

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 736 358**

②① N° d'enregistrement national : **95 08128**

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : C 12 N 7/01, A 61 K 39/275

①②

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 05.07.95.

③① Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la demande : 10.01.97 Bulletin 97/02.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR et ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE — FR.

⑦② Inventeur(s) : BERTAGNOLI STEPHANE, GELFI JACQUELINE, BOUCRAUT BARALON CORINE, PETIT FREDERIQUE et MILON ALAIN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : CABINET LAVOIX.

⑤④ VIRUS MYXOMATEUX RECOMBINANT.

⑤⑦ Un virus myxomateux recombinant vivant atténué, comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique, sous la dépendance d'un promoteur insérés dans l'un des gènes non essentiel pour la réplication dudit virus. Utilisation d'un tel virus pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner et efficacement les léporidés simultanément contre la myxomatose et une autre pathologie, notamment la RVHD, et un tel vaccin.

**FR 2 736 358 - A1**



5

10

15

La présente invention concerne un virus myxomateux recombinant vivant atténué, son utilisation pour la fabrication d'un vaccin, ainsi qu'un tel vaccin.

20

La présente invention concerne en particulier un vaccin recombinant myxomatose/maladie hémorragique virale des lapins utilisable pour vacciner simultanément les léporidés contre ces deux maladies.

25

Le virus myxomateux, étant un léporipoxvirus, présente des caractéristiques qui sont communes à tous les poxviridae. En effet, les poxviridae font partie d'une famille de virus à ADN double brin, qui se répliquent dans le cytoplasme de cellules eucaryotes hôtes. La partie centrale du génome du virus myxomateux comprend des gènes nécessaires à la transcription, à la réplication et à la maturation virales.

30

Aux extrémités de ce génome figurent des gènes non essentiels au cycle viral codant pour des protéines déterminant notamment la virulence du virus.

35

De façon connue, la myxomatose représente toujours une des pathologies virales majeures des léporidés, notamment du lapin de garenne, du lapin d'élevage. Le lièvre étant, quant à lui réceptif au virus, mais peu sensible.

Après infection et 3 à 5 jours d'incubation de la maladie, on observe notamment l'apparition de lésions cutanées pseudotumorales (les myxomes), une vive inflammation des paupières ou blépharite, et un écoulement purulent (conjonctivite et rhinite), aboutissant en quelques jours à la mort du léporidé.

La prophylaxie sanitaire de la myxomatose est très difficile à mettre en oeuvre en raison de ses particularités épidémiologiques (transmission essentiellement par des arthropodes vecteurs, principalement des puces et des moustiques). Seule une prophylaxie médicale généralisée permet de limiter sa progression et la mortalité des lapins.

Mais, celle-ci est d'autant plus compliquée à mettre en oeuvre que les pratiques d'élevage actuelles (production sous hangar...) ne favorisent pas cette prophylaxie sanitaire.

Les nombreuses recherches menées dans ce domaine depuis des années ont permis de mettre au point des techniques de vaccination plus ou moins efficaces contre cette maladie.

Ainsi, en France, a été développée une technique de vaccination reposant sur l'utilisation en primovaccination, d'un léporipoxvirus proche du virus myxomateux, le virus du Fibrome de Shope, et, pour les injections de rappel, d'une souche de virus myxomateux atténuée par passages en série sur culture cellulaire, notamment la souche SG33.

Bien que le virus SG33 s'avère être un virus très stable, on s'est aperçu que celui-ci est peu utilisable chez les jeunes animaux et dans les élevages à haut risque en raison d'un pouvoir immunodépresseur résiduel.

Toutefois, la myxomatose n'est pas la seule pathologie touchant les léporidés. En effet, ceux-ci sont aussi particulièrement sensibles à d'autres agents pathogènes, non seulement d'origine virale, mais aussi d'origines bactérienne ou parasitaire.

Ainsi, peuvent être cités à titre d'exemples non limitatifs : la maladie hémorragique virale des lapins ou RVHD (pour Rabbit Viral Haemorrhagic Disease), le EBHS (pour European Brown Hare Syndrome), les pathologies dues aux

rotavirus, la tularémie due à Francisella tularensis, la coccidiose, les entérites dues notamment à E. Coli ou à des Clostridies, la maladie de Tyzzer due à "Bacillus piliformis", l'encéphalitozoonose, la pasteurellose, la staphylococcie.

5 Afin de lutter contre les divers agents responsables de ces pathologies, des recherches variées ont bien sûr été menées, mais celles-ci n'ont abouti qu'à des résultats très médiocres ou alors difficiles à mettre en oeuvre d'un point de vue industriel.

10 A titre d'exemple non limitatif, on peut citer celles menées sur la maladie hémorragique virale des lapins ou RVHD, qui est également une des pathologies virales majeures des léporidés.

15 Le virus de la RVHD est principalement véhiculé par le biais de la nourriture et/ou de la boisson.

Dans la forme aiguë, la mort du lapin intervient 48 à 72 heures après infection.

20 Après autopsie, on constate de nombreuses hémorragies internes, ainsi que des lésions importantes du foie, de la trachée et des poumons de l'animal.

Actuellement, la prophylaxie médicale anti RVHD est fondée sur l'utilisation d'un vaccin adjuvé à virus inactivé extrait au préalable de foies d'animaux inoculés.

25 On comprend aisément que cette technique présente un inconvénient majeur. En effet, ce procédé, fondé sur une extraction de virus de foies d'animaux inoculés, est lourd. Cependant, il est un des seuls connus jusqu'à présent puisque le RHDV (Rabbit Haemorrhagic Disease Virus) reste impossible à cultiver sur systèmes cellulaires.

30 En résumé, les prophylaxies actuelles contre la myxomatose et les autres pathologies des léporidés présentent les problèmes et inconvénients suivants :

- elles sont parfois difficiles à mettre en oeuvre car elles reposent sur des techniques "lourdes" ;
- 35 - elles ne sont pas toujours efficaces et présentent parfois des effets secondaires indésirables ;
- elles ne permettent pas de lutter simultanément contre plusieurs maladies ;

- elles ne sont que très difficilement applicables à l'échelle industrielle.

5 Afin de pallier les problèmes techniques et les inconvénients de l'art antérieur, les inventeurs de la présente invention se sont fixé pour objectif la mise au point d'un virus myxomateux recombinant et un vaccin à base d'un tel virus recombinant permettant de vacciner efficacement et simultanément les léporidés contre la myxomatose et une autre pathologie, qui soit facile à mettre en oeuvre tout en étant très spécifique.

10 Pour ce faire, les inventeurs de la présente invention ont eu l'idée d'altérer les gènes non essentiels présents sur le génome du virus myxomateux, qui sont notamment le gène TK codant pour la thymidine kinase et les gènes M11L et MGF impliqués dans le pouvoir pathogène afin d'obtenir de nouveaux virus recombinants délétés et atténués utilisables pour la réalisation d'un vaccin anti-myxomatose et exprimant également des antigènes étrangers.

20 De telles recombinaisons entre le génome d'un virus myxomateux et un ou des gènes codant pour des antigènes présents sur différents agents pathogènes permettent une vaccination des léporidés non seulement contre la myxomatose, mais aussi contre la (les) maladie(s) ciblée(s).

