

INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ DES GP<sub>4</sub> ET GP<sub>5</sub> DU VIRUS DU SYNDROME  
REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN ET MODULATION DE LA  
RÉPONSE IMMUNE CHEZ LE PORC**

Par  
Patrick Cléroux

Mémoire présenté pour l'obtention  
Du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
En virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury	Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Laurent Poliquin Département des sciences biologiques Université du Québec à Montréal
Examineur interne	Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche :	Serge Dea, INRS-Institut Armand-Frappier

©droits réservés de Patrick Cléroux, 2001

## RÉSUMÉ

Vers la fin des années 1980's et début des années 1990's une nouvelle maladie affectant les élevages porcins d'Amérique du Nord et d'Europe est apparue. L'agent causal, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (VSRRP), fut identifié en 1991. Depuis ce temps, le virus s'est répandu dans la majorité, sinon la totalité des pays producteurs de porcs et il est présentement reconnu comme étant l'agent le plus dévastateur affectant l'industrie porcine. Ce virus, membre de la famille *Arteriviridae*, est constitué de six protéines structurales regroupées en deux catégories : les protéines structurales majeures (N, M et GP<sub>5</sub>) et les protéines structurales mineures (GP<sub>4</sub>, GP<sub>3</sub> et GP<sub>2</sub>). Les principales cellules cibles du virus sont les macrophages alvéolaires porcins (PAMs). *In vitro*, le VSRRP ne peut se répliquer que sur les PAMs en cultures primaires et sur les lignées cellulaires dérivées de la lignée de rein de singe MA104 que sont les cellules MARC-145 et CL 2621. Récemment, le service de diagnostic a isolé des isolats de VSRRP ayant perdu la capacité de se propager sur les cellules MARC-145. Étant donné l'existence d'anticorps neutralisants dirigés contre la GP<sub>4</sub> et la GP<sub>5</sub> de la souche LV du VSRRP, suggérant que ces protéines pourraient jouer un rôle essentiel dans la liaison du virus à son récepteur cellulaire, cette étude avait pour but de vérifier l'hypothèse selon laquelle des mutations au niveau de ces protéines pourraient être responsables de la modification du tropisme du virus. D'une part, le séquençage des produits de RT-PCR, correspondant aux gènes codant pour la GP<sub>4</sub> et la GP<sub>5</sub> de quelques isolats cliniques ayant perdu la capacité de se répliquer sur les cellules MARC-145, fut réalisé. Les séquences en aa des GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> des isolats étudiés furent comparées à celles de souches de référence ayant la capacité de se multiplier sur les deux types de cultures cellulaires. Deux régions génomiques, l'une située dans l'ORF4 et correspondant aux résidus d'aa 55 à 63 de la GP<sub>4</sub>, et l'autre localisée au niveau de l'ORF5 et impliquant le codon de l'aa 10 de la GP<sub>5</sub>, démontrèrent des variations spécifiques à ces isolats. Ces régions pourraient jouer un rôle important dans la modification du tropisme du VSRRP et, possiblement, interagir avec le récepteur cellulaire.

D'autre part, l'attention fut portée sur l'obtention d'un vaccin efficace et sécuritaire contre le VSRRP. En effet, les vaccins existants sont soit plus ou moins efficaces dans la protection qu'ils confèrent contre la maladie et l'infection (vaccins inactivés), soit non sécuritaires (vaccins vivants atténués). Par ailleurs, bien que les Ac neutralisants soient dirigés contre les GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> du VSRRP, chez les porcelets, ce sont les Ac dirigés contre la GP<sub>5</sub> qui sont les plus nombreux, les plus efficaces et qui réagissent principalement contre des épitopes conservés chez la majorité des isolats. Ainsi, la GP<sub>5</sub> représente une cible intéressante pour la mise au point d'un vaccin sous-unitaire efficace et sécuritaire contre le SRRP. L'efficacité d'un vaccin inactivé par un agent n'affectant pas la structure et la glycosilation des protéines du virion fut évaluée, de même que celle d'adénovirus recombinants humains (hAdVreCs) portant soit le gène de l'ORF5 de type sauvage (ORF5-WT), soit un gène synthétique (ORF5-SYN) codant de façon optimale pour la GP<sub>5</sub> puisqu'il correspond à l'ORF5-WT modifié de façon à ce que l'ARNm qui en découle exprime les codons traduits le plus efficacement par les cellules de mammifères, résultant ainsi en une expression amplifiée de la protéine. Le vaccin inactivé a engendré une mémoire immunologique à l'hôte lui ayant conféré une certaine protection contre l'apparition de lésions pulmonaires suite à une infection-défi, mais la protection des animaux contre l'infection par le virus infectieux n'était que partielle. Lors des immunisations avec les hAdreCs, le virus recombinant exprimant le gène ORF5-SYN a engendré chez les porcelets une bien meilleure mémoire immunologique contre les épitopes neutralisants du VSRRP que le virus recombinant véhiculant le gène ORF5-WT. Toutefois, aucune conclusion n'a pu être émise quant à l'effet protecteur de cette immunisation suite à l'échec de l'infection-défi.

  
Étudiant : Patrick Cléroux

  
Directeur de recherche :  
Serge Dea, DMV, M.Sc., Ph.D.

## REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire n'aurait pu être réalisé sans l'aide des nombreuses personnes que j'ai cotoyées lors des quelques années qu'ont duré mes études de maîtrise à l'INRS-Institut Armand-Frappier. Ainsi, je voudrais remercier tous les gens qui m'ont aidé, de quelques façons que ce soit, à trouver le chemin de la réussite.

Plus particulièrement, je voudrais tout d'abord faire part de ma gratitude envers mon directeur de recherche, le Dr Serge Dea, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et qui m'a toujours encouragé et soutenu malgré les nombreux écueils rencontrés au cours de ma maîtrise. La sollicitude et la confiance qu'il me témoigna jouèrent un rôle important dans la réalisation de ces travaux.

Les différents étudiants et membres du personnel de l'édifice 27 avec qui j'ai travaillé ont également joué un rôle très important pendant cette période. Je voudrais remercier tout spécialement Dominic Therrien, mon partenaire de laboratoire, pour son aide, ses conseils, son humour, ses discussions sur tout et sur rien et son amitié. Aussi un merci spécial à Anne-Marie Gélinas et Geneviève Dorval qui ont grandement facilité mes périodes d'incubation lors de la première moitié de mes études, à Kane Cheikh Saad Bouh pour ses conversations de bureau et à Carl A. Gagnon pour l'ensemble de son œuvre.

Je voudrais également remercier les deux autres membres de mon jury, qui sont les Dr Yves St-Pierre et Laurent Poliquin, ainsi que les organismes subventionnaires et les compagnies qui ont fourni le financement de ce projet et des bourses d'études : Le CRSNG, la fondation Armand-Frappier, le FCAR, le MAPAQ, Biovet, Supratek Pharma et Vétrapharm.

