue mécanistique, les études réalisées sur le modèle de BHE *in vitro* ont suggéré que le VACV pourrait franchir cette barrière via l'infection primaire de certaines cellules de l'endothélium vasculaire, dont la spécificité n'a pas été discernée, permettant la contamination des cellules adjacentes dans un second temps. C'est finalement la mort cellulaire résultant de la réplication virale intracellulaire qui serait responsable de l'augmentation de la perméabilité de la BHE et de l'entrée du virus dans le SNC, conduisant à l'EPV.

CHAPITRE III :
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire avait comme objectif l'étude du vaccin antivariolique historique *Lister* dans un cadre de stratégie vaccinale. En effet ce vaccin a été très largement utilisé au cours du XX^e siècle et son utilisation en parallèle d'autres souches vaccinales, a permis l'éradication mondiale de la variole. Cet aboutissement majeur repose sur deux facteurs principaux. Premièrement la grande efficacité du vaccin historique a été particulièrement décisive ; elle a permis l'immunisation efficace d'une grande partie de la population mondiale, indispensable pour stopper le fléau que constituait cette maladie. Deuxièmement, l'absence de réservoir naturel du VARV implique une transmission inter-humaine obligatoire. Ainsi l'immunisation d'une grande partie de la population mondiale a suffi pour éradiquer la maladie. Après contact avec le VARV cette immunisation est acquise à vie. En effet les personnes ayant survécu à la maladie ne peuvent pas être à nouveau atteintes.

Malgré cette réussite médicale majeure et la demande, par les autorités, de destruction du VARV stocké au sein des laboratoires de recherche (excepté aux Etats-Unis et en ex-URSS), le développement d'un nouveau type de terrorisme basé sur l'utilisation d'armes biologiques et les soupçons portés sur la possible mise à disposition du virus à des entités terroristes, font craindre la résurgence de la maladie. En effet, la déficience de l'immunité résiduelle de la population mondiale suite à l'arrêt de la vaccination antivariolique et à la disparition de la maladie, constitue un contexte favorable à la réintroduction volontaire de ce pathogène. De plus de nombreuses caractéristiques de ce virus telles que sa stabilité dans l'environnement, sa dissémination efficace par aérosol, sa forte morbidité et mortalité, font de lui le chef de file des agents viraux « militarisables ». La réponse à cette menace est de ce fait une nécessité internationale et fait l'objet d'un plan national. Les stratégies de lutte envisageables sont l'utilisation de moyens prophylactiques ou de moyens thérapeutiques que sont les vaccins. Malgré une forte activité de recherche en vue d'élaborer des molécules thérapeutiques contre les OPVs, nous ne disposons toujours pas d'une molécule qui ait fait la preuve de son efficacité contre la variole, du fait de l'éradication de la maladie. La vaccination antivariolique reste la seule alternative avérée. Cependant le stock des vaccins antivarioliques historiques doit être renouvelé par des vaccins produits en culture de cellules selon les normes actuelles. L'une des solutions choisie par certains producteurs de vaccins a été de développer des vaccins dits de deuxième génération à partir des souches

ayant fait leur preuve historiquement sur le terrain. Ces vaccins de deuxième génération sont développés selon l'une des deux stratégies suivantes : l'amplification d'un seul clone viral choisi pour sa faible virulence et une efficacité similaire à celle du vaccin de référence et la production d'un vaccin polyclonal composé de tous les clones constituant la population vaccinale initiale.

Ce travail de thèse comprend trois études portant sur le vaccin historique *Lister* : l'étude de la diversité de la population virale, la détermination et la description de la séquence génomique et l'étude de la neuropathogénicité de ce vaccin.

L'ignorance de l'origine du VACV, les croisements susceptibles de s'être opérés entre les souches, les techniques de production du vaccin historique chez l'animal, ainsi que les études réalisées sur d'autres vaccins de première génération, suggèraient la présence d'une diversité clonale au sein de la population virale, qui devait être prise en considération pour l'élaboration de nouveaux vaccins. L'étude de la diversité de la population virale et la caractérisation phénotypique et génétique de certains clones devaient permettre d'appréhender l'intérêt ou non du développement d'un vaccin monoclonal issu de cette souche et d'éventuellement identifier la présence de clones aussi immunogènes mais moins virulents que le vaccin historique.

A l'occasion de ce travail, nous avons en effet mis en évidence par des études phénotypiques *in vitro* et *in vivo*, la nature polyclonale du vaccin historique *Lister*. Nous avons également pu isoler des clones dont la virulence importante suggère un possible rôle lors de la réplication excessive du virus à partir du point d'inoculation du vaccin, précédant le développement d'une complication post-vaccinale. D'un point de vue fondamental, il serait à présent intéressant d'étudier les facteurs de virulence de ces clones afin de caractériser leurs particularités. Ces études devraient être réalisées dans plusieurs modèles animaux afin de multiplier les mesures d'efficacité (protection et immunogénicité) et d'innocuité / pathogénicité. Il pourrait ainsi être envisagé de tester la virulence des clones viraux chez un modèle souris immunodéficiente (souris Nude infectées par scarification) qui vient d'être mis en place au laboratoire.

Malgré l'absence de corrélation observée entre la virulence d'un clone et sa capacité de protection, aucun des dix clone sélectionné sur les cent-vingt isolés

initialement à partir du vaccin, n'a eu une virulence plus faible que celle du vaccin historique tout en ayant une capacité de protection similaire.

L'étude de la diversité génétique des clones étudiés a montré l'existence de gènes cibles préférentiels de l'expression de la diversité mais n'a pas mis en évidence le rapprochement de certains clones viraux à une autre souche vaccinale, signe d'un croisement inter-souches.

Parmi les clones viraux étudiés, un clone a particulièrement attiré notre attention par son incapacité à se répliquer dans la lignée cellulaire Vero, communément utilisée pour la production du VACV, alors qu'il se réplique normalement en culture de cellules MRC-5 sur lesquelles il a été isolé et sur cellules BHK-21. Ensuite, lors de l'étude de la pathogénicité et de la protection induites par ce clone, nous avons observé qu'il se répliquait dans le tissu cérébral des souris, entraînant la mort de 100 % des animaux dans un temps intermédiaire par rapport aux autres clones étudiés, alors qu'il n'induisait aucune protection vaccinale. Il serait donc très intéressant de poursuivre la caractérisation de ce clone. La lignée cellulaire Vero étant une lignée épithéliale de rein de singe vert, contrairement à la lignée MRC-5 issue de fibroblastes de poumons humains et à la lignée BHK-21 immortalisées à partir de fibroblastes de rein de hamster, des essais de répllication de ce clone viral sur un panel de cellules d'origines diverses permettraient d'identifier une possible corrélation entre l'absence de répllication de ce clone et une espèce ou un organe à partir duquel a été isolé le type cellulaire. Par la suite l'identification par immunofluorescence ou par microscopie électronique de l'étape de blocage dans le cycle de répllication de ce clone sur culture de cellules Vero pourrait orienter les recherches vers des gènes spécifiquement impliqués dans l'étape en question.

En définitive, chacun des clones étudiés a montré des caractéristiques phénotypiques distinctes en culture cellulaire et chez la souris. A l'occasion de cette étude, nous avons montré la difficulté de faire un choix pour la sélection d'un candidat vaccin répondant aux critères d'innocuité et d'efficacité. Le développement d'un candidat vaccin cloné a pour but de proposer un nouveau vaccin présentant une meilleure innocuité suite à l'élimination des clones viraux les plus virulents, mais son efficacité contre la variole ne pouvant être démontrée, n'est que probable. L'autre stratégie consistant à conserver la diversité de la population au sein d'un vaccin de deuxième génération est quant à elle basée sur la quasi-assurance de l'efficacité de ce vaccin prouvée lors de la campagne

d'éradication de la variole mais ne permet pas d'améliorer son innocuité. Ainsi chacune des stratégies présente des avantages et des inconvénients devant être pris en considération dans le choix d'utilisation de ces nouveaux vaccins en fonction de la menace de résurgence du VARV.

Au cours de cette étude, nous avons sélectionné un clone ayant des propriétés phénotypiques similaires à celle du vaccin historique. Ce clone a été choisi comme référence de la souche *Lister*, afin de définir la séquence génomique de la souche dont il est issu. Un second clone a également été sélectionné et fourni à des collaborateurs afin d'initier la mise au point d'un vaccin de troisième génération *Lister* délété d'un ou plusieurs gènes de virulence, correspondant à ceux de la souche MVA.

