

Université de Montréal

Étude d'une nouvelle méthode vaccinale contre le virus de  
la diarrhée virale bovine (BVDV); la vaccination par ADN

par  
SERGE HARPIN

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Virologie

Janvier, 1999

© Serge Harpin, 1999.



W  
4  
US8  
1999  
V.117

Université de Montréal

Étude d'une nouvelle méthode de mesure de la force de  
la réaction de la terre (RVD) à l'aide d'un capteur de force

1997

BRISE HARRIS

Département de médecine, des sciences et de technologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à l'École des études supérieures  
pour l'obtention du grade de  
Maîtrise en médecine (M.Sc.)  
en médecine



Janvier 1997  
100-10100

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures  
Cette thèse intitulée:

Étude d'une nouvelle méthode vaccinale contre le virus de la diarrhée virale  
bovine (BVDV); la vaccination par ADN

présenté par:

Serge Harpin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Amer Silim	Président du jury
Dr. Youssef Elazhary	Directeur de recherche
Dr. Brian G. Talbot	Codirecteur de recherche
Dr. Maximilien Arella	Membre du jury
Dr. Joseph Weber	Examineur externe
Dr. Zaher Hanna	Représentant du doyen

  
Thèse acceptée le 16 ~~1998~~ 1999

# SOMMAIRE



Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est un important agent pathogène de l'industrie du bovin causant d'énormes pertes économiques. En 1993, malgré la vaccination conventionnelle, des records de morbidité et de mortalité ont été enregistrés chez les éleveurs de veaux de grains ainsi que dans l'industrie des vaches laitières.

Le premier objectif de mon programme de doctorat a été de caractériser d'un point de vue génomique, les isolats de BVDV émergeant de la récente épidémie. Lors de cette recherche, nous avons démontré que la souche de BVDV responsable de cette épidémie se distinguait génotypiquement des souches classiques de BVDV. Contrairement aux souches classiques (classées comme souche du génotype 1), les isolats de BVDV émergeant de la récente épidémie ont donc été classés comme membres du génotype 2.

Suite à ces premiers résultats, l'objectif général de ce projet se tournait donc vers l'évaluation d'une nouvelle approche vaccinale, soit la vaccination par ADN. L'immunisation par injection directe d'ADN plasmidique chez l'animal mène à la production d'anticorps et à l'activation des lymphocytes-T cytotoxiques contre des protéines étrangères et protège contre des challenges viraux.

Ce projet de recherche avait donc comme but premier d'évaluer si cette nouvelle technologie pouvait effectivement être applicable dans l'élaboration d'un vaccin contre le BVDV. Il est connu que la majorité des vaccins classiques contre le BVDV ciblaient une protection via la production d'anticorps neutralisants. A cet égard, nous avons choisi comme gène modèle, le gène codant pour la glycoprotéine majeure de l'enveloppe E2, la protéine cible des anticorps neutralisants.

Ainsi le deuxième objectif était l'étude de faisabilité, chez un modèle murin, de l'induction d'une réponse humorale contre le BVDV suite à une immunisation via l'injection d'un plasmide codant pour la protéine E2. Nos résultats démontrèrent, qu'effectivement une injection plasmidique induisait la production d'anticorps contre la protéine E2. Cette immunisation plasmidique a

aussi conduit à la production d'anticorps neutralisants suggérant ainsi que la maturation de la protéine E2 était adéquate.

Le prochain objectif avait pour but d'évaluer si une immunisation par ADN pouvait être applicable chez l'hôte naturel du BVDV, soit le bovin. Les résultats ainsi recueillis nous a permis de conclure que cette nouvelle méthode vaccinale permet non seulement la production d'une réponse humorale via la production d'anticorps neutralisant, mais aussi l'induction d'une réponse cellulaire via l'observation d'une prolifération *ex vivo* des monocytes provenant des bovins DNA-vaccinés. Suite à l'introduction d'un virus de challenge chez ces animaux, nous avons observé que ce vaccin à ADN codant pour la protéine E2 avait aussi la capacité d'induire une réponse immune protectrice chez le bovin.

L'étape suivante avait pour objectif d'évaluer si une immunisation multigénique impliquant les protéines Erns, E1, E2 et NS3 pouvait améliorer la réponse immune protectrice chez le bovin. Malheureusement, pour des raisons encore inconnues, cette expérience n'a pas permis de répondre à notre objectif. Par contre, cette expérience nous a permis de reproduire les réponses humorales neutralisantes tant sérique que mucosale.

Le dernier objectif de ce projet avait pour but de démontrer que la réponse immune induite par la vaccination génétique est vraisemblablement liée à l'activation des cellules qui sont à la base du développement de la réponse immunitaire, soit les cellules dendritiques. Grâce à l'utilisation d'un promoteur à restriction tissulaire soit celui de la proconvertase-2 (PC2), dont l'expression est restreinte aux cellules de souches neuronales telles les cellules de Langerhans (cellules de type dendritiques), nous a permis d'observer, qu'une immunisation de souris via l'injection d'un plasmide dont l'expression du gène de la betagalactosidase (Bgal) sous le contrôle du promoteur de la PC2 permettait d'induire des niveaux de réponses humorales et cellulaires comparables à ceux observés chez des souris immunisées par un plasmide contrôle, dont la Bgal était exprimée via le puissant promoteur du cytomégalovirus (CMV).

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	I
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
REMERCIEMENTS.....	XI
CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES.....	XIII
CHAPITRE 1: Revue de littérature.....	1
1. Le virus de la diarrhée virale bovine.....	2
1.1 Historique.....	2
1.2 Taxonomie.....	2
1.3 Organisation génomique.....	3
1.3.1 Les protéines du BVD.....	5
1.3.1.1 Les protéines de structure.....	5
1.3.1.2 Les protéines non-structurales.....	6
1.4 Pathogénie et problèmes reliés au BVDV.....	6
1.4.1 La maladie de la diarrhée virale bovine.....	6
1.4.2 La forme aiguë de la maladie de la diarrhée virale bovine.....	7
1.4.3 L'immunotolérance et l'infection persistante chez le bovin.....	7
1.4.4 La maladie des muqueuses.....	8
1.4.5 L'immunosuppression causée par le BVDV.....	9
1.5 Vaccination et BVDV.....	9
1.5.1 Les vaccins atténués.....	10
1.5.2 Les vaccins inactivés.....	11
1.5.3 Les vaccins à sous-unités.....	12
2. La vaccination par ADN.....	12
2.1 Vaccination par ADN: maturation et présentation de l'antigène.....	13

2.2 Composantes du vecteur.....	16
2.3 Adjuvantité de l'ADN .....	17
2.4 Méthodes d'inoculation de l'ADN plasmidique.....	18
2.4.1 L'injection intramusculaire.....	18
2.4.2 L'injection intradermique.....	18
2.4.3 Genegun.....	19
2.5 Protection via les vaccins à ADN .....	19
2.5.1 Modèle de protection de maladies virales.....	19
2.5.2 Modèle de protection de maladies bactériennes .....	20
2.5.3 Modèle de protection de maladies parasitaires.....	20
2.6 Vaccination par ADN chez les nouveaux-nés.....	21
2.6.1 Réponse humorale .....	22
2.6.2 Réponse CD4+.....	22
2.6.3 Réponse cellulaire CD8+ .....	22
2.7 Vaccin à ADN: des inquiétudes qui persistent .....	23
2.7.1 Intégration .....	23
2.7.2 Autoimmunité.....	24
2.7.3 Tolérance .....	24

## CHAPITRE 2:       Expérience #1

The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of Bovine Viral Diarrhea Virus .....	25
--	----

## CHAPITRE 3:       Expérience #2

Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein gp53 (E2).....	34
---	----

## CHAPITRE 4:       Expérience #3

Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2.....	47
---	----

CHAPITRE 5:       Expérience #4	
Immunisation multigénique chez le bovin par l'injection de plasmides codants pour les protéines Erns, E1, E2 et NS3 du virus de la diarrhée virale bovine .....	75
CHAPITRE 6:       Expérience #5	
Neuroendocrine-specific promoter in a DNA vaccine targets antigen expression in skin cells and elicits both humoral and cellular immune responses in mice.....	94
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	112
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	121
BIBLIOGRAPHIE .....	124

**LISTE DES TABLEAUX****Expérience #1**

Table 1. Associated clinical signs and classification of the Quebec isolates according to the restriction enzyme digestion and sequence results

Table 2. Degenerate primers used to amplify parts of the 5'-untranslated region from BVDV

**Expérience #2**

Table 1. BVDV-specific antibody generated by injection of pcDNA/gp53.

Table 2. Induction of BVDV-neutralizing antibodies by pcDNA/gp53.

Table 3. Neutralizing antibody titer 6 months after the last injection.

**Expérience #3**

Table 1. Development of serum neutralizing antibodies to BVDV/Singer strain in DNA-vaccinated calves

Table 2. Nasal secretions neutralizing antibodies to BVDV/Singer and BVDV/125 after challenge

Table 3. Development of serum neutralizing antibodies to BVDV/125 strain from DNA-vaccinated calves after challenge

Table 4. Clinical signs assessment

**Expérience #4**

Table 1. Charte d'évaluation des signes cliniques

**Expérience #5**

Table 1.  $\beta$ gal-specific cytokine production by Balb/c splenic cells following DNA immunization

## LISTE DES FIGURES

### Introduction: section 1.3 Organisation génomique

Figure 1. Carte d'organisation génique du BVDV

### Expérience #1

Figure 1. Comparison of the 5'-UTR nucleotide sequences of the new Quebec isolates versus the following pestivirus: NADL, Olsoss, New-York, SD-1, Alfort, Brescia, BDVc and BDVnc.

Figure 2. Comparison of the 5'-UTR sequence corresponding to the conservative XhoI site and the non-conservative PstI site.

### Expérience #2

Figure 1. Expression of BVDV/NADL major glycoprotein gp53/E2 in transiently transfected cells.

Figure 2. Comparison by PLA of the level of antibody generated from intramuscular (im) and intradermal (id) routes of injection.

### Expérience #3

Figure 1. In vitro proliferative response of bovine MN cells from DNA-vaccinated calves to live BVDV.

Figure 2. Clinical score from vaccinated calves after challenge.



**Expérience #4**

Figure 1. Expression du gène NS3 dans les cellules COS-7

Figure 2. Visualisation, par SDS-PAGE, des protéines de fusion Erns/GST et E1/GST exprimées chez *Escherichia coli*.

Figure 3. Cinétique de la réponse en anticorps neutralisant présents dans le sérum.

Figure 4. Cinétique de la réponse en anticorps présents dans les sécrétions nasales

Figure 5. Réponse proliférative des cellules mononucléaires bovines suite à une stimulation par la ConA.

Figure 6. Cinétique de la température corporelle des bovins après challenge viral.

**Expérience #5**

Figure 1. Kinetic of antibody response of mice immunized with  $\beta$ gal-encoding plasmids.

Figure 2. *In vitro* proliferative response.

## Liste des abréviations

ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
APC:	antigen-presenting cells
ARN:	acide ribonucléique
BDV:	border disease virus
BVDV:	bovine viral diarrhea virus
CD:	cluster of differentiation
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV:	cytomégalovirus
Con A:	concanavaline A
CSFV:	classical swine fever virus
CTL:	cytotoxic T-lymphocyte
HA:	hemagglutinin
IFN:	interféron
IL:	interleukine
MD:	mucosal disease
mg:	milligramme
ml:	millilitre
NK:	natural killer cell
NP:	nucleoprotein
ORF:	open reading frame
pb:	pair de base
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
RNase:	ribonucléase
RSV:	rous sarcoma virus
TCID:	tissue culture infectious dose
Th:	T-helper

## REMERCIEMENTS

La chance m'est donné de remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, le docteur Youssef Elazhary, et mon codirecteur, le docteur Brian G. Talbot, pour leurs conseils et leurs encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de ce programme de doctorat.

Je tiens à sincèrement remercier les docteurs Majambu Mbikay et David J. Hurley pour leurs conseils judicieux et ainsi que pour leurs entretiens amicaux qui ont mené à d'inoubliables discussions scientifiques.

Un gros merci aux docteurs Robert H. Yolken, Estela Cornaglia, Marian Sajna, Raymond Ethier et Boby Makabi-Panzu pour leur implication au projet.

Mes remerciements vont également à tous les membres de la virologie, soient Mesdames Brigitte Bousquet, Nadine Bouchard, Diane Frenette, Lucie Beauregard et Messieurs Claude Paquet, Mehdy S. Elahi et Younes Chorfy.

Je remercie mes parents, mes frères, ma famille, ma belle-famille et mes amis pour leur encouragement lors de ces quatre dernières années.

Je n'ai que déloges pour ma chère épouse Manon. Car, par sa patience et sa profonde compréhension, elle a su générer en moi, l'énergie et le courage nécessaires afin d'accomplir ce projet.

## CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Jusqu'à ce jour, les vaccins conventionnels, c'est-à-dire, vaccins atténués et vaccins inactivés sont les seuls types de vaccins utilisés pour contrôler les infections par le virus de BVD. Malgré leur utilisation à grande échelle, les problèmes causés par cette maladie existent toujours et par conséquent, les élevages bovins sont sous une constante menace.

Afin de combattre le virus du BVD, nous avons évalué, lors de ce programme de doctorat, une nouvelle et prometteuse méthode de vaccination, soit la vaccination par ADN.

Notre contribution scientifique a été basée sur l'évaluation de l'immunogénéicité de la protéine codée par le gène E2 du virus du BVD chez la souris. Dans ce travail préliminaire, nous avons démontré que suite à une injection plasmidique du gène E2, une production d'anticorps neutralisants a été induite chez les souris immunisés. Par la suite, une étude cruciale chez le bovin, soit l'hôte naturel du BVDV, a contribué de démontrer que le même gène a permis d'induire chez les veaux, une réponse humorale neutralisante et une réponse cellulaire. Ces réponses immunes ont généré une certaine protection chez les animaux suite à une infection expérimentale. Le fait d'avoir démontré que la protéine E2 comporte des épitopes induisant l'immunité cellulaire est notamment très important dans la compréhension de l'immunité induite par cette protéine chez le bovin.

Malgré que ce vaccin à ADN n'a pas été optimisé dans notre étude, une porte importante a été ouverte pour explorer plusieurs avenues de recherche pour le futur. En bref, nos travaux effectués dans le cadre de cette étude ont, d'une façon générale, contribué à l'avancement des connaissances en ce qui concerne la faisabilité de la vaccination par ADN chez le bovin et pourront certainement conduire au développement d'une nouvelle génération de vaccins contre le virus du BVD.

# **CHAPITRE 1**

## **Revue de littérature**

## 1. Le virus de la diarrhée virale bovine

### 1.1 Historique

C'est dans l'état de New-York que furent décrits pour la première fois, les symptômes reliés au virus de la diarrhée virale bovine (Olafson *et al.*, 1946). Cette maladie se caractérisait par une diarrhée, une fièvre transitoire, une leucopénie, des lésions buccales et des avortements. Dans la même année, Childs (1946) décrivit une maladie bovine mystérieuse aux symptômes similaires mais plus sévères tels une forte diarrhée sanguinolante et des lésions érosives au niveau des muqueuses du système digestif, des voies respiratoires et du système uro-génital. Une autre étude faite par Ramsey et Chivers (1953) confirmant les observations de Childs, ont permit d'avancer le terme «maladie des muqueuses» (MD) afin de décrire ces symptômes.

### 1.2 Taxonomie

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est membre du genre des pestivirus tout comme pour le virus de la peste porcine classique (CSFV) et du virus de la maladie des frontières (BDV) chez le mouton. Auparavant membre de la famille des *Togaviridae* (Fenner, 1976), la classification des pestivirus a été modifiée dûe à l'absence d'ARN subgénomique et d'une queue polyadénylée à leur extrémité 3' (Purchio *et al.*, 1983; Renard *et al.*, 1985) ainsi que par leur organisation génomique (Collet *et al.*, 1988a). Grâce à ces études qui, non seulement illustrent des différences entre les pestivirus et les togavirus, mais aussi démontrent une grande similarité entre les pestivirus et les flavivirus. Le comité international de taxonomie des virus a donc reclassé le genre pestivirus dans la nouvelle famille des *Flaviviridae* (Westaway *et al.*, 1985).

Récemment, le BVDV a été divisé en deux génotypes soit le génotype 1 incluant les souches classiques de BVDV et le génotype 2 regroupant les souches émergeant de la dernière épidémie (Ridpath *et al.*, 1994; Pellerin *et al.*, 1994; Harpin *et al.*, 1995). De plus, chaque génotype est composé de souches ayant le biotype cytopathogène (causant une lyse de cellules en culture cellulaire) ou le biotype non-cytopathogène ne produisant pas de lyse cellulaire *in vitro*.

### 1.3 Organisation génomique

Les pestivirus sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité positive (Hafez et Liess, 1972; Diderholm et Dinter, 1966). Un génome typique de BVDV est composé d'une région non codante à son extrémité 5', d'une région codante d'un seul cadre de lecture ouverte (ORF) ayant la capacité de coder pour une polyprotéine de 440 kDa (Deng et Brock, 1992), et d'une autre région non codante, celle-ci située à l'extrémité 3' du génome.

Il est connu pour certains virus que les régions 5' et 3' non codantes sont des régions comportant des éléments importants dans la réplication et la virulence du virus (Strauss et Strauss, 1983). Une étude a démontré que la région 5' non codante du BVDV contenait un site interne d'entrée au ribosome, un élément jouant un rôle important dans l'initiation de la traduction (Poole *et al.*, 1995). Suite à une analyse de structures primaires et secondaires de l'ARN viral, il a été suggéré que d'importants signaux qui seraient impliqués lors de la réplication de l'ARN viral, pourraient être possiblement situés dans la région 3' non codantes du BVDV (Deng et Brock, 1993).

L'ARN viral du BVDV, tout comme tous les autres virus à ARN de polarité positive code pour des protéines structurales et non structurales dont les rôles sont respectivement de produire des virions et de répliquer le matériel génétique. Ainsi d'autres études sur l'organisation génomique du BVDV démontrent que le premier tiers de l'ORF code pour les protéines de structure et que les protéines non-structurales sont codées par le deux tiers restant (Collett *et al.*, 1988b). Au moins dix protéines virales sont produites dont quatre sont de structures et six sont non-structurales (Fig. 1). Pour les souches dites cytopathogènes, on y retrouve au moins une protéine virale additionnelle (Collett *et al.*, 1989). Jusqu'à présent cinq souches de BVDV ont été entièrement séquencées, trois souches de type 1 (NADL: Collett *et al.*, 1988b; Osloss: Renard *et al.*, 1985; SD-1: Deng et Brock, 1992) et une souche de type 2 (890: Ridpath et Bolin, 1995).

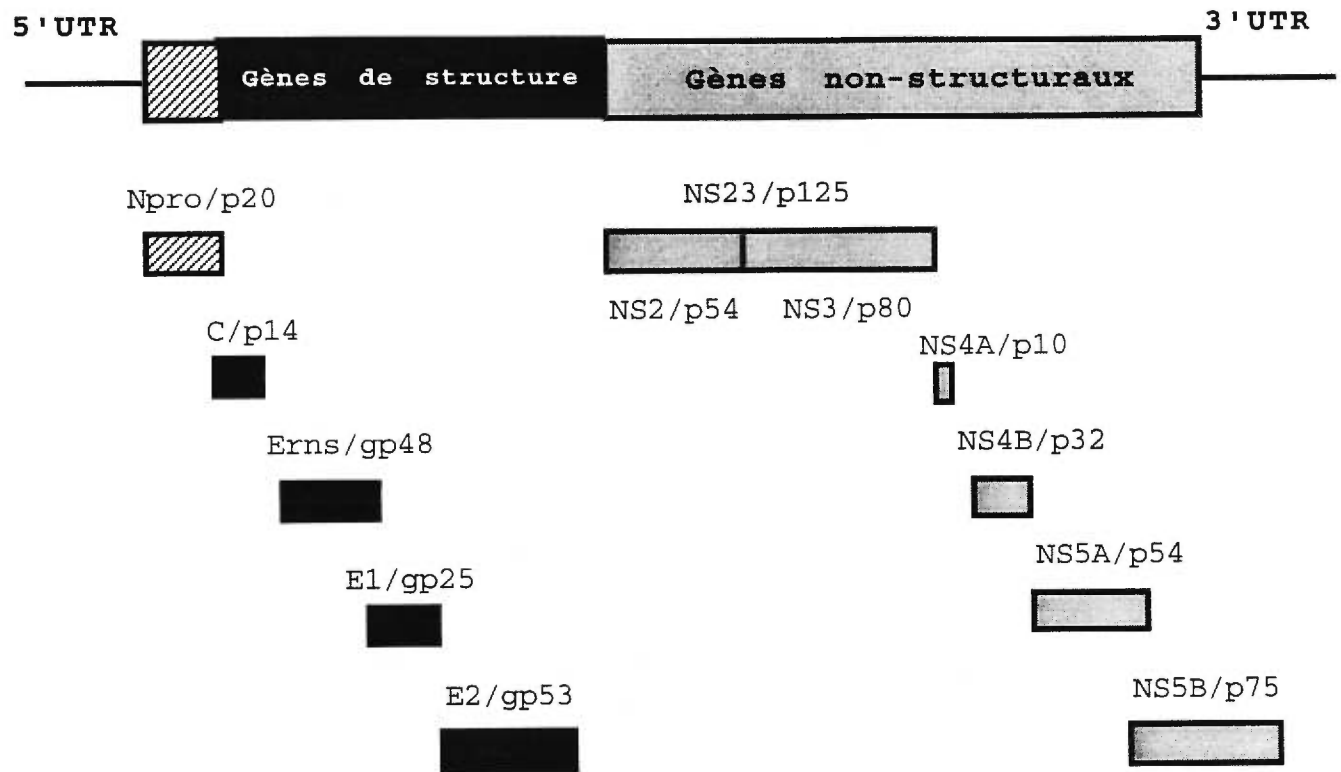


Figure 1. Carte de l'organisation génique du BVDV.



### 1.3.1 Les protéines du BVDV

L'unique ORF code pour une polyprotéine qui suite à une série de clivages protéolytiques de sources cellulaire ou virale donne naissance aux différentes protéines virales. La première protéine produite est une protéine de 20 kDa nommée Npro. Le rôle de la protéine Npro reste nébuleux. Toutefois, il a été démontré qu'elle possédait une action d'autoprotéase, clivant ainsi entre sa partie C-terminale et la région précurseure des protéines de structure (Wiskerchen *et al.*, 1991).

#### 1.3.1.1 Les protéines de structure

Le deuxième produit de l'ORF code pour une protéine de 140 kDa qui serait le précurseur des quatre protéines de structure, soit les protéines C, Erns, E1 et E2. La protéine C correspondrait à la protéine constituant la capsid. Suivent ensuite, les glycoprotéines de l'enveloppe dont la protéine Erns d'environ 48 kDa dont des études lui attribuerait une activité Rnase (Schneider *et al.*, 1993). Récemment, une étude a démontré que la protéine Erns induisait l'apoptose suggérant ainsi un rôle important dans la pathogénèse des pestivirus (Bruschke *et al.*, 1997). En ce qui concerne la deuxième glycoprotéine soit la protéine E1, peu d'informations sont rapportées dans la littérature à son sujet quant à son rôle dans la pathogénèse du virus. Finalement, la glycoprotéine E2 est connue comme étant la protéine majeure de l'enveloppe. Cette protéine E2 joue un rôle prépondérant dans la réponse immune du bovin puisqu'elle est très antigénique et qu'elle induit la production d'anticorps neutralisants (Donis *et al.*, 1988). Récemment, une nouvelle protéine virale de BVDV a été démontrée (Elbers *et al.*, 1996). Cette protéine de 7 kDa environ semble être étroitement associée à la protéine majeure de l'enveloppe E2. L'assemblage de virions contenant une enveloppe requiert des interactions spécifiques entre les glycoprotéines de l'enveloppe et celles de la capsid. En général, les glycoprotéines sont ancrées à l'enveloppe par une région riche en acides aminés hydrophobes. Tandis que la liaison des glycoprotéines de l'enveloppe avec les protéines de la capsid se font par des domaines cytoplasmiques donc hydrophiles. Aucun domaine cytoplasmique

n'a été trouvé chez les glycoprotéines de l'enveloppe du BVDV; par contre, un domaine cytoplasmique a été identifié chez la protéine p7 (Elbers *et al.*, 1996). Bref, la protéine aurait comme rôle de permettre la liaison des protéines de la capsid à celles de l'enveloppe.

#### **1.3.1.2 Les protéines non-structurales**

Comme mentionné précédemment, les deux tiers restants du génome codent pour les protéines non-structurales. La protéine NS23 a la particularité intéressante d'être clivée en protéines NS2 et NS3, et ce seulement chez les souches de BVDV arborant le biotype cytopathogène. Peu d'informations sont rapportées concernant le rôle de la protéine NS2. Tandis que pour la protéine NS3, un rôle multifonctionnel lui est attribué. En effet, des études ont démontré des activités de sérine-protéase, nucléoside triphosphatase et d'hélicase d'ARN (Wiskerchen et Collett, 1991; Tamura *et al.*, 1993; Warrener et Collett, 1995). Finalement, la protéine précurseure de 175 kDa suite à l'action de protéases, produit le reste des protéines non-structurales dont entre autres, la protéine NS5B dont le rôle serait possiblement celui d'ARN polymérase ARN-dépendant.

### **1.4 Pathogénie et problèmes reliés au BVDV**

Une infection par le BVDV peut causer une très grande variété de maladies allant d'infections subcliniques jusqu'à une forme mortelle, soit la maladie des muqueuses (MD). Après infection, les voies respiratoires supérieures et les tissus lymphoïdes semblent être les sites majeurs de la réplication virale (Bolin, 1990). La majorité des infections causées par le BVDV sont subcliniques. Il a même été estimé que 70 à 90% des infections dues au BVDV surviennent sans aucune manifestation clinique (Anderson *et al.*, 1994).

#### **1.4.1 La maladie de la diarrhée virale bovine**

Lorsque l'infection devient clinique généralement chez des animaux dont l'âge varie de six mois à deux ans (Blood *et al.*, 1983), on réfère donc à la maladie de la diarrhée virale bovine. La virémie apparaît après quatre à cinq

jours et peut même persister jusqu'à quinze jours (Brownlie *et al.*, 1987). Les signes cliniques souvent associés à la maladie de la diarrhée virale bovine sont une fièvre transitoire, une leucopénie, une respiration rapide, un écoulement oculo-nasal et bien sûr, une diarrhée (Duffell et Harkness, 1985). Les troupeaux infectés peuvent atteindre une très forte morbidité et développer une faible mortalité. Chez les vaches laitières, on remarque parfois une diminution de la production laitière. Chez les troupeaux infectés, le virus semble être sécrété à de faibles concentrations (Duffell et Harkness, 1985). Un diagnostic positif de la maladie peut être fait par isolement viral à partir de sécrétions et d'excrétions ou par la séroconversion de l'animal.

#### **1.4.2 La forme aigüe de la maladie de la diarrhée virale bovine**

Vers 1993, une forme très sévère de la maladie de la diarrhée virale bovine est apparue (Carman *et al.*, 1994). Cette maladie a été associée à l'apparition des souches de BVDV de génotype 2. Les signes cliniques de cette nouvelle épidémie incluaient entre autres une pyrexie, une pneumonie et une forte diarrhée.

#### **1.4.3 L'immunotolérance et l'infection persistante chez le bovin**

La source probable de BVDV provient possiblement d'animaux immunotolérants et infectés de manière persistante par une souche de BVDV. Ceci survient lors d'une infection par le virus durant les stades précoces du développement foetal, et ce avant même que le foetus ait atteint sa maturation immunitaire. Le foetus devient immunocompétent approximativement après 150 à 200 jours de gestation (Braun *et al.*, 1973; Bielefeldt-Ohmann *et al.*, 1982), toutefois personne n'a pu déterminer le stade exact du développement foetal durant lequel l'infection doit survenir pour causer l'immunotolérance. L'immunotolérance et la persistance virale semblent être associées à une infection par une souche de BVDV dont le biotype est non-cytopathogène (McClurkin *et al.* 1985; Bolin, 1990). Ces animaux relâchent constamment du virus même s'ils ne démontrent généralement aucun signe clinique (Coria et McClurkin, 1978). Même si ces animaux sont immunotolérants pour le BVDV,

ils sont toutefois immunocompétents contre d'autres microorganismes (Houe et Heron, 1993). Mais il est important de préciser que l'immunotolérance semble être spécifique à la souche infectante et que ces animaux infectés de manière persistante ont la capacité de générer une réponse immune contre une souche de BVDV hétérologue (Steck *et al.*, 1980; Bolin *et al.*, 1985).

Le taux de propagation de l'infection semble être relativement faible par des animaux infectés mais immunocompétents. Par contre, le taux de propagation virale à des animaux naturellement prédisposés à une infection est rapide si ces derniers entrent en contact avec des animaux infectés de manière persistante (Duffell et Harkness, 1985). Les principales voies d'infection sont par inhalation ou ingestion de salive infectée, d'écoulement oculo-nasale, d'urine et d'excréments (Duffell et Harkness, 1985). L'infection virale peut aussi passer par le liquide séminale, les sécrétions utérines et par un placenta infecté (Stober, 1984).