Pour terminer, je voudrais remercier deux personnes, n'ayant rien à voir avec le milieu scientifique, qui ont joué un rôle primordial dans la réalisation de ce travail par le support moral et l'amour qu'elles m'ont démontrées. Tout d'abord, merci à ma mère qui m'a

toujours encouragé dans tout ce que j'ai entrepris et qui a toujours fait tout ce qui était en son pouvoir pour me rendre heureux. Finalement, merci à une personne que je n'aurais jamais rencontrée si je n'avais pas fait ma maîtrise, merci à celle qui me comble de bonheur, merci à la femme que j'aime, merci Catherine...

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1.1 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin.....	10
1.1.1 Historique.....	10
1.1.2 Taxonomie.....	12
1.1.3 Structure.....	12
1.1.3.1 Morphologie.....	12
1.1.3.2 Génome.....	17
1.1.3.3 Protéines virales.....	17
1.1.3.3.1 Protéines non-structurales.....	17
1.1.3.3.2 Protéines structurales.....	23
1.1.3.3.2.1 Protéines majeures.....	23
1.1.3.3.2.2 Protéines mineures.....	24
1.1.4 Caractéristiques physico-chimiques.....	26
1.1.5 Variabilité génomique.....	26
1.1.5.1 Régions non-codantes en 5' et en 3'.....	27
1.1.5.2 ORF1a et ORF1b.....	27
1.1.5.3 ORF2 à ORF7.....	28
1.1.6 Morphogenèse.....	30
1.1.6.1 Tropisme et récepteur.....	30
1.1.6.2 Réplication.....	33
1.2 Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin.....	34

1.2.1	Signes cliniques.....	34
1.2.2	Lésions.....	36
1.2.3	Hôte et transmission.....	38
1.2.4	Réponse immunitaire.....	39
1.2.4.1	Réponse humorale.....	39
1.2.4.2	Réponse cellulaire.....	41
1.2.5	Vaccination.....	42
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		45
2.1	Étude du tropisme du VSRRP.....	48
2.1.1	Sélection des souches à tropisme restreint pour les cellules PAMs.....	48
2.1.1.1	Lignées cellulaires établies.....	49
2.1.1.2	Immunofluorescence indirecte (IFI).....	50
2.1.2	Extraction d'ARN génomique.....	50
2.1.3	Amorces.....	51
2.1.4	Transcription inverse (RT).....	52
2.1.5	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	52
2.1.6	Purification, concentration et dosage de l'ADN.....	53
2.1.7	Séquençage et analyse des séquences.....	54
2.2	Infection expérimentale.....	55
2.2.1	Animaux.....	55
2.2.2	Virus.....	55
2.2.2.1	Titrage du virus.....	56
2.2.3	Infection des porcelets.....	56
2.2.4	Examens histologiques.....	56
2.2.5	Détection et isolement du virus.....	57
2.2.6	Analyses sérologiques.....	57
2.2.6.1	Immunofluorescence indirecte.....	57
2.2.6.2	ELISA Herdcheck de IDEXX.....	58
2.2.6.3	Séroneutralisation (SN).....	59
2.3	Vaccination avec virus inactivé.....	60

2.3.1	Animaux.....	60
2.3.2	Virus inactivé et vaccination.....	60
2.3.3	Virus et infection-défi.....	61
2.3.4	Examens histologiques.....	61
2.3.5	Détection et isolement du virus.....	61
2.3.6	Analyses sérologiques.....	61
2.3.6.1	Immunobuvardage de type Western (WB).....	62
2.4	Immunsation avec ORF5 recombinants.....	63
2.4.1	Gène ORF5 synthétique (ORF5-SYN).....	63
2.4.2	Vecteurs adénovirus recombinants.....	64
2.4.3	Vérification de l'expression de l'ORF5.....	64
2.4.3.1	GFP et Immunofluorescence indirecte.....	65
2.4.3.2	Marquage et immunoprécipitation des protéines recombinantes.....	65
2.4.4	Animaux.....	67
2.4.5	Protocole d'immunisations.....	67
2.4.6	Virus et infection-défi.....	68
2.4.7	Examens histologiques.....	68
2.4.8	Analyses sérologiques.....	68
2.4.8.1	ELISA anti-N.....	69
CHAPITRE III : RÉSULTATS.....		70
3.1	Étude du tropisme du VSRRP.....	71
3.1.1	Sélection des souches et isolats de VSRRP.....	71
3.1.2	Amplification des ORF4 et ORF5 des divers isolats par RT-PCR.....	72
3.1.3	Comparaisons des séquences en acides aminés.....	72
3.1.3.1	ORF4.....	75
3.1.3.2	ORF5.....	80
3.2	Infection expérimentale.....	80
3.2.1	Histologie.....	85
3.2.2	Analyses sérologiques.....	85

3.2.2.1	Immunofluorescence indirecte.....	85
3.2.2.2	ELISA Herdcheck de IDEXX.....	88
3.2.2.3	Séroneutralisation.....	88
3.2.3	Détection et isolement du virus.....	90
3.3	Vaccination avec virus inactivé.....	90
3.3.1	Histologie.....	91
3.3.2	Analyses sérologiques.....	91
3.3.2.1	Immunofluorescence indirecte.....	91
3.3.2.2	ELISA Herdcheck de IDEXX.....	92
3.3.2.3	Séroneutralisation.....	92
3.3.2.4	Immunobuvardage de type Western.....	94
3.3.3	Détection et isolement du virus.....	94
3.4	Immunsation avec ORF5 recombinants.....	97
3.4.1	Expression des protéines recombinantes.....	97
3.4.1.1	Expression de la GFP et IFI.....	98
3.4.1.2	Radioimmunoprécipitation (RIPA).....	98
3.4.2	Résultats suite à l'immunsation et à l'infection-défi.....	102
3.4.2.1	Histologie.....	105
3.4.2.2	Analyses sérologiques.....	105
3.4.2.2.1	Immunofluorescence indirecte.....	105
3.4.2.2.2	ELISA Herdcheck de IDEXX.....	106
3.4.2.2.3	ELISA anti-N.....	106
3.4.2.2.4	Séroneutralisation.....	108
3.4.2.2.5	Immunobuvardage de type Western.....	109
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....		112
4.1	Étude du tropisme du VSRRP.....	113
4.2	Modulation de la réponse immune contre l'infection par le VSRRP chez les porcs.....	117
4.2.1	Infection expérimentale.....	120
4.2.2	Vaccination avec le virus inactivé.....	122

4.2.3	Immunisation avec les vecteurs viraux exprimant le gène ORF5.....	125
APPENDICE A :	Increased proteolytic activity and matrix metalloprotease expression in lungs during infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus.....	133
RÉFÉRENCES.....		144