25 La présente invention se propose donc de résoudre les inconvénients et de combler les lacunes de l'art antérieur grâce à un virus myxomateux recombinant vivant atténué, comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique sous la dépendance d'un promoteur insérés dans l'un des gènes non essentiel à la répllication dudit virus, par exemple un gène de virulence.

30 De façon avantageuse, ladite séquence nucléotidique code pour un immunogène viral, bactérien ou parasitaire des léporidés.

35 Préférentiellement, ladite séquence nucléotidique code pour une protéine antigénique, notamment de capsid, de membrane ou d'enveloppe d'un agent pathogène choisi dans le groupe formé par : le virus de la RVHD, le virus de l'EBHS, les rotavirus, le protozoaire responsable de l'encéphalitozoonose, les

entérobactéries notamment E. Coli et les clostridies, "Bacillus piliformis", les coccidies, les Pasteurella, Francisella tularensis, les staphylocoques.

Avantageusement, le virus myxomateux est issu d'une souche  
5 de léporipoxvirus choisie dans le groupe formé par les  
souches : SG 33, LEON 162, HONGROIS, FINISTERE, R 801,  
TOULOUSE 1, LAUSANNE.

Ces différentes souches ont fait l'objet d'un dépôt auprès  
de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes  
10 (C.N.C.M.) et ont été référencées comme suit :

- SG 33 : CNCM n° I-1594
- LEON 162 (L162) : CNCM n° I-1595
- HONGROIS (HG) : CNCM n° I-1593
- FINISTERE (F9) : CNCM n° I-1596
- 15 - R 801 : CNCM n° I-1598
- TOULOUSE 1 (T1) : CNCM n° I-1592
- LAUSANNE (Laus) : CNCM n° I-1597

Il est à noter que la souche 801 est une souche de type  
respiratoire c'est-à-dire qu'elle induit une pathologie  
20 respiratoire chez le lapin mais sans myxomes, et que les  
souches TOULOUSE 1 et LAUSANNE sont des souches classiques  
virulentes mais pouvant être atténuées par déletion.

Ces différentes souches présentent les propriétés et  
caractéristiques habituelles en ce qui concerne leur culture.

25 Préférentiellement, ladite séquence nucléotidique et ledit  
promoteur sont insérés dans les gènes M11L-MGF ou TK dudit  
virus myxomateux.

La présente invention concerne également l'utilisation d'un  
virus recombinant vivant atténué tel que décrit précédemment  
30 pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner  
efficacement les léporidés simultanément contre la myxomatose  
et une autre pathologie.

De façon avantageuse, le vaccin selon l'invention comprend  
comme vecteur le virus myxomateux recombiné vivant atténué tel  
35 que décrit précédemment.

Avantageusement, ledit vaccin comprend une dose vaccinale  
efficace de virus myxomateux recombiné.

Selon un mode de réalisation préférentiel, l'invention

concerne un vaccin recombinant permettant de vacciner simultanément les léporidés contre la myxomatose et la maladie hémorragique virale des lapins (RVHD), caractérisé en ce qu'il comprend comme vecteur le virus myxomateux vivant atténué  
5 comprenant une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique du virus de la maladie hémorragique virale des lapins, sous la dépendance d'un promoteur.

Préférentiellement, ladite séquence nucléotidique code pour  
10 et exprime, la protéine de capsid VP60 ou VP60+VP12 dudit virus de la maladie hémorragique virale des lapins.

Avantageusement, ledit promoteur de ladite séquence nucléotidique est le promoteur de vaccine précoce/tardif P7,5.

De façon avantageuse, la quantité efficace de virus  
15 recombinant par dose vaccinale est comprise entre  $10^2$  et  $10^9$  équivalents pfu (unités formant plaques ou "plaque forming units" en anglais), et pour la voie intradermique, de préférence entre  $10^3$  à  $10^6$  équivalents pfu.

Avantageusement, le vaccin est formulé en vue d'une  
20 administration parentérale, de préférence intradermique, ou orale.

Dans le cas de la maladie hémorragique virale des lapins (RVHD), les inventeurs ont réalisé un virus recombinant myxomatose-RHDV à partir d'un seul et même virus vivant  
25 atténué issu de la souche SG33, dans lequel a été cloné un gène de capsid du RHDV codant pour la protéine VP60.

Un tel recombinant myxomatose-RHDV permet une double vaccination anti-myxomatose et anti-RVHD (Rabbit Viral Haemorrhagic Disease), résolvant ainsi le(s) problème(s)  
30 posé(s) par ces deux agents pathogènes en élevage de lapins.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description suivante du protocole expérimental suivi, non limitatif, illustrant un mode de réalisation de l'invention, à savoir la réalisation d'un virus  
35 recombinant myxomatose-RHDV, en référence aux figures parmi lesquelles :

- la figure 1 représente des schémas illustrant la construction des plasmides pSM1 et pSM2 à partir du plasmide

pSC11-(VP60+VP12) et des gènes M11L-MGF et TK du virus de la souche SG33 ;

- la figure 2A représente un southern blot après migration en PFGE et hybridation par une sonde totale SG33 ;

5 - la figure 2B représente un southern blot après migration en PFGE et hybridation par une sonde VP60 ;

- les figures 3A et 3B représentent les gels d'électrophorèse obtenus après immunoprécipitation des virus SG33, RecIA122 et RecB2111 ;

10 - la figure 4 représente les courbes de titrage en anticorps anti VP60 (c'est-à-dire anti RVHD) obtenues par test ELISA après vaccination de lapins avec les virus RecA et RecB ;

15 - la figure 5 représente les courbes de titrage en anticorps anti myxomatose obtenues par test ELISA après vaccination de lapins avec les virus SG33, Rec A et Rec B ;

- la figure 6 représente les courbes de titrage en anticorps anti-myxomatose obtenues par séroneutralisation après vaccination de lapins avec les virus SG33, Rec A et Rec B.

20 Tout d'abord, le virus myxomateux SG33 (souche vaccinale) est cultivé sur cellules RK13 à 37°C en présence de milieu OptiMEM à 2% SVF (Sérum de Veau Foetal).

25 Le génome viral comprend les gènes M11L et MGF qui sont situés à son extrémité gauche. Ces deux gènes sont placés en tandem, la partie 3' de M11L chevauchant la partie 5' de MGF (2 cadres de lecture).

Une séquence de 1063 pb comprenant les 2 cadres de lecture plus les zones promotrices a été amplifiée par la réaction de PCR (polymerase Chain Reaction).

Les amorces utilisées sont les suivantes :

30 -GTAGGATCCGTAACAAGTGTAATATA (SEQ ID 1)

-CCCGGGATGTTTTTCGCGATGTGA (SEQ ID 2)

L'amplification a été réalisée en présence d'une unité de Taq polymérase sur un appareil Perkin-Elmer en utilisant le programme suivant sur 30 cycles :

35 50°C pendant 1 mn, 72° C pendant 1 mn et 95°C pendant 1 mn.

Le produit obtenu a ensuite été visualisé sur gel d'agarose à 0,7 % après coloration au BET.

On procède également à une amplification du gène de la TK

du virus SG33 dans les mêmes conditions, grâce aux amorces suivantes (séquence de la souche LAUSANNE) :

-GGTGTGGATAAGGAAGTTACG (SEQ ID 3)

-GAGGTCGCTGTCGGAGACG (SEQ ID 4)

5 Le produit obtenu, de 700 pb, comprend le cadre ouvert de lecture plus les séquences régulatrices.

Les amplicons obtenus ont été clonés dans le plasmide PGEMT (Promega). La séquence M11L-MGF a été ensuite sous clonée dans pSK+(Stratagène), aux sites Apal et Spel.