La prévalence d'animaux infectés de manière persistante dans la population de bovin en général n'est pas connue. Une étude faite aux Etats-Unis démontre que 9% des troupeaux sur un total de 66 contenaient des animaux infectés de manière persistante. Et que sur 3157 animaux testés, 54 d'entre eux, soit 1.7%, présentaient une infection persistante (Bolin *et al.*, 1985). A la naissance, ces animaux sont souvent plus chétifs et on note une croissance plus lente que la population saine. Tous ne sont pas autant affectés, et par conséquent, ils peuvent donc atteindre l'âge mature pour la reproduction. Mais en général, 50% d'entre eux meurent durant la première année (Duffell et Harkness, 1985). Ces animaux infectés de manière persistante représentent donc un énorme danger pour la transmission de la maladie au reste du troupeau.

#### **1.4.4 La maladie des muqueuses**

La maladie des muqueuses est une forme d'infection sporadique par le BVDV chez le bovin généralement âgé de 6 mois à 2 ans. Cette maladie est caractérisée par la présence de signes cliniques très sévères, d'une faible morbidité mais d'un taux de mortalité élevé. Cette maladie serait associée à des

bovins immunotolérants et infectés de manière persistante. La maladie des muqueuses survient lorsqu'un animal immunotolérant et infecté de manière persistante avec une souche de BVDV non-cytopathogène subit une surinfection par une souche cytopathogène. Le degré de sévérité de la maladie dépend du niveau d'homologie entre les deux souches (Brownlie, 1991). La forme fatale de la maladie survient lorsque les deux souches partagent une très forte homologie. Dans le cas contraire, l'animal subira une simple séroconversion sans parfois même démontrer aucun signe clinique dû à une surinfection par une souche hétérologue.

#### **1.4.5 L'immunosuppression causée par le BVDV**

L'immunosuppression de l'hôte suite à une infection par le BVDV est un sujet bien documenté (Potgieter, 1988). Malgré le fait que généralement peu d'animaux présentent de signes cliniques suite à une infection par le BVDV, une immunosuppression transitoire est souvent induite (Potgieter *et al.*, 1984a; Potgieter *et al.*, 1984b). La conséquence importante de l'immunosuppression induite par le BVDV est que l'animal devient beaucoup plus susceptible face à la présence de pathogènes opportunistes et, par le fait même, augmente parfois leur degré de pathogénicité. De plus, l'habileté avec laquelle le BVDV induit l'immunosuppression chez son hôte, contribue aussi à générer la panoplie de signes cliniques associés à une infection par ce virus. Les cellules lymphocytaires et les macrophages sont des cibles très importantes pour la réplication du BVDV (Truitt et Shechmeister, 1973). Il est par conséquent plausible d'envisager que le mécanisme par lequel le BVDV induit une immunosuppression impliquerait entre autre, la destruction de ces types cellulaires qui sont d'importantes composantes de la réponse immune.

#### **1.6 Vaccination et BVDV**

Aujourd'hui, des vaccins atténués ou inactivés sont disponibles pour contrer une infection par le BVDV. Aux Etats-Unis, plus de 150 vaccins contre le BVDV ont été licenciés (Bolin, 1995). La majorité de ces vaccins sont

multifonctionnels car ils contiennent le virus du BVDV mais aussi d'autres agents viraux et bactériens.

### **1.6.1 Les vaccins atténués**

Les vaccins atténués ont l'avantage d'induire à la fois une réponse humorale et cellulaire sans le besoin de rappel vaccinal. Ils offrent aussi la chance d'être relativement économiques à produire et peu coûteux à l'achat car seulement un faible nombre de particules virales est nécessaire pour l'immunisation (Kahrs, 1966). Par contre, des maladies post-vaccinales peuvent survenir si la souche vaccinale récupère sa virulence initiale. Les lignées cellulaires et le sérum de bovin utilisés lors de la production des souches vaccinales sont fréquemment contaminés par des souches de BVDV non-cytopathogènes (Bolin *et al.*, 1991; Nuttal *et al.*, 1977; Rossi *et al.*, 1980). Plusieurs documents décrivent l'émergence d'épidémies suite à l'utilisation de vaccins contaminés par le BVDV (Kreeft *et al.*, 1990; Levings et Wessman 1990; Wensvoort *et al.*, 1988). Les vaccins atténués ont aussi le sérieux désavantage d'infecter le fœtus en traversant la barrière placentaire et ainsi induire toutes les conséquences cliniques d'une infection prénatale (Duffell et Harkness, 1985). Grooms *et al.* ont démontré la présence de virus du BVDV dans les ovaires de vaches matures suite à une immunisation avec un vaccin atténué (Grooms *et al.*, 1998). La signification de ces résultats amène la possibilité que le virus du BVDV puisse se répliquer dans les ovaires générant ainsi un problème de fertilité. Des études ont aussi démontré qu'une augmentation du taux de mortalité à cause de maladies respiratoires chez des veaux d'élevage était attribuable à une immunisation avec un vaccin atténué (Martin *et al.*, 1980; Martin *et al.*, 1981; Martin *et al.*, 1982).

Une étude démontre que les vaccins atténués de BVDV induisent une immunosuppression (Roth et Kaeberle, 1983). Cette activité immunosuppressive causée par le vaccin amplifie la pathogénicité de certains agents infectieux causant ainsi des maladies post-vaccinales. Il y a aussi la possibilité que la souche vaccinale atténuée subisse une recombinaison génétique. Des études rapportent le fait que le BVDV acquiert du matériel



généétique de source cellulaire et virale par recombinaison (Meyers *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1992; Qi *et al.*, 1992). La recombinaison génétique de l'ARN du BVDV avec celui de l'animal vacciné ou de celui d'une autre virus peut ainsi créer un souche de BVDV ayant la capacité d'induire, entre autres, la maladie des muqueuses. En fait, lorsque que ce type d'évènement survient à un site spécifique de l'ARN viral du BVDV, une protéine virale, soit la NS3, caractéristique d'une souche cytopathogène de BVDV est produite. Le biotype de la souche en question est donc passé de non-cytopathogène à cytopathogène. Donc, l'accumulation de cette protéine NS3 dans la cellule hôte pourrait alors induire une cytopathologie qui en retour mènerait à la maladie (Wiskerchen et Collett, 1991).

Il est intéressant de mentionner qu'une étude sur le développement et sur l'efficacité d'une souche vaccinale de BVDV thermosensible a été faite (Lobmann *et al.*, 1984). Ce vaccin induit une réponse humorale et ne semble pas causer des signes cliniques telle qu'une leucopénie. Grâce au fait que la croissance de cette souche vaccinale est sensible à la température, aucune infection foetale n'a été rapportée.

### **1.6.2 Les vaccins inactivés**

Les vaccins inactivés ont l'avantage d'être relativement sécuritaires surtout pour l'immunisation de vaches gestantes car ils n'occasionnent pas de danger d'infection foetale. Grâce aux méthodes utilisées pour inactiver la souche vaccinale, les vaccins inactivés ne causent pas de maladies post-vaccinales car tous les contaminants pathogènes seront eux aussi inactivés. De plus, les vaccins inactivés ne semblent pas causer d'immunosuppression chez les animaux vaccinés (Atluru *et al.*, 1990; Larsson et Fossum, 1992).

Le principal désavantage des vaccins inactivés est le besoin d'une deuxième immunisation pour atteindre une immunité protective. La durée de l'immunisation d'un vaccin inactivé est plus courte que celle induite par les vaccins atténués. Le coût de production d'un vaccin inactivé est généralement plus élevé que celui d'un virus atténué, par conséquent, le vaccin inactivé est plus cher à l'achat (Bolin, 1995). Les anticorps d'origine maternelle peuvent

interférer à l'induction d'une réponse immune suite à l'injection d'un vaccin inactivé (Schultz *et al.*, 1993). Des réactions secondaires suite à une injection d'un vaccin inactivé telles une réponse inflammatoire au site d'injection ou une baisse de production laitière peuvent survenir (Bolin, 1995).

### 1.6.3 Les vaccins à sous-unités

Les vaccins à sous-unités impliquent l'injection de protéines recombinantes virales purifiées et exprimées généralement à partir de lignées cellulaires. Ces types de vaccins sont habituellement sécuritaires et efficaces pour induire une réponse humorale. Leur principale limitation est leur incapacité d'induire la réponse à médiation cellulaire. À ce jour, aucun vaccin à sous-unités contre le BVDV n'a été licencié. Par contre, certains groupes de recherches ont évalué leur efficacité chez le bovin. La glycoprotéine E2 exprimée par un système d'expression de baculovirus et purifiée à partir d'une lignée cellulaire d'insecte a été utilisée pour vacciner des veaux. Ce vaccin a permis de protéger partiellement contre seulement une infection de BVDV homologue (Bolin et Ridpath, 1996). Une autre étude de vaccination impliquant la glycoprotéine E2, mais chez le mouton, a induit une protection foetale suite à une infection homologue de BVDV (Bruschke *et al.*, 1997).

## 2. La vaccination par ADN

La vaccination par ADN représente un nouveau moyen pour l'expression d'antigène *in vivo* afin de générer à la fois une immunité humorale et cellulaire. Les vaccins à ADN impliquent le gène codant pour la protéine d'un pathogène au lieu de la protéine même, et ce, sans la participation de vecteurs viraux. Ce type de vaccin est constitué d'un plasmide bactérien contenant un promoteur eucaryote, le gène d'intérêt et d'une séquence de polyadénylation. Le plasmide est généralement purifié à partir d'une culture bactérienne puis dissout dans une solution saline pour être finalement injecté à l'animal. Suite à l'injection d'ADN plasmidique, les cellules de l'hôte acquièrent l'ADN et expriment par la suite la protéine, donc l'antigène. Cet antigène mène à l'induction d'une réponse immunitaire chez l'animal hôte.



## 2.1 Vaccination par ADN: maturation et présentation de l'antigène

Un des aspects très intéressants de la vaccination par ADN est le type de cellules présentatrices d'antigènes (APC) responsables pour l'induction de la réponse à médiation cellulaire cytotoxique. En général, les antigènes doivent être maturés par des cellules APC afin de les présenter aux cellules-T. De la façon par laquelle les antigènes sont processés déterminera la nature de la réponse à médiation cellulaire induite pour cet antigène.

La majorité des cellules-T CD4<sup>+</sup> reconnaissent des peptides dérivant de protéines exogènes ou extracellulaires qui ont été endocytées par des APC. Ces protéines sont par la suite dégradées en de petits fragments peptidiques pour être finalement associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe 2 (Kalish, 1995). L'expression des molécules de CMH classe 2 est généralement associée aux cellules originaires de la moelle osseuse. Il est plus que probable que ces cellules soient responsables pour la présentation des antigènes.

Les cellules-T CD8<sup>+</sup>, quant à elles, reconnaissent généralement des peptides dérivant de protéines endogènes ou intracellulaires, associées aux molécules du CMH classe 1. Bref, les protéines sont dégradées en fragments peptidiques par des protéosomes et transportés à la lumière du réticulum endoplasmique par des transporteurs membranaires nommés TAP-1 and TAP-2 (Kalish, 1995). Ces peptides s'associent par la suite aux molécules du CMH classe 1 nouvellement synthétisées. Ces complexes peptides/CMH voyagent du réticulum endoplasmique au golgi pour finalement atteindre la surface cellulaire où ils seront présentés aux cellules-T CD8<sup>+</sup> (Cox *et al.*, 1990). Contrairement au CMH classe 2, les molécules du CMH classe 1 sont exprimées par la plupart des cellules nucléées.

L'injection d'ADN plasmidique par voie intramusculaire ou par voie intradermique induit une réponse immune forte et longue contre l'antigène codant. Malgré le fait que la voie intradermique semble être la plus efficace, il y a quand même des évidences que l'une ou l'autre des voies mène à la production d'anticorps et à l'activation du CMH classe 1 et 2 et des cellules-T cytotoxiques (CTL) (Fynan *et al.*, 1993; Manickan *et al.*, 1995; Raz *et al.*, 1996).

Mais initialement, les vaccins à ADN étaient administrés par injections intramusculaires. Le fait que ces vaccins à ADN injectés par voie intramusculaire agissent comme d'efficaces inducteurs de la réponse cellulaire cytotoxique était donc très surprenant. Par conséquent, il était assumé que l'antigène codé par l'ADN plasmidique n'était pas seulement exprimé par les cellules musculaires afin de générer une réponse cellulaire cytotoxique (Pardoll et Beckerleg, 1995). Car il a été rapporté que les myocytes ne possèdent pas les molécules co-stimulatrices nécessaires au mécanisme de reconnaissance par les cellules CTL (Pardoll et Beckerleg, 1995). Par contre, il a été démontré que les myocytes acquièrent l'ADN plasmidique et expriment l'antigène codé par le plasmide suite à une injection par voie intramusculaire (Wolff *et al* 1990). L'expression du gène chez les myocytes peut durer des mois, allant même jusqu'à plusieurs années (Yankauckas *et al.*, 1993). Avec l'aide du PCR (polymerase chain reaction), Nichols *et al.* (1995) ont démontré que suivant une injection intramusculaire, peu ou pas de plasmide n'était retrouvé dans les cellules autres que musculaires. Aujourd'hui, Il est donc généralement accepté que les myocytes soient la source majeure d'antigène suite à une injection intramusculaire. Toutefois, afin d'activer des cellules-T CD8+, ceci requiert à la fois la reconnaissance d'un complexe CMH classe 1/peptide et d'un signal co-stimulateur, habituellement fourni par l'interaction entre les molécules CD28 d'une cellule-T et CD86 d'une cellule APC (Schwartz, 1992; Schwartz, 1996). Plusieurs études ont démontré que la présentation d'antigène par des cellules non-APC, qui ne possédaient pas les molécules appropriées pour la co-stimulation, menait au phénomène de tolérance (Lamb *et al.*, 1983; Jenkins et Schwartz, 1987; Mueller *et al.*, 1989).

Si les myocytes sont la source majeure d'antigène, comment se fait-il que survient l'activation des cellules-T au lieu de la tolérance ? Comme décrit précédemment, afin de stimuler des cellules-T CD8+, une synthèse endogène protéique est habituellement considérée comme nécessaire. Toutefois, Bevan (1995) illustre des moyens par lesquels des protéines extra-cellulaires peuvent emprunter la voie menant à la présentation d'antigène aux cellules-T CD8+. Par exemple, il existe une voie par laquelle des protéines extra-cellulaires sont

détournées des phagolysosomes vers le cytosol et ainsi prendre le chemin vers le réticulum endoplasmique (Kovacsics-Bankowsky et Rock, 1995). D'autres ont suggéré que des peptides sont évacués hors des cellules pour finalement interagir avec des molécules de CMH de classe 1 libres à la surface cellulaire (Pfeifer *et al.*, 1993). Une étude démontre que des fibroblastes transfectés ont induit une réponse de type CMH classe 1 lorsqu'elles ont été physiquement relocalisées dans les tissus lymphoïdes secondaires (Kundig *et al.*, 1995). Ceci suggère que la présentation de l'antigène et le signal de co-stimulation n'ont pas besoin d'être fournis par la même cellule, mais le tout doit survenir dans le même environnement. Par conséquent, il est envisageable de croire que les cellules CTL reconnaissent la présentation du complexe CMH classe 1/antigène via un myocyte et reçoivent le signal de co-stimulation par une cellule de type hématopoïétique recrutée lors d'une réaction locale d'inflammation au site d'injection.

Une série d'expériences ont été faites pour évaluer le rôle des myocytes transfectés au niveau de la présentation de l'antigène lors d'une injection intramusculaire d'ADN plasmidique (Doe *et al.*, 1996; Corr *et al.*, 1996). Ces résultats indiquent que les cellules musculaires au site d'injection ne présentent pas elles-mêmes l'antigène codé par l'ADN plasmidique aux cellules du système immunitaire. La présentation de l'antigène survient plutôt par les cellules originaires de la moëlle osseuse. Ces cellules pourraient être transfectées au site d'injection mais à cause de la rareté de ce type cellulaire dans le tissu musculaire, ceci favorise l'hypothèse suggérant un transfert de la protéine codée du myocyte vers une cellule APC. Cette hypothèse a été supportée par une étude dont des cellules musculaires H-2k transfectées ont été intrapéritonéalement injectées à des souris hybrides (H-2kxd). Ces dernières ont induit une réponse CTL H-2d spécifique (Ulmer *et al.*, 1996). Puisque les myocytes de l'hôte n'exprimaient pas l'antigène, seules les cellules injectées pouvaient être la source d'antigène. Donc, l'antigène a été transféré aux cellules APC de l'hôte pour spécifiquement présenter l'antigène à des cellules d'haplotype H-2d. Toutefois, le mécanisme par lequel la protéine est transférée des cellules musculaires aux cellules APC reste énigmatique.

La peau contient une variété de cellules APC telles les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques et macrophages qui peuvent être transfectées suite à une injection d'ADN plasmidique (Nickloff, 1993). En effet, Raz *et al.* (1994) ont démontré que des cellules de type macrophages, des kératinocytes et des fibroblastes ont permis l'expression du gène d'intérêt suite à une injection intradermique. De plus, en utilisant la technologie du gengun, Condon *et al.* (1996) ont réussi à transfecter des cellules dendritiques qui plus tard, ces même cellules transfectées ont été retrouvées dans les nodules lymphatiques. Ceci amène la perspective intéressante que suite à la transfection de cellules dendritiques, une réponse immunitaire à la fois de type CMH classe 1 et de CMH classe 2 peut être induite.

## 2.2 Les composantes du vecteur

La majorité des plasmides utilisés dans la vaccination par ADN possèdent les caractéristiques de ceux qui ont été développés pour l'expression de gène suite à la transfection de lignées cellulaires eucaryotes. Ces vecteurs plasmidiques contiennent donc une origine de réplication bactérienne (ColE1) afin de produire une grande quantité de plasmide dans la souche bactérienne *Escherichia coli*. La sélection des bactéries transformées est assurée par la présence d'un gène de résistance à un antibiotique (par exemple; ampicilline, kanamycine). Un promoteur et ainsi qu'une séquence de polyadénylation et de terminaison de la transcription de l'ARN messagé sont inclus pour fin d'expression du gène chez les cellules de mammifères.

Les séquences promotrices fréquemment utilisées sont le promoteur du cytomegalovirus humain (CMV) (Boshart *et al.*, 1985), celui du virus du sarcome de Rous (RSV) (Gorman *et al.*, 1982) et du promoteur du SV40 (Moreau *et al.*, 1981). L'action promotrice est complétée par la présence de la séquence de polyadénylation et de terminaison de la transcription du SV40 ou celui de l'hormone de croissance bovine (BGHpa) (Pfarr *et al.*, 1986).

### 2.3 Adjuvantité de l'ADN

Lors de l'évaluation de vaccins contenant une faible concentration d'antigène, des adjuvants sont ajoutés pour accroître la réponse immune. Toutefois, depuis l'apparition de vaccins à ADN, il était difficile de comprendre comment un tel vaccin pouvait être si efficace sans adjuvant. Plusieurs études ont démontré que de courtes séquences nucléotidiques agissent comme adjuvant (Messina *et al.*, 1991; Klinman *et al.*, 1997; Krieg *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1992).

Contrairement à l'ADN des vertébrés, celui des bactéries induit une prolifération des cellules B et la sécrétion de cytokines (Krieg *et al.*, 1995). Cette prolifération cellulaire est attribuée à des séquences d'ADN contenant des motifs CpG, soit des dinucléotides non-méthylés. Ces motifs CpG ont la formule suivante: 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3'. Outre l'action sur les cellules B, les motifs CpG peuvent aussi activer les macrophages et les cellules dendritiques *in vitro* en ayant un effet de surexpression des molécules co-stimulatoires. Cet effet se traduit en la sécrétion d'une variété de cytokines, telle l'IL-12 (Klinman *et al.*, 1996; Halpern *et al.*, 1996). Cette cytokine stimule donc les cellules NK à sécréter l'IFN- $\gamma$  (Yamamoto *et al.*, 1992; Ballas *et al.*, 1996). Bref, les motifs CpG induisent une réponse immune de type Th1 caractérisée par la production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  et peu de cytokines de type Th2 (Krieg *et al.*, 1995).

Le mécanisme d'action de ces motifs CpG n'est pas très clair. Mais il a été suggéré que l'activation de cellules B humaines se faisait par l'entremise de récepteurs spécifiques à ces motifs (Liang *et al.*, 1996). Un autre groupe ajoute à ce résultat, que l'entrée de l'ADN dans les cellules B est requise pour induire la prolifération cellulaire (Krieg *et al.*, 1995). Un des premiers effets des motifs CpG sur les cellules B et les monocytes est la production de radicaux oxygènes (Yi *et al.*, 1996). Ces radicaux oxygènes semblent agir comme un signal secondaire et non pas être un simple sous-produit dû à une stimulation par des motifs CpG. Car un traitement des cellules leucocytaires avec des inhibiteurs de radicaux oxygènes inhibe la cascade d'évènements menant à la prolifération cellulaire (Yi *et al.*, 1996).

## 2.4 Méthode d'inoculation de l'ADN plasmidique

### 2.4.1 Injection intramusculaire

L'injection intramusculaire est la méthode la plus couramment utilisée à cause de sa simplicité et de son efficacité. L'ADN plasmidique dissout dans une solution saline semble être le véhicule optimal pour l'expression génique chez la souris (Wolff *et al.*, 1992). L'administration d'agents toxiques causant une nécrose du tissu musculaire précédant l'injection de l'ADN afin d'augmenter l'expression génique a été étudiée par certains groupes de recherche. Des études ont démontré une augmentation de l'expression d'un gène rapporteur suite à un pré-traitement par un anesthésique local, le bupivacaine (Wells, 1993; Vitadello *et al.*, 1994). Babiuk *et al.*, (1995), quant à eux, suite à l'injection chez la souris, d'un plasmide codant pour la glycoprotéine D du virus de l'Herpes bovin précédé d'un pré-traitement à la bupivacaine, n'ont pas observé une augmentation significative de la réponse immunitaire contre cette protéine.

### 2.4.2 Injection intradermique

L'injection d'ADN plasmidique par voie intradermique a été aussi exploitée puisque le muscle n'est pas considéré comme étant le tissu de choix pour permettre la transfection d'APC. Contrairement au tissu musculaire, la peau contient beaucoup plus d'APC telles les cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes (Raz *et al.*, 1994). Des groupes de recherche ont rapporté qu'une injection intradermique d'un plasmide codant pour des protéines du virus de l'influenza a induit une protection contre le virus homologue (Fynan *et al.*, 1993; Yankauckas *et al.*, 1993). Donnelly *et al.* (1994) ont fait une étude comparative sur le niveau de protection induit contre le virus de l'influenza suite à une injection intramusculaire ou intradermique. Dans cette étude, il démontre que suite à une administration égale d'ADN, l'immunisation par voie intradermique était moins efficace que par voie musculaire.



### **2.4.3 Genegun**

L'ADN peut être enduit de particules d'or pour être ensuite carabiné dans la peau d'un animal afin de pénétrer le cytoplasme des cellules environnantes. Le système d'inoculation utilisé est communément appelé "genegun". Ce type d'immunisation a été efficacement utilisé pour transférer des gènes rapporteurs dans les tissus suivants: épiderme, derme, muscle, foie et le pancréas (Cheng *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1992). Cette méthode semble être une voie d'immunisation très efficace (Barry et Johnston, 1997). Une infime quantité d'ADN, de l'ordre de nanogramme, est suffisante pour induire une réponse immunitaire. En soi, 20 à 100 fois plus d'ADN est nécessaire pour induire une réponse immune suite à une immunisation intramusculaire. Une étude rapporte qu'une immunisation intradermique par genegun induit une réponse immunitaire de type Th2 (Fuller et Haynes, 1996), contrairement à une immunisation intramusculaire qui induirait préférentiellement une réponse de type Th1. Cette étude suggère que la présentation de l'antigène au système immunitaire serait différente par voie d'immunisation intramusculaire ou par genegun. Toutefois, d'autres groupes de recherche ont démontré l'induction d'une réponse immune de type Th1 suite à une immunisation par genegun (Barry et Johnston, 1997; Pertmer *et al.*, 1995).

## **2.5 Protection via les vaccins à ADN**

### **2.5.1 Modèle de protection contre des maladies virales**

La première protection induite par la vaccination par ADN fût démontrée chez des souris immunisées avec un plasmide codant pour la nucléoprotéine du virus de l'influenza de type A (Ulmer *et al.*, 1993). Une réponse immune protectrice a été démontrée chez des modèles animaux pour le virus de l'influenza (Fynan *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1994), le virus de l'herpes bovin (Cox *et al.*, 1993), le virus de la rage (Xiang *et al.*, 1994), et le virus de l'hépatite B (Prince *et al.*, 1996).

### 2.5.2 Modèle de maladies bactériennes

Contrairement aux virus, les protéines bactériennes sont exprimés par le micro-organisme même et non par la machinerie traductionnelle des cellules de l'hôte. Néanmoins, l'injection de plasmides codant pour des protéines bactériennes ont généré une production d'anticorps. Une étude a démontré une induction d'une réponse humorale contre la protéine OmpC de *Salmonella typhi* (Lopez-Macias *et al.*, 1996). Des vaccins à ADN codant pour des antigènes de *Mycoplasma tuberculosis* ont généré une protection chez des modèles animaux (Huygen *et al.*, 1996; Tascon *et al.*, 1996). Anderson *et al.* (1996) ont rapporté que des animaux ont été protégés suite à l'injection d'un plasmide codant pour la toxine C du tétanos. Barry *et al.* (1995) ont démontré que suite à une immunisation avec un cocktail plasmidique en utilisant la technique ELI (expression library immunization), ces vaccins à ADN ont induit une protection contre le pathogène *Mycoplasma pulmonis*. Ces études démontrent l'efficacité de la vaccination par ADN contre des maladies bactériennes.

### 2.5.3 Modèle de maladies parasitaires

Une production d'anticorps a été induite avec succès contre des protéines de *Schistosoma japonicum* (Yang *et al.*, 1995), de *Leishmania major* (Xu et Liew, 1995), et de *Plasmodium yoelii* (Sedegah *et al.*, 1994). Des réponses immunes protectrices ont été démontrées chez la souris contre *Leishmania major* et *Plasmodium yoelii* suite à une immunisation par ADN (Xu et Liew, 1995; Sedegah *et al.*, 1994). L'immunisation de souris BALB/c avec un plasmide codant pour la protéine gp63 de *L. Major* induit une réponse cellulaire de type Th1 (Xu et Liew, 1995). Les souris BALB/c sont généralement sensibles à une infection par *L. Major* dûe à leur incapacité de générer une réponse cellulaire de type Th1. Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation d'un vaccin par ADN peut offrir les moyens nécessaires pour contourner ce problème.



## 2.6 Vaccination par ADN chez les nouveaux-nés

Les vaccins conventionnels sont généralement efficaces chez les animaux adultes mais ils le sont moins chez les animaux nouveaux-nés. Plusieurs facteurs contribuent à la vulnérabilité des nouveaux-nés via des infections virales. Le premier serait que le développement et la maintenance de la réponse cellulaire cytotoxique chez les nouveaux-nés semblent être fonctionnellement immatures. Peu de temps après la naissance, le niveau de cellules-T matures de la rate est au moins mille fois moins que chez les adultes (Ridge *et al.*, 1996). De plus, une large dose d'antigène telle que retrouvée lors d'une infection virale ou lors de l'utilisation d'un vaccin atténué peut surcharger le système immunitaire en développement menant à l'induction d'une réponse de type Th2 au détriment d'une réponse cellulaire cytotoxique (Forsthuber *et al.*, 1996; Sarzotti *et al.*, 1996). Le second facteur critique dans l'échec de la vaccination chez les nouveaux-nés, est la présence d'anticorps antiviraux maternels. Malgré que ces anticorps maternels ont le rôle de fournir une protection passive à court terme aux nouveaux-nés, ils contribuent aussi à inactiver les vaccins atténués (Stewien *et al.*, 1978).

La vaccination par ADN a la possibilité de résoudre certains problèmes associés à la vaccination chez les nouveaux-nés. Une injection intramusculaire d'ADN plasmidique semble favoriser l'induction d'une réponse CTL, d'une réponse de type Th1 (Pertmer *et al.*, 1996; Raz *et al.*, 1996) et l'expression protéique à long terme (Wolff *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1992) permettant ainsi de surmonter le problème de l'immaturité du système immunitaire du nouveau-né. De plus, puisque la protéine antigénique n'est pas présente dans la préparation vaccinale, l'ADN plasmidique ne devrait pas être prédisposé à l'inactivation directe par les anticorps maternels.

La fonction altérée des macrophages chez les nouveaux-nés a été associée à la sous-expression des molécules du CMH classe 2 et des molécules de co-stimulation, la capacité réduite du processing d'antigène et la sous-production de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12.

Une réponse humorale peut être induite chez les nouveaux-nés suite à une vaccination, toutefois cette réponse est souvent plus lente et plus faible que celles induites chez les adultes.

### **2.6.1 Réponse humorale**

En général, les vaccins conventionnels génèrent une réponse humorale primaire plus faible chez les nouveaux-nés que chez des animaux adultes (Barrios *et al.*, 1996). Toutefois, suivant une deuxième injection, les titres d'anticorps sont similaires. Par contre, une seule injection d'ADN plasmidique semble générer une réponse humorale similaire chez les deux groupes d'âges (Martinez *et al.*, 1997). Une analyse isotypique des anticorps produits par des vaccins conventionnels révèle une diminution de l'isotype IgG2a chez les nouveaux-nés même si des niveaux similaires de l'isotype IgG1 sont induits chez les deux groupes d'âges (Barrios *et al.*, 1996). Toutefois, des patrons isotypiques similaires sont induits chez les deux groupes d'âges suite à une immunisation par ADN (Martinez *et al.*, 1997).