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Classification du VSRRP approuvée par le comité international pour la taxonomie des virus (ICTV) (Cavanagh, 1997).....13
- Figure 2 : Représentation schématique d'un isolat nord-américain du VSRRP (Tiré de Dea et al, 2000).....15
- Figure 3 : Organisation génomique et mode de répllication du VSRRP (Tiré de la thèse de doctorat de Carl Gagnon (2001) INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Qc, Canada).....19
- Figure 4 : Représentation schématique des polyprotéines codées par les ORF1a et ORF1ab et des sites de clivages de celles-ci (Tiré de Meulenberg, 2000).....21
- Figure 5 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose des produits d'amplification des régions d'ARN génomique englobant l'ORF4 et l'ORF5 du VSRRP.....73
- Figure 6 : Séquences en aa des GP<sub>4</sub> de divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs, par rapport à celles de souches de référence nord-américaines IAF-Klop et ATCC-VR2332, déduites à partir des séquences nucléotidiques déterminées pour les ORF4 amplifiés par RT-PCR.....76
- Figure 7 : Mise en évidence de deux régions des séquences en aa des GP<sub>4</sub> où des changements d'aa uniques aux divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs ont été identifiés et positionnement de ces régions sur un profil d'hydrophobicité généré à partir

	de la séquence en aa de l'isolat de référence IAF-Klop.....	78
Figure 8 :	Séquences en aa des GP <sub>5</sub> de divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs, par rapport à celles de souches de référence nord-américaines IAF-Klop et ATCC-VR2332, déduites à partir des séquences nucléotidiques déterminées pour les ORF5 amplifiés par RT-PCR.....	81
Figure 9 :	Mise en évidence de deux régions des séquences en aa des GP <sub>5</sub> où des changements d'aa uniques aux divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs ont été identifiés et positionnement de ces régions sur un profil d'hydrophobicité généré à partir de la séquence en aa de l'isolat de référence IAF-Klop.....	83
Figure 10 :	Photos comparatives de coupes histologiques de poumons de porcelets contrôles (a-c) versus celles de porcelets infectés par le VSRRP (d-f) colorées par H & E (Tiré de Girard et al., 2001; voir appendice A).....	86
Figure 11 :	Profils d'immunobuvardage de type Western obtenus pour les sérums récoltés 14 jours après une infection-défi avec la souche IAF-Klop du VSRRP chez des porcelets vaccinés et non vaccinés avec le virus inactivé.....	95
Figure 12 :	Expression de la glycoprotéine GP <sub>5</sub> recombinante dans les cellules MARC-145 infectées par les hAdVreco exprimant le gène ORF5-WT ou ORF5-SYN.....	99
Figure 13 :	Profils de radioimmunoprécipitation de la glycoprotéine GP <sub>5</sub> exprimée dans les lysats de cellules 293 rtTA infectées, en présence	

de doxycycline, avec les virus recombinants hAdTR5/ORF5-  
WT/DC/GFPq ou hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq.....103

Figure 14 : Profils d'immunobuvardage de type Western obtenus pour les  
sérums récoltés 10 et 28 jours après l'infection-défi avec la souche  
IAF-Klop du VSRRP chez des porcelets ayant été pré-immunisés  
ou non avec les hAdVrecs non-réplicatifs et inductibles portant les  
gènes ORF5-WT ou ORF5-SYN.....110

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Pourcentage d'identité en acides aminés des ORFs 2 à 7 de la souche européenne LV avec les souches de VSRRP provenant de différents pays et aussi avec deux autres artérovirus.....	29
Tableau 2 :	Adhérence du VSRRP à la surface des cellules permissives et non-permissives.....	32
Tableau 3 :	Analyses sérologiques effectuées sur les sérums prélevés, aux jours 0, 7 et 14, chez les porcelets infectés expérimentalement par la voie intratrachéale avec la souche IAF-Klop du VSRRP.....	89
Tableau 4 :	Résumé des analyses sérologiques effectuées sur les sérums des porcelets vaccinés et non-vaccinés avec le virus IAF-Klop inactivé, avant l'infection-défi (Pré) et après celle-ci (J14).....	93
Tableau 5 :	Résultats des analyses sérologiques effectuées , avant et après l'infection-défi, sur les sérums des porcelets ayant été pré-immunisés avec l'hAdCMV/tTA seul, ou simultanément avec l'hAdCMV/tTA et l'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq ou avec l'hAdCMV/tTA et l'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq.....	107

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa :	Acides aminés
Ac :	Anticorps
AcMo :	Anticorps monoclonaux
ADE :	Ac favorisants (« Antibody-dependant enhancement »)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ag :	Antigène
APS :	Persulfate d'ammonium
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
BALT :	« Bronchus associated lymphoid tissue »
BEA :	2-bromoéthylamine
BEI :	Éthylenimine binaire
BSA :	Albumine sérique bovine
°C :	Degré celcius
cp :	Cystéine protéase
cpm :	coups par minute
ctd :	Domaine 3'-terminal conservé
DO :	Densité optique
DTH :	Hypersensibilité de type retardée
EAV :	Virus de l'artérite équine
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ECP :	Effet cytopathique
ELISA :	« Enzyme-linked immunosorbent assay »
EMCV :	Virus de l'encéphalomyocardite
g :	gramme
GFP :	« Green fluorescent protein »
GP <sub>5</sub> :	Glycoprotéine majeure de l'enveloppe
GST :	Glutathione S-transférase
h :	Heure

HAAT :	Hyperthermie Anorexie Avortement Truie
hAdVrec :	Adénovirus recombinant humain
hd :	Domaine hydrophobe conservé
hel :	Motif hélicase
HEV :	Virus de l'encéphalomyélite hémagglutinant
ICTV :	Comité international pour la taxonomie des virus
IFI :	Immunofluorescence indirecte
Ig :	Immunoglobuline
kb :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
LBA :	Lavage broncho-alvéolaire
LDV :	Virus élévateur de la déhydrogénase lactique
LV :	Virus de Lelystad
m :	Domaine de liaison au zinc
M :	Protéine de la matrice
min :	Minute
mL :	Millilitre
mm :	Millimètre
MOI :	Multiplicité d'infection
N :	Protéine de la nucléocapside
nm :	Nanomètre
nsp :	Protéine non-structurale
nt :	Nucléotide
ORF :	Cadre de lecture ouvert
ORF5-WT :	Gène ORF5 de type sauvage
ORF5-SYN :	Gène ORF5 synthétique
PAMs :	Macrophages alvéolaires porcins
pb :	Paire de bases
PBS :	Solution tamponnée phosphate-saline
PCMV :	Cytomégalovirus porcine
pcp :	Cystéine protéase de type papaine

PEARS :	« Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome »
PEV :	Entérovirus porcin
pfu :	« plaque forming unit »
pi :	post-infection
pol :	Motif ARN polymérase ARN-dépendant
PPV :	Parvovirus porcin
PRRS :	« Porcine reproductive and respiratory syndrome »
PRV :	Virus de la pseudorage
RIPA :	Radioimmunoprécipitation
rpm :	Révolutions par minute
RT :	Transcription inverse
SDS-PAGE :	Électrophorèse sur gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide
SFB :	Sérum fœtal bovin
SHFV :	Virus de la fièvre hémorragique simienne
SIRS :	« Swine infertility and reproductive syndrome »
SIV :	Virus de l'influenza porcin
SN :	Séroneutralisation
sp :	Sérine protéase
SPF :	Exempt de pathogènes spécifiques
SRRP :	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
TCID <sub>50</sub> :	Dose infectieuse induisant un effet cytopathique dans 50% des cultures infectées
TGEV :	Virus de la gastroentérite transmissible du porc
tTA :	Transactivateur régulé par la tétracycline
UV :	Ultraviolets
V :	Volt
VSRRP :	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin
WB :	Immunobuvardage de type Western
µg :	Microgramme
µL :	Microlitre