10 Par ailleurs, le gène de la VP60, avec ses séquences promotrices, suivies de la séquence VP12 en 3' a été cloné sous forme de cDNA dans pSK+. La protéine VP60 est la seule protéine de capsid du RHDV.

15 Après digestion par SacI et SmaI puis polissage par le fragment de Klenow de la DNA pol I, un fragment de 2,2 Kb comprenant l'ORF de la VP60 et la VP12 est cloné au site SmaI du plasmide pSC11 donnant le plasmide pSC11-VP60+VP12.

20 Le plasmide pSC11-VP60+VP12 est digéré par NotI en 3' et subit une digestion partielle par PstI en 5', dégageant ainsi un fragment de 5,6 kb (fragment A) comprenant le gène de la  $\beta$ gal, sous la dépendance du promoteur de vaccine tardif P11K et les gènes de la VP60+VP12 en aval du promoteur de vaccine précoce/tardif P7,5.

25 Cet ensemble est sous cloné dans pSK+ aux sites NotI et PstI (pSK+-A).

Après amplification par PCR des gènes TK et M11L-MGF de la souche SG33, les amplicons obtenus ont été clonés dans pGEMT, puis sous-clonés dans le plasmide pSK+ pour M11L-MGF.

30 Le plasmide pGEMT-TK a été digéré par EcoRV et, après digestion par NotI et KpnI, le fragment A est intégré dans pGEMT-TK au site EcoRV donnant le plasmide pSM2 dont la bonne orientation (le gène de la VP60 vers l'extrémité 3' de TK) est vérifiée par PCR et profil de restriction.

35 En ce qui concerne pSK+(M11L-MGF), les digestions par HincII et BsaBI ont permis de déléter les ORF des gènes M11L et MGF de 356 pb et d'insérer auxdits sites HincII et BsaBI un fragment plus petit de 5,3 Kb (fragment B) issu de la digestion par HindIII de pSK+(A) et ne comprenant pas la

séquence VP12, donnant ainsi pSM1.

La bonne orientation (VP60 vers l'extrémité 3' de MGF) est vérifiée par PCR et profil de restriction.

5 Pour chaque plasmide, l'orientation correcte est celle où le sens de transcription du gène de la VP60 correspond à celui du gène TK ou des gènes M11L-MGF. Ceci est vérifié par profil de restriction et amplification par PCR en utilisant une amorce externe sur les séquences TK ou M11L-MGF et une amorce interne sur la séquence  $\beta$ gal ou la séquence VP60.

10 Les virus recombinants ont été construits en suivant une procédure modifiée de la méthode standard d'obtention des mutants poxvirus.

Des cellules RK13 de 24 heures, à 90 % de confluence ont été infectées par 0,03 à 0,04 pfu/cellule de virus SG33.

15 Après 2 heures à 37°C, l'inoculum viral est éliminé et les cellules lavées deux fois avec de l'OptiMEMSS (sans sérum). Le mélange de transfection additionné de 3 ml d'OptiMEMSS est alors ajouté aux cellules. Ce mélange de transfection comprend 10  $\mu$ g de pSM1 ou pSM2, préalablement mixé pendant 20 mn à 20 40  $\mu$ g de lipofectamine.

L'ensemble est laissé à 37°C pendant 5h30, puis complété par 3 ml d'OptiMEM à 4 % de sérum de veau foetal (SVF), et remis à l'étuve (37°). Après 48 heures, les produits de recombinaison subissent 3 cycles de congélation-décongélation 25 et 20 secondes de sonication (puissance maximale, sonicateur B15 Branson) puis sont étalés sur des cellules RK13 de 24 heures, en OptiMEM 2 % SVF.

48 heures plus tard, le milieu liquide est remplacé par un milieu gélosé (M.E.M.E 2 X, agarose LM (Low Melting) 1 % et 30 SVF 2,5 %) qui, après 48 heures, est recouvert d'une surcouche d'agarose permettant la détection des virus recombinants (M.E.M.E. 2 X, LM 1 %, RN (Rouge Neutre) 1 % et Xgal 330  $\mu$ g/ml). Chaque plage bleue signalant la présence de virus recombinant est prélevée et diluée dans du DMEM à 2,5% SVF 35 afin d'être réétalée, après congélation-décongélation et sonication, sur cellules RK13. Après 5 cycles de purification sous agarose LM à 1 %, les virus recombinants sont amplifiés sur cellules RK13.

La structure génomique des virus recombinants a été confirmée par réaction de PCR (données non montrées), puis analysée par Southern-Blot. Le virus recombinant Myx.( $\Delta$ M11L-MGF)(VP60) est appelé RecB2111 (Rec B) et le virus recombinant Myx.[TK-(VP60+VP12)] est appelé RecIA122 (Rec A) .

Comme cela a été décrit ci-avant, les virus recombinants RecIA122 et RecB2111 ont été obtenus par une méthode classique dans laquelle la sélection de virus mutants est réalisée grâce à la coloration bleue issue de la dégradation du Xgal par la  $\beta$  galactosidase.

Les "foyers de lyse" produits par RecIA122 (Rec A) et le virus SG33 sont de taille et d'aspect équivalents. En revanche, pour RecB2111 (Rec B), les foyers sont plus petits, sans que cela nuise à la production virale.

D'abord vérifiés par PCR (données non fournies), les virus candidats sont analysés par southern-blot après une migration par la technique d'électrophorèse en champs pulsés (PFGE).

Ainsi, peut-on observer un polymorphisme de restriction entre les virus recombinants et le SG33.

Les étapes de l'analyse électrophorétique sont exposés ci-après.

Des inserts d'agarose à 0,75 % contenant l'extrait cytoplasmique de l'équivalent de  $10^6$  cellules RK13 infectées par un virus recombinant ou du virus SG33 sont préincubés dans du tampon 1 X de digestion pendant 15 mn à 4°C. Puis, 80 U d'enzyme de restriction (HindIII ou PstI) sont ajoutées et l'ensemble est mis à incuber 12 heures à 37°C.

Les inserts ainsi préparés sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % où ils subissent une migration électrophorétique en champs pulsés (alternance 1,5 s) dans un tampon TBE 0,5 X , à 275 V pendant 7 heures. Les profils obtenus sont visualisés après coloration au BET.

En vue de compléter l'analyse de la structure génomique, on utilise la technique de Southern-Blot. Les gels d'électrophorèse en champs pulsés précédents ont été transférés sur membrane de nylon. Un fragment d'ADN de 830 pb correspondant aux sites internes ClaI-ClaI du gène de la VP60, et de l'ADN total du virus SG33, ont été marqués à la

digoxigénine par "Random-Priming". Après hybridation une nuit avec l'une ou l'autre des deux sondes, la détection se fait par réaction chemiluminescente suite à la dégradation d'un substrat par la phosphatase alcaline couplée à un anticorps anti digoxigénine.

En coloration au BET, et après hybridation avec une sonde SG33 totale, des différences nettes apparaissent entre les profils de digestion des virus-recombinants et ceux du virus SG33. Ces profils de restriction sont représentés sur la figure 2.