### **2.6.2 Réponse cellulaire CD4+**

La réponse CD4 observée chez des animaux nouveaux-nés suite à l'utilisation de vaccins conventionnels consiste en une plus grande production d'IL-5 par les splénocytes que ceux des animaux adultes (Barrios *et al.*, 1996). Lorsque l'étude de la réponse CD4 s'est portée sur des animaux immunisés par des vaccins à ADN, des niveaux similaires de prolifération cellulaire ont été observés chez les deux groupes d'âges (Martinez *et al.*, 1997).

### **2.6.3 Réponse cellulaire CD8+**

Parmi les vaccins conventionnels, généralement seuls les vaccins dit vivants ont la capacité de générer une réponse cellulaire cytotoxique chez des animaux adultes. Toutefois, cette réponse cellulaire cytotoxique chez des animaux nouveaux-nés est plus faible. Les vaccins à ADN sont reconnus comme étant d'efficaces inducteurs de la réponse cellulaire cytotoxique chez des animaux adultes. Plusieurs études ont démontré que c'est aussi le cas lors

d'une immunisation néonatale. Martinez *et al.* (1997) ont observé l'induction d'une réponse cellulaire cytotoxique suite à l'immunisation de souris par un plasmide codant pour la nucléoprotéine du virus de Sendai. Suite à l'immunisation de souris par un plasmide codant pour le génome entier du virus de la leucémie murine, Sarzotti *et al.* (1997) ont rapporté qu'une réponse cellulaire cytotoxique a été induite.

## **2.7 Vaccin à ADN: des inquiétudes qui persistent**

L'efficacité des vaccins à ADN à induire une réponse immune protectrice a été démontrée; toutefois, leur efficacité et plus précisément, leurs effets secondaires à long terme sont moins connus. De ce fait, l'utilisation de ces vaccins à ADN amène une inquiétude à certains niveaux, entre autres sur les sujets suivants:

- 1) l'intégration du matériel plasmidique dans le génome de l'hôte
- 2) le développement de maladies autoimmunes
- 3) l'induction de la tolérance

### **2.7.1 Intégration**

Depuis déjà plusieurs années, dans les domaines de la biologie moléculaire et cellulaire, on y pratique de façon courante l'intégration de gènes dans les génomes de lignées cellulaires. Il est rapporté que les conditions optimales d'intégration pour une recombinaison homologue doivent réunir les facteurs suivants:

- a) une réplication simultanée des ADNs plasmidique et génomique.
- b) la présence de grandes régions homologues de l'ordre d'au-moins 600 pb.

Dans le cas de la vaccination par ADN, le plasmide ne contient pas d'origine de réplication fonctionnelle eucaryote et il partage très peu d'homologie de séquence avec l'ADN de mammifère. Selon une étude qui utilise une technique de PCR très sensible (détection de 1 copie / 150 000 noyaux), aucune intégration de l'ADN plasmidique injecté n'a été observée (Nichols *et al.*, 1995).

### 2.7.2 Autoimmunité

Une étude a démontré qu'une augmentation dans le nombre de cellules B sécrétant des anticorps contre l'ADN de l'hôte, soit la souris, a été générée suite à une immunisation répétée d'ADN plasmidique (Klinman *et al.*, 1997).

Malgré le fait que l'immunisation par ADN induisait une réponse immune contre l'ADN de l'hôte, cette même étude rapporte qu'aucun effet autoimmunitaire n'a été observé, et ce, même chez des souris immuno-déficientes. Ces résultats suggèrent que le taux d'autoanticorps produits suite à une immunisation par ADN est insuffisant pour l'induction de l'autoimmunité.

### 2.7.3 Tolérance

Il est connu qu'une vaccination via de multiples injections à faibles doses mène au développement de la tolérance. Dans le cas de la vaccination par ADN, la quantité d'antigène produite suite à une immunisation est faible, et semble persister pour plusieurs semaines, et même dans certains cas, pour plusieurs mois. Dans ce système, il existe donc la possibilité de créer tous les facteurs menant à la tolérance. Toutefois, aucune tolérance n'a été induite chez des animaux adultes, même suite à des injections à de très faibles doses (Liu *et al.*, 1997).

Chez les nouveaux-nés, la vaccination par ADN peut induire la tolérance chez la souris (Mor *et al.*, 1996). Mais d'autres études ont démontré qu'une vaccination par ADN chez des nouveaux-nés induisait une réponse immunitaire (Martinez *et al.*, 1997; Prince *et al.*, 1997)

# CHAPITRE 2

Le virus de la diarrhée virale bovine est un agent pathogène causant d'énormes pertes économiques chaque année, et ce, dans plusieurs pays industrialisés. Au Canada, en 1991, le taux de mortalité chez les veaux suite à une infection par le BVD était de 5%. En 1993, une sévère épidémie de BVD a frappé l'industrie bovine élevant le taux de mortalité à près de 35%.

Le but de ce chapitre était donc la caractérisation génomique des isolats provenant de la récente épidémie de BVD. Nous avons procédé à l'analyse des séquences de plusieurs isolats de BVD issus de la dernière épidémie, et ce à partir d'un fragment d'ADN amplifié par PCR situé dans la région la plus conservée du génome du BVD, soit la région 5'UTR. Par rapport aux séquences de souches classiques du BVD, le groupe A avait une similarité de séquence de 74%, tandis que le groupe B avait une similarité de séquence de 93.5%.

Nous pouvons donc conclure que les isolats du groupe A soient génotypiquement différents des souches classiques de BVD.

## CHAPITRE 2

### Expérience #1

**The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype  
of Bovine Viral Diarrhea Virus.**

Serge Harpin<sup>1</sup>, Robert H. Yolken<sup>2</sup>, Seyyed Mehdy Elahi<sup>1</sup>,  
Estela Cornaglia<sup>1</sup>, and Youssef Elazhary<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal,  
Department of Pathology and Immunology, Section of Virology,  
C.P. 5000, St-Hyacinthe, Quebec, Canada, J2S 7C6.  
fax: (514) 778-8113

<sup>2</sup> Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, U.S.A.

Résultats publiés dans *Archives of Virology* (1995) 140: 1285-1290.

**Summary.** The 5' untranslated region (UTR) of several Bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from the severe Quebec outbreak was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. Sequences revealed the loss, for the BVDV type II isolates, of an internal PstI restriction site, which is present in all known BVDV type I 5'UTR sequences. A single restriction enzyme digestion (PstI) of an aliquot of PCR product allowed us to differentiate BVDV type I and BVDV type II.

Pestiviruses are a group of economically important and worldwide distributed animal diseases in cattle, swine, sheep and goats (7). Pestiviruses have a small, enveloped positive-strand RNA and they belong to the Flaviviridae family (2, 8, 9). The members of this genus are the hog cholera virus (HoCV), the bovine viral diarrhea virus (BVDV), and the border disease virus (BDV).

In 1993, the bovine industry in the province of Quebec (Canada) has experienced a severe outbreak of BVDV-associated disease. The morbidity rate of these herds was as high as 80% and the mortality rate reached a record level of 30% (Dr. G. Rivard, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAC), personal communication). This disease is characterized by thrombocytopenia, leukopenia, fever, diarrhea, and death. In the present study, a number of field isolates with different patterns of pathogenicity were sequenced after PCR amplification of a highly conserved 5'-untranslated region (5'UTR). We also used a single PstI restriction enzyme digestion to classify outbreak-associated BVDV isolates into BVDV type I or BVDV type II.

Organ extracts or sera from 40 diseased calves were prepared from lung, intestine and spleen samples. The clinical signs associated with these isolates are shown in Table 1. Organ material (5 g) was homogenized (Sorvall Omni-mixer) and centrifuged (5000 rpm for 15 min) to pellet the cell debris. Blood samples were centrifuged at 2000 rpm for 10 min and kept at -70°C until use. Total RNA was extracted as previously described (1). First strand cDNA was synthesized using random hexanucleotides primers and 200

units of Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Gibco BRL) at 37°C for 1 hour. After 5 min denaturation at 94°C, the cDNA was first amplified by 30 cycles of PCR (5 cycles of 94°C /45 sec, 43°C /1 min, 72°C /1 min and 25 cycles of 94°C /45 sec, 38°C /1 min and 72°C /1 min) using primers UTR2 and UTR6r (Table 2). A second round of PCR was performed with primers UTR2 and UTR4r to improve the sensitivity. PCR amplification products were analysed on 2% agarose gel. The restriction enzyme digestion was performed by extraction of 20 µl of the PCR product with phenol-chloroform and followed by a precipitation step with ethanol according to standard procedures (16). Digestion was then carried out at 37° C for a minimum of 3 h using restriction enzymes PstI and XhoI (Boehringer Mannheim). Nucleic acid samples were analysed by agarose gel electrophoresis as described above. PCR amplification products were purified from agarose by electroelution and sequenced by the fluorescent di-deoxy terminator method on an Applied Biosystem, Inc. 373a automated DNA sequencer (11) and/or by the fmol™ DNA Sequencing System (Promega). Due to possible error of nucleotide incorporation from the Taq polymerase, a minimum of two PCR fragments were sequenced for each isolate. Computer analysis of nucleotide sequence was performed by using a GCG software package (8).

In this study, sequences of all the viral isolates originating from Quebec (Canada) were compared to those of previously published pestivirus strains: NADL, Singer, New York, Osloss, SD-1, Alfort, Brescia, as well as two BDV isolates, BDVc and BDVnc (Figure 1). Nucleotide sequence comparison revealed two types of isolates infecting herds in Quebec. The first group of isolates (93-T6, 93-T9, 93-T11, 93-T12, 93-T15, 93-T18, 93-T19, 92-TR2, 93-S1, 93-S2, 93-S3, 93-S6) had a homology of 71.5% with the second group (93-T7, 93-T71, 93-R207, 93-R214). The sequences of the first group of isolates compared to known pestivirus sequences showed a degree of homology ranging from 68% (Alfort and Brescia), 70% (BDVc, BDVnc) to 74% (NADL, Osloss, SD-1, Singer, New York). However, with the second group of isolates, homology ranged from 71% (BDVc, BDVnc), 77% (Alfort, Brescia), 89% (NADL, Singer, SD-1) and 94% (Osloss, New York). In recent publications, sequences



of the 5'UTR from haemorrhage-associated BVDV isolates were also reported (13,15). Sequence homology ranged from 96 to 98.3% when compared to the first group of Quebec isolate. Such high homologies found from three different laboratories working with different isolates confirm the presence of a new BVDV genotype.

The restriction digestion of the 5'UTR amplified fragment with XhoI and PstI was performed in order to classify the bovine isolates as BVDV type I or type II (Table 1). Figure 2 demonstrated that all the BVDV, HoCV, and BDV isolates have a PstI site, such not being the case for the Quebec isolates belonging to the new BVDV genotype. Digestion with XhoI was considered as a positive control for all the samples tested. A positive PstI digestion indicates that the isolate is a BVDV type I, whereas a negative one means that it is a BVDV type II (Table 2).

In conclusion, we found from the 5'UTR sequence results that all and only the haemorrhage-associated isolates belong to the BVDV type II group. The single restriction endonuclease digestion of PCR-amplified 5'UTR products may be a quick and easy method for identification of BVDV type II.

## REFERENCES

1. Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
2. Collett MS, Anderson DK, Retzel E (1988) Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 69: 2637-2643
3. Collett MS, Larson R, Gold C, Strick D, Anderson DK, Purchio AF (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology.* 165: 191-199.
4. Deng R, Brock KV (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1. *Virology.* 191: 867-879
5. De Moerlooze L, Lecomte C, Brown-Shimmer S, Schmetz D, Guiot C, Vandenberg D, Allaer D, Rossius M, Chappius G, Dina D, Renard A, Martial JA (1993) Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J. Gen Virol.* 74: 1433-1438
6. Devereux J, Haeberli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395
7. Duffell SJ, Harkness JW (1985) Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117: 240-245
8. Franki RIB, Fauquet CM, Knudson DL, Brown F (1991) Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol. Supplement.* 2: 1-450
9. Horzinek MC (1991) Pestiviruses-taxonomic perspectives. *Arch. Virol. Supplement.* 3: 55-65
10. Meyers G, Rumenapf T, Thiel HJ (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology.* 171: 555-567
11. McCombie WR, Heiner C, Kelley JM, Fitzgerald MG, Gocayne JD (1992) Rapid and reliable fluorescent cycle sequencing of double stranded templates. *DNA Sequence.* 2: 289-296

12. Moormann RJM, Warmerdam PA, van der Meer B, Schaaper WMM, Wensvoort G, Hulst MM (1990) Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology*. 177: 184-198
13. Pellerin C, Van Den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P (1994) Identification of a new group of Bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreak and high mortalities. *Virology*. 203: 260-268
14. Renard A, Dina D, Martial JA (1987) Complete nucleotide sequence of bovine viral diarrhea virus genome and its fragment, useful for making antigenic protein in therapy and diagnosis. European Patent Application, no. 0208672
15. Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ (1994) Segregation of Bovine Viral Diarrhea Virus into Genotypes. *Virology*. 205: 66-74.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y

Table 1. Associated clinical signs and classification of the Quebec isolates according to the restriction enzyme digestion and sequence results.

Isolate	Associated clinical signs	XhoI*	PstI*	Sequence	Classification
93-T10	Haemorrhage	+	-	no	BVDV type II
93-T15	"	+	-	yes	"
93-T18	"	+	-	"	"
93-T19	"	+	-	"	"
93-T56	"	+	-	no	"
93-T61	"	+	-	"	"
93-15404	"	+	-	"	"
93-15409	"	+	-	"	"
93-15414	"	+	-	"	"
93-15434	"	+	-	"	"
93-15458	"	+	-	"	"
93-15462	"	+	-	"	"
93-R76	"	+	-	"	"
93-R82	"	+	-	"	"
93-R238	"	+	-	"	"
93-R251	"	+	-	"	"
93-R253	"	+	-	"	"
93-R3288	"	+	-	"	"
93-R3291	"	+	-	"	"
93-R3294	"	+	-	"	"
93-R3297	"	+	-	"	"
93-S1	"	+	-	yes	"
93-S2	"	+	-	"	"
93-S3	"	+	-	"	"
93-S6	"	+	-	"	"
93-T6	Nervous/respiratory	+	-	yes	BVDV type II
93-T7	problems, diarrhea	+	+	"	BVDV type I
93-T8	"	+	-	no	BVDV type II
93-T9	"	+	-	yes	"
93-T11	"	+	-	"	"
93-T12	"	+	-	"	"
93-T71	"	+	+	"	BVDV type I
93-TR2	"	+	-	"	BVDV type II
93-R174	"	+	+	no	BVDV type I
93-R185	"	+	+	"	"
93-R207	"	+	+	yes	"
93-R214	"	+	+	yes	"
93-R222	"	+	+	no	"
93-R225	"	+	+	"	"
93-R233	"	+	+	"	"

\* + : positive digestion, - : negative digestion



	XhoI	PstI
	219      *****      236	329      *****      348
NADL	: AAGGTCTCGAGATGCCAC	TAGGGTGCTGCAGAGGCCCA
Singer	: .....	.....
Osloss	: C.A.C.....G.....	.....
New York	: C.A.C.....	.....
SD-1	: .....	.....
Alfort	: ----C.....T..	.....
Brescia	: ----C.....T.T	.....
BDVc	: ??????????????????	.....
BDVnc	: ??????????????????	.....
93-T7	: C.A.C.....T.....	.....
93-T71	: C.A.C.....T.....	.....
93-R207	: C.A.C.....T.....	.....
93-R214	: C.A.C.....T.....	.....
93-T6	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-T9	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-T11	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-T12	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-T15	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-T18	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-T19	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
92-TR2	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-S1	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-S2	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-S3	: GGA.....T	.....TA.....A..TT
93-S6	: GGA.....T	.....TA.....A..TT

Fig. 2 : Comparison of the 5'UTR sequence corresponding to the conservative XhoI site and the non-conservative PstI site. A dot represents a homology to NADL sequence, a letter represents a difference, a dash represents a base deletion, an interrogation mark represents a region with no sequence available. The numbers correspond to those of the NADL sequence.

Table 2. Degenerate primers used to amplify defined parts of the 5'-untranslated region from BVDV genome.

Primer	Sequence <sup>a</sup>	Position <sup>b</sup>
UTR 2	TGGXXAAGXCCTGAGTACAG	166-186
UTR 4r	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	371-395
UTR 6r	GTTTGXXTGTTTTGTATAAXAATTC	404-428

<sup>a</sup> X represents an equimolar mix of nucleotides A, G, C and T.

<sup>b</sup> The base numbering is according to NADL sequence (3).

# CHAPITRE 3

Malgré la pratique intensive de vaccination contre le BVD, une nouvelle souche de BVD est apparue. Donc ceci nous a permis de tester des techniques qui sont à la base des nouvelles générations de vaccins, en l'occurrence, la vaccination par ADN.

Dans ce chapitre, le but était d'étudier la faisabilité d'une immunisation génétique dans le cadre d'un programme de vaccination contre le BVD.

Pour ce faire, nous avons établi notre première expérience dans un modèle murin. L'antigène choisi a été la protéine E2 du BVD car elle possède la caractéristique intéressante d'être la protéine cible des anticorps neutralisants. Donc, suite au clonage d'un fragment d'ADN codant pour la protéine E2 dans un vecteur d'expression eucaryote, dont le gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus, nous avons immunisé des groupes de souris par voies intramusculaires et intradermiques. Nous avons observé les points suivants:

- 1) le développement d'anticorps contre la protéine E2
- 2) ces anticorps avaient la capacité de neutraliser des souches de BVD
- 3) la présence de ces anticorps neutralisants persistaient à long terme chez la souris

Nous pouvons donc conclure, qu'en effet, une immunisation génétique semble être un nouvel outil prometteur pour contrer le BVD.

## CHAPITRE 3

### Expérience #2

#### **Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein gp53 (E2)**

Serge Harpin<sup>1</sup>, Brian Talbot<sup>2</sup>, Majambu Mbikay<sup>3</sup>,  
and Youssef Elazhary<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Faculté de médecine vétérinaire , Université de Montréal,  
Département de pathologie et microbiologie, section virologie,  
C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec (Canada) J2S 7C6.

<sup>2</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de  
Sherbrooke, Québec (Canada)

<sup>3</sup> Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Université de  
Montréal, Montréal (Canada).

Résultats publiés dans FEMS Microbiology Letters (1997) 146: 229-234



## Abstract

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a worldwide pathogen in cattle which has not been controlled by classical vaccination. The region encoding the BVDV major glycoprotein gp53 (E2) known to possess virus-neutralizing activity, was cloned into a mammalian expression vector under the human cytomegalovirus (CMV) intermediate early promoter. Intramuscular and intradermal administration of the recombinant plasmid DNA into BALB/c mice induced BVDV gp53-specific antibody responses to both biotypes (cytopathic and noncytopathic) of BVDV genotype 1, and to cytopathic BVDV genotype 2. BVDV-neutralizing antibodies were generated against BVDV genotype 1 strains and they also persisted six months after the last injection.

Keywords: BVDV, gp53 (E2) expression, DNA plasmid immunization

## 1. Introduction

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is an enveloped single-stranded RNA virus classified as a member of the genus *Pestivirus* within the Flaviviridae family [1]. The BVDV genome is approximately 12.5 kb in length and contains one large open reading frame (ORF). The ORF incodes a large polyprotein of approximately 450 kDa which is processed co- and post-translationally by either host or viral proteases [2]. Processing of the standard BVDV polyprotein results in a nonstructural protein p20 (Npro), capsid protein p14 (C); envelope glycoproteins gp48 (E0), gp25 (E1), gp53 (E2); nonstructural proteins p125 (NS23), p10 (NS4A), p32 (NS4B), p58 (NS5A) and p75 (NS5B). Recently, subgroups of BVDV have been identified which appear to represent two different genotypes (1 and 2) [3-5].

Direct injection of DNA into animals has recently been shown to induce both humoral and cellular immune responses against several infectious agents, such influenza, rabies, human immunodeficiency and bovine herpes viruses as

well malaria parasites [6-10]. Most of these studies were carried out using a mouse model to determine the efficiency of the plasmid DNA immunization. Antibodies to the BVDV major glycoprotein gp53 (E2) have been shown to possess virus-neutralizing activity [11], and in this study, we evaluated the immunogenic potential of plasmidic expression vectors encoding the BVDV genotype 1 gp53 (E2) protein when injected into mice as naked DNA.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Viruses.*

The BVDV strains used are from genotype 1 and 2. Each genotype is represented by a cytopathic (c) and noncytopathic (nc) strain. Genotype 1 strains NADL c (ATCC VR-1422) and New-York nc (ATCC vr-524) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Genotype 2 strains BVDV2/145 c and BVDV2/890 nc were kindly provided by Dr. Frey (USDA, Ames, Iowa, USA).

### *2.2 Cells.*

Bovine turbinate (BT; ATCC CRL-1390) cell line free of BVDV was cultured in Earle's minimum essential medium (MEM, GIBCO BRL) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 0.5% lactalbumine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 2.4 mM glutamine, and 8% Fetal Bovine Serum (FBS). COS-7 cell line (ATCC CRL-1651) was cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, GIBCO BRL), and 10% FBS.

### *2.3 Cloning of the BVDV genotype 1 gp53 gene.*

RNA extraction and cDNA synthesis of BVDV/NADL strain were performed as previously described [5]. NADL cDNA product was used as a template for amplification of the gp53 region (nucleotides 2414-3725 according

to NADL sequence [12]). The sense primer (GGGATCCACCATGGTACAGGGCATTCTG) contains a *Bam*HI restriction enzyme site and a Kozak translation initiation sequence [13]. The antisense primer (GTCTAGACTATAAGAGTAAGACCCACTT) contains a *Xba*I restriction enzyme site and a stop codon. After digestion with these two enzymes, the gp53 PCR product, was inserted between the *Bam*HI and the *Xba*I sites of the pcDNA3 mammalian expression vector (InVitrogen).

#### *2.4 Cell transfection and protein detection.*

COS-7 cells were transfected with pcDNA/gp53 DNA by lipofection (LipofectAMINE, GIBCO BRL) according to the manufacturer's instructions. Twenty-four, forty-eight, and seventy-two hours after transfection, the cells were acetone fixed. Expression of the glycoprotein gp53 was monitored by indirect immunofluorescence (IF) for BVDV antigen. Briefly, polyclonal bovine anti-BVDV serum (1:50) was added for 30 min at 37°C and cells were washed twice with PBS and once with distilled water. This was followed by a 30 min incubation at 37°C with a fluorescein-conjugated rabbit anti-bovine IgG (1:50). COS-7 cells transfected with plasmid pcDNA3 were used as a negative control.

#### *2.5 Immunization of mice.*

Female 6-week-old BALB/c mice were used in this study. Each mouse was injected either intra-muscularly (thigh muscle) or intra-dermally (dorsal epidermis tissue) with 100 µg of either plasmid DNA pcDNA/gp53, pcDNA3 (plasmid control) or with 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> of BVDV/NADL strain. The injection was repeated 2 weeks later. Blood samples from each mouse were collected by retroorbital puncture at week 2, 6, and 8.

### *2.6 Antibody response in immunized mice.*

Sera from immunized mice were pooled and tested for antibody against both BVDV genotypes and biotypes by peroxidase-linked antibody assay (PLA assay). BT cells grown in 96-well tissue culture plates were infected with each of the BVDV strains ( $10^2$  TCID<sub>50</sub>/well). After a 3 day incubation, the cell monolayers were washed with PBS-Tween (0.05% Tween 20, Sigma), fixed, and dried at 30°C for 3 h. Each well was incubated with pooled mice sera (1:10) for 10 min at 30°C. Plates were then washed, and dried at room temperature (RT). For the detection of bound gp53-specific antibodies, 100 µl/well of goat anti-mouse IgG (H+L) Horseradish peroxidase conjugate (BIO-RAD) diluted 1:20 was added and incubated for 10 min at RT. Plates were washed three times. Finally, the substrate (3-amino-9-ethylcarbazole, Sigma) and hydrogen peroxide in 0.05 M acetate buffer (pH5) were added. After a 10 min incubation, the plates were examined for fluorescence.

### *2.7 Neutralization assay for BVDV-specific antibodies.*

Sera were inactivated for 30 min at 56°C. One hundred TCID<sub>50</sub> of each BVDV strain was preincubated with serial dilutions (1:4 to 1:256) of mouse antisera for 1 h at 37°C. This antiserum-virus mixture (50 µl) was then added to each well of BT cell cultures for 1 h at 37°C. MEM medium was then added to the cells and incubated at 37°C for 3 to 5 days. The highest dilution that completely inhibited the virus cytopathic effect in at least 50% of the culture was considered as the virus neutralization titer. For testing the noncytopathic BVDV strains, the plates were stained after 3 days by PLA assay as described above.

### 3. Results and discussion

#### *3.1 Expression of the BVDV gp53 (E2) gene in COS cells.*

BVDV major glycoprotein gp53 (E2) was first PCR cloned into the pcDNA3 mammalian expression plasmid. To verify the ability of this vector to direct expression of gp53, COS cells were transiently transfected with the plasmid DNA construct pcDNA/gp53. Cytoplasmic expression of the gp53 (E2) in transfected cells was intense and could be detected in 50% to 80% of the cells by IF staining after only 24 h (Fig. 1).

#### *3.2 BVDV-specific antibody responses by DNA injection of pcDNA/gp53.*

Intramuscular (im) and intradermal (id) routes of DNA administration were tested for their ability to raise an immune response against gp53 in mice. Antibodies were identified using the PLA test. Table 1 shows that BVDV-specific antibodies were generated by both im/id injections and were able to detect BVDV genotype 1 strains NADL (c), and New-York (nc), and genotype 2 strain BVDV2/145 (c). Microscope visualization of PLA assay showed that sera induced by pcDNA/gp53 id injection gave a lower level of antibodies compared to im injection (Fig 2.).

#### *3.3 BVDV-specific neutralizing responses by DNA injection of pcDNA/gp53.*

Sera were also tested for BVDV-neutralizing antibodies. Data in Table 2 shows that sera (titer 1:20) from mice immunized with pcDNA/gp53 by im and id injection generated BVDV-neutralizing antibodies against only BVDV genotype 1 strains (NADL and New-York). This response was similar to that generated by immunization with the virus itself (BVDV/NADL). Similar results have been reported for recombinant baculovirus-expressed gp53 protein from BVDV/Singer strain (genotype 1 member) that failed to induce a protection against strains of BVDV genotype 2 [14]. Interestingly, bacterial recombinant

BVDV gp53 protein was unable to generate strain homologous neutralizing antibodies, presumably due to a lack of proper glycosylation [15].

Data in Table 3 shows that neutralizing antibodies of immunized mice elicited by DNA immunization still persist six months after the last injection. Neutralizing antibody titer induced by plasmid DNA immunization ranged from 1/4 to 1/32 (im injection) and 0 to 1/128 (id injection) whereas the neutralizing response from vaccination with the virus itself (BVDV/NADL) is individually less variable. Long term persistence of antibody response have also been reported where Influenza anti-nucleoprotein antibodies persisted for at least 68 weeks [16].

This study demonstrated for the first time the ability to induce an immune response against the BVDV glycoprotein gp53 (E2) by the injection of a mammalian expression vector carrying the gp53 gene. The induction of BVDV neutralizing antibody in mice by this new technology shows the feasibility and the potential use of the DNA-based immunization technology for the vaccination field of BVDV.

## References

- [1] Horzinek, M.C. (1991) Pestiviruses-taxonomic perspectives. *Arch. Virol. Supplement.* 3, 55-65.
- [2] Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S.K., & Retzel, E. (1988) Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208.
- [3] Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J., & Tijssen, P. (1994) Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreak and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- [4] Ridpath, J.F., Bolin, S.R., & Dubovi, E.J. (1994) Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205, 66-74.
- [5] Harpin, S., Elahi, S.M., Cornaglia, E., Yolken, R.H., & Elazhary, Y. (1995) The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhoea virus. *Arch Virol* 140, 1285-1290.
- [6] Cox, G.J.M., Zamb, T.J., & Babiuk, L.A. (1993) Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol* 67, 5664-5667.
- [7] Robinson, H.L., Hunt, L.A., & Webster, R.G. (1993) Protection against lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11, 957-960.
- [8] Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. & Hoffman, S.L. (1994) Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9, 9866-9870.
- [9] Wang, B., Ugen, K.E., Srikantan, V., Agadjanyan, M.G., Dag, K., Refaeli, Y., Sato, A.I., Boyer, J., Williams, W.V., & Weiner, D.B. (1993) Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4156-4160.
- [10] Xiang, Z.Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W.H., Cheng, J., & Ertl, H.C.J. (1994) Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199, 132-140.

- [11] Donis, R.O., Corapi, W., & Dubovi, E.J. (1988) Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. gen. Virol* 69, 77-86.
- [12] Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K., Purchio, A.F. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165, 191-199.
- [13] Kozak, M. (1986) Point mutations defines a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.
- [14] Bolin, R., & Ridpath, J.F. (1994) Recombinant baculovirus expression product containing gp53 from type 1 BVDV does not protect against type 2 BVDV. 75th Annual meeting of the Conference of Research Workers in Animal Diseases Chicago, Illinois, USA.
- [15] Yu, M., Gould, A.R., Morrissy, C.J., & Westbury H.A. (1994) High level expression of the envelope glycoprotein (gp53) of bovine viral diarrhoea virus (Singer) and its potential use as diagnostic reagent. *Virus Research* 34, 178-186.
- [16] Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S.H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M.A., Baird, S.M., & Rhodes, G.H. (1994). Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9519-9523.