## Abréviations des acides aminés

A :	Alanine
C :	Cystéine
D :	Acide aspartique
E :	Acide glutamique
F :	Phénylalanine
G :	Glycine
H :	Histidine
I :	Isoleucine
K :	Lysine
L :	Leucine
M :	Méthionine
N :	Asparagine
P :	Proline
Q :	Glutamine
R :	Arginine
S :	Sérine
T :	Thréonine
V :	Valine
W :	Tryptophane
Y :	Tyrosine

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) est une maladie qui engendre d'énormes pertes économiques dans l'ensemble des pays producteurs de porcs de la planète. Cette maladie, qui peut se présenter sous une forme subclinique ou sous une forme aiguë parfois suivie d'une phase chronique, est présente dans la très grande majorité, sinon la totalité des pays producteurs de porcs. La forme aiguë du SRRP peut engendrer d'importants problèmes reproducteurs chez les truies, tel que des mises bas prématurées, de la mommification fœtale, la naissance de porcelets mort-nés ou faibles ainsi qu'une baisse de la fertilité. Ce sont ces problèmes qui sont responsables de la majorité des pertes économiques encourues par la maladie. La composante respiratoire de la maladie peut également se manifester lors des épisodes aigus de SRRP. En effet, les porcelets, particulièrement les non-sevrés, peuvent être affectés de divers symptômes respiratoires tels de la dyspnée, de la toux et des étouffements. Ces troubles respiratoires, qui sont fréquemment aggravés par diverses infections secondaires virales et bactériennes, peuvent aller jusqu'à provoquer la mort de 100% des porcelets. Lors des épisodes chroniques du SRRP, les manifestations de la maladie sont beaucoup moins spectaculaires, quoiqu'elles engendrent tout de même d'importantes pertes économiques. Ainsi, lors de ces épisodes, on peut noter, entre autres, l'apparition d'infections respiratoires secondaires opportunistes et des retards de croissance des porcelets. De plus, les animaux peuvent demeurer séropositifs et continuer à transmettre l'agent causal de la maladie pendant au moins six mois après la disparition des signes cliniques.

Cette maladie est apparue presque simultanément en Amérique du Nord et en Europe. Les premiers cas de SRRP ont été rapportés aux Etats-Unis et au Canada vers la fin de l'année 1987 et au début de l'année 1988, respectivement (Bilodeau et al., 1991; Keffaber, 1989), alors que les premiers cas européens furent rapportés vers la fin de 1990 et au début de 1991 (Lindhaus et Lindhaus, 1991). L'agent causal a finalement été identifié en 1991 par Wensvoort et al. et fut nommé virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP).

Ce virus, membre de la famille *Arteriviridae* avec le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV), le virus de l'artérite virale équine (EAV) et le virus élévateur de la

déhydrogénase lactique (LDV), est constitué d'une capsidie icosaédrique qui est enveloppée, ce qui lui confère une taille de 45 à 70 nm. Il possède six protéines structurales qui sont regroupées en deux catégories, soit les protéines structurales majeures et les protéines structurales mineures. Les premières, qui sont présentes en plus grandes quantités que les secondes et qui forment la plus grande partie du virion, sont la protéine de la nucléocapsidie (N), la protéine de la matrice (M) et la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP<sub>5</sub>). Les protéines structurales mineures, qui sont présentes en quantités plus faibles, sont la GP<sub>2</sub>, la GP<sub>3</sub> et la GP<sub>4</sub>.

Le génome du VSRRP consiste en une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive d'une longueur de 15 Kb. L'existence d'une grande variabilité génomique entre les divers isolats de VSRRP a été mise en évidence par plusieurs chercheurs des deux continents. Si l'on prend l'ensemble des souches du VSRRP dont le génome a été analysé, celles-ci définissent deux génogroupes distincts : le génogroupe européen et le génogroupe nord-américain. Les isolats de ces deux génogroupes montrent un pourcentage d'identité nucléotidique de seulement 63% (Allende et al., 1999; Shen et al., 2000), et ce, même si les signes cliniques de la maladie qu'ils provoquent sont similaires. De plus, il existe une variabilité génomique relativement importante, entre les isolats d'un même génogroupe. Parmi les isolats d'un même continent, la glycoprotéine majeure d'enveloppe, la GP<sub>5</sub>, est la protéine structurale la plus variable avec des pourcentages d'homologie en aa variant de 88 à 99% (Gagnon et Dea, 1998; Meng et al., 1995b; Murtaugh et al., 1995)

Le VSRRP possède un tropisme d'espèce très restreint puisqu'il ne peut infecter que les porcs et les sangliers (Albina, 1997). Chez ces animaux, le virus peut se répliquer dans diverses cellules de la lignée monocyte/macrophage et dans les spermatozoïdes (Laroche et al., 1996; Sur et al., 1996). Toutefois, le virus a une préférence marquée pour les macrophages alvéolaires porcins (PAMs). Ceux-ci sont les seules cellules porcines, avec certains monocytes du sang périphérique, permissives au VSRRP (Voicu et al., 1994; Wensvoort et al., 1991). Les seules autres cellules permettant la culture *in vitro* de ce virus sont des lignées cellulaires dérivées de la lignée de cellules épithéliales de rein de

singe MA104. Ce sont les cellules MARC-145 et CL 2621 (Bautista et al., 1993; Kim et al., 1993). Normalement, les isolats du génogroupe nord-américain se répliquent aussi bien sur les cellules dérivées de la lignées MA104 que sur les PAMs, alors que, dans le cas des isolats du génogroupe européen, ces derniers sont habituellement assez réfractaires aux cellules MARC-145 et CL 2621 (Bautista et al., 1993; Mengeling et al., 1995). Il n'a pas encore été déterminé si le récepteur du virus à la surface de ces différents types cellulaires est le même, puisqu'il n'a pas encore été identifié, bien que sa nature protéinique ait été démontrée (Therrien et al., 2000). De même, il n'a pas encore été démontré si c'est la même voie d'internalisation qui est empruntée par le virus pour infecter les lignées cellulaires de rein de singe permissives et les PAMs. Cependant, certaines études laissent entendre que le récepteur du virus à la surface des cellules susceptibles et la voie d'internalisation utilisée diffèrent selon le type de cellules. Premièrement, deux des trois autres membres du genre arterivirus (EAV et SHFV) peuvent infecter, comme le VSRRP, les cellules MA104, ce qui suggère la présence d'un récepteur et d'une voie d'internalisation commune, mais seul le VSRRP peut infecter les PAMs (Plagemann, 1996). Deuxièmement, une équipe a obtenu, suite à des expériences de fusion cellulaire, deux anticorps monoclonaux (AcMo) capables de bloquer l'infection des PAMs par le VSRRP, mais non l'infection des cellules MARC-145 (Duan et al., 1998). Ces résultats, et le fait que ces différents types de cellules aient des rôles physiologiques très distincts, suggèrent l'existence de récepteurs distincts à la surface des PAMs et des cellules dérivées de la lignée MA104.