La détermination de la séquence génomique de ce vaccin qui a donné lieu à une publication dans *Journal of General Virology* avait comme objectif la mise à disposition à la communauté scientifique d'un outil de travail permettant l'étude de la spécificité de la souche, de la fonctionnalité des gènes afin d'envisager des délétions ou le clonage de certains gènes dans un but d'élaboration de vaccins de troisième ou quatrième génération. Alors qu'au commencement du projet de thèse, la séquence génomique de la souche *Lister* n'était pas disponible, peu de temps avant l'annotation de la séquence obtenue, une séquence consensus similaire a été publiée à partir de la souche *Lister* japonaise. Notre travail s'est donc particulièrement orienté vers l'étude de la spécificité de la souche française et l'étude de ses relations avec les autres OPVs. L'annotation du génome de la souche vaccinale *Lister* et les comparaisons de séquences réalisées avec d'autres VACVs et OPVs, ont permis de mettre en évidence des singularités propres à cette souche. En effet, quatre gènes similaires à des gènes de CMLV et de CPXV ont été identifiés pour la première fois chez une souche de VACV, suggérant des échanges génétiques antérieurs entre ces virus. Un de ces gènes code un récepteur du TNF- α alors que la souche *Lister* est par ailleurs dénuée d'un gène codant un inhibiteur de l'IFN. Il serait donc intéressant d'identifier les fonctions des trois autres gènes spécifiques de la souche *Lister* afin d'évaluer l'impact qu'ils pourraient également avoir sur la virulence de cette souche. Une stratégie reposant sur la construction de mutants délétés de chacun ou de tous ces gènes pourrait permettre d'étudier leur impact sur la réplication virale en culture cellulaire et sur

la pathogénicité *in vivo*. L'étude phylogénétique réalisée au cours de ce travail a quant à elle permis de souligner le fort rapprochement de la souche *Lister* avec les autres souches de VACV et en particulier avec la souche *Copenhagen*.

Les travaux initiés en fin de thèse concernant l'interaction du VACV avec la BHE ont déjà donné des résultats ouvrant des perspectives intéressantes dans la compréhension de l'EPV. A l'aide d'un modèle de BHE *in vitro*, nous avons montré que le VACV peut dans un premier temps infecter une sous-population non identifiée de cellules endothéliales de la BHE et s'y répliquer, puis dans un second temps disséminer aux cellules adjacentes par un mécanisme intercellulaire que nous n'avons pas encore identifié. Cette permissivité des cellules endothéliales entraîne la perte de leur intégrité membranaire responsable d'une augmentation de la perméabilité de la BHE, favorisant ainsi le franchissement du virus et probablement des cellules de l'immunité dans un contexte *in vivo*.

Par ailleurs, les résultats obtenus sur notre modèle souris suggèrent que dans un contexte de virémie intense le VACV présent dans le compartiment sanguin peut pénétrer dans le SNC *via* la BHE. Nous avons montré par l'utilisation du LPS que cette entrée est intimement liée à une augmentation de la perméabilité de la BHE. Néanmoins, la charge virale présente dans le tissu cérébral dans les premiers jours qui suivent la virémie, en l'absence d'une atteinte préalable de la BHE, ne semble pas suffisante pour être à l'origine d'une flambée inflammatoire responsable de l'EPV. Inversement, alors que la mise en place de la réponse immune dans le SNC est indispensable à sa protection, un emballement du processus est responsable de dommages irréparables.

Ces travaux préliminaires suggèrent ainsi que les EPVs observées lors de la campagne d'éradication de la variole, ont pu apparaître dans un contexte de co-infection avec un autre pathogène neuro-invasif ou chez des personnes ayant absorbé préalablement une ou des molécules modifiant la perméabilité de la BHE, favorisant la neuroinvasion puis la réplication du VACV dans le SNC.

Pour confirmer la présence du VACV dans le cerveau après infection de souris par voie intraveineuse, des tissus ont d'ores et déjà été fixés et inclus en paraffine afin de révéler la présence du virus et essayer de le localiser par immunomarquage sur coupe. En parallèle, d'autres échantillons sont en cours d'observation en microscopie électronique.

De nombreuses perspectives d'études pourraient être envisagées à ce travail préliminaire :

Tout d'abord, il serait intéressant d'identifier la sous-population de cellules endothéliales permissive au VACV dans les premières heures suivant l'infection. N'ayant pas observé de différence de permissivité au virus entre les cellules endothéliales en solo et en co-culture, la sous-population d'intérêt ne semble pas apparaître au cours de la différenciation induite par la co-culture. Il serait intéressant de tester la permissivité d'autres cellules endothéliales afin de déterminer si cette observation est spécifique aux cellules de la BHE. Dans un but d'identification de la nature de la sous-population de cellules endothéliales de la BHE, nous pourrions envisager de réaliser des gels d'électrophorèse bidimensionnelle à partir de fractions membranaires de cellules endothéliales puis d'étudier l'interaction de chacun des spots protéiques avec le virus révélé par un anticorps anti-VACV afin d'analyser les protéines d'intérêt par spectrométrie de masse. Une autre option consisterait à trier les cellules infectées par cytométrie de flux afin de les isoler en vue d'étudier leur protéome, cette possibilité est néanmoins certainement limitée par le faible nombre de cellules permissives. Concernant le partenaire viral de l'entrée dans ces cellules, il pourrait être envisagé d'identifier si l'expression de protéines virales est augmentée lors de l'invasion de la BHE. Par ailleurs, afin de confirmer le déclenchement d'une encéphalite suite à l'entrée du VACV dans le tissu cérébral, il serait intéressant de doser des marqueurs pro-inflammatoires locaux sécrétés par les cellules activées de la microglie (Cox-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , etc...) et de mettre en évidence leur rôle par l'utilisation de souris knockout. Enfin, profitant du modèle développé, l'administration de molécules antivirales (cidofovir, ST-246) pourrait être testée dans le traitement des EPVs.

Les études réalisées au cours de ce travail de thèse ont permis de caractériser la souche vaccinale historique *Lister* et d'appréhender l'origine d'une complication post-vaccinale mortelle qu'est l'encéphalite, dans la perspective de développement de nouveaux vaccins antivarioliques devant répondre à des critères d'efficacité, d'innocuité et de BPF. Les techniques développées pour déterminer l'efficacité et l'innocuité des différents clones viraux du vaccin antivariolique de première génération ainsi que celles développées

pour l'étude du passage du VACV à travers la BHE devraient être prochainement utilisées pour l'évaluation des vaccins qui seront développés dans le cadre de la lutte contre les agents du bioterrorisme.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, N. J., Hughes, C. C., Revest, P. A., and Greenwood, J. (1992). Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. *J Cell Sci* 103 (Pt 1), 23-37.
- Afonso, P. V., Ozden, S., Prevost, M. C., Schmitt, C., Seilhean, D., Weksler, B., Couraud, P. O., Gessain, A., Romero, I. A., and Ceccaldi, P. E. (2007). Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J Immunol* 179(4), 2576-83.
- Aguzzi, A., Heppner, F. L., Heikenwalder, M., Prinz, M., Mertz, K., Seeger, H., and Glatzel, M. (2003). Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS. *Br Med Bull* 66, 141-59.
- Alibek, K. (1999). The Soviet Union's anti-agricultural biological weapons. *Ann N Y Acad Sci* 894, 18-9.
- Andersen, I. H., Marker, O., and Thomsen, A. R. (1991). Breakdown of blood-brain barrier function in the murine lymphocytic choriomeningitis virus infection mediated by virus-specific CD8+ T cells. *J Neuroimmunol* 31(2), 155-63.
- Angulo, J. J., De Campos, E. P., and De Gomes, L. F. (1964). Postvaccinal Meningoencephalitis; Isolation of the Virus from the Brain. *Jama* 187, 151-3.
- Antoine, G., Scheifflinger, F., Dorner, F., and Falkner, F. G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244(2), 365-96.
- Antonetti, D. A., Wolpert, E. B., DeMaio, L., Harhaj, N. S., and Scaduto, R. C., Jr. (2002). Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem* 80(4), 667-77.
- Artenstein, A. W., Johnson, C., Marbury, T. C., Morrison, D., Blum, P. S., Kemp, T., Nichols, R., Balsler, J. P., Currie, M., and Monath, T. P. (2005). A novel, cell culture-derived smallpox vaccine in vaccinia-naive adults. *Vaccine* 23(25), 3301-9.
- Baker, R. O., Bray, M., and Huggins, J. W. (2003). Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Res* 57(1-2), 13-23.
- Balda, M. S., and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* 19(9), 2024-33.
- Balda, M. S., Whitney, J. A., Flores, C., Gonzalez, S., Cereijido, M., and Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier

- by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134(4), 1031-49.
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16(1), 1-13.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Brennan, J. M., and Vallance, K. L. (1999). Adsorptive endocytosis of HIV-1gp120 by blood-brain barrier is enhanced by lipopolysaccharide. *Exp Neurol* 156(1), 165-71.
- Barnett, E. M., Jacobsen, G., Evans, G., Cassell, M., and Perlman, S. (1994). Herpes simplex encephalitis in the temporal cortex and limbic system after trigeminal nerve inoculation. *J Infect Dis* 169(4), 782-6.
- Bauer, D. J. (1965). Chemoprophylaxis of smallpox and treatment of vaccinia gangrenose with 1-methylisatin 3-thiosemicarbazone. *Antimicrob Agents Chemother* pp, 544-548.
- Bazin, H. (2000). [Eradication of smallpox, already 20 years ago]. *Bull Acad Natl Med* 184(1), 89-99; discussion 99-104.
- Bechmann, I., Galea, I., and Perry, V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol* 28(1), 5-11.
- Beck, D. W., Roberts, R. L., and Olson, J. J. (1986). Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. *Brain Res* 381(1), 131-7.
- Belyakov, I. M., Earl, P., Dzutsev, A., Kuznetsov, V. A., Lemon, M., Wyatt, L. S., Snyder, J. T., Ahlers, J. D., Franchini, G., Moss, B., and Berzofsky, J. A. (2003). Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16), 9458-9463.
- Bharal, N., Pillai, K. K., and Vohora, D. (2006). Effects of sparfloxacin on CNS functions and urinary hydroxyproline in mice. *Pharmacol Res* 54(2), 111-7.
- Biedler, J. L., and Riehm, H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* 30(4), 1174-84.
- Blanchard, T. J., Alcami, A., Andrea, P., and Smith, G. L. (1998). Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* 79(Pt 5), 1159-67.
- Bolton, S. J., Anthony, D. C., and Perry, V. H. (1998). Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86(4), 1245-57.