A partir des profils de restriction par HindIII et PstI du virus myxomateux de souche Lausanne, les fragments de DNA comprenant les gènes TK et M11L-MGF ont été identifiés.

Il est à noter que le fragment de 5,6 Kb (fragment A) ajoute 2 sites HindIII et PstI à ceux déjà existant sur le génome du SG33.

Ceci est illustré également par la figure 2 où :

Piste 1 : DNA de virus SG33 digéré par PstI

Piste 2 : DNA de virus RecIA122 digéré par PstI

Piste 3 : DNA de virus RecB2111 digéré par PstI

Piste 4 : DNA de virus RecB2111 digéré par HindIII

Piste 5 : DNA de virus RecIA122 digéré par HindIII

Piste 6 : DNA de virus SG33 digéré par HindIII.

En effet, sur la figure 2, on voit disparaître, sur les profils, une bande d'environ 32 kb pour le virus RecIA122 au profit de deux de 25 kb et 7 kb environ (fig. 2A, pistes 5 et 6), et une bande de 60 kb au profit d'une de 30 kb environ (pistes 1 et 2).

De même, le fragment de 5,3 kb ajoute, quant à lui, deux sites PstI et un site HindIII, provoquant la disparition d'une bande de 23 kb (fig. 2A, piste 3) d'une part, et d'autre part l'apparition de deux bandes de 13 kb et 8 kb (fig. 2A, piste 4) environ sur les profils obtenus avec le virus RecB2111.

D'autre part, l'hybridation avec une sonde interne (Cla I - ClaI)VP60, de 830 pb confirme la présence d'un seul insert sur le génome myxomateux pour chaque virus recombinant, comme on peut le constater sur la figure 2B où:

Piste 1 : DNA de virus RecIA122 digéré par PstI

Piste 2 : DNA de virus RecB2111 digéré par PstI

Piste 3 : DNA de virus RecB2111 digéré par HindIII

Piste 4 : DNA de virus RecIA122 digéré par HindIII.

5 L'expression de la VP60 en culture cellulaire a été vérifiée par immunoprécipitation et immunofluorescence.

Des cellules RK13 de 24 h, confluentes, infectées par 30 pfu/cellule de virus recombinants, soit RecB2111, soit RecIA122, sont marquées à la méthionine <sup>35</sup>S (100 µci/ml) pendant 5 h 30 min.

10 A l'issue de ce marquage, les cellules sont récoltées, lysées et les cytosols sont précipités en présence de protéine A sépharose, soit avec un sérum immun anti Myxomatose et RVHD, soit avec un anticorps polyclonal anti RVHD, soit avec 2 anticorps monoclonaux anti VP60, 61A47 et 4E3.

15 Les protéines ainsi marquées et précipitées subissent une électrophorèse en gel SDS-PAGE à 10% (figures 3A et 3B).

20 La protéine VP60 est visualisée sur cellules RK13 infectées, par immunofluorescence indirecte. Pour cela, les cellules infectées avec l'un ou l'autre des virus recombinants sont fixées 20 heures post-infection avec une solution à 50 % d'éthanol/50 % d'acétone avant d'être mises en présence d'anticorps anti VP60, soit polyclonaux, soit monoclonaux. La révélation est réalisée par un anticorps anti lapin ou anti souris FITC.

25 Après immunoprécipitation, pour les deux virus, apparaît clairement en SDS-page une bande protéique à environ 60 kDa, signalant la présence de la protéine VP60.

30 Les gels obtenus après immunoprécipitation sur cellules RK13 et électrophorèse sont représentés sur les figures 3A et 3B.

Le gel d'électrophorèse représenté sur la figure 3A a été réalisée selon le protocole suivant :

- piste 1 : protéines de cellules RK13 infectées par le virus SG33,
- 35 - piste 2 : protéines de cellules RK13 infectées par le virus RecIA122,
- piste 3 : protéines de cellules non infectées,
- PM : marqueur de poids moléculaire,

- Série a : précipitation par un sérum immun antimyxomatose et anti RVHD,
- Série b : précipitation par un sérum immun anti RVHD,
- Série c : précipitation par un anticorps monoclonal anti  
5 VP60 (61A47),
- Série d : précipitation par un anticorps monoclonal anti  
VP60 (4E3).

De même, le gel d'électrophorèse représenté sur la figure 3B a été réalisé selon le protocole suivant :

- 10 - piste 1 : protéines de cellules RK13 infectées par SG33,
- piste 2 : protéines de cellules RK13 infectées par Rec B  
2111,
- piste 3 : protéines de cellules RK13 non infectées,
- PM : marqueur de poids moléculaire,
- 15 - Série a : précipitation par un sérum immun anti  
myxomatose,
- Série b : précipitation par un sérum immun anti RVHD,
- Série c : précipitation par un anticorps monoclonal anti  
VP60 (61A47).

20

En immunofluorescence sur cellules RK13, la fluorescence cytoplasmique obtenue grâce à des anticorps anti VP60 ne laisse aucun doute quant à l'expression de la VP60 par les deux virus recombinants.

25

Après vérification de la bonne expression in vitro de la VP60, des lapereaux de 5 semaines ont subi une seule injection par voie ID (intradermique) de  $5 \cdot 10^3$  pfu de virus recombinants.

30

Il faut rappeler ici, que dans le cas de jeunes animaux à peine sevrés, les protocoles classiques préconisés par les industriels, d'une part associent deux injections successives de vaccins à virus inactivés, et d'autre part conseillent une primo vaccination anti myxomatose avec du virus de fibrome de Shope, suivie d'un rappel au SG33.

35

Donc, dans le but d'améliorer les systèmes existants en élaborant des virus recombinants myxomatose-RHDV exprimant de la sorte la protéine VP60, le protocole décrit ci-après a été suivi.

- pour la Valence RVHD :

Les expérimentations permettant d'explorer la valence RVHD ont été menées sur des lapereaux de 5 semaines.

Après prise de sang sur chaque individu, 54 lapins ont été  
5 vaccinés, soit avec une préparation commerciale ("lapinject" de Sanofi) (18 animaux), soit avec un des deux virus recombinants (18 animaux pour chacun).

Le vaccin "lapinject" de SANOFI est une préparation de virus RHDV inactivé et adjuvé. La moitié de chaque lot, et 5  
10 témoins, ont subi une épreuve virulente 5 jours plus tard (J5), tandis que l'autre moitié et 5 nouveaux témoins sont éprouvés à J15 par 1000 DL50 de virus RHDV.

Les épreuves virulentes réalisées à 5 et 15 jours post-inoculation ont mis en évidence la complète protection des  
15 lapereaux vis à vis d'une injection en intra-musculaire de 1000 DL50 de virus RHDV sauvage. En effet, contrairement aux lots témoins, aucun animal vacciné, et ce quelle que soit l'injection réalisée, n'a montré le moindre signe clinique, et tous ont survécu après l'inoculation à J5 ou J15.

Le tableau 1 ci-après expose non seulement quelques détails  
20 du protocole d'inoculation des différents virus, mais aussi les résultats obtenus après épreuves virulentes par 1000 DL50 de virus RHDV, lors de l'exploration de la valence RVHD.