Des AcMos dirigés contre les protéines GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub>, se sont avérés capables de neutraliser l'infectivité du VSRRP, ce qui portent à croire que ces protéines pourraient jouer un rôle essentiel lors de l'infection des cellules par le virus. La principale cible des Ac neutralisants est la GP<sub>5</sub> et les épitopes qu'ils reconnaissent sur cette protéine peuvent être linéaires ou conformationnels en plus d'être conservés chez les isolats des deux génogroupes (Gonin et al., 1999; Pirzahdeh et Dea, 1997; Weiland et al., 1999; Zhang et al., 1998). Les Ac neutralisants dirigés contre la GP<sub>4</sub> sont dirigés contre les épitopes linéaires d'au moins deux souches européennes différentes. Toutefois, ces Ac sont moins efficaces pour neutraliser l'infection que ceux dirigés contre la GP<sub>5</sub> et aucun Ac

neutralisant dirigé contre la GP<sub>4</sub> n'a pu neutraliser l'infectivité des isolats du génogroupe nord-américain (Van Nieuwstadt et al., 1996; Weiland et al., 1999).

Depuis peu, des isolats nord-américains du VSRRP ayant perdu la capacité d'infecter les cellules MARC-145 ont été isolés par le service de diagnostic virologique de l'INRS-Institut Armand-Frappier. La capacité des Ac contre la GP<sub>4</sub> et la GP<sub>5</sub> à neutraliser l'infectivité indiquent que ces deux glycoprotéines d'enveloppe pourraient jouer un rôle essentiel dans la liaison du virus à son récepteur et, par le fait même, être impliquées dans la détermination du tropisme du VSRRP. Le premier objectif de ce travail consistait à identifier, chez ces protéines, les régions impliquées dans la modification du tropisme du VSRRP. Afin de mettre en évidence une telle région chez les deux gènes incriminés, des isolats nord-américains du VSRRP, associés à des épidémies de SRRP au Québec et ayant perdu la capacité de se propager sur les cellules MARC-145 ont été sélectionnés de façon aléatoire. Par la suite, les gènes codant pour la GP<sub>4</sub> et la GP<sub>5</sub> de ces isolats ont été amplifiés par RT-PCR avant de procéder aux travaux de séquençage. Les séquences en acides aminés de ces protéines ont ensuite été déduites à partir des séquences nucléotidiques obtenues pour chaque isolat et furent comparées entre elles et avec les souches de référence nord-américaines, qui ont la capacité de se propager sur les cellules MARC-145 et sur les PAMs, afin de tenter d'identifier des régions qui pourraient être responsables de leur tropisme particulier.

Dans la deuxième partie de ce travail, la protection conférée par différents vaccins commerciaux utilisés comme moyen prophylactique chez les porcs contre le VSRRP fut évaluée et comparée chez des animaux infectés de façon expérimentale. Il existe présentement deux types de vaccins contre le VSRRP : les vaccins faits de virus inactivé et les vaccins faits de virus vivant atténué. Un vaccin inactivé, commercialisé en Europe sous le nom de Cyblue (Laboratorios Sobrino, S.A.), semble peu efficace contre la composante respiratoire du SRRP, mais il offre une certaine protection contre la composante reproductrice. Toutefois, la protection qu'il confère contre l'infection est limitée (Albina, 1997; Dea et al., 2000a). La faible efficacité de ces vaccins pourrait être due en partie à la méthode utilisée pour l'inactivation des virions si les protéines portant

les principaux déterminants antigéniques sont en partie dénaturées. La deuxième catégorie de vaccins disponibles sur le marché, les vaccins vivants atténués, s'avèrent plus efficaces, mais ils comportent des inconvénients majeurs. Ces vaccins confèrent habituellement une bonne protection contre les signes cliniques respiratoires du SRRP et offrent habituellement une protection assez efficace contre l'infection par le VSRRP. Toutefois, ces vaccins engendrent une virémie chez les animaux vaccinés et sont excrétés dans la semence ou dans l'air. Ils provoquent également des troubles reproducteurs comme des avortements, lorsqu'ils sont administrés aux truies gestantes, et une baisse de la qualité de la semence des verrats. De plus, la protection qu'ils confèrent contre l'infection n'est que de courte durée et il est impossible de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés. Toutefois, le problème le plus important est le retour possible à la virulence de ces virus atténués (Albina, 1997; Christopher-Hennings et al., 1997; Dea et al., 2000a; Meng, 2000; Mengeling et al., 1996). Le fait que le VSRRP soit un virus à ARN, avec des taux de mutations élevés, et que les souches vaccinales aient la capacité de se multiplier chez l'animal pendant une longue période de temps (au moins 50 jours) augmentent le risque de retour à la virulence des souches vaccinales atténuées suite à de multiples passages en cultures cellulaires. Une étude a montré qu'un marqueur présent dans une souche vaccinale ne pouvait être isolé chez aucun des 25 isolats de champs étudiés avant la vaccination. Toutefois, ce marqueur a pu être détecté à partir de 24 des 25 isolats de champs étudiés suite à l'introduction du vaccin dans les troupeaux et l'on soupçonne ces isolats d'être des descendants directs de la souche vaccinale (Mengeling et al., 1999).

Ainsi, l'inefficacité et les risques des vaccins actuels font en sorte que la production de vaccins plus efficaces et sécuritaires est essentielle et il semble que la GP<sub>5</sub> pourrait être une cible de choix pour la mise au point de vaccins sous-unitaires ou recombinants. Le fait que cette protéine soit la principale cible des Ac neutralisants suggère qu'une bonne réponse immunitaire contre cette protéine pourrait jouer un rôle majeur dans la protection de l'hôte contre l'infection par le VSRRP. Toutefois, l'existence du phénomène des Ac favorisants ou phénomène ADE semble représenter un obstacle important. En effet, la présence du récepteur de la portion Fc des Ac à la surface des macrophages/monocytes

fait en sorte que les complexes Ac-VSRRP sont opsonisés, ce qui favorise l'infection des macrophages par le VSRRP. Toutefois, il a été démontré, qu'en présence de titres élevés en Ac neutralisants, aucune activité ADE n'est détectée (Yoon et al., 1996).

Des travaux d'immunisation de porcelets ont déjà été réalisés utilisant comme antigène la protéine de fusion recombinante GST-ORF5 exprimée dans *E.coli* et par immunisation génétique avec l'ADN du plasmide pRc/CMV dans lequel avait été cloné l'ORF5 d'une souche Nord-Américaine (Pirzadeh et Dea, 1998) et les résultats obtenus ont confirmé les informations discutées précédemment. Les résultats sur la protection induite suite à la vaccination de porcelets avec la protéine de fusion produite chez *E. coli* se sont révélés inadéquats. Ainsi, suite à une infection-défi, la synthèse d'Ac neutralisants n'a pas été observée et les lésions retrouvées au niveau des poumons étaient accentuées comparativement à l'infection naturelle par le VSRRP, probablement due au phénomène d'ADE qui semble avoir été favorisé par la réponse immunitaire induite par ce type d'antigène. Toutefois, les résultats obtenus suite à une infection-défi chez des porcelets ayant été immunisés génétiquement ont révélé la présence de titres élevés en Ac neutralisants associés à une disparition de la virémie et à une diminution importante des lésions pulmonaires dues au VSRRP. Ainsi, il semble que la présence de titres élevés en Ac neutralisants soit essentielle afin d'obtenir une protection efficace.