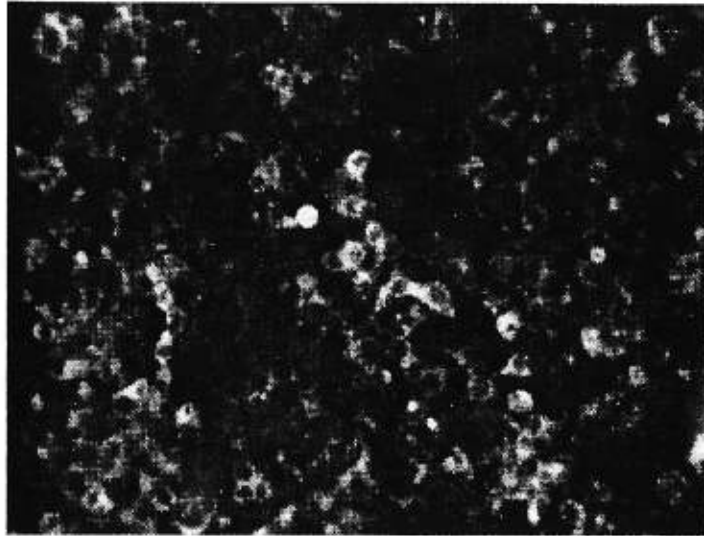


FIG.1. Expression of BVDV/NADL major glycoprotein gp53/E2 in transiently transfected cells. Forty-eight hours after transfection, COS-7 cells were assayed by IF.

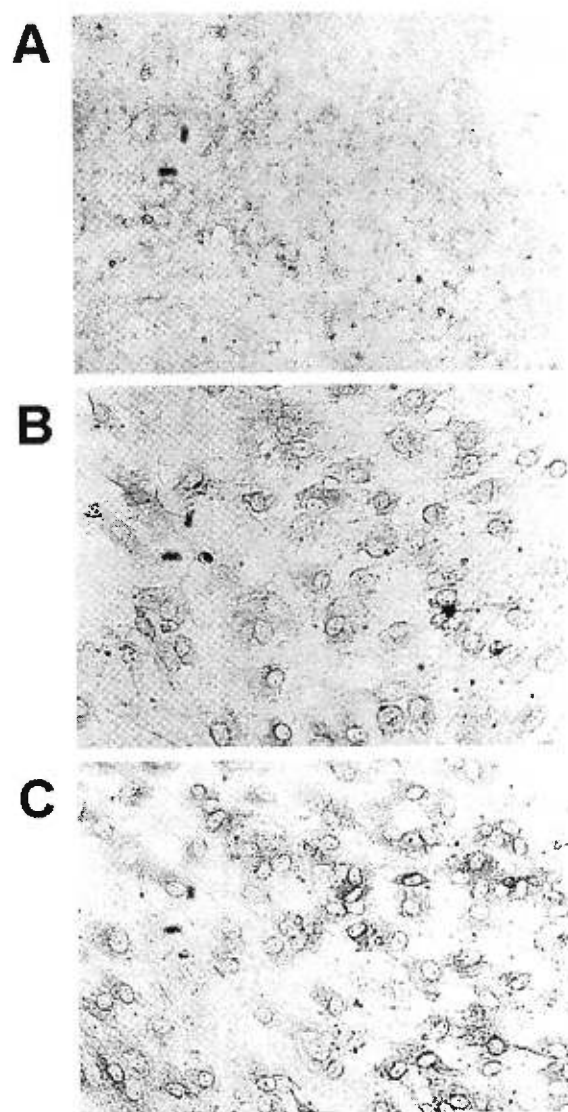


FIG. 2. Comparison by PLA of the level of antibody generated from intramuscular (im) and intradermal (id) routes of injection. Panel A: pcDNA3 (plasmid control); Panel B: pcDNA/gp53 (id); Panel C: pcDNA/gp53 (im).

Table 1. BVDV-specific antibody generated by injection of pcDNA/gp53.

Material injected and route of injection*	Week of bleed	BVDV-specific antibody against different BVDV strains			
		genotype 1		genotype 2	
		NADL	New-York	BVDV2/145	BVDV2/890
Virus/NADL im	2	-	-	-	-
	6	+	+	+	+
	8	+	+	+	+
id	2	-	-	-	-
	6	+	+	+	+
	8	+	+	+	+
pcDNA/gp53 im	2	-	-	-	-
	6	+	+	+	-
	8	+	+	+	-
id	2	-	-	-	-
	6	+	+	-	-
	8	+	+	-	-
pcDNA3/control im	2	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
id	2	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	8	-	-	-	-

Presence of BVDV-specific antibody are scored as follows: +, positive detection; -, no detection. \* im, intramuscular; id, intradermal.

Table 2. Induction of BVDV-neutralizing antibodies by pcDNA/gp53.

Material injected and route of injection*	Week of bleed	BVDV-specific neutralizing antibody against different BVDV strains		
		genotype 1		
		NADL	New-York	
Virus/NADL im	6	+	+	
	8	+	+	
	id	6	+	-
		8	+	+
pcDNA/gp53 im	6	+	+	
	8	+	+	
	id	6	-	-
		8	+	+
pcDNA3/control im	6	-	-	
	8	-	-	
	id	6	-	-
		8	-	-

Note that the end point titration was 1/20 and no neutralizing antibodies were detected against BVDV genotype 2 strains. Legend (see Table 1).

Table 3. Neutralizing antibody titer six months after the last injection.

mouse	Neutralization antibody titer*					
	BVDV/NADL		pcDNA/gp53		pcDNA3	
	im	id	im	id	im	id
1	1/16	1/16	1/16	1/32	0	0
2	1/16	1/8	1/16	0	0	0
3	1/16	0	1/32	1/16	0	0
4	1/16	1/16	1/8	1/128	0	0
5	1/16	dead	1/4	dead	0	0

\* Neutralizing antibody response against BVDV/NADL strain. Legend (see Table 1).

# CHAPITRE 4

Grâce aux résultats obtenus dans le chapitre précédent, à l'effet qu'une immunisation par ADN pouvait permettre le développement d'une réponse humorale en terme d'anticorps neutralisants chez la souris, nous a donc permis de passer à l'objectif le plus important de cette thèse, soit d'évaluer si ce type d'immunisation pourrait être applicable chez l'hôte naturel du BVD, soit le bovin.

Dans ce chapitre, des veaux ont été immunisés soit avec une solution saline plasmidique (N-DNA) contenant le plasmide codant pour la protéine E2, soit par une solution contenant le plasmide pCMVE2 sous une formulation liposomale (L-DNA). Nous avons pu noter, qu'à la huitième semaine de la période de vaccination, que tous les veaux du groupe L-DNA ont développé une réponse humorale neutralisante, tandis qu'un seul des veaux du groupe N-DNA a démontré une réponse significative en terme d'anticorps neutralisant. Par contre, du point de vue de la réponse cellulaire en terme de prolifération des cellules mononucléaires bovine en présence de BVD, seules les cellules mononucléaires des animaux du groupe N-DNA ont su développer une réponse proliférative.

Après l'introduction du virus de challenge, tous les veaux vaccinés ont développé une réponse secondaire, donc une réponse mémoire en terme d'anticorps neutralisants. De plus, durant la période de challenge, tous les veaux vaccinés ont développé d'une part, une réponse neutralisante contre une souche de BVD de type 2, générant ainsi une réponse hétérologue, et d'autre part, une réponse mucosale via la présence d'anticorps neutralisants dans les sécrétions nasales. Finalement, suite à l'observation des signes cliniques dans la période de challenge, seuls les animaux du groupe N-DNA ont démontré des signes de protection.

## CHAPITRE 4

### Expérience #3

#### **Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2**

Serge Harpin<sup>1</sup>, David J. Hurley<sup>1,4</sup>,  
Majambu Mbikay<sup>3</sup>, Brian Talbot<sup>2</sup>, and Youssef Elazhary<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Département de pathologie et microbiologie, section virologie, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6. Phone: 450-773-8521. Fax: 450-778-8106.

<sup>2</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

<sup>3</sup> Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Canada.

<sup>4</sup> Department of Veterinary Science and Biology/Microbiology, College of Agriculture and Biological Sciences, South Dakota State University. USA.

Résultats soumis pour publication

## Summary

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is an economically important pathogen of cattle that is ubiquitously distributed worldwide. In this study, cattle were immunized by intramuscular injections with plasmid DNA expressing the BVDV type 1 major glycoprotein E2. Animals either received injections of naked DNA (N-DNA) or DNA in cationic liposomes (L-DNA). Both DNA preparations induced virus-specific neutralizing antibodies in vaccinates, although the response was much lower in N-DNA immunized animals. N-DNA-vaccinated animals also showed virus-specific lymphocyte proliferation responses to type 1, live BVDV *in vitro*, whereas L-DNA vaccination induced no such responses. After 16 weeks, DNA-vaccinated and mock vaccinated animals were challenged with a USDA-certified BVDV type 1 strain. Four significant observations were made: 1) N-DNA-vaccinated calves were partly protected from viral challenge; 2) L-DNA animals did not show any signs of protection, 3) the challenge induced strong memory responses in the production of serum neutralizing antibodies to both genotypes (type 1 and 2 of BVDV); 4) the challenge induced a mucosal memory response in nasal secretions of both L- and N-DNA-vaccinated animals.

## Introduction

Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) is an enveloped single-stranded RNA virus classified as a member of the genus pestivirus within the *Flaviviridae* family (Horzinek, 1991). The BVDV genome is approximately 12.5 kb in length and contains one large open reading frame which encodes a polyprotein of approximately 450 kDa which is processed co- and post-translationally by either host or viral proteases (Collett *et al.*, 1988). Processing of the standard BVDV polyprotein results in at least 13 individual proteins, 4 of which are structural glycoproteins. Antibodies to the BVDV major glycoprotein E2 (formerly known as gp53) have been shown to possess virus-neutralizing activity (Donis *et al.*, 1988). BVDV is an important pathogen of cattle, causing severe and even fatal infections, which result in significant losses to cattle production worldwide. Two distinct lineages of BVDV exist. One is the classical BVDV strain termed type 1 and the second, known as type 2, was recently found to be involved in atypical outbreaks of severe acute BVDV throughout the world (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994; Harpin *et al.*, 1995).

Commercially available inactivated and modified-live BVDV (MLV) vaccines have been extensively used for more than 30 years, but since their introduction the problem appears to have become worse instead of better (Bolin, 1995). Both MLV and inactivated BVDV vaccines have significant shortcomings. MLV vaccines contain a limited antigen mass and require the opportunity to replicate in the host to establish significant immune activity. They are susceptible to interference from maternal antibody in the system (Schultz, 1993). Further, MLV viruses are a potential source of virus that lead to *in utero* infections and/or immunosuppression (Liess *et al.*, 1984; Roth & Kaeberle,



1983). MLV vaccines are produced in bovine cell cultures and thus have the potential to introduce other biological agents into herds as contaminants. Inactivated viruses are quite expensive to produce and susceptible to loss of important immunogenic activities in the process of inactivation. While they provide a large preformed antigen mass, this may not always be an advantage - as in the case of the neonate - where special conditions of antigen presentation and the potential for development of tolerance exists.

The use of cloned viral genes holds great promise for the development of new vaccines to control BVDV. DNA vaccination can serve as an alternative to conventional immunization with MLV or inactivated vaccines to induce protection (Robinson *et al.*, 1993; Sedegah *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1994). Direct injection of plasmid DNA into animals offers several advantages over classical vaccine preparations and viral vectors for vaccination. Simple, rapid and inexpensive production of plasmid DNA, thermal stability of the plasmid product, and the potential for a long shelf-life of stabilized plasmid DNA are reasons that a DNA vaccine is a candidate of choice for the next generation of vaccines against BVDV. This technology should provide improved protection because it is insensitive to preformed antibody (Siegrist *et al.*, 1997). In addition, DNA vaccines are capable of inducing both humoral and cellular immunity by providing access to newly synthesized antigen in both the MHC class I- and class II-restricted pathways (Donnelly *et al.*, 1997; Hasset & Whitton, 1996). Most DNA vaccination studies have been carried out and designed in mice to determine the efficiency of DNA immunization. Our initial studies of DNA immunization with the E2 gene of BVDV were also carried out in mice (Harpin *et al.*, 1997).

In this study, we examined DNA vaccination for BVDV in cattle, the natural host. The results indicated that vaccination with DNA encoding the BVDV major glycoprotein E2, induced virus-specific neutralizing antibodies when injected as naked plasmid (N-DNA) and when the plasmid was entrapped in cationic liposome (L-DNA). Virus-specific lymphocyte proliferation was observed in vaccinates receiving N-DNA only. We evaluated the response to challenge with the NY-1 strain of type 1 BVDV (produced by the NVSL and USDA-certified as a vaccine challenge strain). We demonstrated that the immune responses induced by vaccination with E2-containing DNA resulted in partial protection from development of symptoms in N-DNA-vaccinated calves but not in L-DNA-vaccinated animals.

## Methods

### Cell and virus

Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells free of BVDV were grown in Earle's Minimum Essential Medium (MEM, Gibco BRL), supplemented with gentamicin (50µg/ml, Sigma) and 10% donor horse serum (Gibco BRL). For this study, BVDV type 1 strain Singer, and type 2 strain 125 were obtained from the National Veterinary Service Laboratory of the United States Department of Agriculture (NVSL-USDA; Ames, Iowa, USA). The type 1 challenge virus (NVSL-USDA BVDV/NY-1 lot # 97-12) was prepared by the USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Center for Veterinary Biologics, in Ames IA, USA. Virus was stored at -80°C until use.

### Plasmid DNA expression vector

Cloning and expression of the BVDV E2 glycoprotein from a cytopathic type 1 strain (BVDV/NADL) yielding the pcDNA/gp53 has been previously described (Harpin *et al.*, 1997). The new gp53 expression vector used in this study and designated as pCMVigp53 (where i stands for intron) was constructed by replacing the region containing the CMV promoter in the pcDNA/gp53 vector by a *BglII/HindIII* fragment containing the CMV promoter and an intron from the pCI-neo plasmid (Promega). Plasmid pCMVintron was used as plasmid control. All plasmids used in this study were prepared according to the manufacturer's directions using the Qiagen DNA purification kit (Mississauga, ONT, Canada). For use in vaccination, the DNA was dissolved in

phosphate-buffered saline (PBS) at a final concentration of 1 mg/ml. The DNA aliquots were stored at -20°C until the time of injection.

### **Entrapment of plasmid DNA into liposomes.**

Liposomes were prepared as unilamellar vesicles containing the cationic lipid DOTAP as DOTAP/DOPE (1:1 molar ratio). DOTAP is N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (Avanti Polar Lipids), and DOPE is the neutral lipid dioleoyl phosphatidylethanolamine (Avanti Polar Lipids). Briefly, a film made of an equimolar mixture of DOTAP and DOPE was first prepared by the standard hydration and re-hydration method (Bangham *et al.*, 1965). The film was re-hydrated in PBS, sonicated for 30 sec in a bath sonicator to form a clear liposomal suspension. Liposomes were stored at 4°C until use. One day before the time of vaccination, a DNA:liposome ratio of 1:10 (w:w) was prepared as previously reported (Felgner *et al.*, 1987). For use in vaccination, the DNA-liposome formulation was kept at 4°C at a final concentration of 0.5 mg of plasmid DNA per ml. A total of 2 ml of the mixture (1 mg DNA) was injected per calf.

### **DNA immunization and challenge**

BVDV and BVDV-antibody negative cattle, 7 to 9 months of age, were used in this study. The animals were housed in an isolated barn and handled under strict precautions to prevent the introduction of BVDV. Calves were intramuscularly (IM) immunized in the thigh muscle. Three calves received 1 mg of pCMVigp53 in a liposome preparation (L-DNA), 3 calves received 1 mg of pCMVigp53 as naked DNA (N-DNA), and 2 calves received 1 mg of control

plasmid pCMVintron. For the challenge study, 2 calves were added to serve as unvaccinated and unchallenged controls. Booster injections were given at weeks 3 and 6. Blood samples were drawn from each calf every two weeks. On week 16 after vaccination, the animals were challenged intranasally with 1.2 ml of  $10^{7.9}$  TCID<sub>50</sub>/2ml of BVDV/NY-1. A volume of 0.6 ml per nare was delivered dropwise to each DNA-vaccinated and mock-vaccinated animal. Clinical signs were observed daily from 3 days prior to challenge, to day 14 post-challenge. During the challenge period, blood samples for antibody and lymphocyte proliferation assays were collected on days -3, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, and 21. Nasal secretions were collected at weeks 0, 3, 5 and 8 during the vaccination phase and on day 21 post-challenge.

### **Virus neutralization assay**

The virus neutralization assays were conducted using heat inactivated (30 min at 56°C) samples (serum, nasal secretion). Two hundred TCID<sub>50</sub> of BVDV (Singer or 125 strains) were pre-incubated with twofold dilutions of the heat inactivated sample for 1 h at 37°C. This mixture (50 µl) was then added to duplicate wells of microtiter plates containing 80-90% confluent MDBK cells for 1 h at 37°C. MEM (150 µl) was added to each well. The plates were incubated at 37°C for 4 days. The reciprocal of the highest dilution that completely inhibited viral cytopathic effect in the 2 test wells was reported as the virus neutralization titer.

### **Proliferative response of bovine mononuclear cells**

Bovine leukocytes were enriched by centrifugation of peripheral blood to collect the buffy coat. The mononuclear (MN) cells were purified from the buffy coat by flotation on Histopaque 1.083 (Sigma), and suspended at the concentration of  $3 \times 10^6$ /ml in RPMI-1640 with 10% FBS, 2mM sodium pyruvate, 2mM glutamine and 50 $\mu$ g/ml gentamicin. The MN cells were added to triplicate wells ( $6 \times 10^5$  cells per well) and incubated in the presence of live BVDV (Singer and 125 strains) at  $5 \times 10^4$  particles per wells in a final volume of 200  $\mu$ l at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After 5 days, the wells were pulsed for 6 hours with 0.2 $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]thymidine (6.7Ci/mM, ICN) and harvested with a Skatron semiautomatic cell harvester (Flow Laboratories, Rockville MD). Stimulation index (SI) was calculated by the following formula: SI = average counts per minute in antigen stimulated wells / average counts per minute in wells containing only cells with medium.

### **Statistical analysis**

The significance of differences observed under test conditions was determined by ANOVA using the Statview+SE software (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

## Results

### **Serum neutralizing antibodies in immunized calves.**

To evaluate the usefulness of a DNA vaccine in the natural host of BVDV, two groups of 3 calves each were immunized with 1 mg of pCMVigp53 in a liposome preparation or as naked DNA on three occasions, three weeks apart. As negative controls, 2 calves were immunized with control plasmid pCMVintron in the same way. Table 1 summarizes the development of serum neutralizing antibodies during this study. We observed that neutralizing antibodies first appeared at week 8 for some animals immunized with the plasmid DNA. All calves injected with L-DNA seroconverted at week 8. However, only one calf in the N-DNA group had a significant titer during the whole vaccination period. No neutralizing antibody (SN titer < 4) was detected in the animals receiving mock plasmid.

Table 1 also indicates a clear evidence of a memory response in the production of serum neutralizing antibodies to BVDV after challenge. This occurred in animals vaccinated with plasmid pCMVigp53, both N-DNA and L-DNA. There was a significant difference in the neutralizing antibody responses after challenge between each of the DNA-vaccinated groups and the mock-vaccinated animals ( $p < 0.01$ ). The serum neutralizing titers of DNA-vaccinated animals showed a marked rise one week after challenge. At week 3 post-challenge, titers of DNA-vaccinated animals were approximately 128-fold higher than those of mock-vaccinates. However, no significant differences in serum neutralization titers were observed between N-DNA-vaccinated and L-

DNA-vaccinated animals ( $p > 0.05$ ). The two unvaccinated, unchallenged control animals remained seronegative (SN titer  $< 4$ ) during the challenge trial.

### **Characterization of the cellular immune response.**

Bovine MN cells were isolated and stimulated *in vitro* with live type 1 (Singer strain) or type 2 (strain 125) BVDV. Control wells were incubated with cells alone. The baseline response was established by using the average SI of the mock-vaccinated animals. Bovine MN cells from 2 N-DNA-vaccinated calves (1 and 3) exhibited an increase in proliferation following stimulation with the Singer strain compared to MN cells from mock-vaccinated calves at week 4 after vaccination (Fig 1). This response slowly decreased during the remainder of the vaccination period. However, L-DNA-vaccinated calves did not show any measurable increase in MN cell response to the Singer strain of BVDV (data not shown). No proliferative response was observed after stimulation with BVDV type 2 in any of the DNA-vaccinated calves (data not shown).

At week 16, after the introduction of the challenge virus, the level of cell proliferation dropped during the first week of challenge for all challenged animals, and then increased until it returned to approximately the pre-challenge baseline. No significant differences in the pattern or magnitude of the response were seen among the groups of DNA- or mock-vaccinated animals after challenge.

### **Nasal secretion neutralizing antibodies to BVDV after challenge**

There was no evidence of neutralizing antibodies to BVDV in nasal secretions from any of the animals during the vaccination period. Nevertheless,



during the challenge period there was a significant seroneutralizing mucosal response in animals vaccinated with plasmid DNA pCMVigp53 (Table 2) as compared to the mock-vaccinated animals. Only DNA-vaccinated animals showed evidence of neutralizing antibody in nasal secretion after challenge. No mucosal responses (SN titer < 4) were observed in the 3 weeks following challenge in mock-vaccinated animals or in unvaccinated, unchallenged control animals.

### **Immune responses to heterologous virus**

To evaluate heterotypic immune responses induced by DNA vaccination against type 1 virus, we measured the responses to a cytopathic type 2 strain (BVDV/125). There was no evidence of serum neutralizing antibodies (SN titer < 4) to type 2 strain 125 in any of the animals during the vaccination period. However, after challenge, memory responses were observed by the production of neutralizing antibodies to the type 2 virus. Beginning with the measurements at 14 days after challenge, all DNA-vaccinated animals showed a marked increase in serum neutralizing antibody titer (Table 3). The titers of both N-DNA and L-DNA vaccinates increased from undetectable at the time of challenge to peak at 3 weeks post-challenge. However, the titers were at least 32-fold lower than the titers obtained with the homologous virus. Mock-vaccinated and unvaccinated, unchallenged control animals remained negative (SN titer < 4) for BVDV type 2 during the challenge period.

There was also evidence of nasal secretion neutralizing antibodies to type 2 strain 125 in DNA-vaccinated animals (Table 2). Only DNA-vaccinated animals showed the evidence of neutralizing antibody in nasal secretion after

challenge. Once again, the titers were considerably lower for the heterologous virus. No mucosal responses (SN titer < 4) were observed to the type 2 strain in mock-vaccinated animals or in unvaccinated, unchallenged control animals after the challenge

### **Evidence of protection in DNA-vaccinated calves**

Following challenge with a BVDV type 1 virus (BVDV/NY-1), the animals were assessed for evidence of disease on the basis of a composite clinical score (Table 4). Due to the small number of animals in the experiment, the results were assessed per animal rather than as an average (Fig. 2). In mock-vaccinated animals, the symptoms occurred as two peaks at ~ day 4 and ~ day 7. In N-DNA-vaccinated animals, the results show that one calf had no signs of disease throughout the challenge period and appeared to be completely protected. The remaining N-DNA-vaccinated animals showed reduced levels of clinical signs compared with the controls indicating partial protection from development of disease. In both animals, the first peak of symptom severity was reduced and the second completely disappeared. L-DNA-vaccinated calves appeared to be unprotected and showed similar patterns of disease severity and duration to the mock-vaccinated animals after challenge (data not shown).

## Discussion

Both MLV and inactivated virus vaccines have been used in attempts to control BVDV. As with similar viruses, such vaccines have not been completely successful because of the considerable instability of the virus genome and a lack of understanding of the mechanism of the protective immune response. New approaches to vaccine technology are necessary and one of the most promising has been the recent development of genetic vaccines. These have been made possible by advances in DNA technology and our understanding of the basic genetics of BVDV (Donis, 1995).

We show here, for the first time, that a DNA vaccine encoding the BVDV (type 1) major glycoprotein E2 can induce both humoral and cellular immune responses, and provide complete or partial protection after challenge infection in cattle.

Only a few other DNA vaccines have been developed for protection of large animals, probably because of the technical and financial difficulty in using large enough numbers of animals. However, DNA vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PPRS) were shown to protect pigs against development of viremia and lung lesions (Pirzadeh & Dea, 1998). Protection of pigs against pseudo-rabies virus, the causative agent of Aujeszky's disease, has also been reported (Gerdtz *et al.*, 1997). In bovine species, DNA constructs encoding bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein D were shown to induce an immune response that partially protected cattle from respiratory disease (Cox *et al.*, 1993). As with our study, this research group also investigated the effects of different routes of DNA immunization and reported that intradermal delivery was more effective than an intramuscular

injection in generating a protective response against BHV-1 as monitored by a reduction in clinical signs of disease (Van Drunen Little-Van den Hurk *et al.*, 1998). In the present work, we chose to use intramuscular injection because this technique is already widely used and well accepted by practitioners in the field. However, in an attempt to investigate the effect of changes in DNA presentation, plasmid DNA was used as naked DNA (N-DNA) or was entrapped in cationic liposomes (L-DNA) which have previously shown some promise in genetic immunization studies of small animals (Donnelly *et al.*, 1997).

Overall, the results show that animals immunized with the plasmid pCMVigp53, either in a liposome formulation or as naked DNA, developed an immune response against BVDV. However, there were significant differences between the responses to N-DNA and L-DNA. N-DNA-immunized animals were partly protected from challenge. In contrast, the L-DNA-vaccinates showed no significant protection. The small numbers (3) of animals preclude a quantitative evaluation of the protection but it is significant that in an out-bred population one N-DNA-vaccinated animal was completely protected and two were partially protected (50% reduction in clinical symptoms and duration of symptoms). Clinical signs of disease showed a typical biphasic response with an initial peak at 4 days followed by a drop to low levels at day 6 and a second significant peak at day 7 or 8. The partially protected animals had reduced disease signs for the first peak and no second peak of symptoms. These observations are all the more surprising when pre-challenge seroneutralizing results are taken into account. Until recently, it has been assumed that BVDV protection in cattle is almost exclusively due to the production of seroneutralizing antibodies. However, the L-DNA-immunized animals in this

study all produced seroneutralizing antibodies in the vaccination period. Yet these animals were not protected. A similar examination of the results for N-DNA-immunized animals shows that two of the three calves produced only a low level of seroneutralizing response during the vaccination period and the third one had titers equivalent to those of the L-DNA vaccinates. This latter observation correlates well with the protection results since the high titer animal was the one that was completely protected. The confusing lack of correlation between L-DNA and N-DNA protection and antibody titers is in some way resolved when the cell proliferation results are included in the scheme. Once again the results vary considerably between animals and between treatment groups yet several distinct conclusions can be drawn. The N-DNA-immunized animals all showed distinctly higher levels of cell proliferation compared to the non vaccinated animals. The L-DNA vaccinates did not show this at all. The N-DNA animal that showed complete protection to virus challenge also demonstrated the highest cell proliferation results in addition to the high antibody titer. No quantitative conclusions can be assumed from the data but qualitatively, it can be hypothesized that for maximum protection, the vaccine must induce not only a seroneutralizing antibody but also a cellular response.

Previous reports on the potential role of cytotoxic T-cells in recovery from infection with BVDV have demonstrated that specific depletion of bovine CD8 cells had no effect on infection, but following depletion of CD4 cells, viremia was prolonged (Howard *et al.*, 1989). Other groups have suggested that IM injection of DNA vaccines in mice resulted in predominantly Th1-like responses whereas intradermal immunization has yielded primarily Th2 responses (Pertmer *et al.*, 1996). In contrast, a different study indicated that this difference

in T-cell response profile was more dependent on the method of injection than the route of inoculation (Feltquate *et al.*, 1997). Our results appear to confirm the important effect of the route of DNA presentation on the direction of the immune response and the T-cell response. In addition, if the CD8 depletion experiments could be repeated in DNA-vaccinated cattle, they would confirm the major role for a cellular response involving CD4 in the resolution of BVDV infection.

The BVDV/E2 gene used in our DNA construct was cloned from the BVDV cytopathic type 1 NADL strain. In the field, several different genotypes of BVDV are circulating in the cattle population, thus we also measured the reactivity to a cytopathic type 2 strain (BVDV/125) to evaluate heterotypic immune responses induced by DNA vaccination. As demonstrated in Table 3, the challenge induced a strong memory response in the production of serum neutralizing antibodies (titers were 256-fold higher than mock vaccinates) to BVDV type 2. Our finding that a type 1 E2 gene will induce neutralizing antibody to type 2 virus is an interesting observation considering the high variability between the two E2 sequences. This is more understandable if one takes into account that all E2-specific seroneutralizing antibodies obtained to date are configuration specific. It is quite likely that despite sequence differences between the E2 of different strains, the configurations of some neutralizing epitopes are similar. An ideal BVDV vaccine should thus be able to induce antibodies capable of neutralizing a wide variety of viral genotypes in a heterotypic response if the antigen expresses an E2 consensus configuration.