25

TABLEAU 1

lot	vaccin utilisé	voie d'inocu- lation	inoculum/ sujet	morts/ total J5	morts/ total J15
1	RecA	ID	$5 \cdot 10^3$ pfu	0/9	0/9
2	RecB	ID	$5 \cdot 10^3$ pfu	0/9	0/9
3	Lapinject	SC	1 ml	0/9	0/9
T	Témoins	/	/	5/5	5/5

35

- Pour la valence myxomatose :

Les virus RecIA122 et RecB2111 ont été étudiés selon le  
40 protocole décrit ci-après et les résultats sont consignés dans le tableau 2.

Afin de tester le virus RecIA122, 24 lapins mâles de 5 semaines ont subi une seule inoculation par voie ID sur la face externe de l'oreille avec  $5.10^3$  pfu de virus en un seul point d'injection (12 avec du virus SG33 et 12 avec RecIA122).

5 En même temps, 6 lapins témoins du même âge, non inoculés, sont élevés dans les mêmes conditions.

Chaque lapin subit une prise de sang à J0, J10, J20, J30 et J44 afin de réaliser des sérologies pour les deux valences.

10 Un examen clinique minutieux est effectué quotidiennement de J0 à J15 afin de vérifier l'apparition de symptômes locaux ou généraux.

15 A l'issue de cette surveillance, les lapins sont éprouvés à J44 par injection ID de  $5.10^3$  pfu de virus myxomateux T1 (souche virulente TOULOUSE 1) et les signes cliniques sont observés pour chacun pendant une dizaine de jours.

Le même protocole a été appliqué dans un deuxième temps au virus RecB2111 avec, cette fois, 15 lapins dans chaque lot.

20 Ce protocole a permis de vérifier la totale innocuité de ces deux virus pour les jeunes lapins. En effet, seule une réaction locale au point d'inoculation équivalente à celle obtenue avec le virus SG33 a été observée.

25 Une cinétique de production d'anticorps anti myxomateux a été réalisée pour les virus recombinants et pour SG33, toujours sur 44 jours. Les réponses obtenues mesurées par la méthode ELISA sont présentées à la figure 5. Il apparaît que pour les virus SG33 et RecIA122, les cinétiques sont tout à fait comparables, avec un titre maximum à J30. Pour le virus RecB2111, les titres en anticorps plafonnent dès J21 et sont bien inférieurs à J30 et J44 à ceux obtenus pour les deux autres virus. Les résultats de tests de séroneutralisation effectués sur les trois virus confirment cette tendance : les titres en anticorps séroneutralisants sont stables de J30 à J44, mais là encore, restent plus faibles pour le virus RecB2111, comme cela est représenté sur la figure 6.

35 Le tableau 2 ci-après expose le protocole d'inoculation des différents virus en vue de l'exploration de la valence myxomatose :

TABLEAU 2

lot	vaccin utilisé	voie d'inocu- lation	inoculum/ sujet	nombre de lapins
1	RecA	ID	$5.10^3$ pfu	12
2	RecB	ID	$5.10^3$ pfu	15
3	SG33	ID	$5.10^3$ pfu	22
T	Témoins			12

15

L'épreuve virulente réalisée à J44 avec un virus myxomateux de souche T1 ( $5.10^3$  pfu) confirme l'équivalence du pouvoir protecteur entre la souche vaccinale SG33 et les virus recombinants. Cette protection, bien que partielle, est très satisfaisante puisqu'on constate la mort de seulement trois lapins dans les lots SG33, d'un lapin dans le lot RecIA122, et de trois lapins dans le lot RecB2111 après un tableau clinique de myxomatose grave généralisée (tableau 3).

Dans le tableau 3, sont consignés les résultats obtenus après épreuve virulente par la souche T1 à une concentration de  $5.10^3$  pfu injectée par voie intradermique.

TABLEAU 3

lot	myxome primaire seul	myxomes secondai- res sans altération de l'EG	généralisa- tion avec altération de l'état général	morts/total
1	6	2	4	1/12
2	1	7	7	3/15
3	6	7	9	3/22
T	0	0	12	12/12

40

Par ailleurs, les titres en anticorps anti-myxomatose et anti-RVHD ont été déterminés par tests ELISA et

séroneutralisation.

- Tests ELISA : Pour la valence myxomatose, des plaques à 96 puits (type Probind Falcon) ont été tapissées par contact durant une nuit à 37°C avec une suspension de virus myxomateux semi purifié sur coussin de saccharose dans du tampon PBS à

5 raison de 800 ng à 1 µg/cupule.

Pour la valence RVHD, les puits ont été recouverts dans les mêmes conditions, par la même quantité de protéine recombinante VP60 purifiée produite par un système Baculovirus en tampon PIPES à pH 6,5.

10

Les puits sont ensuite saturés pendant 1 h à 37°C par de la gélatine à 15 mg/ml diluée dans du PBS.

Après lavages, les échantillons de sérum à tester sont dilués de 2 en 2 dans du PBS à 0,1 % de Tween 20, la réaction antigène-anticorps ayant ensuite lieu à 37°C pendant 1 heure.

15

Après lavages, les puits sont incubés avec un conjugué anti lapin phosphatase alcaline, à 37°C pendant 1 h. Enfin, après lavages, le substrat (PNPP dans du tampon diéthanolamine) est ajouté à température ambiante.

Après 12 à 15 minutes, la lecture est effectuée au spectrophotomètre à une DO de 405 nm. Le titre en anticorps est égal à l'inverse de la dilution dont la DO est supérieure ou égale à trois fois celle du témoin négatif interne.

20

Les résultats obtenus sont schématisés par les figures 4 et 5.

25

En considérant la cinétique de production d'anticorps anti VP60 par test ELISA sur 44 jours après inoculation du virus recombinant RecIA122 à 12 lapereaux et du virus RecB2111 à 15 sujets dans des conditions identiques, il apparait nettement que les taux d'anticorps anti VP60 obtenus sont beaucoup plus importants après injection du virus RecB2111, et ce dès J21 (figure 4). De plus, à J44 il semble que les titres en anticorps ne soient pas encore à leur maximum.

30

Néanmoins, à partir des deux virus recombinants atténués la production d'anticorps anti VP60 est précoce, elle s'accroît de façon constante et elle permet la protection totale dès J5 contre un virus RHDV virulent.

35

- Séroneutralisation : Cette technique n'est utilisable que

pour la valence myxomatose puisque le virus de la RVHD n'est pas adapté à la culture cellulaire. Les sérums à tester sont dilués en série avec de l'OptiMEM en plaques à 96 puits sous un volume de 50  $\mu$ l. On ajoute alors 750 pfu de suspension virale par puits sous 50  $\mu$ l d'OptiMEM et le tout est incubé 60 minutes à 37°C puis 60 autres minutes à 4°C. Des cellules RK13 sont ensuite distribuées à raison de 1 à  $2.10^4$ /puits sous 50  $\mu$ l d'OptiMEM en présence de SVF à une concentration finale de 5 %. Après 3 à 4 jours d'incubation à 37°C, la lecture est effectuée quand l'effet cytopathogène est total dans les puits témoins sans anticorps.

Le titre neutralisant est exprimé par l'inverse de la dilution finale de sérum capable de protéger 75 % du tapis cellulaire (un sérum positif de référence est inclus dans chaque expérience).

Les résultats obtenus sont représentés par la figure 6.

En considérant tous les résultats précédents, on peut conclure que le vaccin selon la présente invention présente une innocuité et une efficacité tout à fait remarquable :

- d'une part, aucun des virus utilisés dans cette étude n'a révélé de pathogénicité résiduelle pour les lapereaux,
- d'autre part, la protection totale et parfaite contre la RVHD est observée dès le cinquième jour après la vaccination avec l'un ou l'autre des virus recombinants et ceci malgré les modestes taux en anticorps mesurés alors.