Donc, dans la deuxième partie de ce projet de recherche des porcelets ont tout d'abord été infectés expérimentalement afin de confirmer la virulence de la souche IAF-Klop utilisée. Par la suite, des porcelets ont été immunisés avec un vaccin inactivé à l'éthylénimine binaire (BEI), un agent ne dénaturant pas les protéines, puis soumis à une infection-défi. Finalement, une infection-défi a aussi été réalisée chez des porcelets ayant été préalablement immunisés avec des adénovirus humains recombinants non-réplicatifs et inductibles véhiculant soit le gène de l'ORF5 de type sauvage, soit le gène de l'ORF5 de type synthétique. Ce dernier est le gène de l'ORF5 de type sauvage dont certains codons ont été modifiés, dans le laboratoire du Dr Serge Dea, pour faire en sorte que l'ARNm soit traduit de façon optimale par les cellules de mammifères. Des échantillons de sérums ont été prélevés à différents temps chez ces animaux afin d'évaluer la réponse humorale

de ceux-ci et la présence du VSRRP. Des échantillons de poumons ont également été récoltés lors de l'euthanasie des animaux afin de procéder à des analyses histologiques et virologiques.

## **CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1.1 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

### 1.1.1 Historique

À l'automne 1987 et pendant l'hiver 1988, une nouvelle maladie a fait son apparition dans les élevages porcins des États-Unis et du Québec (Bilodeau et al., 1991; Keffaber, 1989). Un peu plus tard, vers la fin de 1990 et le début de 1991, une maladie similaire a fait son apparition en Europe (Lindhaus et Lindhaus, 1991). Ces deux maladies, cliniquement similaires, entraînaient une série de problèmes reproducteurs chez les truies ayant été affectées d'une période d'hyperthermie de longue durée, ainsi que des problèmes respiratoires chez les porcelets en période post-sevrage et en l'engraissement.

Avant que l'on puisse clairement l'identifier, cette maladie a été affublée de différents noms. Aux États-Unis, on l'a nommée, entre autres, « swine infertility and reproductive syndrome (SIRS) » (Collins et al., 1992), et « mystery swine disease » (Hill, 1990). Au même moment, au Québec, on parlait plutôt du « syndrome HAAT-pneumonie interstielle » ou les lettres HAAT signifiaient « Hyperthermie, Anorexie, Avortement, Truie » (Martineau et al., 1991), alors qu'en Europe cette maladie était connue sous des noms comme « blue ear disease » (White, 1991), « porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) » (Wensvoort et al., 1991) ou « porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) ». Ce dernier nom, en français, syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP), est maintenant celui qui est reconnu internationalement pour identifier la maladie.

Plusieurs agents ont été soupçonnés comme pouvant être la cause primaire du SRRP. Parmi ceux-ci, on retrouve le virus de la pseudorage (PRV), le parvovirus porcin (PPV), le virus influenza porcin (SIV), le coronavirus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine (HEV), les enterovirus porcins (PEV), le cytomégalovirus porcin (PCMV), *Chlamydia psittaci*, *Leptospira bratislava*, *Leptospira pomona* et les mycotoxines (Goyal, 1993). Toutefois, deux virus ont fait l'objet d'une attention plus particulière soient « le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) et un variant antigénique d'un virus influenza de type A ». Ces deux virus ont été isolés à partir de poumons de porcelets en post-sevrage

et en engraissement provenant de différents élevages du Québec ayant connu des épisodes de problèmes respiratoires et reproducteurs (Martineau, 1992). Toutefois, ces agents n'ont pas permis la reproduction de tous les signes cliniques de la maladie lorsqu'ils ont été inoculés seuls à des porcs dépourvus de pathogènes spécifiques (SPF) ou axéniques.

En 1991, un groupe de chercheurs hollandais a isolé, chez des truies et des porcelets atteints du SRRP, un virus jusqu'alors inconnu. Cette équipe a surnommé ce dernier « virus de Lelystad (LV) » en référence à la ville où eut lieu la découverte (Wensvoort et al., 1991). Ce virus a été ensuite formellement identifié comme l'agent causal de la maladie permettant la reproduction des critères du postulat de Koch (Terpstra et al., 1991). Par la suite, en 1992 aux États-Unis, l'isolat ATCC VR-2332, un virus adapté à la culture sur tissu et relié sérologiquement au virus LV, a été également reconnu comme agent causal du SRRP (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992). Finalement, au Québec, un troisième virus relié sérologiquement aux virus LV et ATCC VR-2332 a été découvert en 1992 et fut surnommé l'isolat IAF-Exp91 (Dea et al., 1992) puisque le virus purifié permit la reproduction des symptômes reproducteurs chez des truies en période de gestation tardive. Ces trois agents sont maintenant reconnus comme trois différentes souches du même virus : le virus du SRRP (VSRRP). Depuis, plusieurs autres souches ont été isolées dans ces pays ainsi que dans plusieurs autres pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Sud (Albina, 1997). Des études rétrospectives ont également permis de démontrer que le VSRRP était présent chez les porcs dès 1979 au Canada (Carman, 1996) et dès 1985 aux États-Unis (Yoon, 1992b; Yoon et al., 1992c)

Aujourd'hui, le fait que le VSRRP soit endémique dans la majorité, sinon la totalité, des pays producteurs de porcs (Dea et al., 2000a) lui confère une grande importance économique. Ainsi, la maladie engendrerait des pertes de l'ordre de 1,5 à 2,0 porcelets par truie par année. Pendant les épisodes aigus de la maladie, les pertes peuvent atteindre de 250 et 500 dollars par truie (Goyal, 1993). Ainsi, lors d'une importante épidémie en Iowa, qui affectait plus de 250 unités de production, le SRRP a été reconnu responsable de la mort de 85 330 porcs, ce qui a engendré des pertes de 10,6 millions de dollars (Loula, 1991).