BVDV infects cattle at mucosal surfaces, primarily the respiratory tract (Bolin, 1990). Thus, mucosal immunity is believed to play an important role in

protection against BVDV infection. After viral challenge, we examined the development of BVDV specific antibodies in nasal secretions. Three weeks after challenge, mucosal neutralizing antibodies were observed only in DNA-vaccinated animals. Significantly, these neutralizing antibodies were observed at similar titers after vaccination with both N-DNA and L-DNA. However, only N-DNA-vaccinated animals showed some level of protection. It should be noted that nasal virus-neutralizing antibodies do not normally appear in nasal secretions in a primary response until at least 4 weeks after infection. Thus, nasal secretion neutralizing antibodies are probably more important for secondary and memory responses. Their actual role in protection needs further investigation in the light of their lack of effect in L-DNA vaccinated animals.

In summary, we have demonstrated that vaccination of cattle using a DNA construct encoding only the E2 protein of BVDV was able to induce both neutralizing antibody production and lymphocyte proliferation. These results suggested that humoral and cellular immune responses are implicated in the development of a protective response in cattle. This study showed the great potential of genetic vaccines for the control of BVDV.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Nadine Bouchard, Boby Makabi-Panzu, Raymond Ethier and Marian Sajna for excellent technical assistance. The authors would also thank the "Ferme Rolland Therrien et Fils" for their assistance in identifying and obtaining BVDV-free calves. Financial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## References

- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965).** Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
- Bolin, S. R. (1990).** The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. *Vet. Med.* **85**, 1124-1132.
- Bolin, S. R. (1995).** Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.* **11**, 615-625.
- Collett, M S., Larson, R., Belzer, S. K., & Retzel, E. (1988).** Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200-208.
- Cox, G .J. M., Zamb, T. J., & Babiuk, L. A. (1993).** Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* **67**, 5664-5667.
- Donis, R. O., Corapi, W., & Dubovi, E. J. (1988).** Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **69**, 77-86.
- Donis, R. O. (1995).** Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.* **11**, 393-423.
- Donnelly, J. J., Ulmer J. B., Shiver J. W., & Liu, M. A. (1997).** DNA vaccines. *Ann. Rev. Immunol.* **15**, 617-648.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop J. P., Ringold, G. M., & Danielsen, M. (1987).**



Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7413-7417.

**Feltquate, D. M., Heaney, S., Webster, R. G., & Robinson, H. L. (1997).** Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* **158**, 2278-2284.

**Gerdts, V., Jöns, A., Makoschey, B., Visser, N., & Mettenleiter, T. C. (1997).** Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* **78**, 2139-2146.

**Harpin, S., Elahi, S. M., Cornaglia, E., Yolken, R. H., & Elazhary, Y. (1995).** The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhea virus. *Arch. Virol.* **140**, 1285-1290.

**Harpin, S., Talbot, B., Mbikay, M., & Elazhary, Y. (1997).** Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein gp53 (E2). *FEMS Microbiol. Lett.* **146**, 229-234.

**Hasset, D., & Whitton, J. L. (1996).** DNA immunization. *Trends in Microbiol.* **4**, 307-312.

**Horzinek, M. C. (1991).** Pestiviruses-taxonomic perspectives. *Arch. Virol. Supplement* **3**, 55-65.

**Howard, C. J., Clarke, M. C., & Brownlie, J. (1989).** Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhea virus by passively acquired antibody. *Vet. Microbiol.* **19**, 195-203.

**Liess, B., Orban, S., Frey, H.R., Trautwien, G., Wiefel, W., & Blindow, H. (1984).** Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhea (BVD) vaccine virus in cattle. *Zbl. Vet. Med. B* **31**, 669-681.

- Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J., & Tijssen, P. (1994).** Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreak and high mortalities. *Virology* **203**, 260-268.
- Pertmer, T. M., Roberts, T. R., & Hayes, J. R. (1996).** Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* **70**, 6119-6125.
- Pirzadeh, B., & Dea, S. (1998).** Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **79**, 989-999.
- Ridpath, J. F., Bolin, S. R., & Dubovi, E.J . (1994).** Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* **205**, 66-74.
- Robinson, H. L., Hunt, L. A., & Webster, R. G. (1993).** Protection against lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* **11**, 957-960.
- Roth, J. A., & Kaeberle, M. L. (1983).** Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhea virus with or without administration of ACTH. *Am. J. Vet. Res.* **44**, 2366-2372.
- Schultz, R. D. (1993).** Certain factors to consider when designing a bovine vaccination program. *In Proc. 26th Ann. Conv. Am. Assoc. of Bovine Practitioners* p.19.
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. & Hoffman, S. L. (1994).** Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **9**, 9866-9870.

**Siegrist, C. A., & Lambert, P. H. (1997).** Immunization with DNA vaccines in early life: advantages and limitations as compared to conventional vaccines. *Sem. Immunopathol.* **19**, 233-243.

**Van Drunen Little-van den Hurk, S., Braun, R. P., Lewis, P. J., Karvonen, B. C., Baca-Estrada, M. E., Snider, M., McCartney, D., Watts, T., & Babiuk, L. A. (1998).** Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *J. Gen. Virol.* **79**, 831-839.

**Xiang, Z. Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W. H., Cheng, J., & Ertl, H. C. J. (1994).** Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* **199**, 132-140.

**Table 1** Development of serum neutralizing antibodies to BVDV/Singer strain in DNA-vaccinated calves.

Treatment a	SN titers <sup>b</sup>								
	Vaccination period <sup>c</sup>					Challenge period <sup>d</sup>			
	0 wk	6 wk	8 wk	10 wk	12 wk	16 wk	17 wk	18 wk	19 wk
L-DNA-1	<4	<4	32	32	32	32	512	16 384	16 384
L-DNA-2	<4	<4	16	8	16	8	32	4096	8192
L-DNA-3	<4	<4	64	32	64	16	128	16 384	16 384
N-DNA-1	<4	<4	<4	4	4	<4	64	8192	8192
N-DNA-2	<4	<4	<4	<4	<4	<4	16	4096	4096
N-DNA-3	<4	<4	64	64	64	32	512	16 384	32 768
Mock	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	8	64
Mock	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	16	128
Mock-U	nd	nd	nd	nd	nd	<4	<4	<4	<4
Mock-U	nd	nd	nd	nd	nd	<4	<4	<4	<4

a 3 calves received 1 mg of pCMVigp53 in a liposome preparation (L-DNA); 3 calves received 1 mg of pCMVigp53 as naked DNA (N-DNA); 2 calves received 1 mg of control plasmid pCMVintron (mock) and 2 calves were unvaccinated and unchallenged control animals (mock-U).

b Virus neutralization (SN) titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution that completely inhibited viral cytopathic effect in the 2 test well cultures.

c Calves were injected on weeks 0, 3, and 6; nd: not done.

d Calves were challenged intranasally on week 16 with 1.2 ml of  $10^{7.9}$  TCID<sub>50</sub>/2ml of BVDV/NY-1.

**Table 2** Nasal secretions neutralization antibodies to BVDV/Singer and BVDV/125 after challenge<sup>a</sup>.

Treatment <sup>b</sup>	SN titer <sup>c</sup>	
	BVDV/Singer	BVDV/125
L-DNA-1	512	16
L-DNA-2	128	<4
L-DNA-3	512	16
N-DNA-1	512	8
N-DNA-2	128	<4
N-DNA-3	512	16
Mock	<4	<4
Mock	<4	<4
Mock-U	<4	<4
Mock-U	<4	<4

<sup>a</sup> Calves were challenged intranasally with 1.2 ml of  $10^{7.9}$  TCID<sub>50</sub>/2ml of BVDV/NY-1 and nasal secretions were collected on day 21 post-challenge.

<sup>b</sup> 3 calves received 1 mg of pCMVigp53 in a liposome preparation (L-DNA); 3 calves received 1 mg of pCMVigp53 as naked DNA (N-DNA); 2 calves received 1 mg of control plasmid pCMVintron (mock) and 2 calves were unvaccinated and unchallenged control animals (mock-U).

<sup>c</sup> Virus neutralization (SN) titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution that completely inhibited viral cytopathic effect in the 2 test well cultures.

**Table 3** Development of serum neutralizing antibodies to BVDV/125 strain from DNA-vaccinated calves after challenge<sup>a</sup>.

Treatment <sup>b</sup>	0d	SN titers <sup>c</sup>		
		1	2	3
L-DNA-1	<4	16	512	512
L-DNA-2	<4	<4	128	128
L-DNA-3	<4	<4	256	128
N-DNA-1	<4	<4	64	64
N-DNA-2	<4	<4	128	128
N-DNA-3	<4	32	512	1024
Mock	<4	<4	<4	<4
Mock	<4	<4	<4	<4
Mock-U	<4	<4	<4	<4
Mock-U	<4	<4	<4	<4

<sup>a</sup> 3 calves received 1 mg of pCMVigp53 in a liposome preparation (L-DNA); 3 calves received 1 mg of pCMVigp53 as naked DNA (N-DNA); 2 calves received 1 mg of control plasmid pCMVintron (mock) and 2 calves were unvaccinated and unchallenged control animals (mock-U).

<sup>b</sup> Calves were challenged intranasally with 1.2 ml of  $10^{7.9}$  TCID<sub>50</sub>/2ml of BVDV/NY-1.

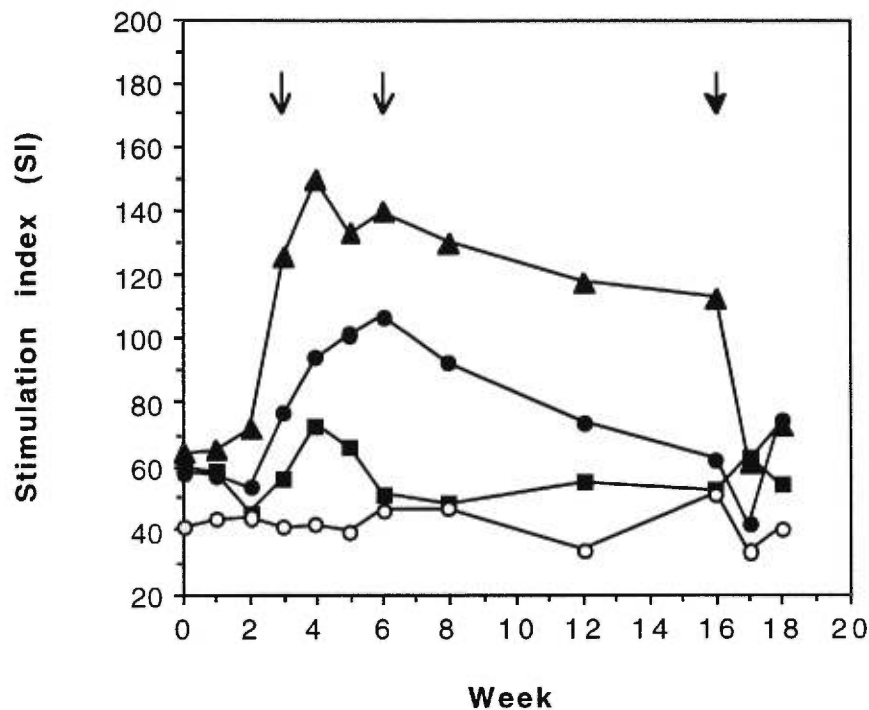
<sup>c</sup> Virus neutralization (SN) titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution that completely inhibited viral cytopathic effect in the 2 test well cultures.

<sup>d</sup> Week postchallenge.

**Table 4** Clinical signs assessment<sup>a</sup>.

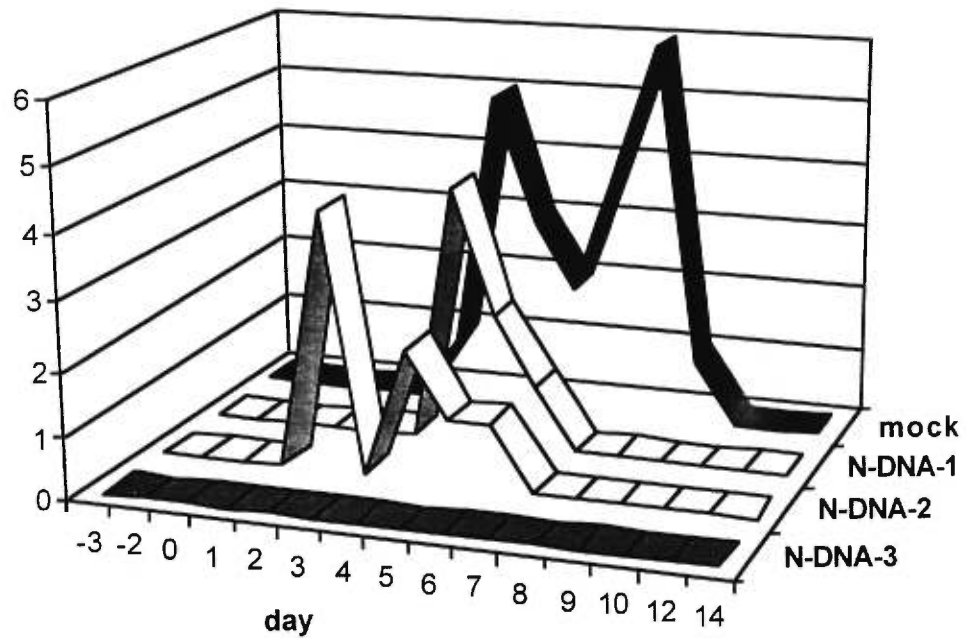
<b>Clinical sign</b>	<b>score</b>	<b>Clinical sign</b>	<b>score</b>
Respiration		Attitude	
severe dispnea	4	dead, comatose	4
mild dispnea	3	severe depression	3
short and rapid	2	moderate depression	2
cough	1	mild depression	1
normal	0	normal	0
Nasal discharge		Gastrointestinal (GI)	
thick, crusted	4	bloody diarrhea	4
purulent	3	watery diarrhea	3
muco-purulent	2	loose feces	2
serous	1	pasty feces	1
normal	0	normal	0
Eyes		Body temperature	
purulent	3	>41°C	4
serous	2	40.5-40.9°C	3
watery	1	40.0-40.4°C	2
normal	0	39.5-39.9°C	1
		<39.5°C	0

<sup>a</sup> The clinical score represents the sum of all values associated with the assessment of clinical signs: i.e., Respiration + Nasal discharge + Eyes + Attitude + GI + Body temperature.



**Figure 1** *In vitro* proliferative response of bovine MN cells from N-DNA-vaccinated calves. MN cells from calves were stimulated with BVDV/Singer type 1 strain. SI are plotted individually for the N-DNA group (calf 1(■); calf 2 (●), and calf 3 (▲)) and as the mean score for the two control calves (mock; ○). Arrows denote times of vaccination. The full arrow indicates time of challenge.





**Figure 2** Clinical score from N-DNA-vaccinated calves after challenge. The animals were challenged intranasally with 1.2 ml of  $10^{7.9}$  TCID<sub>50</sub>/2ml of BVDV/NY-1. Clinical signs were observed daily from 3 days prior to challenge to 14 days after challenge. Clinical scores were assigned according to Table 2. Clinical signs are plotted individually for the N-DNA group and as the mean score for the two control calves (mock).

# CHAPITRE 5

Dans le chapitre précédent, la protection recherchée était via une immunisation contre une seule protéine, soit la protéine E2. Par contre, dans ce chapitre, l'objectif était d'évaluer si une immunisation multigénique pourrait améliorer la réponse immune protectrice chez le bovin.

L'hypothèse générale était que si nous utilisons des gènes codants pour des protéines conservées, ceci améliorerait-elle la réponse cellulaire ?

Pour ce faire, outre l'utilisation de la protéine E2, trois autres protéines ont été ajoutées lors de cette expérience, soit les protéines Erns, E1 et NS3. Les protéines Erns et E1 sont des protéines de structure relativement bien conservées parmi les souches de BVD. Tandis que la protéine NS3 est une protéine non-structurale, et étant la protéine la mieux conservée parmi les protéines de BVD.

En bref, cette expérience ne nous a pas permis d'évaluer si en effet une immunisation multigénique pouvait améliorer les réponses cellulaires et par conséquent, la protection. Par contre, cette expérience nous a permis de reproduire les réponses humorales neutralisantes tant sérique que mucoale observées dans l'expérience du chapitre précédent.

## **CHAPITRE 5**

### **Expérience #4**

**Immunisation multigénique chez le bovin par l'injection de  
plasmides  
codants pour les protéines Erns, E1, E2 et NS3  
du virus de la diarrhée virale bovine**

## Introduction

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est un important agent pathogène de l'industrie du bovin causant d'énormes pertes économiques. Récemment, un variant antigéniquement et génotypiquement différent des souches classiques de BVDV a été associé à la sévère épidémie qu'a souffert l'industrie du bovin au Canada.

La vaccination par ADN représente un nouveau moyen pour l'expression d'antigène *in vivo* afin de générer à la fois une immunité humorale et cellulaire. Les vaccins à ADN impliquent le gène codant pour la protéine immunogène d'un pathogène au lieu de la protéine même, et ce, sans la participation de vecteurs viraux. Suite à l'injection d'ADN plasmidique, les cellules de l'hôte acquièrent l'ADN et expriment par la suite la protéine, donc l'antigène. Cet antigène mène à l'induction d'une réponse immunitaire chez l'animal hôte. Généralement, l'immunisation par ADN se concentre sur une seule protéine afin de générer une réponse immune protectrice. Afin d'élargir la fenêtre de protection, certains groupes de recherche prônent une immunisation centrée sur l'injection d'un mélange plasmidique codant pour plusieurs protéines différentes ou par plusieurs copies différentes d'un même gène. Ceci a pour effet de présenter au système immunitaire de l'hôte, une panoplie d'épitopes pouvant ainsi contrer de façon encore plus efficace, les diversités antigéniques des souches virales.

Dans une étude précédente (Harpin *et al.*, 1998), nous avons démontré que suite à un challenge viral chez des bovins immunisés via l'injection d'un plasmide codant pour la protéine E2 (protéine cible pour la production d'anticorps neutralisants), une protection a été générée. Dans cette expérience, nous avons analysé la réponse humorale et cellulaire induite suite à une immunisation chez le bovin d'un cocktail plasmidique codant pour la protéine E2 et aussi pour 3 protéines, généralement bien conservées entre les différentes souches de BVDV, soit les protéines Erns, E1 et NS3.

## **Matériels et Méthodes**

### **Cellules et virus**

Des cellules de rein de bovin (Madin-Darby bovine kidney; MDBK) libres de BVDV ont été cultivées dans le milieu essentiel minimum de Earle (MEM, Gibco BRL), supplémenté en gentamycine (50µg/ml, Sigma) et de sérum de cheval (10%; Gibco BRL). La lignée cellulaire COS-7 (ATCC CRL-1651) a été mise en culture dans le milieu Dulbecco modified Eagle medium (DMEM, GIBCO BRL), auquel 10% de sérum foetal bovin (FBS) a été ajouté.

Dans cette étude, la souche de BVDV/Singer de type 1 et la souche 125 de type 2 ont été obtenues du National Veterinary Service Laboratory of the United States Department of Agriculture (NVSL-USDA; Ames, Iowa, USA). La souche de challenge de type 1 (NVSL-USDA BVDV/NY-1 lot # 97-12) a été préparée par le USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Center for Veterinary Biologics, in Ames IA, USA.

### **Clonage des gènes Erns, E1 et NS3 du BVDV**

Les méthodes d'extraction d'ARN et de synthèse d'ADNc de la souche NADL de BVDV ont été précédemment décrites (Harpin *et al.*, 1995). Le clonage et l'expression de la glycoprotéine E2 du BVDV ont été décrits précédemment (Harpin *et al.*, 1997, Harpin *et al.*, 1998) Les ADNcs ainsi synthétisés ont servi de substrat pour l'amplification des gènes Erns, E1 et NS3 par la technique de polymérisation en chaîne (PCR). Les gènes ainsi amplifiés ont été clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pCMVintron.

Tous les plasmides utilisés dans cette étude ont été purifiés selon le protocole de purification plasmidique de Qiagen (Mississauga, ONT, Canada). Les ADNs dissouts dans une saline tamponnée en phosphate (PBS) à une concentration finale de 1 mg/ml ont été gardés à -20°C jusqu'au moment de l'injection.

## Validation des protéines codées par les fragments d'ADNc produits

Les cellules COS-7 ont été transfectées par lipofection (LipofectAMINE; Gibco BRL) avec le plasmide pCMVINS3 selon les instructions des manufacturiers. Quarante-huit heures après le début de la transfection, les cellules ont été recueillies par grattage et lysées par une solution de PBS-NP40 (1%) suite à une incubation de 2 heures à 37°C. Le mélange a été par la suite centrifugé afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été soumis à un test d'ELISA-sandwich afin de détecter la protéine NS3 du BVDV. Des cellules transfectées avec le plasmide pCMVintron ont servi de contrôle négatif.

La validité des séquences codant pour les protéines Erns et E1 a été analysées par un système d'expression procaryote. Les fragments d'ADN correspondants au gènes Erns et E1 ont été clonés dans le vecteur d'expression procaryotique pGEX-4T2 (Pharmacia), une protéine de fusion comprenant la glutathione S-transférase (GST) jointe aux protéines du BVDV a été exprimée dans *Escherichia coli* et visualisée sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Brièvement, après transformation bactérienne, une colonie est prélevée et inoculée dans 2 ml de 2X YTA et incubée à une température de 37°C. Lorsque la culture a atteint une densité correspondant à 0.6-0.8 A<sub>600</sub>, 2 ul d'IPTG (100 mM) y est ajoutée et l'incubation se poursuit pour 2 heures additionnelles. Puis, 20 ul de culture est prélevée et 4 ul de tampon de remplissage (6X; loading buffer) y est mélangée. Cette mixture est vortexée brièvement et chauffée à une température de 100°C pour 5 minutes. Finalement, 10 ul est analysée sur SDS-PAGE. Le gel est coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les patrons protéiques. Une culture contrôle transformée par le vecteur pGEX-4T-2 exprimant la protéine GST de 29 kDa a été incluse.

## Immunsation et challenge

Des veaux libres de BVDV et d'anticorps spécifiques au BVDV, âgés de 12 à 14 mois ont été utilisés dans cette étude. Les animaux ont été immunisés

par voie intramusculaire (IM) avec une solution plasmidique contenant 1 mg de chaque plasmide codant pour les protéines de BVDV tandis que les veaux servant de contrôle ont reçu une injection de 1 mg de plasmide pCMVintron. Cinq veaux ont été vaccinés avec les plasmides pCMViErns, pCMViE1, pCMViE2, et pCMViNS3, et trois veaux ont reçu le plasmide contrôle pCMVintron. Les injections de rappel ont été données aux semaines 3 et 6. Les échantillons sanguins ont été recueillis aux deux semaines.

Douze semaines après le début de l'expérience, les animaux ont été infectés par voie intranasale avec la souche de challenge BVDV/NY-1 ( $10^{7.9}$  TCID<sub>50</sub>/2ml). Un volume de 0.6 ml par narine a été administré à chaque animal. L'observation des signes cliniques a débuté 3 jours avant le début du challenge, et s'est poursuivie jusqu'au 14<sup>e</sup> jour post-challenge. Durant cette période, les échantillons sanguins requis pour la détection des anticorps et la prolifération lymphocytaire ont été recueillis aux jours -3, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, et 21. Des échantillons de sécrétions nasales ont été récoltés aux jours 0, 7, 14 et 21 post-challenge.

### **Titrage d'anticorps neutralisants**

Les échantillons (séras et sécrétions nasales) ont été préalablement inactivés à la chaleur (30 min à 56°C) afin de doser les anticorps neutralisants de BVDV. Deux cents TCID<sub>50</sub> de souches de BVDV (Singer ou 125) ont été préincubées pour 1 h à 37°C à des échantillons préalablement dilués (dilution doublante débutant à 1/8). Cette mixture (50 µl) a été ajoutée en duplicata à des puits contenant des cellules MDBK confluentes à 80-90% pour 1 h à 37°C. Cent cinquantes µl de milieu MEM est par la suite ajouté à chaque puits. Finalement, les plateaux sont incubés à 37°C pendant 4 jours. L'inverse de la dilution qui démontre une inhibition de l'effet cytopathogène dans un des deux puits, est considéré comme étant le titre de séroneutralisation virale.

## **Blastogénèse des cellules mononucléaires de bovin**

Un enrichissement de cellules leucocytaires de bovin a été préalablement obtenu par centrifugation des échantillons sanguins. Les cellules mononucléaires (CM) ont été purifiées par un coussin d'Histopaque 1.083 (Sigma), et resuspendues à une concentration de  $3 \times 10^6$ /ml dans le milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% de FBS, de 2mM de sodium pyruvate, de 2mM de glutamine et de 50 $\mu$ g/ml de gentamicine. Des triplicatas de CM ( $6 \times 10^5$  cells par puit) ont été incubées dans un environnement contenant 5% CO<sub>2</sub> à 37°C, et ce, en présence des souches Singer ou 125. Des dilutions de 1/10, 1/20 et 1/40 pour chacune des solutions virales ont été utilisées. Le titre viral pour les souches Singer et 125 sont respectivement  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> et  $10^{6.2}$ TCID<sub>50</sub>. Afin de vérifier la capacité proliférative des cellules mononucléaires bovines, une stimulation avec le mitogène Concanavaline A (ConA; 2 $\mu$ g/ml) a été ajouté à titre de contrôle. Après 5 jours d'incubation, les cellules ont été mises en présence de 0.2 $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]thymidine (6.7Ci/mM, ICN) pour une période de 6 heures. Les cellules ont été récoltées par la suite avec un cell harvester de type Skatron (Flow Laboratories, Rockville MD). L'indice de stimulation (SI) est calculé selon la formule suivante: SI = moyenne des comptes par minute des puits stimulés par l'antigène virale / moyenne des comptes par minute des puits contenant seulement les cellules.



## Résultats

### Construction des vecteurs plasmidiques exprimant les gènes de BVDV

Le fragment de PCR de 2227 paires de base contenant le gène NS3 a été premièrement inséré dans le plasmide pCRII (InVitrogen), pour être ensuite sous-cloné, dans la bonne orientation, dans les vecteurs d'expression eucaryote pcDNA3 et pCMVintron, créant respectivement les plasmides pCMVNS3 (vecteur sans intron) et pCMViNS3 (vecteur avec intron). Afin d'évaluer l'impact de l'intron dans les constructions plasmidiques, des cellules COS-7 ont été transfectées avec les plasmides pCMVNS3 et pCMViNS3. Après la lyse cellulaire, les lysats ont été soumis au test d'ELISA afin de déterminer leur niveau, en densité optique (DO), de la protéine NS3. Une augmentation en DO de l'ordre de deux fois a été observée chez les cellules transfectées avec pCMViNS3 comparée à celles transfectées avec le plasmide pCMVNS3 (Figure 1). Suite à ce résultat, l'intron a été ajouté à toutes les nouvelles constructions plasmidiques.

Les amorces dites «forward» pour l'amplification des gènes Erns et E1 contiennent le site de restriction de l'enzyme *Bam*HI et la séquence consensus de Kozak pour l'initiation de la traduction (Kozak M 1986). Leurs amorces dites «reverse» contiennent le site de restriction de l'enzyme *Xba*I et une séquence représentant le codon d'arrêt de la transcription. Les produits de PCR des gènes Erns et E1 ont été clivés par *Bam*HI et *Xba*I et insérés dans le vecteur pCMVintron, résultant respectivement aux plasmides pCMViErns et pCMViE1.

Afin de vérifier l'identité des produits d'expression pour les gènes Erns et E1, ces gènes ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression procaryote pGEX-4T-2. La validité du produit d'expression du gène d'intérêt est associée à la taille protéique estimée via une fusion avec la GST. Considérant que la GST a un poids moléculaire de 29 kDa, il a été estimé par la séquence du fragment cloné que le poids des protéines déduites pour Erns et E1 sont respectivement 26.6 kDa et 23.5 kDa. Ceci représente donc des protéines de

fusion de l'ordre d'environ de 55.6 kDa et de 52.5 kDa. A la Figure 2, on peut observer qu'effectivement, des protéines de fusion d'environ de 55.6 kDa et de 52.5 kDa sont présentes aux puits 3 et 4 correspondant respectivement aux gènes Erns et E1 du BVDV.

### **La réponse humorale séroneutralisante**

Un des cinq veaux immunisés suite à l'injection d'un cocktail plasmidique codant pour les protéines Erns, E1, E2 et NS3 a développé des anticorps neutralisants seulement contre la souche BVDV/Singer de type 1, et ce, débutant à la semaine 10 (Figure 3). Aucun des animaux contrôles n'ont développé d'anticorps neutralisants durant la période d'immunisation. Après l'introduction du virus de challenge, une réponse secondaire, en terme d'anticorps neutralisants a été générée chez tous les animaux vaccinés avec le cocktail plasmidique, tandis qu'une réponse de type primaire a été observée chez les animaux contrôles (Figure 3). Une faible induction d'anticorps neutralisants contre la souche BVDV/125 de type 2 a été observée après challenge, et ce, chez seulement deux des cinq animaux vaccinés (résultats non illustrés).

La présence d'anticorps neutralisants dans les sécrétions nasales a été analysée. Aucun titre en neutralisation n'a été observé durant la période d'immunisation, par contre, deux semaines après challenge, tous les animaux vaccinés ont développé un titre d'anticorps neutralisant, et ce, seulement contre la souche BVDV/Singer de type 1 (Figure 4).

### **La réponse proliférative des cellules mononucléaires bovines**

Les cellules mononucléaires bovines provenant des animaux des groupes contrôles et vaccinés ont été mises en présence des souches de BVDV Singer et 125. Aucun signe de prolifération cellulaire n'a été observé chez les animaux vaccinés avec le cocktail plasmidique (résultats non illustrés). La Figure 5 démontre que, suite à une stimulation par la Con A, la capacité

proliférative des cellules mononucléaires bovines pour les deux groupes d'injection, a drastiquement diminué, et ce, dès la première semaine de l'expérience. Ce niveau de réponse proliférative a persisté durant toute la période d'immunisation.