- Bond, A., Reichert, Z., and Stivers, J. T. (2006). Novel and specific inhibitors of a poxvirus type I topoisomerase. *Mol Pharmacol* 69(2), 547-57.
- Booss, J., and Davis, L. E. (2003). Smallpox and smallpox vaccination: Neurological implications. *Neurology* 60(8), 1241-5.
- Bozzette, S. A., Boer, R., Bhatnagar, V., Brower, J. L., Keeler, E. B., Morton, S. C., and Stoto, M. A. (2003). A model for a smallpox-vaccination policy. *N Engl J Med* 348(5), 416-25.
- Bray, M., Martinez, M., Smee, D. F., Kefauver, D., Thompson, E., and Huggins, J. W. (2000). Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *J Infect Dis* 181(1), 10-9.
- Bricaire, F., and Bossi, P. (2003). [Vaccinal strategies against smallpox in France]. *Medecine et maladies infectieuses* 34, 1-5.
- Briody, B. A. (1959). Response of mice to ectromelia and vaccinia viruses. *Bacteriol Rev* 23(2), 61-95.
- Calabria, A. R., Weidenfeller, C., Jones, A. R., de Vries, H. E., and Shusta, E. V. (2006). Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem* 97(4), 922-33.
- Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M., and Smith, G. L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* 86(Pt 5), 1279-90.
- Cassel, W. A. (1957). Multiplication of vaccinia virus in the Ehrlich ascites carcinoma. *Virology* 3(3), 514-26.
- Cassimatis, D. C., Atwood, J. E., Engler, R. M., Linz, P. E., Grabenstein, J. D., and Vernalis, M. N. (2004). Smallpox vaccination and myopericarditis: a clinical review. *J Am Coll Cardiol* 43(9), 1503-10.
- CDC (2007a). Household transmission of vaccinia virus from contact with a military smallpox vaccinee--Illinois and Indiana, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56(19), 478-81.
- CDC (2007b). Vulvar vaccinia infection after sexual contact with a military smallpox vaccinee--Alaska, 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 56(17), 417-9.
- Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V. V., Duhem, C., Lundquist, S., Rentfel, M., Torpier, G., and Dehouck, M. P. (1999). In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36(2-3), 165-178.

- Chahroudi, A., Chavan, R., Kozyr, N., Waller, E. K., Silvestri, G., and Feinberg, M. B. (2005). Vaccinia virus tropism for primary hematolymphoid cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *J Virol* 79(16), 10397-407.
- Chang, Y. C., Stins, M. F., McCaffery, M. J., Miller, G. F., Pare, D. R., Dam, T., Paul-Satyaseela, M., Kim, K. S., and Kwon-Chung, K. J. (2004). Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun* 72(9), 4985-95.
- Chapagain, M. L., Verma, S., Mercier, F., Yanagihara, R., and Nerurkar, V. R. (2007). Polyomavirus JC infects human brain microvascular endothelial cells independent of serotonin receptor 2A. *Virology* 364(1), 55-63.
- Chastel, C. (2003). Poxviridae. In "Traité de virologie médicale", pp. 257-267. Estem, Paris.
- Chaudhuri, J. D. (2000). Blood brain barrier and infection. *Med Sci Monit* 6(6), 1213-22.
- Che, X., Ye, W., Panga, L., Wu, D. C., and Yang, G. Y. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res* 902(2), 171-7.
- Cherry, J. D., McIntosh, K., Connor, J. D., Benenson, A. S., Alling, D. W., Rolfe, U. T., Todd, W. A., Schanberger, J. E., and Mattheis (1977). Clinical and serologic study of four smallpox vaccines comparing variations of dose and route of administration. Primary percutaneous vaccination. *J Infect Dis* 135(1), 145-54.
- Chishty, M., Reichel, A., Begley, D. J., and Abbott, N. J. (2002). Glial induction of blood-brain barrier-like L-system amino acid transport in the ECV304 cell line. *Glia* 39(2), 99-104.
- Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S., and Chang, W. (1998). A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol* 72(2), 1577-85.
- Cordy, D. R., and Osebold, J. W. (1959). The neuropathogenesis of listeria encephalomyelitis in sheep and mice. *J Infect Dis* 104(2), 164-73.
- Coulibaly, S., Bruhl, P., Mayrhofer, J., Schmid, K., Gerencer, M., and Falkner, F. G. (2005). The nonreplicating smallpox candidate vaccines defective vaccinia Lister (dVVL) and modified vaccinia Ankara (MVA) elicit robust long-term protection. *Virology*.
- Cucullo, L., Couraud, P. O., Weksler, B., Romero, I. A., Hossain, M., Rapp, E., and Janigro, D. (2007a). Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab*.

- Cucullo, L., Hallene, K., Dini, G., Dal Toso, R., and Janigro, D. (2004). Glycerophosphoinositol and dexamethasone improve transendothelial electrical resistance in an in vitro study of the blood-brain barrier. *Brain Res* 997(2), 147-51.
- Cucullo, L., Hossain, M., Rapp, E., Manders, T., Marchi, N., and Janigro, D. (2007b). Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 48(3), 505-16.
- Cundell, D. R., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., Tuomanen, E. I., and Gerard, N. P. (1996). PAF receptor anchors *Streptococcus pneumoniae* to activated human endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 416, 89-94.
- Dallasta, L. M., Pisarov, L. A., Esplen, J. E., Werley, J. V., Moses, A. V., Nelson, J. A., and Achim, C. L. (1999). Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol* 155(6), 1915-27.
- Damaso, C. R., Esposito, J. J., Condit, R. C., and Moussatche, N. (2000). An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* 277(2), 439-49.
- De Clercq, E. (2001). Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clin Microbiol Rev* 14(2), 382-97.
- Dehouck, B., Dehouck, M. P., Fruchart, J. C., and Cecchelli, R. (1994). Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* 126(2), 465-73.
- Dehouck, M. P., Jolliet-Riant, P., Bree, F., Fruchart, J. C., Cecchelli, R., and Tillement, J. P. (1992). Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* 58(5), 1790-7.
- Dehouck, M. P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54(5), 1798-801.
- Del Maschio, A., De Luigi, A., Martin-Padura, I., Brockhaus, M., Bartfai, T., Fruscella, P., Adorini, L., Martino, G., Furlan, R., De Simoni, M. G., and Dejana, E. (1999). Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med* 190(9), 1351-6.
- Deli, M. A., Abraham, C. S., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 25(1), 59-127.

- Didier, N., Romero, I. A., Creminon, C., Wijkhuisen, A., Grassi, J., and Mabondzo, A. (2003). Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 86(1), 246-54.
- Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M., and Kataoka, Y. (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res* 1038(2), 208-15.
- Drevets, D. A., Jelinek, T. A., and Freitag, N. E. (2001). *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. *Infect Immun* 69(3), 1344-50.
- Drevets, D. A., Leenen, P. J., and Greenfield, R. A. (2004). Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev* 17(2), 323-47.
- Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V., and Sutter, G. (1998). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* 79(Pt 2), 347-52.
- Drillien, R., Spohner, D., and Garin, D. (2004). [Viruses considered for a third generation anti-smallpox vaccine.]. *Med Mal Infect* 34(Suppl 1), S51-S54.
- Driscoll, J. (2002). "Antiviral Drugs." Ashgate Publishing, Aldershot (UK).
- Durieu-Trautmann, O., Foignat-Chaverot, N., Perdomo, J., Gounon, P., Strosberg, A. D., and Couraud, P. O. (1991). Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A(10), 771-8.
- Edghill-Smith, Y., Venzon, D., Karpova, T., McNally, J., Nacsa, J., Tsai, W. P., Trynieszewska, E., Moniuszko, M., Manischewitz, J., King, L. R., Snodgrass, S. J., Parrish, J., Markham, P., Sowers, M., Martin, D., Lewis, M. G., Berzofsky, J. A., Belyakov, I. M., Moss, B., Tartaglia, J., Bray, M., Hirsch, V., Golding, H., and Franchini, G. (2003). Modeling a safer smallpox vaccination regimen, for human immunodeficiency virus type 1-infected patients, in immunocompromised macaques. *J Infect Dis* 188(8), 1181-91.
- el-Ad, B., Roth, Y., Winder, A., Tochner, Z., Lublin-Tennenbaum, T., Katz, E., and Schwartz, T. (1990). The persistence of neutralizing antibodies after revaccination against smallpox. *J Infect Dis* 161(3), 446-8.
- EMEA (2002). Note for guidance on the development of vaccinia virus based vaccines against smallpox.