### 1.1.2 Taxonomie

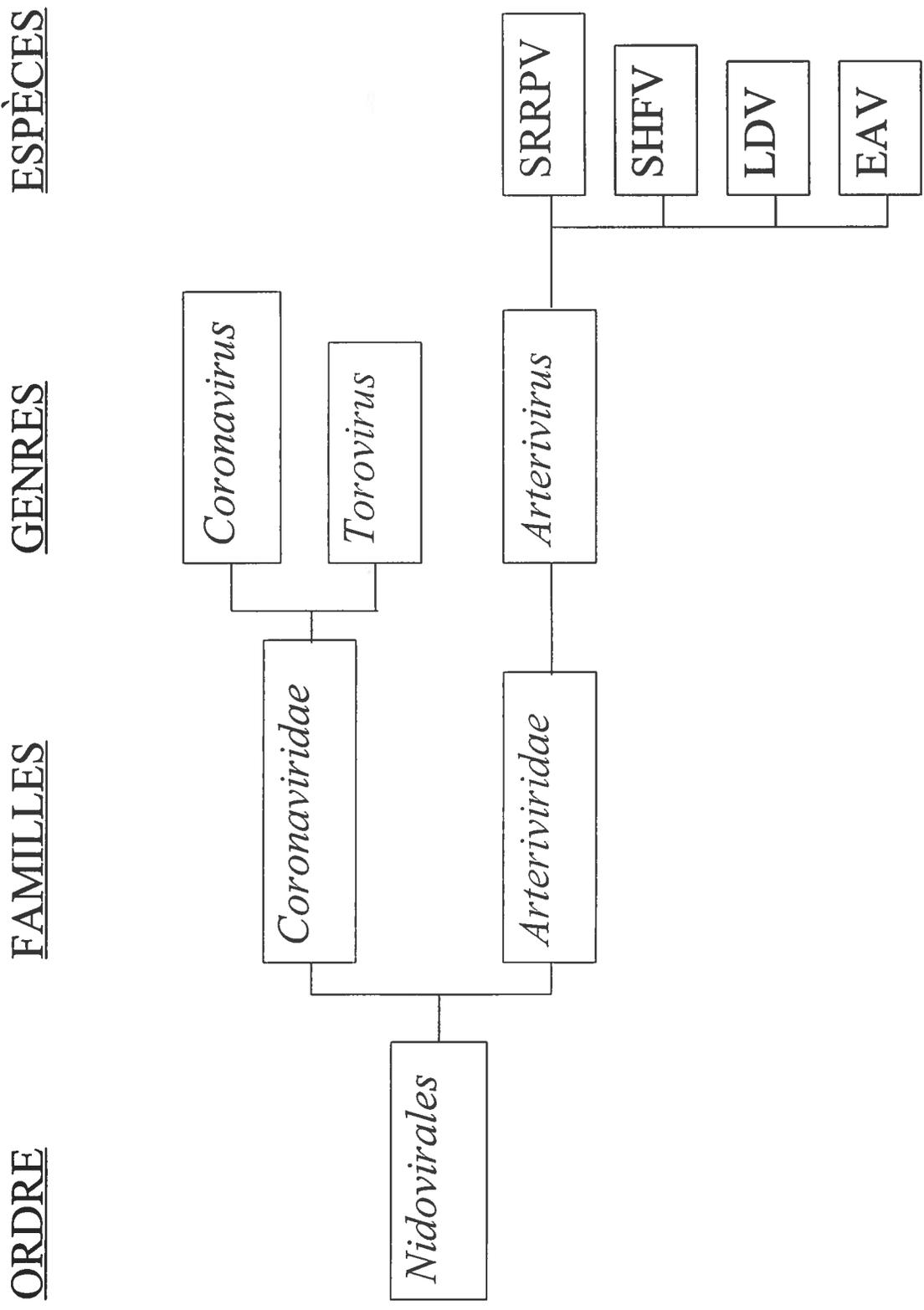
Le VSRRP est un membre d'un ordre récemment créé : l'ordre *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). Cet ordre a été officiellement reconnu par les membres de l'exécutif du Comité International pour la Taxonomie des Virus (ICTV) lors du dixième Congrès International de Virologie ayant eu lieu à Jérusalem en août 1996 (Pringle, 1996). Il est constitué de deux familles : les familles *Coronaviridae* et *Arteriviridae*. Le VSRRP est une membre de cette dernière qui est constituée d'un seul genre; les arterivirus. Outre le VSRRP, ce genre comprend également le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV), le virus de l'artérite virale équine (EAV) et le virus élévateur de la déhydrogénase lactique (LDV) chez la souris. Dans le passé, les arterivirus ont longtemps été classifiés avec les membres de la famille *Togaviridae* avec qui ils partagent la plupart de leurs caractéristiques morphologiques. Toutefois, des études moléculaires ont montré que l'organisation génomique et le mode de répllication de ces virus sont similaires à ceux des membres de la famille *Coronaviridae*, ce qui a mené à la création de l'ordre *Nidovirales*.