### **Observation des signes cliniques suite au challenge viral**

Suite à l'infection des veaux par une souche de type 1 (BVDV/NY-1), le développement des signes cliniques chez ses animaux a été observé et répertorié selon la charte illustrée au Tableau 1. En général, les animaux ont développé surtout des manifestations subcliniques, donc difficile à répertorier. Le seul animal qui a développé des signes cliniques apparents comme par exemple, une respiration rapide et des écoulements de sécrétions nasales, était membre du groupe contrôle. La température corporelle de l'animal a été le seul paramètre démontrant une certaine tendance différentielle entre les groupes d'injection. Le groupe d'animaux de contrôle, donc non-vaccinés, a développé en moyenne une augmentation en température corporelle plus élevée que le groupe d'animaux vaccinés, et ce, entre les jours 3 et 8 post-challenge (Figure 6). Par contre, cette différence était seulement significative au jour 8 post-challenge ( $p < 0.05$ ). Selon la charte d'évaluation des signes cliniques, une température corporelle au-delà de  $39.5^{\circ}\text{C}$  était considérée comme étant un état fiévreux pour l'animal.

## Discussion

En général, les vaccins classiques utilisés aujourd'hui pour contrer les infections causées par le BVDV semblent inadéquats à faire face aux variations antigéniques et génotypiques. Dans une étude précédente, nous avons pu démontrer que des bovins avaient généré un niveau de protection par un challenge viral. Ces animaux avaient été immunisés via une injection plasmidique codant pour la protéine E2 du BVDV. Nous avons ensuite posé l'hypothèse suivante: est-ce que le niveau de protection serait amélioré si l'immunisation induite porterait sur l'action de plusieurs gènes au lieu d'un seul?

Bref, des bovins ont été vaccinés contre le BVDV par l'injection d'un mélange plasmidique codant pour les protéines Erns, E1, E2 et NS3. Une réponse humorale a été observée pré-challenge, et ce, chez 1 des 5 animaux vaccinés. Aucune prolifération des cellules mononucléaires n'a été induite durant la période d'immunisation. Du fait qu'un seul des animaux contrôles a démontré des signes cliniques apparents après challenge viral, aucune protection significative n'a pu être ainsi attribuée au groupe d'animaux vaccinés. Seule, l'analyse de la température corporelle prise après challenge semble démontrer une tendance différentielle entre les deux groupes d'immunisation.

Dans l'étude précédente (Harpin *et al.*, 1998), nous avons démontré que, suite à l'immunisation de bovin avec un plasmide codant pour la glycoprotéine E2, une blastogénèse des cellules mononucléaires des animaux DNA-vaccinés stimulées par la souche Singer du BVDV avait été observée. Dans cette présente expérience, aucune prolifération cellulaire n'a été observée. Par contre, grâce à l'activité mitogénique de la Con A, on a observé une baisse très significative de la capacité proliférative des cellules mononucléaires dès la première semaine de l'expérience. De plus, on avait remarquée que certains veaux avaient développés une diarrhée transitoire suite aux injections. Ces facteurs combinés montrent qu'une réaction inflammatoire mal définie pour

nous, s'est manifestée, et ce, chez les deux groupes d'injection sans exception, masquant probablement la réponse lymphoproliférative.

L'âge des animaux a probablement été un facteur limitant lors de l'évaluation de la protection induite par le développement des symptômes cliniques suite à l'infection virale par la souche de challenge. La capacité de cette souche à induire les signes cliniques associés à une infection par le BVDV n'est pas mise en cause, car le même lot de virus ait été utilisé simultanément pour une autre étude. En effet, les animaux contrôles ont tous, sans exception, développé des signes cliniques tels une respiration rapide, une température corporelle élevée, des écoulements nasaux, et de la diarrhée. Toutefois, ces veaux étaient âgés de 3 à 4 mois au moment du challenge, contrairement à ceux utilisés dans cette étude âgés de 15 à 16 mois. Il est par conséquent apparent que cette souche n'était pas assez virulente pour induire les symptômes chez des bovins plus âgés, et que, l'infection était probablement sub-clinique.

En conclusion, cette expérience ne nous a pas permis d'évaluer si une immunisation multigénique pouvait élargir la fenêtre de protection du bovin contre une infection par le BVDV. Néanmoins, cette étude a permis de confirmer qu'une immunisation via l'injection d'un plasmide codant pour la protéine E2 menait à une réponse mémoire suite à l'introduction du virus du BVD chez le bovin.

## Références

Harpin, S., Elahi, S. M., Cornaglia, E., Yolken, R. H., & Elazhary, Y. 1995. The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhea virus. *Arch. Virol.* 140: 1285-1290.

Harpin, S., Talbot, B., Mbikay, M., and Elazhary, Y. 1997. Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein gp53 (E2). *FEMS Microbiol. Lett.* 146: 229-234.

Harpin, S., Hurley, D. J., Mbikay, M., Talbot, B., and Elazhary, Y. 1998. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein E2. Soumis à *Vaccine*.

**Table 1** Charte d'évaluation des signes cliniques.

<b>Signes cliniques</b>	<b>score</b>	<b>Signes cliniques</b>	<b>score</b>
<b>Respiration</b>		<b>Attitude</b>	
sévère dyspnée	4	mort, comateux	4
légère dyspnée	3	sévère dépression	3
courte et rapide	2	moyenne dépression	2
toux	1	légère dépression	1
normale	0	normale	0
<b>Sécrétions nasales</b>		<b>Gastrointestinal (GI)</b>	
épaisse, croulée	4	diarrhée sanguinolante	4
purulente	3	diarrhée liquide	3
muco-purulente	2	féces molle	2
séreuse	1	féces pâteuse	1
normale	0	normale	0
<b>Yeux</b>		<b>Température</b>	
purulente	3	>41°C	4
séreuse	2	40.5-40.9°C	3
humide	1	40.0-40.4°C	2
normal	0	39.5-39.9°C	1
		<39.5°C	0

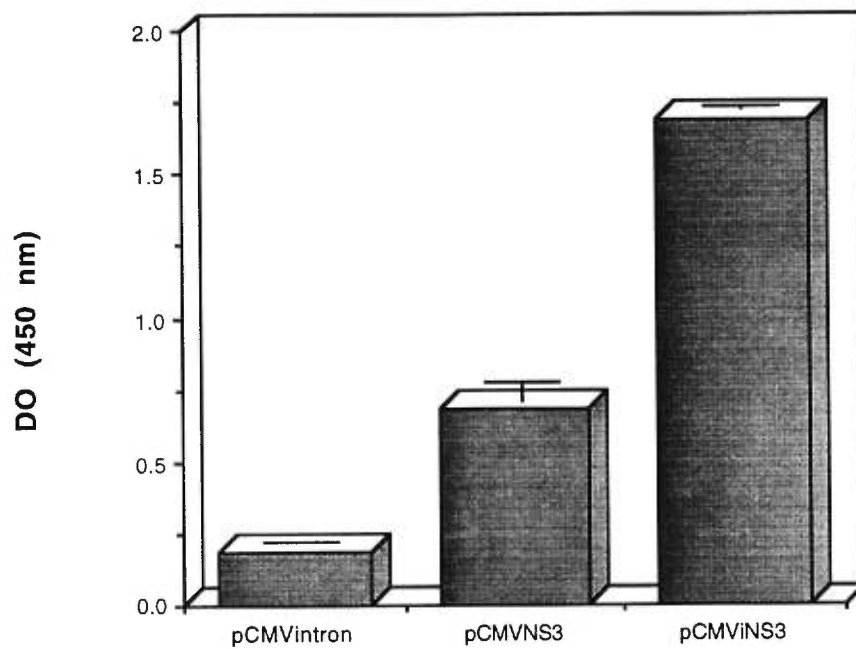


Figure 1. Expression du gène NS3 dans les cellules COS-7.



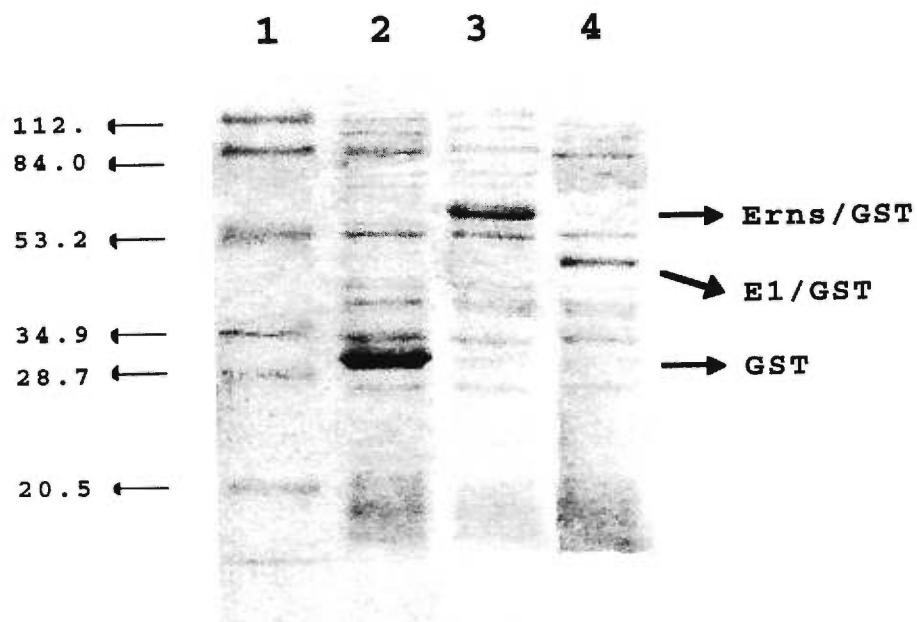


Figure 2. Visualisation, par SDS-PAGE, des protéines de fusion Erns/GST et E1/GST exprimées chez *Escherichia coli*. Puits 1: marqueur de poids moléculaire (kDa); 2: culture contrôle avec GST seule; 3: Erns fusionnée à la GST; 4: E1 fusionnée à la GST.

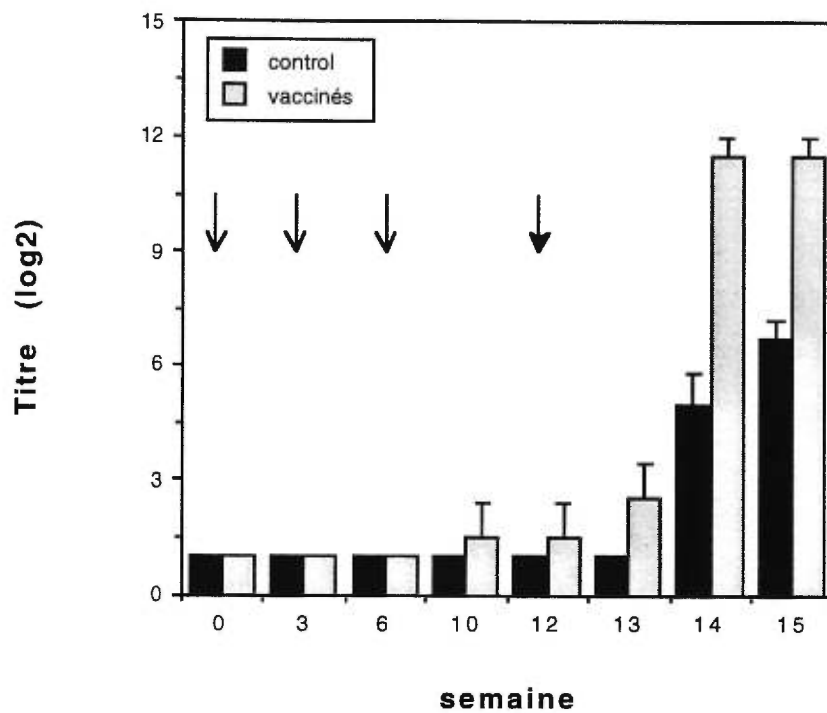


Figure 3. Cinétique de la réponse en anticorps neutralisants présents dans le sérum.

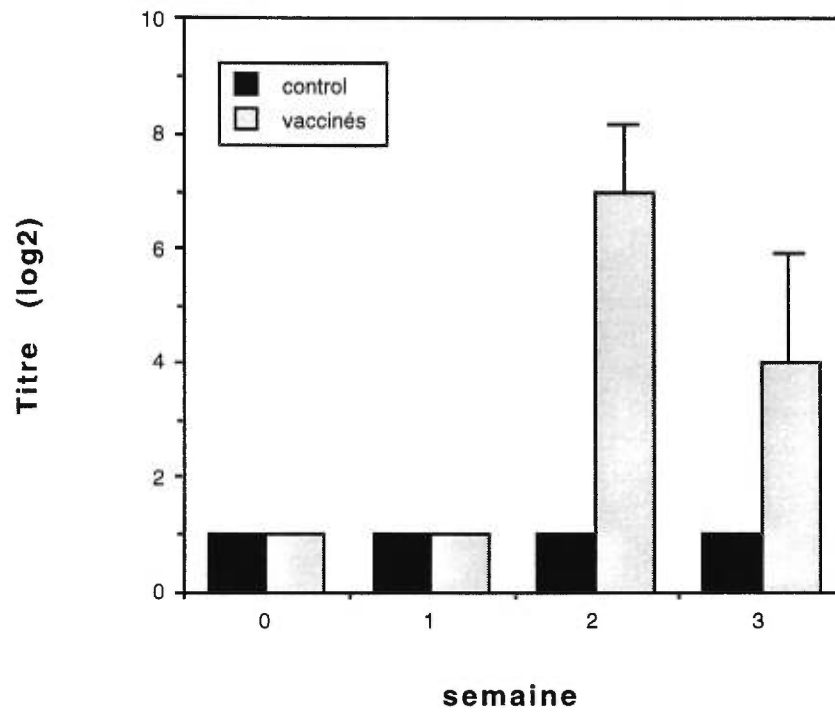


Figure 4. Cinétique de la réponse en anticorps neutralisants présents dans les sécrétions nasales.

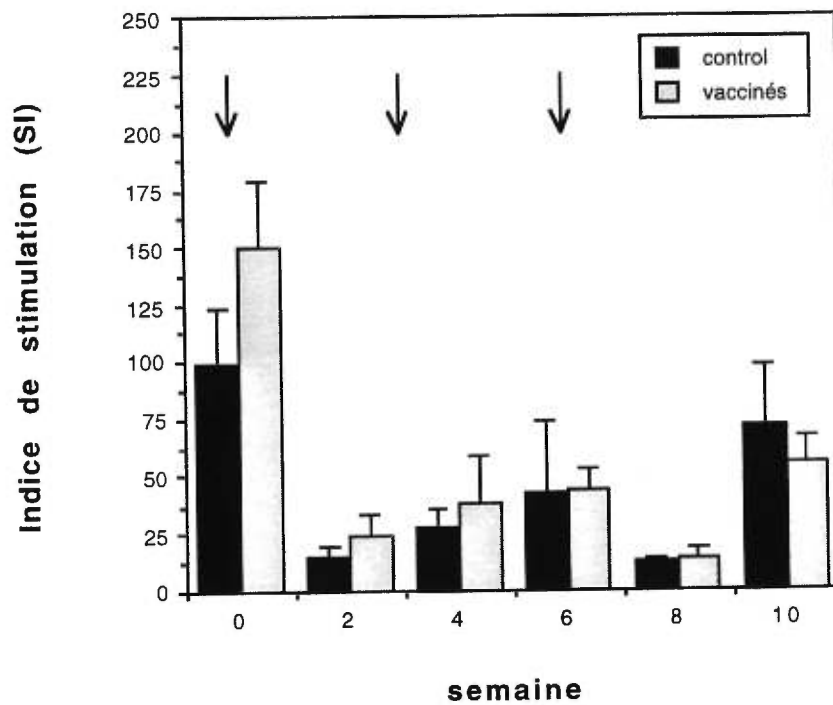


Figure 5. Réponse proliférative des cellules mononucléaires bovines suite à une stimulation par la Con A.

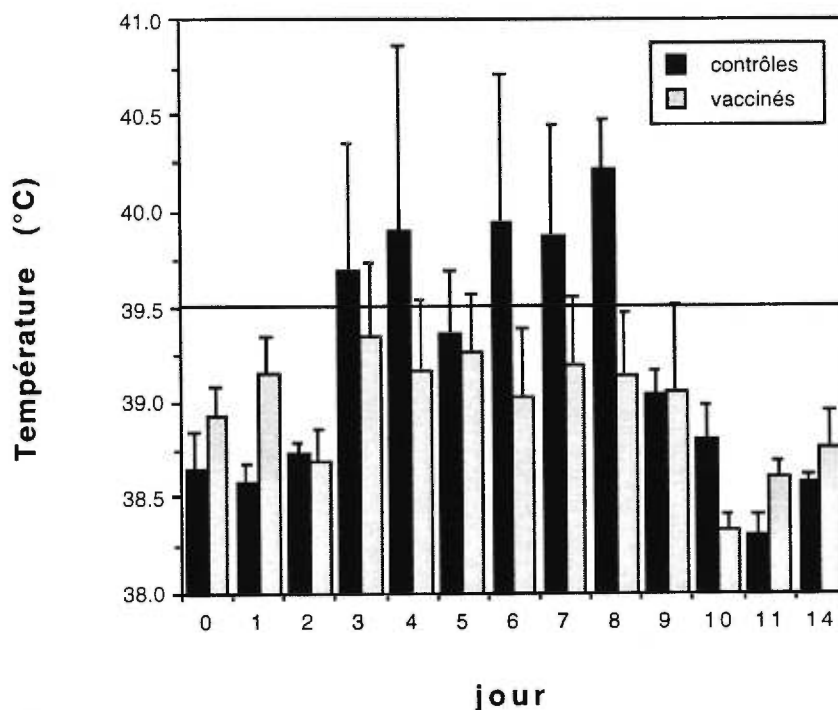


Figure 6. Cinétique de la température corporelle des bovins après challenge viral. La ligne horizontale indique qu'une température corporelle au-delà de 39.5°C était considérée comme étant un état fébrile pour l'animal. Une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe de vaccinés a été observée au jour 8 post-challenge ( $p < 0.05$ ).

# CHAPITRE 6

Lors de ce chapitre, nous voulions étudier d'un point de vue plus fondamental, un aspect de la vaccination génétique. Suite à l'introduction d'un plasmide chez un individu, plusieurs types cellulaires ont la capacité de synthétiser l'antigène d'intérêt. Par contre, seules certaines cellules permettront d'activer d'une manière optimale, le système immunitaire.

Le dernier objectif de ce projet avait pour but de démontrer que la réponse immune induite par la vaccination génétique est vraisemblablement liée à l'activation des cellules qui sont à la base du développement de la réponse immunitaire, soit les cellules dendritiques. Grâce à l'utilisation d'un promoteur à restriction tissulaire soit celui de la proconvertase-2 (PC2), dont l'expression est restreinte aux cellules de souches neuronales telles les cellules de Langerhans (cellules de la peau de type dendritique), nous a permis d'observer, qu'une immunisation génétique chez la souris via l'injection d'un plasmide dont l'expression du gène de la bêtagalactosidase (Bgal) sous le contrôle du promoteur de la PC2 permettait d'induire des niveaux de réponses humorales et cellulaires comparables à ceux observés chez des souris immunisées par un plasmide contrôle, dont la Bgal était exprimée via le puissant promoteur du cytomégalovirus (CMV).

Donc, en guise de conclusion, si l'immunisation génétique focuse spécialement sur la transfection des cellules dendritiques, meilleures seront les chances de bien activer toutes les différentes facettes de la réponse immunitaire.

## CHAPITRE 6

### Expérience #5

**Neuroendocrine-Specific Promoter in a DNA Vaccine Targets  
Antigen Expression in Skin Cells and Elicits both Humoral  
and Cellular Immune Responses in Mice**

Serge Harpin<sup>1</sup>, Steve St-Onge<sup>2</sup>, Majambu Mbikay<sup>3</sup>,  
Brian Talbot<sup>2</sup>, and Youssef Elazhary<sup>1\*</sup>.

*<sup>1</sup>Faculté de médecine vétérinaire , Université de Montréal, Département de pathologie et microbiologie, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6;*

*<sup>2</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Québec, Canada; <sup>3</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Université de Montréal, Montréal, Canada H2W 2R7.*

\*Author for correspondance

Résultats soumis pour publication.

## Abstract

The most frequently used promoters in DNA vaccines are chosen for their high levels of gene expression in a variety of mammalian cell cultures *in vitro*. The cytomegalovirus (CMV) enhancer-promoter is a prototype of such potent and promiscuous promoters. It is known, however, that after injection of an antigen-encoding DNA plasmid, only a subset of transfected cells, dendritic cells in particular, are most responsible for the induced immune response. Thus, for DNA vaccines, promoters that can drive antigen expression in the cells essential for the induction of the immune response should be as effective as the promiscuous ones. In this study, we investigated the efficacy of the promoter for the proprotein convertase 2 (PC2), known to be primarily expressed in cells of neuronal origin. We report here that mouse vaccination with a PC2 promoter-*lacZ* generated high levels of anti- $\beta$ galactosidase antibodies, and was as efficient as a CMV-*lacZ* plasmid at inducing cellular immune responses. We presume that the PC2 promoter to be active in antigen-presenting Langerhans cells, the skin-associated dendritic cells which are functionally associated to the nervous system.



## Introduction

The use of antigen-encoding DNA plasmids represents a new approach to the development of vaccines capable of eliciting both cell-mediated and humoral immune responses (Tang *et al.*, 1992; Finan *et al.*, 1993). The ability of DNA vaccines to induce protective immune responses in natural-host systems (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1998; Gerdts *et al.*, 1997; Harpin *et al.*, 1998) indicate that DNA vaccination can serve as an alternative to immunization with classical vaccines.

Direct injection of plasmid DNA either intramuscularly or intradermally can induce long-lasting immune responses to the antigen encoded by the DNA vaccine (Donnelly *et al.*, 1994; Harpin *et al.*, 1997). Both injection routes lead to antibody production and to activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) (Finan *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1995; Raz *et al.*, 1994). However, intramuscular injection is not considered the best immunization route because muscle tissue do not contain many professional antigen presentation cells (APC), although these may be recruited at the site of injection due to local irritation (Hohlfeld and Engel, 1994; Pardoll and Beckerleg, 1995). In contrast, the dermis of the skin contains a variety of professional APC, such as dendritic cells, Langerhans cells, macrophages, lymphocytes capable of enhancing immune responses (Raz *et al.*, 1994; Nickloff, 1993).

The most frequently used promoters for DNA vaccines are those known to drive high levels of gene expression in a variety of mammalian cell cultures. These include the cytomegalovirus (CMV) promoter (Boshart *et al.*, 1985), and the Rous sarcoma virus (RSV) promoter (Gorman *et al.*, 1982). Moreover, Manthorpe *et al.* (1993) evaluated the efficiency of several promoters and found

that the CMV and the RSV promoters gave the highest levels of expression for muscle transfection.

At the IBC's 4th Annual Genetic Vaccines Meeting, it was unanimously accepted that dendritic cells are among the most relevant target cells in DNA immunization. The best studied of these are the Langerhans cells of the skin and their role in immunity is to transport antigens from sites of infection to lymphoid tissues, where they efficiently activate recirculating T lymphocytes. These cells are able to express some neuronal markers, thus Langerhans cells and the nervous system are anatomically and functionally associated (Misery, 1998).

The search for dendritic cell-specific promoter led us to examine the ability of the promoter for the proprotein convertase 2 (PC2) gene to direct antigen production and to induce immune response in DNA vaccination. PC2 is a serine protease responsible for the proteolytic maturation of precursors to hormones and neuropeptides in neural and neuroendocrine cells (Seidah *et al.*, 1991; Smeekens *et al.*, 1991), but not in liver, kidney, heart, intestines, spleen, or in skeletal muscle (Smeekens *et al.*, 1991). The possibility that the PC2 promoter may be active in immune cells is suggested by the presence of this enzyme in rat polymorpholeukocytes as well as alveolar and splenic macrophages (Vindrola *et al.*, 1994).

In this study, we have compared the efficacy of the PC2 and the CMV promoters at inducing humoral and cellular immune responses to the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ gal) following DNA vaccination with *lacZ* expression vectors. We report that the PC2-*lacZ* plasmid was able to generate high levels of anti- $\beta$ gal antibodies, and was as efficient as the CMV-*lacZ* plasmid in inducing cellular immune responses.

## Materials and Methods

### Plasmid DNA expression vector

Plasmid pCMVi*lacZ* (where i stands for intron) was constructed by inserting a *SpeI-SaII* fragment containing the *lacZ* reporter gene encoding the bacterial  $\beta$ gal between the *NheI* and *SaII* sites in the pCi plasmid (Promega). The CMV promoter was removed from this vector by *SpeI-HindIII* digestion and replaced by a 0.6-kilobase (kb) *XbaI-HindIII* PC2 gene fragment which contained the proximal promoter and 198 base-pair (bp) encoding the 5'-untranslated region (5'-UTR) to produce the pPC2i*lacZ* expression vector. The 5'-UTR-encoding region contained a cis element that attached the repressing factor present only in non-neuroendocrine cells and thus restrict PC2 promoter activity to neuroendocrines cells (Raffin-Sanson *et al.*, 1998, unpublished results).

Plasmids were prepared using the Qiagen DNA purification kit (Mississauga, ONT, Canada). For vaccination, the DNA was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) at a final concentration of 1 mg/ml for intramuscular (im) injections and 2 mg/ml for intradermal (id) injections.

### Immunization of mice

Six-week-old female BALB/c mice were used in this study. Each group of five mice received im (in the hind leg) or id (at the base of the tail) injections of 100  $\mu$ g of the following plasmids: pCMVi*lacZ*, pPC2i*lacZ*, pCMVi (control plasmid). Booster injections were given at weeks 2 and 4. Blood samples from each mouse were collected by retro-orbital puncture at weeks 2, 4, 6, and 8.

## **ELISA assay**

Microtiter plates were coated overnight at 4°C with 5 ug of  $\beta$ gal (Gibco-BRL) in 1 ml of carbonate/bicarbonate-buffered saline (pH 9.3) and then washed with PBS-Tween (0.5%; Sigma). Non-specific binding sites were blocked with 1% casein in PBS-Tween for 1 h at 30°C. After washing three times with PBS-Tween, serum samples diluted in twofold serial dilutions were added to the wells. After an incubation of 30 min at 30°C, the plates were washed with PBS-Tween and incubated with HRP-labelled goat anti-mouse IgG (1:6000; BioRad) for 30 min at 30°C. Plates were washed five times with PBS-Tween and a solution of tetramethylbenzidine (TM Blue; Intergen) was added for 10 min at room temperature. The reaction was stopped with a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution (2 M) and the absorbance at 450 nm was read.

## **Proliferation response of murine spleen cells**

Spleens from each group were removed and pooled. Single-spleen cell suspensions were obtained by mincing and teasing the tissue with microscope slides. Then, spleen cells were suspended at the concentration of  $3 \times 10^6/\text{ml}$  in RPMI-1640 containing 10% heat-inactivated FBS, 2 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin. Spleen cells were distributed into triplicate wells ( $3 \times 10^5$  cells per well) and incubated in the presence of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of  $\beta$ gal in 200  $\mu\text{l}$  cultures at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . After 5 days, wells were pulsed for 6 hours with 0.2 $\mu\text{Ci}$  of [ $^3\text{H}$ ]thymidine (6.7Ci/mM, ICN) and harvested with a Skatron semiautomatic cell harvester (Flow Laboratories, Rockville MD). Stimulation index (SI) was calculated by the following formula: SI

= average counts per minute in antigen stimulated wells / average counts per minute in wells containing only cells with medium.

### **Cytokine assays**

Spleen cells ( $3 \times 10^6$ /ml) in RPMI-1640 containing 10% heat-inactivated FBS, 2 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 50  $\mu$ g/ml gentamicin, were stimulated with 50  $\mu$ g/ml of  $\beta$ gal. Supernatants were harvested at 72 hours. IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 levels were determined in the supernatants by using sandwich ELISA assays (PharMingen) according to manufacturer's instructions. Cytokine levels were expressed in pg/ml.

### **Statistical analysis**

The significance of differences observed under test conditions was determined by ANOVA using the Statview+SE software (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

## Results

### Anti- $\beta$ gal immune response

The titers of  $\beta$ gal-specific antibodies in mice immunized by im and id injections with either pCMVi/*lacZ* or pPC2i/*lacZ* are shown in Fig 1. Mice immunized with plasmid pCMVi/*lacZ* either by im or id injections induced similar levels of anti- $\beta$ gal antibodies through the 8-week period and produced titers of approximately one  $\log_{10}$  higher than mice immunized with plasmid pPC2i/*lacZ*. However, the time course of the immune response induction by the latter plasmid differed with the injection route: a significant response ( $p < 0.01$ ) was observed at week 4 when mice were id-immunized with pPC2i/*lacZ* whereas the first significant response ( $p < 0.01$ ) was observed at week 6 following im injections. Mice injected with control plasmid pCMVi remained negative for anti- $\beta$ gal antibodies during the course of the experiment.