- Empig, C., Kenner, J. R., Perret-Gentil, M., Youree, B. E., Bell, E., Chen, A., Gurwith, M., Higgins, K., Lock, M., Rice, A. D., Schriewer, J., Sinangil, F., White, E., Buller, R. M., Dermody, T. S., Isaacs, S. N., and Moyer, R. W. (2006). Highly attenuated smallpox vaccine protects rabbits and mice against pathogenic orthopoxvirus challenge. *Vaccine*.
- Eralinna, J. P., Soilu-Hanninen, M., Roytta, M., Hukkanen, V., Salmi, A. A., and Salonen, R. (1996). Blood-brain barrier breakdown and increased intercellular adhesion molecule (ICAM-1/CD54) expression after Semliki Forest (A7) virus infection facilitates the development of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 66(1-2), 103-14.
- Esposito, J. J., and Knight, J. C. (1985). Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology* 143(1), 230-51.
- Fang, M., Cheng, H., Dai, Z., Bu, Z., and Sigal, L. J. (2006). Immunization with a single extracellular enveloped virus protein produced in bacteria provides partial protection from a lethal orthopoxvirus infection in a natural host. *Virology* 345(1), 231-43.
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., and Anderson, J. M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273(45), 29745-53.
- Fenner, F. (1989). Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res Virol* 140(5), 465-6; discussion 487-91.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., and Ladnyi, I. D. (1988). "Smallpox and its eradication." (WHO, Ed.) WHO, Geneva.
- Fenstermacher, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S., and Gruber, K. (1988). Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann NY Acad Sci* 529, 21-30.
- Ferrier-Rembert, A., Drillien, R., Tournier, J. N., Garin, D., and Crance, J. M. (2007). Intranasal cowpox virus infection of the mouse as a model for preclinical evaluation of smallpox vaccines. *Vaccine* 25(25), 4809-17.
- Fiala, M., Looney, D. J., Stins, M., Way, D. D., Zhang, L., Gan, X., Chiappelli, F., Schweitzer, E. S., Shapshak, P., Weinand, M., Graves, M. C., Witte, M., and Kim, K. S. (1997). TNF-alpha opens a paracellular route for HIV-1 invasion across the blood-brain barrier. *Mol Med* 3(8), 553-64.
- Fine, P. E., Jezek, Z., Grab, B., and Dixon, H. (1988). The transmission potential of monkeypox virus in human populations. *Int J Epidemiol* 17(3), 643-50.

- Fischer, S., Wiesnet, M., Renz, D., and Schaper, W. (2005). H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Eur J Cell Biol* 84(7), 687-97.
- Fletcher, N. F., Brayden, D. J., Brankin, B., Worrall, S., and Callanan, J. J. (2006). Growth and characterisation of a cell culture model of the feline blood-brain barrier. *Vet Immunol Immunopathol* 109(3-4), 233-44.
- Fogg, C., Lustig, S., Whitbeck, J. C., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., and Moss, B. (2004). Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *J Virol* 78(19), 10230-7.
- Gallwitz, S., Schutzbank, T., Heberling, R. L., Kalter, S. S., and Galpin, J. E. (2003). Smallpox: residual antibody after vaccination. *J Clin Microbiol* 41(9), 4068-70.
- Galmiche, M. C., Goenaga, J., Wittek, R., and Rindisbacher, L. (1999). Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia virus envelope antigens. *Virology* 254(1), 71-80.
- Gangemi, J. D., and Sharp, D. G. (1976). Use of a restriction endonuclease in analyzing the genomes from two different strains of vaccinia virus. *J Virol* 20(1), 319-23.
- Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J. O., and Osterberg, T. (2005). In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicol In Vitro* 19(3), 299-334.
- Gentil, B. J., Benaud, C., Delphin, C., Remy, C., Berezowski, V., Cecchelli, R., Feraud, O., Vittet, D., and Baudier, J. (2005). Specific AHNAK expression in brain endothelial cells with barrier properties. *J Cell Physiol* 203(2), 362-71.
- Ginsberg, A. H., and Johnson, K. P. (1976). Vaccinia virus meningitis in mice after intracerebral inoculation. *Infect Immun* 13(4), 1221-7.
- Goebel, S. J., Johnson, G. P., Perkus, M. E., Davis, S. W., Winslow, J. P., and Paoletti, E. (1990). The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179(1), 247-66, 517-63.
- Goldstein, J. A., Neff, J. M., Lane, J. M., and Koplan, J. P. (1975). Smallpox vaccination reactions, prophylaxis, and therapy of complications. *Pediatrics* 55(3), 342-7.
- Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., and Louvard, D. (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20), 10779-84.

- Grab, D. J., Nikolskaia, O., Kim, Y. V., Lonsdale-Eccles, J. D., Ito, S., Hara, T., Fukuma, T., Nyarko, E., Kim, K. J., Stins, M. F., Delannoy, M. J., Rodgers, J., and Kim, K. S. (2004). African trypanosome interactions with an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Parasitol* 90(5), 970-9.
- Greenberg, M., and Appelbaum, E. (1948). Postvaccinal encephalitis: a report of 45 cases in New York City. *Am J Med Sci* 216, 565-570.
- Greenberg, R. N., Kennedy, J. S., Clanton, D. J., Plummer, E. A., Hague, L., Cruz, J., Ennis, F. A., Blackwelder, W. C., and Hopkins, R. J. (2005). Safety and immunogenicity of new cell-cultured smallpox vaccine compared with calf-lymph derived vaccine: a blind, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* 365(9457), 398-409.
- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F. J., and Smith, G. L. (2007). A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS Pathog* 3(2), e17.
- Gubser, C., Hue, S., Kellam, P., and Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85(Pt 1), 105-17.
- Gurvich, E. B., and Vilesova, I. S. (1983). Vaccinia virus in postvaccinal encephalitis. *Acta Virol* 27(2), 154-9.
- Halsell, J. S., Riddle, J. R., Atwood, J. E., Gardner, P., Shope, R., Poland, G. A., Gray, G. C., Ostroff, S., Eckart, R. E., Hospenhal, D. R., Gibson, R. L., Grabenstein, J. D., Arness, M. K., and Tornberg, D. N. (2003). Myopericarditis following smallpox vaccination among vaccinia-naive US military personnel. *Jama* 289(24), 3283-9.
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., Strelow, L. I., Nelson, J. A., Sexton, G. J., Hanifin, J. M., and Slifka, M. K. (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 9(9), 1131-7.
- Hashizume, S., Morita, M., and Takahashi, F. (1987). [New technology of vaccine production--international prospect of the development. Method and theory of production of vaccines by genetic engineering. a. Vaccinia vector vaccine]. *Nippon Rinsbo* 45(10), 2333-41.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J., and Stevenson, B. R. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141(1), 199-208.
- Hawkins, B. T., and Egleton, R. D. (2006). Fluorescence imaging of blood-brain barrier disruption. *J Neurosci Methods* 151(2), 262-7.

- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., and Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19(1), 13-26.
- Henderson, D. A. (1999). Lessons from the eradication campaigns. *Vaccine* 17(Suppl 3), S53-5.
- Hertzog, T., Weber, M., Greiffenberg, L., Holthausen, B. S., Goebel, W., Kim, K. S., and Kuhn, M. (2003). Antibodies present in normal human serum inhibit invasion of human brain microvascular endothelial cells by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 71(1), 95-100.
- Hoffman, H. J., and Olszewski, J. (1961). Spread of sodium fluorescein in normal brain tissue. A study of the mechanism of the blood-brain barrier. *Neurology* 11, 1081-5.
- Hoheisel, D., Nitz, T., Franke, H., Wegener, J., Hakvoort, A., Tilling, T., and Galla, H. J. (1998). Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 247(2), 312-5.
- Holzer, G. W., and Falkner, F. G. (1997). Construction of a vaccinia virus deficient in the essential DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase by a complementing cell line. *J Virol* 71(7), 4997-5002.
- Hooper, J. W., Custer, D. M., Schmaljohn, C. S., and Schmaljohn, A. L. (2000). DNA vaccination with vaccinia virus L1R and A33R genes protects mice against a lethal poxvirus challenge. *Virology* 266(2), 329-39.
- Hooper, J. W., Custer, D. M., and Thompson, E. (2003). Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. *Virology* 306(1), 181-95.
- Hooper, J. W., Thompson, E., Wilhelmson, C., Zimmerman, M., Ichou, M. A., Steffen, S. E., Schmaljohn, C. S., Schmaljohn, A. L., and Jahrling, P. B. (2004). Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *J Virol* 78(9), 4433-43.
- Hori, S., Ohtsuki, S., Hosoya, K., Nakashima, E., and Terasaki, T. (2004). A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* 89(2), 503-13.
- Hruby, D. E. (1990). Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin Microbiol Rev* 3(2), 153-70.
- Hsiao, J. C., Chung, C. S., and Chang, W. (1999). Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J Virol* 73(10), 8750-61.