La présence ou non de la VP12 n'a aucune influence sur le pouvoir protecteur de la VP60 exprimée par le vecteur myxomateux. Ces résultats, particulièrement intéressants puisque obtenus après vaccination avec des virus vivants, encouragent l'utilisation de nouveaux vaccins et allègent significativement les procédés de fabrication de vaccins anti RVHD.

De plus, dans des conditions d'élevage, contrairement aux recommandations actuelles concernant le vaccin classique anti RVHD, le même résultat pourrait être obtenu avec une seule injection sur des lapereaux de moins de deux mois indépendamment de la présence ou non d'anticorps maternels anti RVHD résiduels.

La protection imparfaite observée après une épreuve par un virus myxomateux de type T1, tant avec le virus SG33 (3 morts sur 22) qu'avec les virus RecIA122 (1 mort sur 12) ou RecB2111 (3 morts sur 15), va dans le sens des précédents travaux. En effet, sur des animaux aussi jeunes, la protection conférée par une seule injection de virus vaccinal de type SG33 est très hétérogène et explique le protocole en deux injections préconisé par les fabricants. Cependant, tous les lapins présentant une forte séroconversion ont résisté sans dommage à l'épreuve virulente. En revanche, ceux ayant succombé faisaient partie d'une population à taux d'anticorps (dont les anticorps neutralisants) plus faibles. D'autre part, malgré des titres en anticorps moins élevés, les lapins vaccinés avec du virus RecB2111 ont, dans l'ensemble, bien résisté à l'épreuve.

Il est à noter que c'est la première fois que la souche SG33 fait l'objet d'une délétion ou d'une atténuation par recombinaison.

Une autre originalité de l'invention est que le virus vecteur est aussi le pathogène contre lequel on désire vacciner.

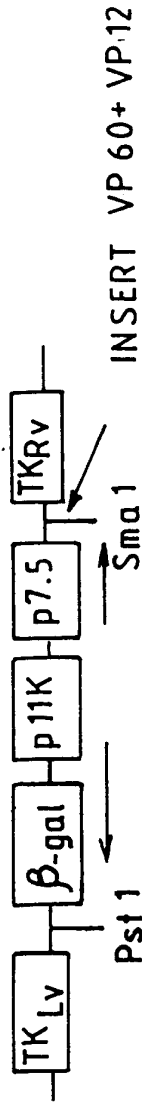
Enfin, un avantage non négligeable de l'utilisation d'un vecteur comme le virus myxomateux est que sa spécificité est si étroite qu'il n'est pathogène que pour les léporidés.

**REVENDEICATIONS**

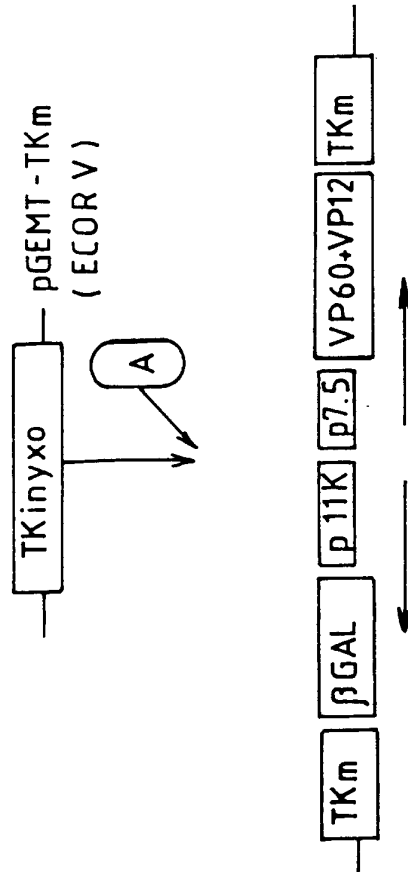
1. Virus myxomateux recombinant vivant atténué, comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique, sous la dépendance d'un promoteur insérés dans l'un des gènes non essentiel pour la réplication dudit virus.  
5
2. Virus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique code pour un immunogène viral, bactérien ou parasitaire des léporidés.  
10
3. Virus recombinant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique code pour une protéine antigénique, notamment de capsid, de membrane ou d'enveloppe, d'un agent pathogène choisi dans le groupe formé par : le virus de la RVHD, le virus de l'EBHS, les rotavirus, le protozoaire responsable de l'encéphalitozoonose, les entérobactéries notamment E. Coli et les clostridies, "Bacillus piliformis", les coccidiés, les Pasteurella, Francisella tularensis, les staphylocoques.  
15  
20
4. Virus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que le virus myxomateux est issu d'une souche choisie dans le groupe formé par les souches : SG33, LEON 162, HONGROIS, FINISTERE, R 801, TOULOUSE 1, LAUSANNE.  
25
5. Virus recombinant selon l'une des revendications 1, 2, 3 ou 4, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique et ledit promoteur sont insérés dans les gènes M11L-MGF ou TK dudit virus myxomateux.  
30
6. Utilisation d'un virus recombinant vivant atténué selon l'une des revendications 1 à 5 pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner efficacement les léporidés simultanément contre la myxomatose et une autre pathologie.  
35

7. Vaccin recombinant vivant atténué permettant de vacciner simultanément les léporidés contre la myxomatose et une autre pathologie selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend comme vecteur le virus myxomateux recombiné vivant atténué selon l'une des revendications 1 à 5.
8. Vaccin recombinant selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il comprend une dose vaccinale efficace de virus myxomateux recombiné.
9. Vaccin recombinant permettant de vacciner simultanément les léporidés contre la myxomatose et la maladie hémorragique virale des lapins (RVHD) selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il comprend comme vecteur le virus myxomateux vivant atténué comprenant une séquence nucléotidique codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique du virus de la maladie hémorragique virale des lapins, sous la dépendance d'un promoteur.
10. Vaccin recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite séquence nucléotidique code pour et exprime, la protéine de capsid VP60 ou VP60+VP12 dudit virus de la maladie hémorragique virale des lapins.
11. Vaccin recombinant selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce que ledit promoteur de ladite séquence nucléotidique est le promoteur de vaccine précoce/tardif P7,5.
12. Vaccin recombinant selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que la quantité efficace de virus recombinant par dose vaccinale est comprise entre  $10^2$  et  $10^9$  équivalents pfu, et pour la voie intradermique, de préférence, entre  $10^3$  et  $10^6$  équivalents pfu.
13. Vaccin recombinant selon la revendication 12, caractérisé en ce que le vaccin est formulé en vue d'une administration parentérale, de préférence intradermique, ou orale.