### Specific blastogenic response to $\beta$ gal

Eight weeks after the first immunization, spleen cells were collected and stimulated with  $\beta$ gal. Splenocytes from all the mice id-vaccinated with *lacZ* vectors exhibited a significant increase in proliferation compared to splenocytes from mock-vaccinated mice ( $p < 0.01$ ). Splenocytes from mice vaccinated with pCMVi/*lacZ*, and pPC2i/*lacZ* were stimulated 6-fold, and 4-fold respectively (Fig 2a). With splenocytes from im-injected mice, stimulation indices were significantly above control ( $p < 0.01$ ) in mice injected with pCMVi/*lacZ* and pPC2i/*lacZ* with a 4-fold, and a 2.5-fold increase respectively (Fig 2b).

### Cytokine secretion by $\beta$ gal-activated spleen cells

We also analysed  $\beta$ gal-induced cytokine release by cultured spleen cells from vaccinated mice (Table 1). Antigen-activated splenocytes from mice intradermally vaccinated with pCMVi/*lacZ* and pPC2i/*lacZ* secreted high amounts of interferon (IFN)- $\gamma$ . An increased secretion of IFN- $\gamma$  was also observed with splenocytes from mice intramuscularly vaccinated with pCMVi/*lacZ* and pPC2i/*lacZ*, three-fold more so with the former than with the latter.

Interleukin-2 (IL-2) secretion by  $\beta$ gal-activated splenocytes was comparable among mice intradermally vaccinated with *lacZ* vectors (Table 1). In contrast, among splenocytes from mice vaccinated by im injection, those from pCMVi/*lacZ*-vaccinated mice secreted higher amounts of IL-2 than those of pPC2i/*lacZ*-vaccinated mice (Table 1). No detectable amount of IL-4 was released by splenocytes from mice vaccinated by either route with any of the *lacZ* vectors.

## Discussion

In this paper we have compared the efficacy of the neuroendocrine-specific PC2 promoter and the promiscuous CMV promoter at driving *lacZ* expression vectors after id or im injections as naked plasmids into mice, by evaluating the levels of induced humoral and cellular immune response to  $\beta$ gal. In quantitative terms, the two promoters were very comparable. Both induced high titers of anti- $\beta$ gal antibodies in mice irrespective of the vaccination route. Both caused splenocytes to secrete IFN- $\gamma$  and IL-2 in culture in the presence of  $\beta$ gal after intradermal vaccination. There were differences however: the serum titer of anti- $\beta$ gal antibodies in mice vaccinated with pCMVi/*lacZ* was one log<sub>10</sub> higher than in pPC2i/*lacZ* vaccinates. Moreover, splenocytes from mice intramuscularly vaccinated with the former vector secreted higher levels of IFN- $\gamma$  and IL-2 than those of mice vaccinated with the latter vector.

$\beta$ gal had a specific blastogenic effect on spleen cells from DNA-vaccinated mice. In general, the effect was slightly higher in mice vaccinated with pCMVi/*lacZ* by either routes. Splenocytes from mice immunized with pPC2i/*lacZ* showed significant blastogenesis whether immunization was conducted by im or id injection. Spleen cells from mice immunized with pCMVi/*lacZ* and pPC2i/*lacZ* released very similar levels of IFN- $\gamma$  upon  $\beta$ gal stimulation. Similarly, spleen cells from mice id-vaccinated with either of the two *lacZ* vectors secreted similar levels of IL-2, whereas in im-vaccinated, spleen cells from mice vaccinated with pPC2i/*lacZ* secreted less IL-2 than those immunized with pCMVi/*lacZ*. No detectable amount of IL-4 was released by splenocytes from mice vaccinated by either route with any of the *lacZ* vectors. All together, these results suggest that immunization of mice with plasmids



pCMVi/*lacZ* and pPC2i/*lacZ* induced a cellular immune response polarized toward a Th1 phenotype.

After im injection of DNA vaccines, muscle cells appear to be the predominant cell type transfected. They presumably serve as an antigen reservoir for APC (Doe *et al.*, 1996; Corr *et al.*, 1996). After id injection, on the other hand, APC appear to be transfected at the site of injection (Raz *et al.*, 1994). Im injection of the pPC2i/*lacZ* induced both humoral and cellular responses, suggesting that this promoter was maybe active in myocytes. This result might be in contradiction with the observation of Smeekens *et al.* (1991) who reported that there was no expression of the PC2 protein in skeletal muscle. It is very likely that full repression of the PC2 promoter is dependent on several factors including the chromosomal context. The episomal nature of the vector may permit some degree of leakiness in the repressive effect of the NRSE. It is also possible that the plasmid pPC2i/*lacZ* migrated to the secondary lymphoid tissues through the lymphatic system and, transfection of dendritic-like cells may have occurred. The immune responses induced in mice id-vaccinated with pPC2i/*lacZ* were probably due to transfection of Langerhans-like cells since a study by Neerman-Arbez *et al.* (1993) showed that the PC2 promoter was able to drive expression of its protein in islets of Langerhans cells.

In summary, we have demonstrated that, in a DNA vaccine, a promoter with cell-restricted expression can be as effective as the ubiquitous CMV promoter at driving expression of an antigen and at inducing both humoral and cellular immune responses to it. This study showed that successful induction of immune responses via DNA vaccines is elicited by targeting antigen expression in cells that are at the basis of the development of the immunity. Thus, future genetic vaccines may need to be optimized in terms of promoter

and other vector sequences for the most efficacious type of immune responses to a pathogen or a molecule.

## **Acknowledgements**

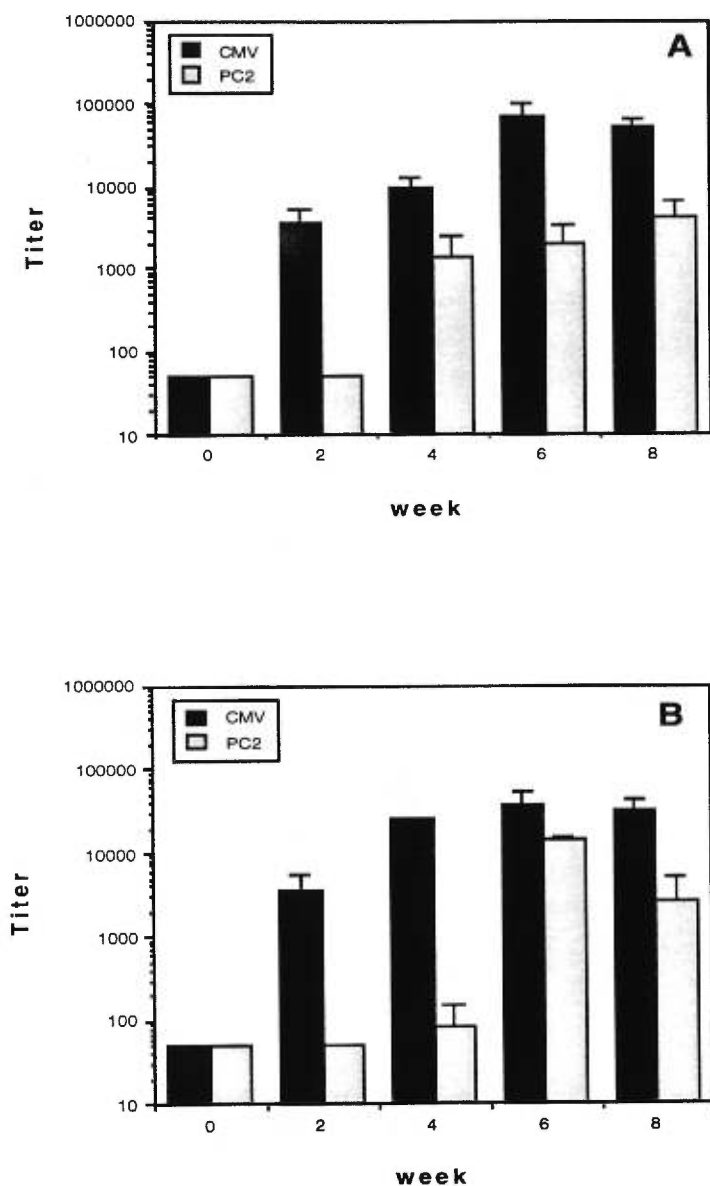
We are grateful to Francine Bernard for excellent technical assistance. Financial support was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## References

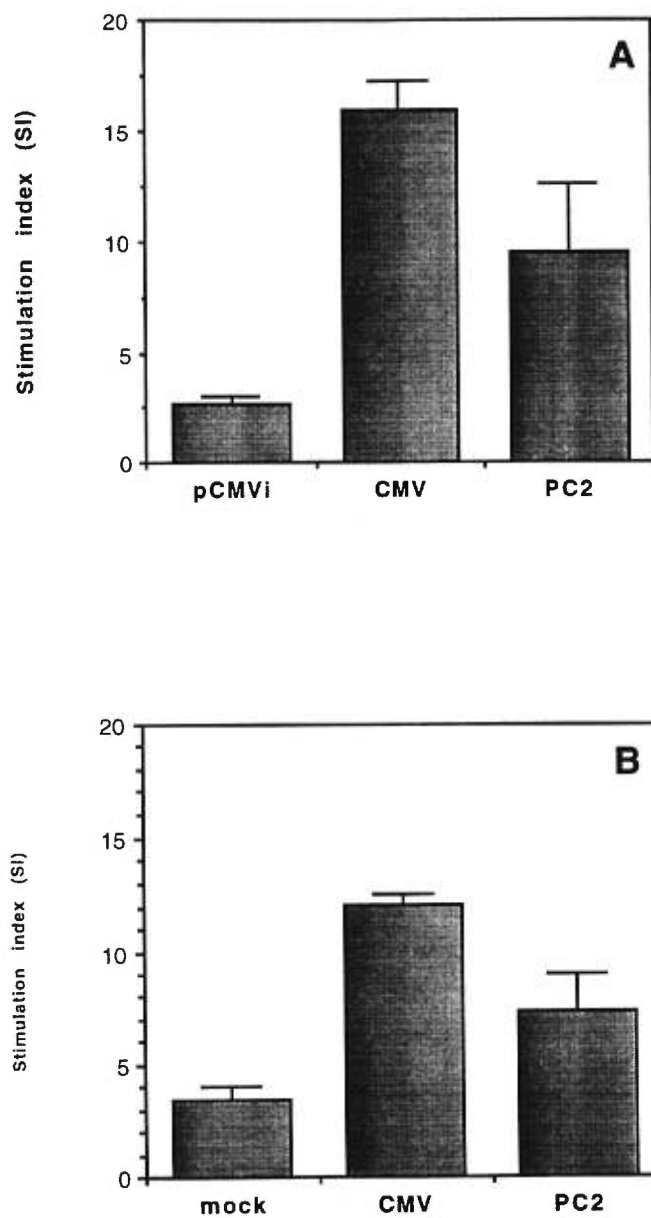
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., & Schaffner, W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41: 521-530.
- Corr, M., Lee, D. J., Carson, D. A., & Tighe, H. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* 184: 1555-60.
- Davis, H. L., Schirmbeck, R., Reimann, J., & Whalen, R. G. 1995. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther* 6: 1447-56.
- Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenzinger, J., & Walker, C. M. 1996. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone-marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8578-83.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., & Liu, M. A. 1994. Immunization with DNA. *J. Immunol. Meth.* 176: 145-152.
- Gerdts, V., Jöns, A., Makoschey, B., Visser, N., & Mettenleiter, T. C. 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* 78: 2139-2146.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I., & Howard, B. H. 1982. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6777-6781.
- Harpin, S., Talbot, B., Mbikay, M., & Elazhary, Y. 1997. Immune response to vaccination with DNA encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein gp53 (E2). *FEMS Micro. Lett.* 146: 229-234.
- Harpin, S., Hurley, D. J., Mbikay, M., Talbot, B. G., & Elazhary, Y. 1998. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein E2. Submitted to *J. Gen. Virol.*

- Hohlfeld, R., & Engel, A. G. 1994. The immunobiology of muscle. *Immunol Today* 15: 269-274.
- Manthorpe, M., Cornefert-Jensen, F., Hartikka, J., Felgner, J., Rundell, A., Margalith, M., & Dwarki, V. 1993. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gen Ther* 4: 419-431.
- Misery, L. 1998. Langerhans cells in the neuro-immuno-cutaneous system. *J. Neuroimmunol.* 89: 83-87.
- Nickloff, B. M. 1993. Dermal immune system. CRC Press, Boca Raton.
- Pardoll, D. M., & Beckerleg, A. M. 1995. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity* 3: 165-169.
- Raffin-Sanson, M-L., Sirois, F., Kalenga, L., Seidah, N. G., Chrétien, M., & Mbikay, M. 1998. Differential interactions of conserved elements in the promoter of the proprotein convertase PC2 with nuclear factors from PC2-expressing and non-expressing cells. Manuscript submitted.
- Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S.H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M.A., Baird, S.M., & Rhodes, G.H. 1994. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9519-9523.
- Seidah, N. G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M. G., Lazure, C., Mbikay, M., & Chrétien, M. 1991. Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol* 5: 111-222.
- Smeekens, S. P., Avruch, A. S., LaMendola, J., Chan, S. J., & Steiner, D. F. 1991. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 340-344.
- Tang, D. C., Devit, M., & Johnston, S. A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.

- van Drunen Little-van den Hurk, S., Braun, R.P., Lewis, P.J., Karvonen, B.C., Baca-Estrada, M.E., Snider, M., McCartney, D., Watts, T., & Babiuk, L.A. 1998. Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *J. Gen. Virol.* 79: 831-839.
- Vindrola, O., Mayer, A. M., Citera, G., Spitzer, J. A., & Espinoza, L. R. 1994. Prohormone convertases PC2 and PC3 in rat neutrophils and macrophages. Parallel changes with proenkephalin-derived peptides induced by LPS in vivo. *Neuropeptides* 27: 235-244.



**Figure 1** Kinetic of antibody response of mice immunized with  $\beta$ gal-encoding plasmids. Mice were vaccinated either id (Fig 2a) or im (Fig 2b) with plasmids pCMVi/*lacZ* or pPC2i/*lacZ*. Mice immunized with plasmid control pCMVi remained negative for anti- $\beta$ gal antibodies throughout the experiment. Times of immunization were at weeks 0, 2, and 4.



**Figure 2** *In vitro* proliferative response. Spleen cells stimulated with 50 ug/ml of  $\beta$ gal were collected at week 8 from mice vaccinated id (Fig 3a) and im (Fig 3b) with plasmids pCMVi, pCMVi/lacZ or pPC2i/lacZ.

Table 1.  $\beta$ gal-specific cytokine production by Balb/c splenic cells following DNA immunization<sup>a</sup>.

Immunogens	IFN- $\gamma$ <sup>b</sup>		IL-2 <sup>b</sup>		IL-4 <sup>b</sup>	
	id	im	id	im	id	im
pCMVi/lacZ	8168 $\pm$ 1550	9900 $\pm$ 1580	148 $\pm$ 28	148 $\pm$ 44	0	0
pPC2i/lacZ	7730 $\pm$ 1028	3690 $\pm$ 960	154 $\pm$ 25	70 $\pm$ 25	0	0
pCMVi	356 $\pm$ 140	1630 $\pm$ 600	0	0	0	0

<sup>a</sup> Splenic cells were collected at week 8 and stimulated with 50  $\mu$ g/ml of  $\beta$ gal

<sup>b</sup> Cytokine levels were expressed in pg/ml



## **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Le vaccin idéal devrait être en principe, peu coûteux, sécuritaire pour la population à vacciner, et protecteur pour une multitude d'agents pathogènes. Mais à ce jour, aucun vaccin présentement sur le marché ne regroupe tous ces critères.

L'émergence de cette nouvelle technologie qu'est la vaccination par ADN, apporte un regain d'énergie et d'espoir, afin de combattre des maladies qu'on ne parvient pas à éliminer par les moyens technologiques dont on dispose à ce jour.

La vaccination génétique s'est attaquée, dès ses débuts, à l'agent infectieux le mieux connu de tous, et ce depuis l'antiquité, soit le virus de la grippe. La grippe est une infection causée par le virus influenza, et les premières études ont démontré que l'injection intramusculaire d'un plasmide codant pour la protéine de l'hémagglutinine a généré une production d'anticorps (Robinson *et al.*, 1993). Une autre étude a démontré que suite à un challenge viral, les animaux ont développé non seulement une protection contre un virus homologue, mais aussi contre des souches hétérologues (Ulmer *et al.*, 1993). Dans cette dernière étude, les souris avaient été immunisées avec un plasmide codant pour la nucléoprotéine (NP) de l'influenza, une protéine très conservée chez les souches d'influenza. La protection induite a été donc attribuée à l'activation de cellules CTL car les anticorps produits contre la NP ne conféraient aucune protection. À cet égard, l'efficacité de la vaccination par ADN a non seulement mis à jour son potentiel à induire une réponse humorale, mais aussi l'activation de la réponse à médiation cellulaire. Ces études ont donc ouvert le chemin à de multiples groupes de recherche travaillant sur divers agents pathogènes.

Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) est un agent pathogène causant d'énormes pertes économiques dans le monde de l'industrie du bovin. Malgré une vaccination intense, une sévère épidémie s'est développée, et ce, dans toute l'Amérique du Nord. Suite à une analyse génotypique des isolats de BVDV impliqués dans l'épidémie qui a sévi au Québec, deux études, dont la nôtre, ont démontré qu'un nouveau génotype était responsable des dommages causés dans l'industrie du bovin (Pellerin *et al.*, 1994, Harpin *et al.*, 1995).

L'émergence d'un nouveau génotype de BVDV qui est apparu malgré l'utilisation de vaccins, nous a donc sensibilisés à l'inefficacité des vaccins commerciaux à faire face à de nouvelles souches.

Ce projet de recherche avait donc pour but d'évaluer si la technologie de la vaccination par ADN pouvait être applicable dans le domaine de la vaccination contre le BVDV. Tout d'abord, nous avons choisi comme gène marqueur, celui codant pour la protéine majeure de l'enveloppe, soit la protéine E2. Cette dernière est la protéine cible pour la production d'anticorps neutralisants contre le BVDV (Donis *et al.*, 1988). De ce fait, dans un modèle murin, nous avons démontré que non seulement des anticorps reconnaissant le BVDV ont été produits, mais qu'ils avaient aussi la capacité de neutraliser le virus. Ces résultats démontrent que la région d'ADN cloné permet une synthèse protéique menant à une conformation protéique similaire à celle de la protéine E2 native. Ce qui en résulte au maintien des épitopes conformationnels dont l'importance est capitale pour le développement d'anticorps neutralisants.

Très peu d'études ont démontré la capacité des vaccins à ADN de générer une protection chez l'hôte naturel de l'agent pathogène, surtout chez des espèces animales à gros gabarit. Récemment, des vaccins à ADN ont permis de protéger des porcs contre le développement de maladies causées par l'agent causal de la maladie d'Aujeszky et contre le virus du syndrome reproductif et respiratoire (PPRS) (Gerdtts *et al.*, 1997; Pirzadeh et Dea, 1998). van Drunen Little-van der Hurk *et al.* (1998) ont démontré que, via une injection intradermale, une réponse immune protectrice a été induite chez le bovin contre l'herpesvirus-1 bovin.

L'objectif général de ce programme de recherche était de démontrer chez l'hôte naturel du BVDV, soit le bovin, l'efficacité d'un vaccin à ADN codant pour la protéine E2 à générer une réponse immunitaire. Suite à l'introduction du virus de challenge, une forte réponse mémoire humorale neutralisante a été observée chez les deux groupes de vaccination, soit les animaux immunisés par une solution saline plasmidique (N-DNA) et les veaux vaccinés avec une formulation liposomale (L-DNA). Toutefois, seuls les veaux du groupe N-DNA ont développé une réponse immune protectrice car les animaux du groupe L-

DNA ont développé des signes cliniques de sévérité et de durée comparables au groupe contrôle. Durant la période d'immunisation, seul le groupe N-DNA a développé une réponse immune cellulaire, observée *ex vivo* par un test de prolifération des cellules mononucléaires bovines. Ces résultats suggèrent donc que l'immunisation générée chez les animaux vaccinés avec la solution plasmidique mènerait à une réponse de type Th1 tandis qu'une réponse de type Th2 aurait été induite chez les animaux vaccinés avec la solution liposomale.

Les cellules-T CD8+, caractérisées par une réponse cellulaire de type Th1, ont été confirmées comme étant des cellules effectrices très importantes dans l'élaboration d'une réponse immunitaire protectrice (Wang *et al.*, 1998; Xu et Liew, 1995). Notre groupe de recherche a de plus démontré, qu'une immunisation chez un modèle murin, via un vecteur recombinant de fowlpox portant le gène E2 du BVDV, aurait induit la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , une cytokine de type Th1 (Elahi *et al.*, 1998a). Cette étude suggère donc que la protéine E2 posséderait des épitopes ayant la capacité d'activer une réponse cellulaire de type Th1. Il est donc plausible que la protection induite chez les veaux du groupe N-DNA immunisés par l'injection d'un plasmide codant pour la protéine E2 du BVDV ait été médiée par l'activation des cellules CTL.

L'adjuvantivité des vaccins à ADN est attribuée à des séquences d'ADN contenant des motifs CpG, soit des dinucléotides non-méthylés. Ces motifs CpG induisent une réponse immune de type Th1 caractérisée par la production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  et peu de cytokines de type Th2 cytokine (Krieg *et al.*, 1995). Récemment, Brown *et al.* (1998) ont démontré que les motifs CpG induisent aussi une immunomodulation chez des cellules bovines.

Dans notre étude de vaccination génétique chez le bovin, le vecteur plasmidique utilisé est le plasmide pcDNA3. Ce vecteur possède quelques uns de ces motifs CpG qui contribuent possiblement à la modulation de la réponse immunitaire. Le mécanisme d'action de ces motifs CpG est toutefois encore très obscur. Liang *et al.* (1996) ont suggéré que ce mécanisme serait médié par l'entremise de récepteurs spécifiques à ces motifs. Récemment, il a été rapporté que l'activation des cellules présentatrices d'antigène médiée par les

motifs CpG serait dépendante de l'entrée de ces derniers dans la cellule par endocytose suivie par l'activation de la cascade des kinases de stress (Hacker *et al.*, 1998). Comme mentionné ci-haut, des veaux vaccinés via une solution plasmidique générerait une réponse de type Th1 tandis qu'une réponse de type Th2 aurait été induite chez les animaux vaccinés avec la solution liposomale. Le fait que l'ADN plasmidique est enveloppé de lipides, dans le cas d'une immunisation via une formulation liposomale, il est possible que l'interaction entre les motifs CpG et ses récepteurs ait été masquée ou bien que la fusion du complexe liposome-ADN à la cellule n'emprunte pas la voie endocytose, bloquant ainsi la cascade d'évènements menant à la production de cytokines de type Th1.

Nous avons démontré que la technologie de la vaccination génétique peut effectivement être efficace pour l'induction d'une réponse immune chez le bovin. Plusieurs voies s'ouvrent afin d'améliorer cette réponse immunitaire. Il serait intéressant d'évaluer la meilleure voie d'inoculation afin d'induire une meilleure réponse humorale et cellulaire. Le groupe de recherche dirigé par Dr Lorne Babiuk a rapporté que, malgré l'induction d'une réponse immune chez le bovin suite à l'injection intramusculaire d'un plasmide codant pour la glycoprotéine D de l'herpesvirus bovin (BHV-1), cette voie serait inefficace (van Drunen Little-van der Hurk *et al.*, 1998). La suite de leur expérience nous renseigne à l'effet que non seulement une administration intradermique du plasmide semble plus appropriée, mais que la forme protéique codée par le vecteur influence l'ampleur de la protection générée chez l'animal. En effet, les animaux immunisés intradermique par un plasmide codant pour la forme sécrétée de la glycoprotéine D ont développé une réponse immune protectrice contrairement à ceux immunisés par le plasmide codant pour la forme protéique transmembranaire.

Tout comme la protéine D du BHV-1, la protéine E2 du BVDV possède une région riche en acides aminés hydrophobes permettant une localisation transmembranaire. Une étude par notre groupe de recherche est en cours afin d'évaluer si la sécrétion de la protéine E2 aurait pour effet d'augmenter la quantité d'antigène disponible pour la maturation et la présentation par les

cellules présentatrices d'antigène afin de stimuler une meilleure réponse immunitaire.

La peau semble être le tissu de choix pour l'administration des futurs vaccins à ADN. Contrairement au tissu musculaire, la peau regorge de cellules qui sont à la base du développement de la réponse immunitaire telle les cellules dendritiques (Raz *et al.*, 1994). Lors d'une immunisation par ADN via genegun, une étude démontre que très peu de cellules localisées dans les nodules lymphatiques expriment l'antigène codé par le plasmide. Il semble que ces cellules soient des cellules dendritiques (Porgador *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent que très peu de cellules sont nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire via une immunisation par ADN.

Comme nous le démontrons dans l'étude utilisant un vecteur d'expression à restriction tissulaire, une immunisation par ADN doit cibler les cellules initiatrices de la réponse immune. Dans cette étude, seule une expression dans des cellules d'origine neuronale, comme par exemple des cellules dendritiques, est permise par le vecteur arborant un promoteur à restriction tissulaire. Nos résultats démontrent qu'une forte réponse humorale et cellulaire a été induite chez des souris injectées avec le plasmide à restriction tissulaire. La réponse immunitaire induite était similaire à celle développée chez les souris injectées avec un plasmide arborant le promoteur du cytomégalo virus (CMV). Notre étude suggère donc qu'il n'est pas nécessaire à ce qu'une multitude de cellules différentes expriment l'antigène afin d'induire une réponse immune via une immunisation par ADN, mais au contraire, que l'expression s'effectue dans la ou les bonnes populations cellulaires, vraisemblablement les cellules dendritiques.

Depuis plusieurs années, des adjuvants ont été utilisés afin d'améliorer l'efficacité des vaccins. Malgré le fait qu'il ait été démontré que certains motifs contenus dans l'ADN plasmidique agissent comme adjuvants, d'autres groupes de recherche déploient beaucoup d'énergie afin d'incorporer différents types d'adjuvants dans une formulation d'ADN plasmidique. Entre autres, un adjuvant membre du groupe des saponines, le QS-21, a été utilisé en association avec un vaccin à ADN codant pour la protéine env du HIV-1

(Sasaki *et al.*, 1998). Cette étude a démontré que les souris injectées avec cette formulation vaccinale ont développé une meilleure réponse humorale et cellulaire.

Une augmentation dans la réponse humorale et cellulaire a été observée chez des souris injectées avec une solution plasmidique couplée à une formulation de liposomes cationiques (Ishii *et al.*, 1997). Dans notre étude, une production plus constante d'anticorps neutralisants a été observée lors de la période d'immunisation chez les veaux vaccinés avec la formulation liposomale que chez les animaux injectés avec la solution saline d'ADN plasmidique. Par contre, une meilleure réponse cellulaire, évaluée par prolifération des cellules mononucléaires bovines, a été générée chez les animaux vaccinés avec l'ADN plasmidique dissout dans une solution saline.

Certaines études ont démontré que l'ampleur et la nature de la réponse immune générée par un vaccin à ADN peuvent être modulées par une co-injection de plasmides codant pour des cytokines (Iwasaki *et al.*, 1997; Geissler *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 1998). Dans la littérature, les séquences codantes pour les cytokines bovines IL-2, IL-4, IL-12 et IFN- $\gamma$  ont été publiées (Reeves *et al.*, 1986; Heussler *et al.*, 1992; Zarlenga *et al.*, 1995; Cerretti *et al.*, 1986). Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact qu'aurait la co-injection de plasmides codant pour des cytokines bovines dans le cadre d'un programme de vaccination contre le BVDV.

Certains groupes de recherche préconisent l'utilisation de plusieurs gènes d'un agent pathogène afin d'établir une réponse immunitaire à large spectre. Hinkula *et al.* (1997) ont démontré que suite à l'injection intranasale de vaccins à ADN codant pour cinq gènes du HIV-1, des souris ont développé une réponse humorale par l'induction d'IgG, d'IgA et d'une réponse proliférative des cellules-T. Dans une autre étude, l'immunisation de souris via l'injection de plasmides codant pour les protéines NP et HA du virus Influenza a généré une protection contre des infections virales par des souches homologues et même hétérologues (Montgomery *et al.*, 1993).

Dans cette même pensée, nous avons injecté un groupe de bovin avec un mélange plasmidique codant pour quatre protéines de BVDV, soit les



protéines Erns, E1, E2 et NS3. Malheureusement, cette expérience ne nous a pas permis d'évaluer si une immunisation multigénique pouvait élargir la fenêtre de protection du bovin. Suite au challenge viral, les animaux contrôles ont très peu réagi face à l'infection virale, diminuant ainsi le développement de signes cliniques, qui sont finalement cruciaux pour l'évaluation de la protection. Néanmoins, cette étude a toutefois permis de confirmer qu'une immunisation via l'injection d'un plasmide codant pour la protéine E2 menait à une réponse mémoire suite à l'introduction du virus du BVD chez le bovin.

D'autres gènes ont la possibilité d'être d'excellents candidats pour l'élaboration d'un vaccin contre le BVDV. Par exemple, la protéine NS5B dont le rôle serait possiblement celui d'ARN polymérase ARN-dépendant, devrait être relativement bien conservée à cause de son importance dans la réplication virale. Cette protéine pourrait être donc une excellente cible pour les cellules CTL. C'est en effet le cas pour une protéine de l'hépatite C, un virus membre de la famille des *Flaviviridae* tout comme pour le BVDV. Car une étude rapporte que des cellules CD8<sup>+</sup> reconnaîtraient un épitope CTL sur cette protéine, à laquelle on attribuerait le rôle d'ARN polymérase (Shirai *et al.*, 1992). D'autre part, une étude faite par notre groupe de recherche démontre qu'une immunisation de souris via un vecteur recombinant d'adénovirus codant pour la protéine de la capsid du BVDV a mené à une réponse cellulaire de type Th1 (Elahi *et al.*, 1998b). Cette protéine de 14 kDa semble relativement bien conservée parmi les souches de BVDV. Le gène codant pour la protéine de capsid du BVDV serait alors un candidat de choix dans le cadre d'une immunisation génétique contre le BVDV.