- Ichikawa, N., Naora, K., Hirano, H., Hashimoto, M., Masumura, S., and Iwamoto, K. (1996). Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells for studying drug transport in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods* 36(1), 45-52.
- Inoue, A., Koh, C. S., Yamazaki, M., Yanagisawa, N., Ishihara, Y., and Kim, B. S. (1997). Fibrin deposition in the central nervous system correlates with the degree of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 77(2), 185-94.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147(6), 1351-63.
- Jackson, R. J., Ramsay, A. J., Christensen, C. D., Beaton, S., Hall, D. F., and Ramshaw, I. A. (2001). Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J Virol* 75(3), 1205-10.
- Jacomy, H., and Talbot, P. J. (2003). Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43. *Virology* 315(1), 20-33.
- Jain, S. K., Paul-Satyaseela, M., Lamichhane, G., Kim, K. S., and Bishai, W. R. (2006). Mycobacterium tuberculosis invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis. *J Infect Dis* 193(9), 1287-95.
- Janzer, R. C., and Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325(6101), 253-7.
- Jarhrling, P. B., Zaucha, G. M., and Huggins, J. W. (2000). Countermeasures to the reemergence of Smallpox Virus as an Agent of Bioterrorism. *Emerging Infections* 4.
- Jeliazkova-Mecheva, V. V., and Bobilya, D. J. (2003). A porcine astrocyte/endothelial cell co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Protoc* 12(2), 91-8.
- Jenner, E. (1801). "Origine of the vaccine inoculation." 1 vols. Soho, Londres (UK).
- Jones, B. R., Galbraith, J. E., and Al-Hussaini, M. K. (1962). Vaccinial keratitis treated with interferon. *Lancet* 1, 875-9.
- Jong, A. Y., Stins, M. F., Huang, S. H., Chen, S. H., and Kim, K. S. (2001). Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. *Infect Immun* 69(7), 4536-44.
- Kanmogne, G. D., Schall, K., Leibhart, J., Knipe, B., Gendelman, H. E., and Persidsky, Y. (2007). HIV-1 gp120 compromises blood-brain barrier integrity and enhances

- monocyte migration across blood-brain barrier: implication for viral neuropathogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 27(1), 123-34.
- Karupiah, G., Fredrickson, T. N., Holmes, K. L., Khairallah, L. H., and Buller, R. M. (1993). Importance of interferons in recovery from mousepox. *J Virol* 67(7), 4214-26.
- Kemp, C. H., Berge, T., and England, B. (1956). Hyperimmune vaccinal gammaglobulin: source, evaluation and use in prophylaxis and therapy. *Pediatrics* 18, 177-188.
- Kennedy, J. S., Frey, S. E., Yan, L., Rothman, A. L., Cruz, J., Newman, F. K., Orphin, L., Belshe, R. B., and Ennis, F. A. (2004). Induction of human T cell-mediated immune responses after primary and secondary smallpox vaccination. *J Infect Dis* 190(7), 1286-94.
- Kern, E. R. (2003). In vitro activity of potential anti-poxvirus agents. *Antiviral Res* 57(1-2), 35-40.
- Kern, E. R., Hartline, C., Harden, E., Keith, K., Rodriguez, N., Beadle, J. R., and Hostetler, K. Y. (2002). Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 46(4), 991-5.
- Ketabi-Kiyanvash, N., Herold-Mende, C., Kashfi, F., Caldeira, S., Tommasino, M., Haefeli, W. E., and Weiss, J. (2007). NKIM-6, a new immortalized human brain capillary endothelial cell line with conserved endothelial characteristics. *Cell Tissue Res* 328(1), 19-29.
- Kido, Y., Tamai, I., Nakanishi, T., Kagami, T., Hirosawa, I., Sai, Y., and Tsuji, A. (2002). Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 17(1), 34-41.
- Kidokoro, M., Tashiro, M., and Shida, H. (2005). Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11), 4152-7.
- Kim, K. S. (2006). Microbial translocation of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 36(5), 607-14.
- Kim, T. A., Avraham, H. K., Koh, Y. H., Jiang, S., Park, I. W., and Avraham, S. (2003). HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *J Immunol* 170(5), 2629-37.
- Kirk, J., Plumb, J., Mirakhur, M., and McQuaid, S. (2003). Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol* 201(2), 319-27.

- Kniesel, U., and Wolburg, H. (2000). Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20(1), 57-76.
- Kotwal, G. J., and Moss, B. (1988). Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature* 335(6186), 176-8.
- Kozler, P., and Pokorny, J. (2003). Altered blood-brain barrier permeability and its effect on the distribution of Evans blue and sodium fluorescein in the rat brain applied by intracarotid injection. *Physiol Res* 52(5), 607-14.
- Kretzschmar, M., Wallinga, J., Teunis, P., Xing, S., and Mikolajczyk, R. (2006). Frequency of Adverse Events after Vaccination with Different Vaccinia Strains. *PLoS Med* 3(8).
- Kubota, K., Furuse, M., Sasaki, H., Sonoda, N., Fujita, K., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1999). Ca²⁺-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr Biol* 9(18), 1035-8.
- Kusch-Poddar, M., Drewe, J., Fux, I., and Gutmann, H. (2005). Evaluation of the immortalized human brain capillary endothelial cell line BB19 as a human cell culture model for the blood-brain barrier. *Brain Res* 1064(1-2), 21-31.
- Kutinova, L., Ludvikova, V., Simonova, V., Otavova, M., Krystofova, J., Hainz, P., Press, M., Kunke, D., and Vonka, V. (1995). Search for optimal parent for recombinant vaccinia virus vaccines. Study of three vaccinia virus vaccinal strains and several virus lines derived from them. *Vaccine* 13(5), 487-93.
- Lambotin, M., Hoffmann, I., Laran-Chich, M. P., Nassif, X., Couraud, P. O., and Bourdoulous, S. (2005). Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipo-oligosaccharide. *J Cell Sci* 118(Pt 16), 3805-16.
- Lane, J. M., Ruben, F. L., Neff, J. M., and Millar, J. D. (1969). Complications of smallpox vaccination, 1968. *N Engl J Med* 281(22), 1201-8.
- Lane, J. M., Ruben, F. L., Neff, J. M., and Millar, J. D. (1970). Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys. *J Infect Dis* 122(4), 303-9.
- Law, K. M., and Smith, G. L. (1992). A vaccinia serine protease inhibitor which prevents virus-induced cell fusion. *J Gen Virol* 73(Pt 3), 549-57.
- Lee, H. J., Essani, K., and Smith, G. L. (2001). The genome sequence of Yaba-like disease virus, a yatapoxvirus. *Virology* 281(2), 170-92.
- Lee, H. S., Namkoong, K., Kim, D. H., Kim, K. J., Cheong, Y. H., Kim, S. S., Lee, W. B., and Kim, K. Y. (2004). Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 68(3), 231-8.

- Lee, J. D., Tsai, L. Y., Chen, C. H., Wang, J. J., Hsiao, J. K., and Yen, C. M. (2006). Blood-brain barrier dysfunction occurring in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop* 97(2), 204-11.
- Lee, M. S., Roos, J. M., McGuigan, L. C., Smith, K. A., Cormier, N., Cohen, L. K., Roberts, B. E., and Payne, L. G. (1992). Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *J Virol* 66(5), 2617-30.
- Leech, S., Kirk, J., Plumb, J., and McQuaid, S. (2007). Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33(1), 86-98.
- Leite, J. A., Drumond, B. P., Trindade, G. S., Lobato, Z. I., da Fonseca, F. G., dos, S. J., Madureira, M. C., Guedes, M. I., Ferreira, J. M., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2005). Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis* 11(12), 1935-8.
- Li, Z., Rubin, S. A., Taffs, R. E., Merchlinsky, M., Ye, Z., and Carbone, K. M. (2004). Mouse neurotoxicity test for vaccinia-based smallpox vaccines. *Vaccine* 22(11-12), 1486-93.
- Licon Luna, R. M., Lee, E., Mullbacher, A., Blanden, R. V., Langman, R., and Lobigs, M. (2002). Lack of both Fas ligand and perforin protects from flavivirus-mediated encephalitis in mice. *J Virol* 76(7), 3202-11.
- Lin, C. L., Chung, C. S., Heine, H. G., and Chang, W. (2000). Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* 74(7), 3353-65.
- Liu, K., Lemon, B., and Traktman, P. (1995). The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro. *J Virol* 69(12), 7823-34.
- Liu, N. Q., Lossinsky, A. S., Popik, W., Li, X., Gujuluva, C., Kriederman, B., Roberts, J., Pushkarsky, T., Bukrinsky, M., Witte, M., Weinand, M., and Fiala, M. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 76(13), 6689-700.
- Lublin-Tennenbaum, T., Katzenelson, E., el-Ad, B., and Katz, E. (1990). Correlation between cutaneous reaction in vaccinees immunized against smallpox and antibody titer determined by plaque neutralization test and ELISA. *Viral Immunol* 3(1), 19-25.