### pSC11 - VP 60 + VP 12

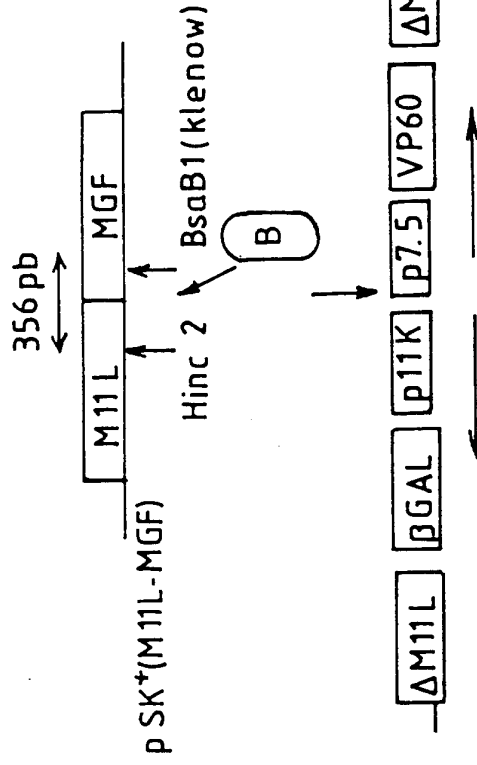


### pSM2



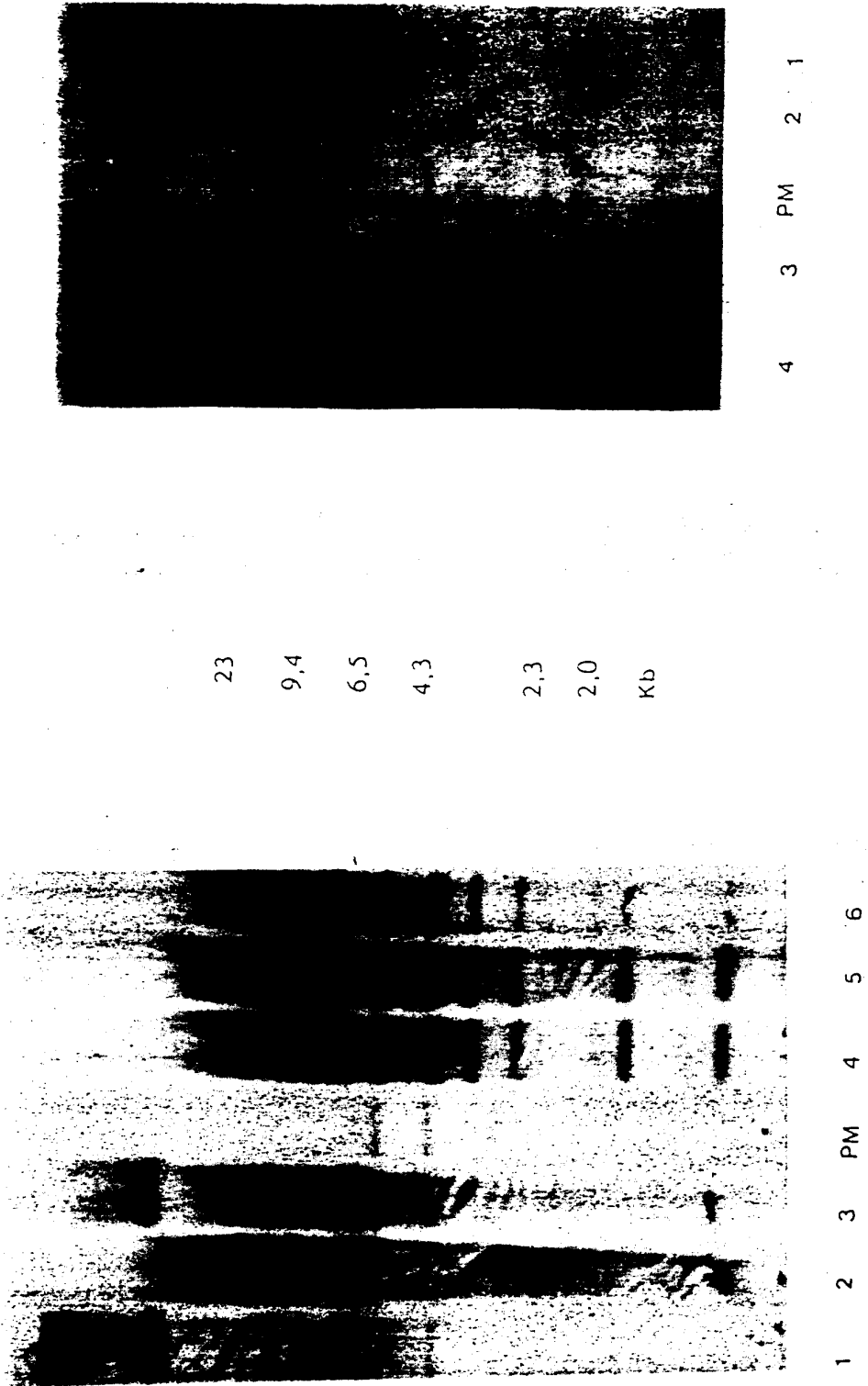
### pSM2

### pSM1



### pSM1

2/5



3/5

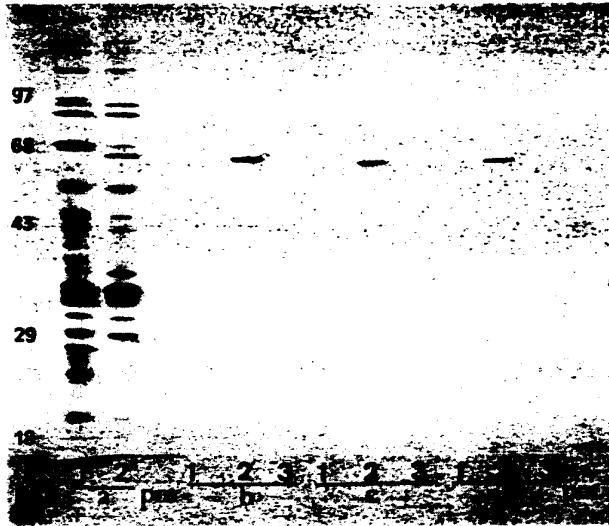


FIG. 3A

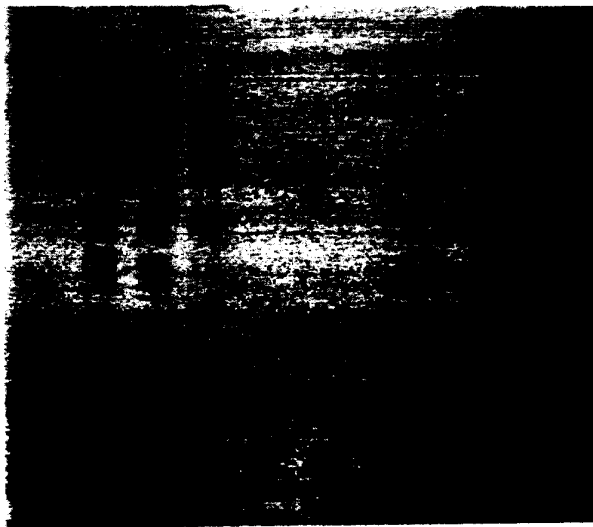
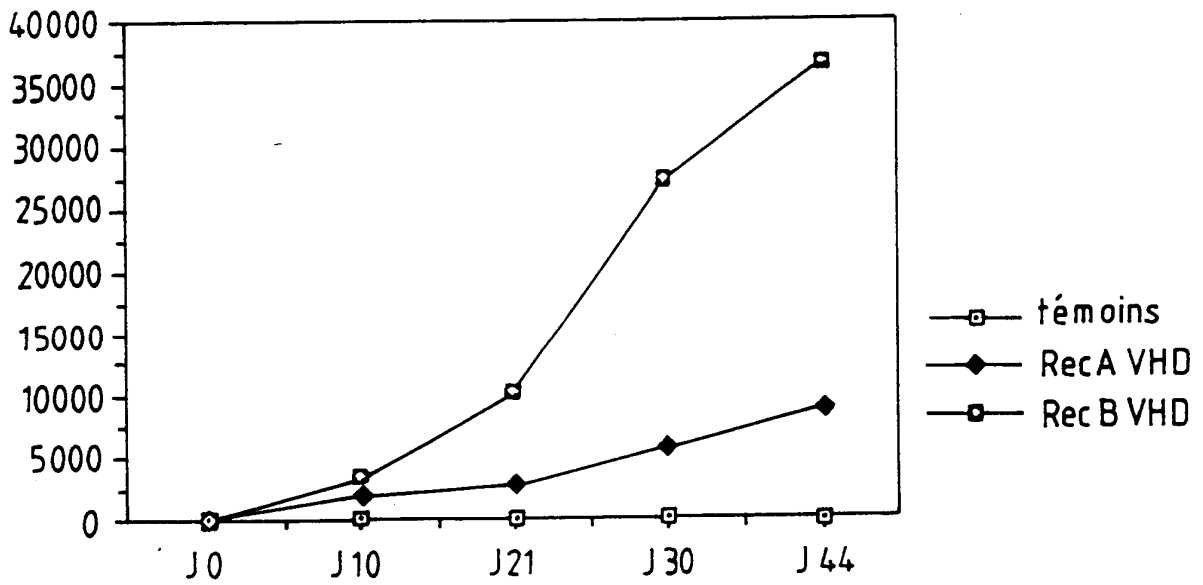
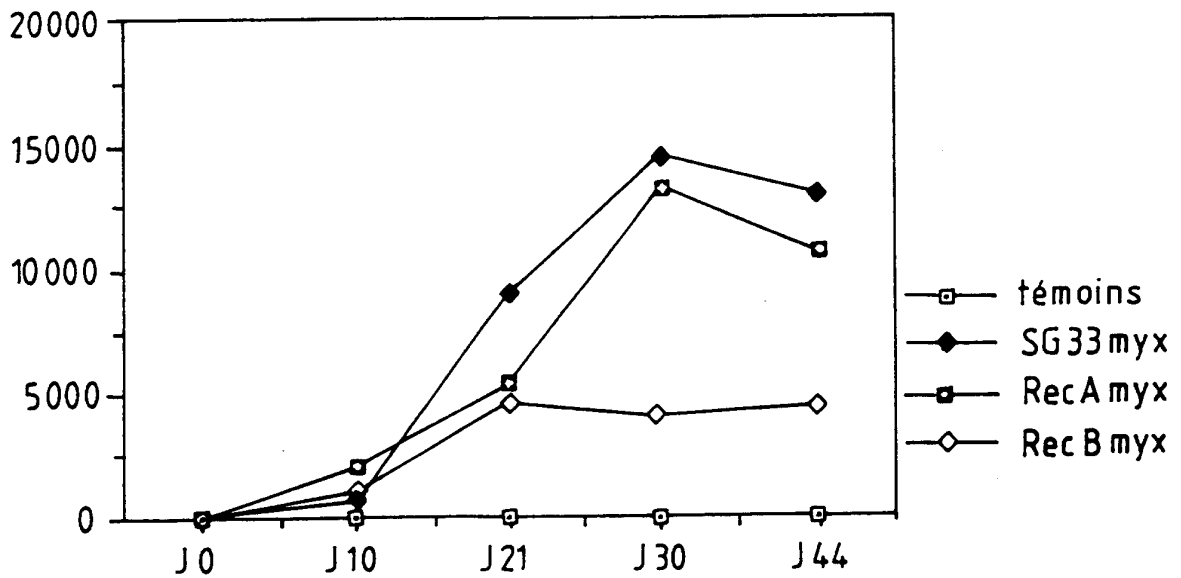


FIG. 3B

4/5

FIG. 4FIG. 5

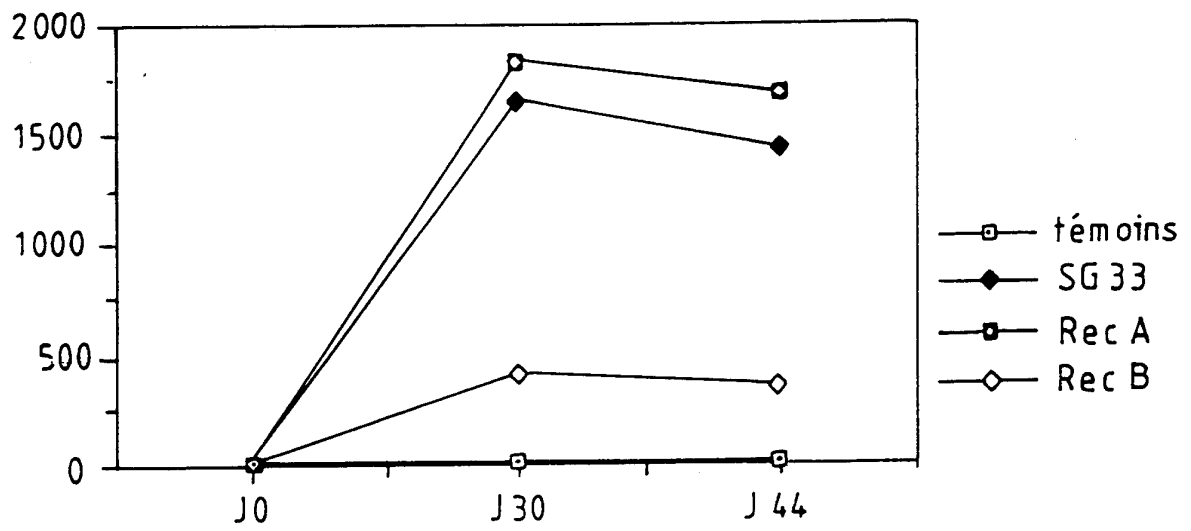


FIG. 6

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	J VIROL, AUG 1992, 66 (8) P4720-31, UNITED STATES, XP000568466 OPGENORTH A ET AL: "Deletion analysis of two tandemly arranged virulence genes in myxoma virus, M11L and myxoma growth factor." * le document en entier * ---	1-13
Y	J VIROL, OCT 1994, 68 (10) P6794-8, UNITED STATES, XP002002209 LAURENT S ET AL: "Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection." * le document en entier * ---	1-13
Y	ANN N Y ACAD SCI, MAY 31 1995, 754 P222-33, UNITED STATES, XP000568457 PERKUS ME ET AL: "Live attenuated vaccinia and other poxviruses as delivery systems: public health issues." * page 231 * ---	1-13
A	WO-A-95 03070 (SYNTRO CORP ; COCHRAN MARK D (US); JUNKER DAVID E (US)) 2 Février 1995 * revendications 1-20,71-86 * ---	1-13
A	J GEN VIROL, DEC 1992, 73 ( PT 12) P3241-5, ENGLAND, XP002002210 JACKSON RJ ET AL: "A myxoma virus intergenic transient dominant selection vector." * le document en entier * -----	1-13
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
6 Mai 1996		Gurdjian, D
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1500 03.82 (P04C13)

DOMAINES TECHNIQUES  
RECHERCHES (Int.CL.6)

A61K