L'immunité à médiation cellulaire est un facteur crucial dans l'élaboration d'une défense contre des virus. De plus, les cellules CTL sont des pions jouant un rôle majeur dans le cadre de l'immunité à médiation cellulaire. Une connaissance des séquences virales pour des épitopes spécifiques à l'activation des cellules CTL devrait alors aider à l'élaboration de meilleurs vaccins.

Avec l'aide de programmes informatiques, Hegde et Srikumaran (1997) ont identifié sur le génome du BVDV, des épitopes potentiels pour l'activation



de cellules CTL. Cette analyse dénombre plusieurs séquences candidates, surtout dans le premier et dernier tiers du génome du BVDV. Ces informations pourraient servir, entre autres, à la construction de plasmides codant pour plusieurs de ces épitopes candidats et ainsi activer une panoplie de cellules CTL afin d'améliorer la réponse immune face à une infection virale. Ce type de technologie a d'ailleurs déjà été testée par Thomson *et al.* (1996). Ces études ont démontré qu'un plasmide codant pour une multitude d'épitotes CTL spécifiques à différents agents pathogènes, a généré une protection contre le cytomégalovirus murin et le virus Sendai.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Ce projet de recherche permet de faire les conclusions suivantes:

- 1) un vaccin à ADN est relativement simple et rapide à développer.
- 2) une injection plasmidique codant pour la glycoprotéine majeure de l'enveloppe E2 induit des anticorps contre cette protéine chez un modèle murin.
- 3) chez la souris, les anticorps produits ont la capacité de neutraliser le BVDV.
- 4) une vaccination par ADN via la glycoprotéine E2 du BVDV induit la production d'une réponse humorale neutralisante chez le bovin.
- 5) une vaccination par ADN via la glycoprotéine E2 du BVDV induit une réponse cellulaire évaluée via une réponse proliférative des cellules mononucléaires.
- 6) une vaccination par ADN via la glycoprotéine E2 du BVDV induit une forte réponse mémoire au niveau des anticorps neutralisants après challenge.
- 7) une vaccination par ADN via la glycoprotéine E2 du BVDV induit une production d'anticorps neutralisants contre une souche hétérologue après challenge.
- 8) une vaccination par ADN via la glycoprotéine E2 du BVDV induit une production d'anticorps neutralisants au niveau des sécrétions nasales après challenge.

- 9) une vaccination par ADN via la glycoprotéine E2 du BVDV induit une réponse immune protectrice.
  
- 10) les cellules de la peau de type dendritiques sont vraisemblablement les cellules cibles à activer pour induire les réponses humorale et cellulaire via une immunisation par ADN.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Anderson, M. L. 1994. Peracute bovine viral diarrhea reportedly spreading. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205: 391-392.
- Anderson, R., Gao, X-M., Papakonsantinopoulou, A., Roberts, M., & Dougan, G. 1996. Immune response in BALB/c mice following intramuscular immunization with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Infect. Immun.* 64: 3168-73.
- Atluru, D., Xue, W., Polam, S., Atluru, S., Blecha, F., & Minocha, M. C. 1990. In vitro interactions of cytokines and bovine viral diarrhea virus in phytohemagglutinin-stimulated bovine mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 25: 47-59.
- Babiuk, L. A., Lewis, P. J., Cox, G., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Baca-Estrada, M., & Tikoo, S. K. 1995. DNA immunization with bovine herpesvirus-1 genes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772: 47-63.
- Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., & Krieg, A. M. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157: 1840-1845.
- Barrios, C., Brawand, P., Berney, M., Brandt, C., Lambert, P. H., & Siegrist, C. A. 1996. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur. J. Immunol.* 26: 1489-96.
- Barry, M. A., Lai, W. C., & Johnston, S. A. 1995. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 377: 632-635.
- Barry, M. A., and Johnston, S. A. 1997. Biological features of genetic immunization. *Vaccine* 15: 788-791.
- Bevan, M. J. 1995. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 182: 639-641.
- Bielefeldt-Ohmann, H., Holm Jensen, M., Sorensen, K. J., & Dalsgaard, K. 1982. Experimental fetal infection with bovine viral diarrhea virus. I. Virological and serological studies. *Can. Comp. Med.* 46: 357-362
- Blood, D. C. 1983. *Veterinary Medicine*. Baillière Tindall, London, 6th ed. p754-761.

- Bolin, S.R. 1990. The current understanding about the pathogenesis and clinical forms of BVD. *Vet Med*, 85: 1124-1132.
- Bolin, S. R., McClurkin, A. W., Cutlip, R. C., & Coria, M. F. 1985. Response of cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus to vaccination for bovine viral diarrhoea and subsequent challenge exposure with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Res.* 46: 2467-2470.
- Bolin, S. R., McClurkin, A. W., & Coria, M. F. 1985. Frequency of persistent bovine viral diarrhoea virus infections in selected herds. *Am J. Vet. Res.* 46: 2385-2387.
- Bolin, S. R., Matthews, P. J., & Ridpath, J. F. 1991. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 199-203.
- Bolin, S. R. 1995. Control of bovine viral diarrhoea infection by use of vaccination. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.* 11: 615-625
- Bolin, S.R., & Ridpath, J. F. 1996. Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease. *Arch. Virol.* 141: 1463-1477.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., & Schaffner, W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41: 521-530.
- Braun, R. K., Osburn, B. I., & Kendrick, J. W. 1973. Immunologic response of bovine to bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* 34: 1127-1132.
- Brown, W. C., Estes, D. M., Chantier, S. E., Kegerreis, K. A., & Suarez, C. E. 1998. DNA and a CpG oligonucleotide derived from *Babesia bovis* are mitogenic for bovine B cells. *Infect. Immun.* 66: 5423-5432.
- Brownlie, J., Clarke, M. C., & Howard, C. J. 1987. The pathogenesis and epidemiology of bovine viral diarrhoea virus infection in cattle. *Ann. Rech. Vet.* 18: 157-166.
- Brownlie, J. 1991. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol.* 3(Suppl): 79-96.

- Bruschke, C. J., Moormann, R. J., van Oirschot, J. T., & van Rijn, P. A. 1997a. A subunit vaccine based on glycoprotein E2 of bovine virus diarrhea virus induces fetal protection in sheep against homologous challenge. *Vaccine* 15: 1940-1945.
- Bruschke, C. J., Hulst, M. M., Moormann, R. J., van Rijn, P., & van Oirschot, J. T. A. 1997b. Glycoprotein E2 of pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol.* 71: 6692-6696.
- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J. F., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A., & Anderson, N. 1998. Severe acute bovine diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J. Vet Diagn. Invest.* 10: 27-35.
- Cerretti, D. P., McKereghan, K., Larsen, A., Cosman, D., Gillis, S., & Baker, P. E. 1986. Cloning, sequence, and expression of bovine interferon-gamma. *J. Immunol.* 136: 4561-64.
- Cheng, L., Ziegelhoffer, P. R., & Yang, N-S. 1993. In vivo promoter delivery and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4455-4459.
- Childs, T. 1946. X-disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* 10: 316-319.
- Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S.K., & Retzel, E. 1988a. Proteins encoded bovine virus diarrhea virus: the genomic organization of pestivirus. *Virology* 165: 200-208.
- Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K., & Purchio, A. F. 1988b. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165: 191-199.
- Collett, M. S., Moenning, V., & Horzinek, M. C. 1989. Recent advances in pestivirus research. *J. Gen. Virol.* 70: 253-266.
- Condon, C., Watkins, S. C., Celluzi, C. M., Thompson, K., & Falo, L. D. 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med.* 2: 1122-28.
- Coria, M. F., & McClurkin, A. W. 1978. Specific immunotolerance in an apparently healthy bull persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 449-451.



- Corr, M., Lee, D. J., Carson, D. A., & Tighe, H. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* 184: 1555-60.
- Cox, J. H., Yewdell, J. W., Eisenlohr, L. C., Johnson, P. R., & Bennink, J. R. 1990. Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum. *Science* 247: 715-718.
- Cox, G.J.M., Zamb, T.J., & Babiuk, L.A. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* 1993, 67: 5664-5667.
- Deng, R., & Brock, K. V. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncythopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology* 191: 867-869.
- Deng, R., & Brock, K. V. 1993. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: Primary and secondary structures analyses. *Nucleic Acid Res.* 21: 1949-1957.
- Diderholm, H., & Dinter, Z. 1966. Infectious RNA derived from Bovine Viral Diarrhea Virus. *Zentbl. Bakteriol Abt I* 201: 270-272.
- Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenzinger, J., & Walker, C. M. 1996. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone-marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8578-83.
- Donis, R.O., Corapi, W., & Dubovi, E.J. 1988. Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein. *J. Gen. Virol* 69: 77-86.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., & Liu, M. A. 1994. Immunization with DNA. *J. Immunol. Meth.* 176: 145-152.
- Duffell, S. J., & Harkness, J. W. 1985. Bovine virus diarrhea-mucosal disease infection in cattle. *Vet. Rec.* 117: 240-245
- Elahi, S. M., Bergeron, J., Nagy, E., Talbot, B. G., Harpin, S., Shen, S-H., & Elazhary, Y. 1998a. Induction of humoral and cellular immune responses in mice by a recombinant fowlpox virus expressing the E2

- protein of of bovine viral diarrhea virus. Sous presse dans *FEMS Micro. Biol.*
- Elahi, S. M., Shen, S.-H., Talbot, B. G., Massie, B., Harpin, S., & Elazhary, Y. 1998b. Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with inducible promoter. Soumis à *J. Virol.*
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rumenapf, & Thiel, H. J. 1996. Processing in the pertivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* 70: 4131-4135.
- Fenner, F. 1976. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of viruses in Madrid, September 1975. *Virology* 6: 1-12.
- Forsthuber, T., Yip, H. P., & Lehmann, P. V.. 1996. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science* 271: 1728-1730.
- Fuller, D. H., & Haynes, J. R. 1994. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10: 1433-41.
- Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., & Robinson, H. L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11478-11482.
- Geissler, M., Gesien, A., Tokushige, K., & Wands, J. R. 1997. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J. Immunol.* 158: 1231-37.
- Gerdts, V., Jöns, A., Makoschey, B., Visser, N., & Mettenleiter, T. C. 1997. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J. Gen. Virol.* 78: 2139-2146.
- Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I., & Howard, B. H. 1982. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter

- when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6777-6781.
- Grooms, D. L., Brock, K. V., & Ward, L. A. 1998. Detection of cytopathic bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhea virus vaccine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 130-134.
- Hacker, H., Mischak, H., Miethke, T., Liptay, S., Schmid, R., Sparwasser, T., Heeg, K., Lipford, G. B., & Wagner, H. 1998. CpG-DNA-Specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 17: 6230-40.
- Hafez, S. M., & Liess, B. 1972. Studies on bovine viral diarrhea-mucosal disease virus. II. Stability and some physico-chemical properties. *Acta Virol.* 16: 399-408.
- Halpern, M. D., Kurlander, R. J., & Pisetsky, D. S. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon- $\gamma$  production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cell. Immunol.* 167: 72-78.
- Harpin, S., Elahi, S. M., Cornaglia, E., Yolken, R. H., & Elazhary, Y. 1995. The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol* 140: 1285-1290.
- Hegde, N. R. & Srikumaran, S. 1997. The use of bovine MHC class I allele-specific peptide motifs and proteolytic cleavage specificities for the prediction of potential cytotoxic T lymphocyte epitopes of bovine viral diarrhea virus. *Virus Gene* 14: 111-121.
- Hinkula, J., Lundholm, P., & Wahren, B. 1997. Nucleic acid vaccination with HIV regulatory genes: a combination of HIV-1 genes in separate plasmids induces strong immune responses. *Vaccine* 15: 874-8.
- Houe, H., & Heron, I. 1993. The immune response to other agents of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Acta Vet Scand.* 34: 305-310.

- Heussler, V. T., Eichhorn, M., & Dobbelaere, D. A. 1992. Cloning of a full-length cDNA encoding bovine interleukin 4 by the polymerase chain reaction. *Gene* 114: 273-278.
- Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D. L., Yawman, A. M., Deck, R. R., Dewitt, C. M., Orme, I. M., Baldwi, S., D'Souza, C. S., Drowart, A., Lozes, E., Van-denbussche, P., Mooren, J-P., Liu, M. A., & Ulmer, J. B. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Med.* 2: 893-898.
- Ishii, N., Fukushima, J., Kaneko, T., Okada, E., Tani, K., Tanaka, S. I., Hamajima, K., Xin, K. Q., Kawamoto, S., Koff, W., Nishioka, K., Yasuda, T., & Okuda, K. 1997. Cationic liposomes are a strong adjuvant for a DNA vaccine of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13: 1421-28.
- Iwasaki, A., Stiernholm, B. J., Chan, A. K., Berinstein, N. L., & Barber, B. H. 1997. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *J. Immunol.* 158: 4591-4601.
- Jenkins, M. K., & Schwartz., R. H. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165: 302-319.
- Kahrs, R. F. 1966. Determination of 95% antigenic dose for bovine viral diarrhea vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 27: 1551-1554.
- Kalish, R. S. 1995. Antigen processing: the gateway to the immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32: 640-652.
- Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., & Krieg, A. M. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2879-2883.
- Klinman, D. M., Yamshchikov, G., Ishigatsubo, Y. 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 158: 3635-39.

- Klinman, D. M., Takeno, M., Ichino, M., Gu, M., Yamshchikov, G., Mor, G., & Conover, J. 1997. DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Semin. Immunopathol.* 19: 245-256.
- Kovacsics-Bankowsky, M., & Rock, K. L. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267: 243-?
- Kreeft, H. A. J. G., Grieser-Wilke, I., Moenning, V., & Horzinek, M. C. 1990. Attempts to characterize bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 97: 63-65.
- Krieg, A. M., Yi, A-K., Matson, S., Wald-Schmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretsky, G. A., & Klinman, D. M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-548.
- Kundig, T. M., Bachmann, M. F., DiPaolo, C., Simard, J. J., Battegay, M., Lother, H., Gessner, A., Kuhlcke, K., Ohashi, P. S., *et al.* 1995. Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* 268: 1343-47
- Lamb, J. R., Skidmore, B. J., Green, N., Chiller, J. M. & Feldmann, M. 1983. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J. Exp. Med.* 157: 1434-47.
- Larsen, D. L., Dybdahl-Sissoko, N., McGregor, M. W., Draper, R., Neumann, V., Swain, W. F., Lunn, D. P., & Olsen, C. W. 1998. Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J. Virol.* 72: 1704-08.
- Larsson, B., & Fossum, C. 1992. Bovine viral diarrhoea virus induces in vitro a proliferative response of peripheral blood mononuclear cells from cattle immunized by infection. *Vet. Micro.* 31: 317-325.
- Levings, R. L., & Wessman, S. J. 1991. Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. *Dev. Biol. Stand.* 75: 177-181.

- Liang, H., Nishioka, Y., Reich, C. F., Pisetsky, D. S., & Lipsky, P. E. 1996. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest.* 98: 1119-1129.
- Liu, M. A., McClements, W., Ulmer, J. B., Shiver, J., & Donnelly, J. 1997. Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 15: 909-912.
- Lobmann, M., Charlier, P., Florent, G., & Zygraich, N. 1984. Clinical evaluation of a temperature-sensitive bovine viral diarrhea vaccine strain. *Am J. Vet. Res.* 45: 2498-2503.
- Lopez-Macias, C., Lopez-Hernandez, M. A., Gonzalez, C. R., Isibasi, A., & Ortiz-Navarrete, V. 1996. Induction of antibodies against *Salmonella typhi* OmpC porin by naked DNA immunization. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 772: 285-288.
- Manickan, E., Rouse, R., Yu, Z. Y., Wire, W. S., & Rouse, B. T. 1995. Genetic immunization against herpes-simplex-virus protection is mediated by CD4(+) T-lymphocytes. *J. Immunol.* 155: 259-265.
- Martin, S. W., Meek, A. H., Davis, D. G., Thomson, R. G., Johnson, J. A., Lopez, A., Stephens, L., Curtis, R. A., Prescott, J. F., Rosendal, S., Savan, M., Zubaidy, A. J., & Bolton, M. R. 1980. Factors associated with mortality in feedlot cattle: the Bruce County Beef Cattle Project. *Can. J. Comp. Med.* 44: 1-10.
- Martin, S. W., Meek, A. H., Davis, D. G., Johnson, J. A., & Curtis, R. A. 1981. Factors associated with morbidity and mortality in feedlot calves: the Bruce County beef project, year two. *Can. J. Comp. Med.* 45: 103-112.
- Martin, S. W., Meek, A. H., Davis, D. G., Johnson, J. A., & Curtis, R. A. 1982. Factors associated with morbidity and treatments costs in feedlot calves: the Bruce County beef project, years 1978, 1979, 1980. *Can. J. Comp. Med.* 46: 341-346.
- Martinez, X., Brandt, C., Saddallah, F., Tougne, C., Barrios, C., Wild, F., Dougan, G., Lambert, P. H., & Siegrist, C. A. 1997. DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T

- lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8726-31
- McClurkin, A. W., Bolin, S. R., & Coria, M. F. 1985. Isolation of cytophatic and noncytophatic bovine viral diarrhea virus from spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186: 568-569.
- Messina, J. P., Gilkeson, G. S., & Pisetsky, D. S. 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* 147: 1759-1964.
- Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E. J., & Thiel, H. J. 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 180: 602-616.
- Meyers, G., Tautz, N., Stark, R., Brownlie, J., Dubovi, E. J., Collett, M. S., & Thiel, H. J. 1992. Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology* 191: 368-386.
- Montgomery, D. L., Shiver, J. W., Leander, K. R., Perry, H. C., Friedman, A., Martinez, D., Ulmer, J. B., Donnelly, J., J., & Liu, M. A. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* 12: 777-783.
- Mor, G., Yamshchikov, G., Segegah, M., Takeno, M., Wang, R., Houghten, R. A., Hoffman, S., & Klinman, D. M. 1996. Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination in mice. *J. Clin. Invest.* 98: 2700-2705.
- Moreau, P., Hen, R., Wasyluk, B., Everett, R., Gaub, M. P., & Chambon, P. 1981. The SV40 72 base pair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucleic Acid Res.* 9: 6047-6068.
- Mueller, D. L., Jnekins, M. K., & Schwartz, R. H. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 445-480.

- Nichols, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V., & Troilo, P. J. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772: 30-39.
- Nickloff, B. M. 1993. Dermal immune system. CRC Press, Boca Raton.
- Nuttall, P. A., Luther, P. D., & Stott, A. J. 1977. Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. *Nature* 266: 835-837.
- Olafson, P., MacCallum A. D., & Fox, A. 1946. An appenrently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 37: 104-106.
- Pardoll, D. M., & Beckerleg, A. M. 1995. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity* 3: 165-169.
- Pfarr, D. S., Rieser, L. A., Woychik, R. P., Rottman, F. M., Rosenberg, M., & Reff, M. E.. 1986. Differential effects of polyadenylation regions on gene expression in mammals cells. *DNA* 5: 115-122.
- Pellerin, C., Van Den Hurk, J., Lecomte, J., & Tijssen, P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreak and high mortalities. *Virology* 203: 260-268.
- Pertmer, T. M., Eisenbraun, M. D., McCabe, D., Prayaga, S. K., Fuller, D. F., & Haynes, J. R. 1995. Gene gun-based nucleic acid immunization-elicitation of humoral and cytotoxic T-lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 13: 1427-30.
- Pertmer, T.M., Roberts, T.R., & Hayes, J.R. 1996. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.* 70: 6119-6125.
- Pfeifer, J. D., Wick, M. J., Roberts, R. L., Findlay, K., Normark, S. J., & Harding, C. V. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361: 359-62.
- Pirzadeh, B., & Dea, S. 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 79: 989-999.



- Poole, T. L., Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A., & Collett, M. S. 1995. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206: 750-754.
- Porgador, A., Irvine, K. R., Iwasaki, A., Barber, B. H., Restifo, N. P., & Germain, R. N. 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 188: 1075-82.
- Potgieter, L. N., McCracken, M. D., Hopkins, F. M., Walker, R. D., & Guy, J. S. 1984a. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J. Vet. Res.* 45: 687-690.
- Potgieter, L. N. D., McCracken, M. D., Hopkins, F. M., & ?. 1984b. Experimental production of respiratory tract disease with bovine viral diarrhoea virus. *Am J. Vet. Res.* 45: 1582-1585.
- Potgieter, L. N. 1988. Immunosuppression of cattle as a result of bovine viral diarrhoea infection. *Agri Pract* 9: 7-14.
- Prince, A. M., Whalen, R., & Brotman, B. 1997. Successful DNA-based HBV immunization of newborn chimpanzees. *Vaccine* 15: 916-919.
- Purchio, A. F., Larson, R., Torborg, L. L., & Collett, M. S. 1983. Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 48: 320-324.
- Qi, F., Ridpath, J. F., Lewis, T., *et al.* 1992. Analysis of the bovine viral diarrhoea virus genome for possible cellular insertions. *Virology* 189: 285-292.
- Ramsey, F. K., & Chivers, W. H. 1953. Mucosal disease of cattle. *North Am. Vet.* 34: 629-633.
- Raz, E., Carson, D.A., Parker, S.E., Parr, T.B., Abai, A.M., Aichinger, G., Gromkowski, S.H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M.A., Baird, S.M., & Rhodes, G.H. 1994. Intradermal gene immunization: The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9519-9523.
- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J. A., Roman, M., Swann, S. L., Spiegelberg, H. L., & Carson, D. A. 1996. Preferential induction of a Th1

- immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5141-5145.
- Reeves, R., Spies, A. G., Nissen, M. S., Buck, C. D., Weinberg, A. D., Barr, P. J., Magnuson, N. S., & Magnuson, J. A.. 1986. Molecular cloning of a functional bovine interleukin 2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3228-32.
- Renard, A., Guiot, C., Schmetz, D., Dagenais, L., Pastoret, P. P., Dina, D., & Martil, J. A. 1985. Molecular cloning of bovine viral diarrhoea virus sequences. *DNA* 4: 429-438.
- Ridge, J. P., Fuchs, E. J., & Matzinger, P. 1996. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science* 271: 5141-5145.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., & Dubovi, E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.
- Ridpath, J.F., & Bolin, S.R. 1995. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212: 39-46.
- Robinson, H.L., Hunt, L. A., & Webster, R. G. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11: 957-960.
- Rossi, C. R., Bridgman, C. R., & Kiesel, G. K. 1980. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1680-1681.
- Roth, J. A., & Kaeberle, M. L. 1991. Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with or without the administration of ACTH. *Am. J. Vet. Res.* 44: 2366-2372.
- Sarzotti, M., Robbins, D. S., & Hoffman, P. M.. 1996. Induction of protective CTL response in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 271: 1726-1728.
- Sarzotti, M., Dean, T. A., Remington, M. P., Ly, C. D., Furth, P. A., & Robbins, D. S.. 1997. Induction of cytotoxic T cell responses in newborn mice by DNA immunization. *Vaccine* 15: 795-797.

- Sasaki, S., Sumino, K., Hamajima, K., Fukushima, J., Ishii, N., Kawamoto, S., Mohri, H., Kensil, C. R., & Okuda, K. 1998. Induction of systemic and mucosal responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS-21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. *J. Virol.* 72: 4931-39.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E., & Thiel, H. L. 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261: 1169-1171.
- Schultz, R. D. 1993. Certain factors to consider when designing a bovine vaccination program. In Proceedings of the 26th Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioners, Albuquerque, NM, p. 19.
- Schwartz, R. H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of Cd28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71: 1065-8.
- Schwartz, R. H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?. *J Exp. Med.* 184: 1-8.
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. & Hoffman, S.L. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9: 9866-9870.
- Shirai, M., Akatsuka, T., Pendleton, C. D., Houghten, R., Wychowski, C., Mihalik, K., Feinstone, S., & Berzofsky, J. A. 1992. Induction of cytotoxic T cells to a cross-reactive epitope in the hepatitis C virus nonstructural RNA polymerase-like protein. *J. Virol.* 66: 4098-4106.
- Steck, F., Lazary, S., Fey, H., Wandeler, A., Huggler, C., Oppliger, G., Baumberger, H., Kaderli, R., & Martig, J.. 1980. Immune responsiveness in cattle fatally affected by bovine viral diarrhea-mucosal virus. *Zentbl. Vet. Med. B* 27: 429-448.
- Stewien, K. E., Barbosa, V., de Lima, O. S., & Osiro, K. 1978. The influence of maternally derived antibody on the efficacy of further attenuated measles vaccines. *Infection* 6: 207-210.

- Stober, M. 1984. Current knowledge of the BVD syndrome of cattle: Agent, immune response, course and spread, control. *Bov. Pract.* 19: 49-60.
- Strauss, E. G., & Strauss, J. H. 1983. Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes. *Curr. Top. Micro. Immunol.* 105: 1-98.
- Tamura, J. K., Warrener, P., & Collett, M. S. 1993. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 193: 1-10.
- Tang, D. C., Devit, M., & Johnston, S. A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.
- Tascon, R. E., Colston, M. J., Ragno, S., Stavropoulos, E., Gregory, D., & Lowrie, D. B. 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Med.* 2: 888-892.
- Thomson, S. A., Elliott, S. L., Sherritt, M. A., Sproat, K. W., Coupar, B. E., Scalzo, A. A., Forbes, C. A., Ladhmans, A. M., Mo, X. Y., Tripp, R. A., Doherty, P. C., Moss, D. J., & Suhrbier, A. 1996. Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* 157: 822-826.
- Truitt, R.L., & Shechmeister, I.L. 1973. The replication of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in bovine leukocytes in vitro. *Arch. Ges. VirusF* 42: 78-87.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., Dewitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L., & Liu, M. A.. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-49.
- Ulmer, J. B., Deck, R. R., Dewitt, C. M., Donnelly, J. J., & Liu, M. A. 1996. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89: 59-67.

- van Drunen Little-van den Hurk, S., Braun, R.P., Lewis, P.J., Karvonen, B.C., Baca-Estrada, M.E., Snider, M., McCartney, D., Watts, T., & Babiuk, L.A. 1998. Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *J. Gen. Virol.* 79: 831-839.
- Vitadello, M., Schiaffino, M. V., Picard, A., Scarpa, M., & Schiaffino, S. 1994. Gene transfert in regenerating muscle. *Hum. Gene Ther.* 5: 11-18.
- Wang, R., Doolan, D. L., Charoenvit, Y., Hedstrom, R. C., Gardner, M. J., Hobart, P., Tine, J., Sedegah, M., Fallarme, V., Sacci, J. B., Kaur, M., Klinman, D. M., Hoffman, S. L., & Weiss, W. R. 1998. Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four Plasmodium falciparum DNA plasmids. *Infect. Immun.* 66: 4193-4202.
- Warrener, P., & Collett, M. S. 1995. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.* 69: 1720-1726.
- Webster, R. G., Fynan, E. F., Santoro, J. C., & Robinson, H. 1994. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the hemagglutinin. *Vaccine* 12: 1495-98.
- Wells, D. J. 1993. Improved gene transfert by direct plasmid injection associated with regeneration in mouse skeletal muscle. *FEBS lett.* 332: 179-182.
- Wensvoort, G., & Terpstra, C. 1988. Bovine viral diarrhea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccines. *Res. Vet. Sci.* 45: 143-148.
- Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Y., Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kaariainen, L., Lvov, D. K., Porterfield, J. S., Russell, P. K., & Trent, D. W. 1985. Flaviviridae. *Intervirology* 24: 183-192.
- Wiskerchen, M., & Collett, M. S. 1991. Pestivirus gene expression: prottein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 184: 341-350.
- Wiskerchen, M., Belzer, S. K., & Collett, M. S. 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open

- reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* 65: 4508-4514.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Ascadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L.. 1990. Direct gene transfert into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-68.
- Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., & Jani, A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expresion in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* 1: 363-369.
- Xiang, Z.Q., Spitalnik, S., Tran, M., Wunner, W.H., Cheng, J., & Ertl, H.C.J. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994, 199: 132-140.
- Xu, D., & Liew, F. Y. 1995. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L.-major*. *Immunology* 84: 173-176.
- Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Kuramoto, E., Yano, O., & Tokunaga, T. 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce TNF and augment TNF-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* 148: 4072-4076.
- Yang, W., Waine, G. J., & McManus, D. P. 1995. Antibodies to *Schistosoma-japonicum* (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic-acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 1029-1039.
- Yankauckas, M. A., Morrow, J. E., Parker, S. E., Abai, A., Rhodes, G. H., Dwarki, V. J., & Gromkowski, S. H. 1993. Long-term antinucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injections of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol.* 12: 771-776
- Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. L., Matson, S., & Krieg, A. M. 1996. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J. Immunol.* 157: 5394-5402.
- Zarlenga, D. S., Canals, A., Aschenbrenner, R. A., & Gasbarre, L. C. 1995. Enzymatic amplification and molecular cloning of cDNA encoding the

small and large subunits of bovine interleukin 12. *Biochim. Biophys. Acta* 1270: 215-217.