- Lustig, S., Danenberg, H. D., Kafri, Y., Kobiler, D., and Ben-Nathan, D. (1992). Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. *J Exp Med* 176(3), 707-12.
- Mahy, B. W. (2003). An overview on the use of a viral pathogen as a bioterrorism agent: why smallpox? *Antiviral Res* 57(1-2), 1-5.
- Mark, K. S., and Davis, T. P. (2002). Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(4), H1485-94.
- Marris, E. (2007). Dramatic rescue relieves rare case of smallpox infection. *Nat Med* 13(5), 517.
- Mayne, M., Bratanich, A. C., Chen, P., Rana, F., Nath, A., and Power, C. (1998). HIV-1 tat molecular diversity and induction of TNF-alpha: implications for HIV-induced neurological disease. *Neuroimmunomodulation* 5(3-4), 184-92.
- Mayr, A., Stickl, H., Muller, H. K., Danner, K., and Singer, H. (1978). [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* 167(5-6), 375-90.
- McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* 3(3), 201-13.
- McIntosh, K., Cherry, J. D., Benenson, A. S., Connor, J. D., Alling, D. W., Rolfe, U. T., Todd, W. A., Schanberger, J. E., and Mattheis, M. J. (1977). Clinical and serologic study of four smallpox vaccines comparing variations of dose and route of administration. Standard percutaneous revaccination of children who receive primary percutaneous vaccination. *J Infect Dis* 135(1), 155-66.
- Megard, I., Garrigues, A., Orłowski, S., Jorajuria, S., Clayette, P., Ezan, E., and Mabondzo, A. (2002). A co-culture-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo-in vitro correlation. *Brain Res* 927(2), 153-67.
- Meiser, A., Boulanger, D., Sutter, G., and Krijnse Locker, J. (2003). Comparison of virus production in chicken embryo fibroblasts infected with the WR, IHD-J and MVA strains of vaccinia virus: IHD-J is most efficient in trans-Golgi network wrapping and extracellular enveloped virus release. *J Gen Virol* 84(Pt 6), 1383-92.
- Menzio, F. D., Reddy, V. M., Cayet, D., Raze, D., Debrie, A. S., Dehouck, M. P., Cecchelli, R., and Locht, C. (2006). Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microbes Infect* 8(1), 1-9.

- Meseda, C. A., Garcia, A. D., Kumar, A., Mayer, A. E., Manischewitz, J., King, L. R., Golding, H., Merchlinsky, M., and Weir, J. P. (2005). Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model. *Virology*.
- Meyer, H., Sutter, G., and Mayr, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 72(Pt 5), 1031-8.
- Monath, T. P., Caldwell, J. R., Mundt, W., Fusco, J., Johnson, C. S., Buller, M., Liu, J., Gardner, B., Downing, G., Blum, P. S., Kemp, T., Nichols, R., and Weltzin, R. (2004). ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) - a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int J Infect Dis* 8 Suppl 2, 31-44.
- Monath, T. P., Cropp, C. B., and Harrison, A. K. (1983). Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab Invest* 48(4), 399-410.
- Morcos, Y., Hosie, M. J., Bauer, H. C., and Chan-Ling, T. (2001). Immunolocalization of occludin and claudin-1 to tight junctions in intact CNS vessels of mammalian retina. *J Neurocytol* 30(2), 107-23.
- Mori, I., Goshima, F., Ito, H., Koide, N., Yoshida, T., Yokochi, T., Kimura, Y., and Nishiyama, Y. (2005). The vomeronasal chemosensory system as a route of neuroinvasion by herpes simplex virus. *Virology* 334(1), 51-8.
- Morikawa, S., Sakiyama, T., Hasegawa, H., Saijo, M., Maeda, A., Kurane, I., Maeno, G., Kimura, J., Hirama, C., Yoshida, T., Asahi-Ozaki, Y., Sata, T., Kurata, T., and Kojima, A. (2005). An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J Virol* 79(18), 11873-91.
- Moses, A. V., Bloom, F. E., Pauza, C. D., and Nelson, J. A. (1993). Human immunodeficiency virus infection of human brain capillary endothelial cells occurs via a CD4/galactosylceramide-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22), 10474-8.
- Moses, A. V., and Nelson, J. A. (1994). HIV infection of human brain capillary endothelial cells--implications for AIDS dementia. *Adv Neuroimmunol* 4(3), 239-47.
- Moya, K. L., Hassig, R., Creminon, C., Laffont, I., and Di Giamberardino, L. (2004). Enhanced detection and retrograde axonal transport of PrPc in peripheral nerve. *J Neurochem* 88(1), 155-60.
- MSJS (2003a). Biotox: plan national de réponse à une réintroduction délibérée de variole.

- MSJS (2003b). Le plan national de réponse à une menace de variole.
- Muruganandam, A., Herx, L. M., Monette, R., Durkin, J. P., and Stanimirovic, D. B. (1997). Development of immortalized human cerebromicrovascular endothelial cell line as an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Faseb J* 11(13), 1187-97.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoka, R., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 27(6), 687-94.
- Nanning, W. (1962). Prophylactic effect of antivaccinia gammaglobulin against post-vaccinal encephalitis. *Bull World Health Organ* 27, 317-24.
- Nassif, X. (1999). Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucaryotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? *Curr Opin Microbiol* 2(1), 71-7.
- Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugene, E., and Couraud, P. O. (2002). How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol* 10(5), 227-32.
- Neuhaus, J., Risau, W., and Wolburg, H. (1991). Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann N Y Acad Sci* 633, 578-80.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161(3), 653-60.
- O'Toole, T. (1999). Smallpox: An attack scenario. *Emerg Infect Dis* 5(4), 540-6.
- O'Toole, T., Mair, M., and Inglesby, T. V. (2002). Shining light on "Dark Winter". *Clin Infect Dis* 34(7), 972-83.
- Ober, B. T., Bruhl, P., Schmidt, M., Wieser, V., Gritschenberger, W., Coulibaly, S., Savidis-Dacho, H., Gerencer, M., and Falkner, F. G. (2002). Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus lister: comparison with modified vaccinia virus Ankara. *J Virol* 76(15), 7713-23.
- Oldendorf, W. H., Cornford, M. E., and Brown, W. J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1(5), 409-17.

- Olsen, A. L., Morrey, J. D., Smee, D. F., and Sidwell, R. W. (2007). Correlation between breakdown of the blood-brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice. *Antiviral Res* 75(2), 104-12.
- Orent, W. (1998). Escape from moscow. *The sciences* 3, 26-31.
- Pakaski, M., and Kasa, P. (1992). Glial cells in coculture can increase the acetylcholinesterase activity in human brain endothelial cells. *Neurochem Int* 21(1), 129-33.
- Pardridge, W. M., Triguero, D., Yang, J., and Cancilla, P. A. (1990). Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 253(2), 884-91.
- Payne, L. G. (1980). Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. *J Gen Virol* 50(1), 89-100.
- Perlman, S., Evans, G., and Afifi, A. (1990). Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J Exp Med* 172(4), 1127-32.
- Perriere, N., Demeuse, P., Garcia, E., Regina, A., Debray, M., Andreux, J. P., Couvreur, P., Scherrmann, J. M., Tamsamani, J., Couraud, P. O., Deli, M. A., and Roux, F. (2005). Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem* 93(2), 279-89.
- Perriere, N., Yousif, S., Cazaubon, S., Chaverot, N., Bourasset, F., Cisternino, S., Declèves, X., Hori, S., Terasaki, T., Deli, M., Scherrmann, J. M., Tamsamani, J., Roux, F., and Couraud, P. O. (2007). A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res* 1150, 1-13.
- Persidsky, Y., Heilman, D., Haorah, J., Zelivyanskaya, M., Persidsky, R., Weber, G. A., Shimokawa, H., Kaibuchi, K., and Ikezu, T. (2006). Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). *Blood* 107(12), 4770-80.
- Phares, T. W., Kean, R. B., Mikheeva, T., and Hooper, D. C. (2006). Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. *J Immunol* 176(12), 7666-75.
- Phelps, A. L., Gates, A. J., Hillier, M., Eastaugh, L., and Ulaeto, D. O. (2006). Comparative efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) as a potential replacement smallpox vaccine. *Vaccine*.
- Pu, H., Tian, J., Flora, G., Lee, Y. W., Nath, A., Hennig, B., and Toborek, M. (2003). HIV-1 Tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain. *Mol Cell Neurosci* 24(1), 224-37.

- Pujol, C., Eugene, E., de Saint Martin, L., and Nassif, X. (1997). Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect Immun* 65(11), 4836-42.
- Quenelle, D. C., Buller, R. M., Parker, S., Keith, K. A., Hraby, D. E., Jordan, R., and Kern, E. R. (2007). Efficacy of delayed treatment with ST-246 given orally against systemic orthopoxvirus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51(2), 689-95.
- Rao, A. R., Savithri Sukumar, M., Kamalakshi, S., Paramasivam, T. V., and Ramakrishnan, S. (1972). Further studies with precipitation in gel test in diagnosis of smallpox. I. Studies on detection of antibodies in sera by pig test. *Indian J Med Res* 60(9), 1254-60.
- Raoult, D. (2003). Bioterrorisme: rapport de mission du Pr Raoult. Ministères de la santé et de la recherche.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S., and Pickup, D. J. (1992). Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69(4), 597-604.
- Reese, T. S., and Karnovsky, M. J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34(1), 207-17.
- Reuter, J. D., Gomez, D. L., Wilson, J. H., and Van Den Pol, A. N. (2004). Systemic immune deficiency necessary for cytomegalovirus invasion of the mature brain. *J Virol* 78(3), 1473-87.
- Risau, W., and Wolburg, H. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 13(5), 174-8.
- Rockoff, A., Spigland, I., Lorenstein, B., and Rose, A. L. (1979). Postvaccinal encephalomyelitis without cutaneous vaccination reaction. *Ann Neurol* 5(1), 99-101.
- Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Ojakian, G. K., and Esteban, M. (1991). Vaccinia virus preferentially enters polarized epithelial cells through the basolateral surface. *J Virol* 65(1), 494-8.
- Romero, I. A., Prevost, M. C., Perret, E., Adamson, P., Greenwood, J., Couraud, P. O., and Ozden, S. (2000). Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system. *J Virol* 74(13), 6021-30.
- Romero, I. A., Radewicz, K., Jubin, E., Michel, C. C., Greenwood, J., Couraud, P. O., and Adamson, P. (2003). Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 344(2), 112-6.

- Roos, K. L., and Eckerman, N. L. (2002). The smallpox vaccine and postvaccinal encephalitis. *Semin Neurol* 22(1), 95-8.
- Roux, F., Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Claire, M., Maily, P., Bourre, J. M., Strosberg, A. D., and Couraud, P. O. (1994). Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 159(1), 101-13.
- Roy, C. J., Baker, R., Washburn, K., and Bray, M. (2003). Aerosolized cidofovir is retained in the respiratory tract and protects mice against intranasal cowpox virus challenge. *Antimicrob Agents Chemother* 47(9), 2933-7.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, J., and et al. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115(6), 1725-35.
- Rucker, H. K., Wynder, H. J., and Thomas, W. E. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull* 51(5), 363-9.
- Saijo, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Iwata, N., Hasegawa, H., Ogata, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Sata, T., Kurata, T., Kurane, I., and Morikawa, S. (2006). LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *J Virol* 80(11), 5179-88.
- Savona, M. R., Dela Cruz, W. P., Jones, M. S., Thornton, J. A., Xia, D., Hadfield, T. L., and Danaher, P. J. (2006). Detection of vaccinia DNA in the blood following smallpox vaccination. *Jama* 295(16), 1898-900.
- Sbrana, E., Jordan, R., Hruby, D. E., Mateo, R. I., Xiao, S. Y., Siirin, M., Newman, P. C., AP, D. A. R., and Tesh, R. B. (2007). Efficacy of the antipoxvirus compound ST-246 for treatment of severe orthopoxvirus infection. *Am J Trop Med Hyg* 76(4), 768-73.
- Scaramozzino, N., Ferrier-Rembert, A., Favier, A. L., Rothlisberger, C., Richard, S., Crance, J. M., Meyer, H., and Garin, D. (2007). Real-Time PCR to Identify Variola Virus or Other Human Pathogenic Orthopox Viruses. *Clin Chem*.
- Schiera, G., Sala, S., Gallo, A., Raffa, M. P., Pitarresi, G. L., Savettieri, G., and Di Liegro, I. (2005). Permeability properties of a three-cell type in vitro model of blood-brain barrier. *J Cell Mol Med* 9(2), 373-9.
- Sedlakova, R., Shivers, R. R., and Del Maestro, R. F. (1999). Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31(1), 149-61.
- Sekiguchi, J., Stivers, J. T., Mildvan, A. S., and Shuman, S. (1996). Mechanism of inhibition of vaccinia DNA topoisomerase by novobiocin and coumermycin. *J Biol Chem* 271(4), 2313-22.

- Senkevich, T. G., Ward, B. M., and Moss, B. (2004). Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *J Virol* 78(5), 2357-66.
- Shah, M. V., Audus, K. L., and Borchardt, R. T. (1989). The application of bovine brain microvessel endothelial-cell monolayers grown onto polycarbonate membranes in vitro to estimate the potential permeability of solutes through the blood-brain barrier. *Pharm Res* 6(7), 624-7.
- Sharp, J. C., and Fletcher, W. B. (1973). Experience of anti-vaccinia immunoglobulin in the United Kingdom. *Lancet* 1(7804), 656-9.
- Shi, B., De Girolami, U., He, J., Wang, S., Lorenzo, A., Busciglio, J., and Gabuzda, D. (1996). Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system. *J Clin Invest* 98(9), 1979-90.
- Sidwell, R. W., Allen, L. B., Khare, G. P., Huffman, J. H., Witkowski, J. T., Simon, L. N., and Robins, R. K. (1973). Effect of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole, ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals. *Antimicrob Agents Chemother* 3(2), 242-6.
- Sliva, K., and Schnierle, B. (2007). From actually toxic to highly specific--novel drugs against poxviruses. *Virology* 4, 8.
- Smee, D. F., and Sidwell, R. W. (2003). A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models. *Antiviral Res* 57(1-2), 41-52.
- Smee, D. F., Sidwell, R. W., Kefauver, D., Bray, M., and Huggins, J. W. (2002). Characterization of wild-type and cidofovir-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 46(5), 1329-35.
- Smith, G. L., and Law, M. (2004). The exit of Vaccinia virus from infected cells. *Virus Res* 106(2), 189-97.
- Smith, G. L., Vanderplasschen, A., and Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* 83(Pt 12), 2915-31.
- Song, L., and Pachter, J. S. (2003). Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39(7), 313-20.
- Spehner, D., Drillien, R., Proamer, F., Houssais-Pecher, C., Zanta, M. A., Geist, M., Dott, K., and Balloul, J. M. (2000). Enveloped virus is the major virus form produced during productive infection with the modified vaccinia virus Ankara strain. *Virology* 273(1), 9-15.

- Staib, C., Suezer, Y., Kislting, S., Kalinke, U., and Sutter, G. (2006). Short-term, but not post-exposure, protection against lethal orthopoxvirus challenge after immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J Gen Virol* 87(Pt 10), 2917-21.
- Stamatovic, S. M., Shaku, P., Keep, R. F., Moore, B. B., Kunkel, S. L., Van Rooijen, N., and Andjelkovic, A. V. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 25(5), 593-606.
- Stanley, M. A. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol* 27(7), 571-7.
- Stanness, K. A., Guatteo, E., and Janigro, D. (1996). A dynamic model of the blood-brain barrier "in vitro". *Neurotoxicology* 17(2), 481-96.
- Stewart, P. A., and Wiley, M. J. (1981a). Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 84(1), 183-92.
- Stewart, P. A., and Wiley, M. J. (1981b). Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. *J Comp Neurol* 202(2), 157-67.
- Stickl, H., and Hochstein-Mintzel, V. (1971). [Intracutaneous smallpox vaccination with a weak pathogenic vaccinia virus ("MVA virus")]. *Munch Med Wochenschr* 113(35), 1149-53.
- Stittelaar, K. J., Neyts, J., Naesens, L., van Amerongen, G., van Lavieren, R. F., Holy, A., De Clercq, E., Niesters, H. G., Fries, E., Maas, C., Mulder, P. G., van der Zeijst, B. A., and Osterhaus, A. D. (2006). Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection. *Nature* 439(7077), 745-8.
- Sussman, S., and Grossman, M. (1965). Complications of smallpox vaccination. Effects of vaccinia immunoglobulin therapy. *J. Pediatr.* 67, 1168-1173.
- Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., and et al. (1992). NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* 188(1), 217-32.
- Terzin, A. L., Masic, M., Vukovic, B., and Mudric, V. (1974). A virological study of post-vaccinal encephalitis. *J Hyg (Lond)* 72(2), 169-72.
- Thach, D. C., Kimura, T., and Griffin, D. E. (2000). Differences between C57BL/6 and BALB/cBy mice in mortality and virus replication after intranasal infection with neuroadapted Sindbis virus. *J Virol* 74(13), 6156-61.

- Tomlinson, A. H., and Esiri, M. M. (1983). Herpes simplex encephalitis. Immunohistological demonstration of spread of virus via olfactory pathways in mice. *J Neurol Sci* 60(3), 473-84.
- Townsley, A. C., Weisberg, A. S., Wagenaar, T. R., and Moss, B. (2006). Vaccinia Virus Entry into Cells via a Low-pH-Dependent Endosomal Pathway. *J Virol* 80(18), 8899-908.
- Treeratanapiboon, L., Psathaki, K., Wegener, J., Looareesuwan, S., Galla, H. J., and Udomsangpetch, R. (2005). In vitro study of malaria parasite induced disruption of blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 335(3), 810-8.
- Trindade, G. S., Lobato, Z. I., Drumond, B. P., Leite, J. A., Trigueiro, R. C., Guedes, M. L., da Fonseca, F. G., dos Santos, J. R., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2006). Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg* 75(3), 486-90.
- Tuomanen, E. (1996). Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiol Rev* 18(4), 289-99.
- Turner, P. C., and Moyer, R. W. (1992). An orthopoxvirus serpinlike gene controls the ability of infected cells to fuse. *J Virol* 66(4), 2076-85.
- Upton, C., Macen, J. L., Schreiber, M., and McFadden, G. (1991). Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 184(1), 370-82.
- Van Itallie, C. M., and Anderson, J. M. (2004). The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* 19, 331-8.
- Vermeer, P. D., McHugh, J., Rokhlina, T., Vermeer, D. W., Zabner, J., and Welsh, M. J. (2007). Vaccinia Virus Entry, Exit, and Interaction with Differentiated Human Airway Epithelia. *J Virol*.
- Vestey, J. P., Yirrell, D. L., and Norval, M. (1991). What is human catpox/cowpox infection? *Int J Dermatol* 30(10), 696-8.
- Vollmar, J., Arndtz, N., Eckl, K. M., Thomsen, T., Petzold, B., Mateo, L., Schlereth, B., Handley, A., King, L., Hulsemann, V., Tzatzaris, M., Merkl, K., Wulff, N., and Chaplin, P. (2006). Safety and immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine* 24(12), 2065-70.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10(12), 1366-73.

- Wegmann, F., Ebnet, K., Du Pasquier, L., Vestweber, D., and Butz, S. (2004). Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts. *Exp Cell Res* 300(1), 121-33.
- Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., and Couraud, P. O. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J* 19(13), 1872-4.
- Weltzin, R., Liu, J., Pugachev, K. V., Myers, G. A., Coughlin, B., Blum, P. S., Nichols, R., Johnson, C., Cruz, J., Kennedy, J. S., Ennis, F. A., and Monath, T. P. (2003). Clonal vaccinia virus grown in cell culture as a new smallpox vaccine. *Nat Med* 9(9), 1125-30.
- Willis, C. L., Nolan, C. C., Reith, S. N., Lister, T., Prior, M. J., Guerin, C. J., Mavroudis, G., and Ray, D. E. (2004). Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia* 45(4), 325-37.
- Wilson, S. L., and Drevets, D. A. (1998). *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. *J Infect Dis* 178(6), 1658-66.
- Wiranowska, M., Wilson, T. C., Bencze, K. S., and Prockop, L. D. (1988). A mouse model for the study of blood-brain barrier permeability. *J Neurosci Methods* 26(2), 105-9.
- Wispelwey, B., Lesse, A. J., Hansen, E. J., and Scheld, W. M. (1988). Haemophilus influenzae lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability during experimental meningitis in the rat. *J Clin Invest* 82(4), 1339-46.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C., and Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 5), 1347-57.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E. H., Risau, W., and Engelhardt, B. (2003). Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 105(6), 586-92.
- Wu, D. T., Woodman, S. E., Weiss, J. M., McManus, C. M., D'Aversa, T. G., Hesselgesser, J., Major, E. O., Nath, A., and Berman, J. W. (2000). Mechanisms of leukocyte trafficking into the CNS. *J Neurovirol* 6 Suppl 1, S82-5.

- Wyatt, L. S., Earl, P. L., Eller, L. A., and Moss, B. (2004). Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Xiao, Y., Aldaz-Carroll, L., Ortiz, A. M., Whitbeck, J. C., Alexander, E., Lou, H., Davis, H. L., Braciale, T. J., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., and Isaacs, S. N. (2007). A protein-based smallpox vaccine protects mice from vaccinia and ectromelia virus challenges when given as a prime and single boost. *Vaccine* 25(7), 1214-24.
- Yamaguchi, M., Kimura, M., and Hirayama, M. (1975). Japan ministry of health. Report of committee on smallpox vaccination. Investigation of treatment of complications caused by smallpox vaccination. *Clin Virol* 3, 269-278.
- Yang, H., Kim, S. K., Kim, M., Reche, P. A., Morehead, T. J., Damon, I. K., Welsh, R. M., and Reinherz, E. L. (2005). Antiviral chemotherapy facilitates control of poxvirus infections through inhibition of cellular signal transduction. *J Clin Invest* 115(2), 379-87.
- Yang, W. X., Terasaki, T., Shiroki, K., Ohka, S., Aoki, J., Tanabe, S., Nomura, T., Terada, E., Sugiyama, Y., and Nomoto, A. (1997). Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology* 229(2), 421-8.
- Zaucha, G. M., Jahrling, P. B., Geisbert, T. W., Swearingen, J. R., and Hensley, L. (2001). The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Lab Invest* 81(12), 1581-600.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Fernando, G. J., and Frazer, I. H. (1992). The vaccinia virus K2L gene encodes a serine protease inhibitor which inhibits cell-cell fusion. *Virology* 189(2), 678-86.

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS**

Publications

Garcel A., Fauquette W., Crance J-M., Garin D. and Favier A-L. « Smallpox post-vaccinal encephalitis: Vaccinia virus interaction with the Blood Brain Barrier ». En rédaction.

Garcel A., Perino J., Crance J-M., Drillien R., Garin D. and Favier A-L. « Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine ». Soumise à *J. Virol.*

Garcel A., Crance J-M., Drillien R., Garin D. and Favier A-L. « The genomic sequence of a clonal isolate of the Vaccinia virus Lister Strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other *Orthopoxviruses* ». *J. Gen. Virol.*, **88**, 1906-1916 (2007).

Communications orales

Garcel A. & Fauquette W., Diserbo M., Amourette C., Garin D. & Favier A-L., « *In vitro* interaction of Vaccinia virus with the blood-brain barrier ». Faseb summer conference Poxviruses (3 au 8 juin 2006, Indian Wells, USA)

Garcel A., Fauquette W. & Favier A-L., « Etude *in vitro* de l'interaction du virus de la vaccine avec la barrière hémato-encéphalique ». Réunion du club BHE (7 avril 2006, Paris, France)

Garcel A., Fauquette W. & Favier A-L., « Interaction du virus de la vaccine avec la barrière hémato-encéphalique ». Rencontre MTSSA/CRSSA (9 mars 2006, Marseille, France)

Communications affichées

Garcel A. & Favier A-L., Fauquette W., Diserbo M., Cecchelli R., Amourette C. & Garin D., « Interaction of Vaccinia virus with the blood-brain barrier ». Third european congress of virology (1 au 5 septembre 2007, Nürnberg, Allemagne)

Favier A-L., Garcel A., Perino J., Crance J-M., Drillien R. & Garin D., « La diversité de la population virale de la souche vaccinale Lister du vaccin anti-variologique de 1^{ère} génération ». IV^e Journées Francophones de Virologie (26 et 27 avril 2007, Paris, France)

Garcel A. & Fauquette W., Diserbo M., Dehouck M-P., Cecchelli R., Amourette C., Garin D. & Favier A-L., « *In vitro* interaction of Vaccinia virus with the blood-brain barrier ». Ninth International Symposium "signal transduction in the blood-brain barriers" (7 au 10 septembre 2006, Salzburg, Autriche)

Favier A-L., Garcel A., Fauquette W., Diserbo M., Crance J-M. & Garin D., « Diversité génétique du virus de la vaccine : Neuropathogénicité du vaccin anti-variologique, perturbation de la barrière hémato-encéphalique ». 2^{ème} Biennale de la Recherche (13 et 14 juin 2006, Paris, France)

Garcel A., Favier A-L., Crance J-M., Drillien R. & Garin D., «The genomic sequence of a clonal isolate of the Vaccinia virus Lister Strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other *Orthopoxviruses* ». Faseb summer conference Poxviruses (3 au 8 juin 2006, Indian Wells, USA)

Garcel A., Crance J-M., Drillien R., Garin D. & Favier A-L., « Analyse du génome de la souche vaccinale anti-variolique française (virus de la vaccine souche Lister) et comparaison avec les *Orthopoxvirus* ». VIII^e Journées Francophones de Virologie (20 et 21 avril 2006, Paris, France)

Garcel A., Crance J-M., Drillien R., Garin D. & Favier A-L., « Diversité phénotypique de la population virale de la souche vaccinale Lister ». VII^e Journées Francophones de Virologie (27 et 28 avril 2005, Paris, France)