### 1.1.3 Structure

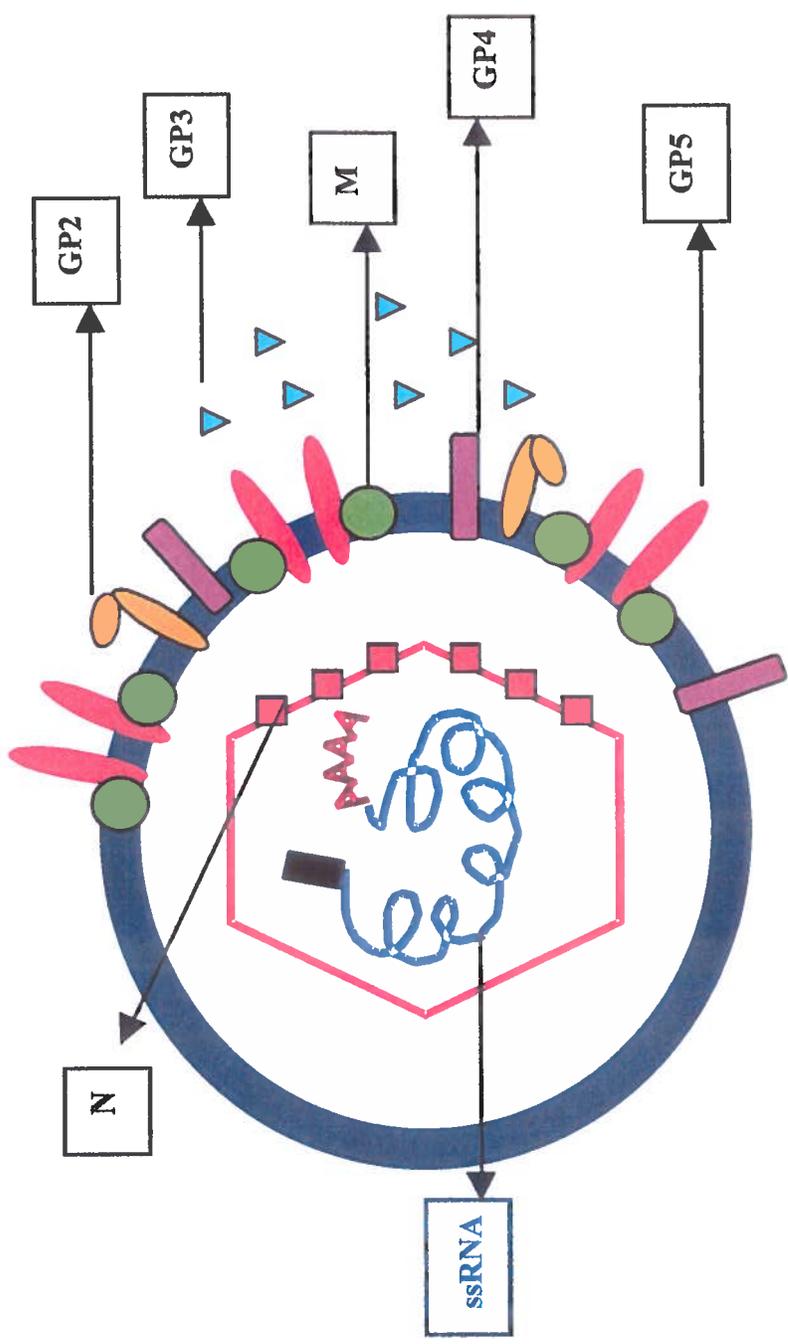
#### 1.1.3.1 Morphologie

Le VSRRP est un petit virus morphologiquement similaire aux virus de la famille *Togaviridae*. Il est constitué d'une capsid de symétrie icosaédrique, d'une taille variant entre 25 et 35 nm, et d'une enveloppe qui confère au virion une forme sphérique et un diamètre se situant de 45 à 70 nm (Benfield et al., 1992; Dea et al., 1992; Wensvoort et al., 1992).

**Figure 1 : Classification du VSRRP approuvée par le Comité International pour la taxonomie des virus (ICTV) (Cavanagh, 1997)**



**Figure 2 : Représentation schématique d'un isolat nord-américain du VSRRP (Tiré de Dea et al, 2000)**



### **1.1.3.2 Génome**

Le génome du VSRRP est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive possédant une séquence de tête coiffée en 5' et qui est polyadénylée en 3'. Il est d'une longueur d'environ 15 kb et est constitué, outre la séquence de tête et la queue poly(A), de huit cadres de lecture ouverts (ORFs) désignés ORF1a, ORF1b, et ORF2 à 7, ainsi que d'une petite région non-codante située entre l'ORF7 et la queue poly(A) (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a; Meulenberg et al., 1993b). Les ORF1a et ORF1b comptent pour environ 80% du génome et codent pour deux polyprotéines (POLa et POLab) associées à la réplication et à la transcription du génome (Meulenberg et al., 1993b), alors que les ORFs2 à 7 codent pour les différentes protéines structurales du VSRRP (Mardassi et al., 1995; Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996; Meulenberg et al., 1995). Récemment, un nouvel ORF a été identifié chez le VSRRP. Ce petit ORF se situe à l'intérieur de l'ORF2 et a été nommé ORF2a alors que le gène auparavant connu sous le nom d'ORF2 porte maintenant la dénomination d'ORF2b (Snijder et al., 1999).

### **1.1.3.3 Protéines virales**

#### **1.1.3.3.1 Protéines non-structurales**

Très peu de travaux ont été réalisés en regard des protéines non-structurales du VSRRP qui sont les produits des ORF1a et 1b. Toutefois, les travaux sur la biologie moléculaire d'un autre arterivirus, l'EAV, (Snijder et Meulenberg, 1998) peuvent nous servir de modèle puisque les virus de ce genre ont tous le même mode de réplication. Ainsi, la plupart des énoncés de cette section proviennent de travaux effectués sur l'EAV qui sont décrits dans un revue de littérature très complète de Snijder et Meulenberg (1998).

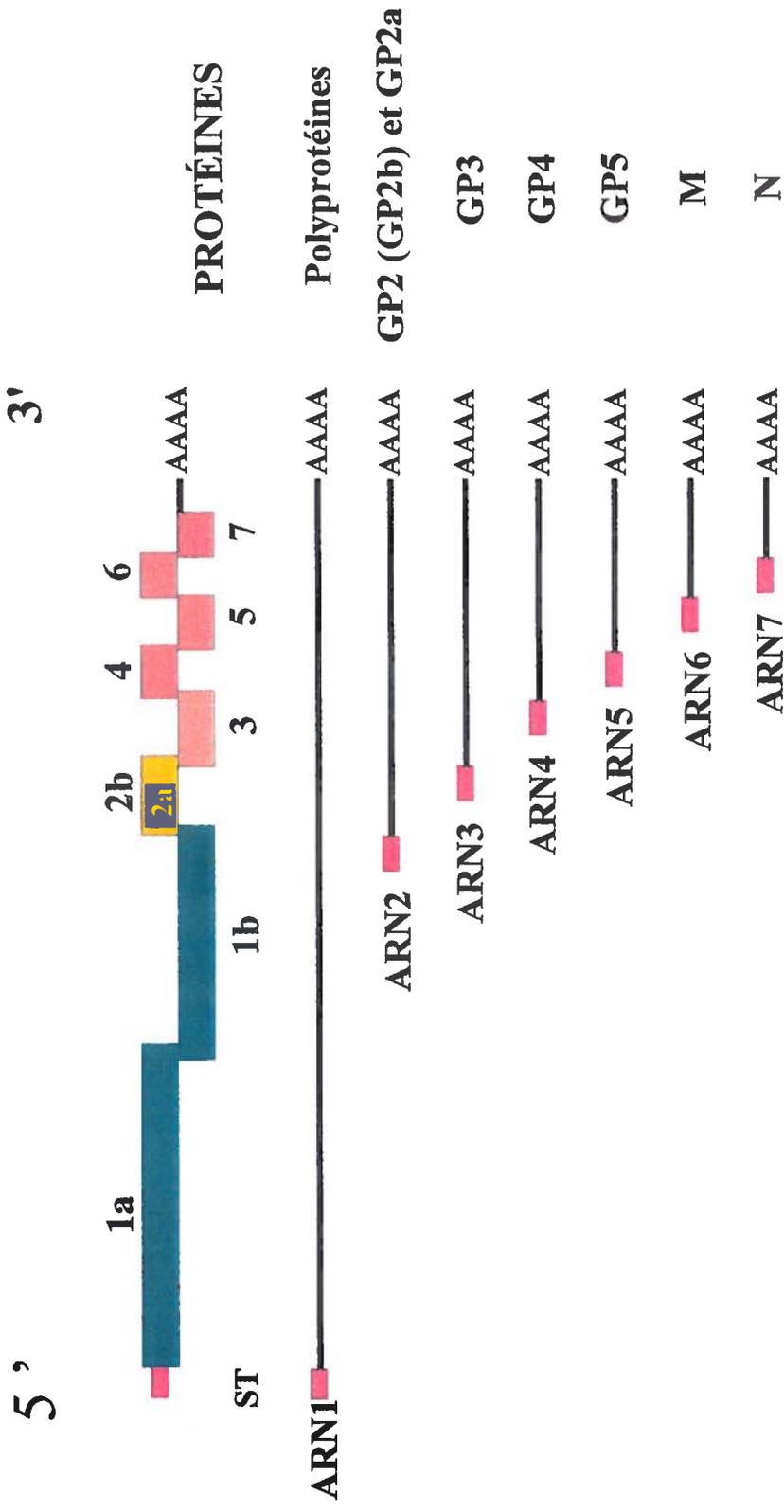
Les protéines non-structurales du VSRRP sont codées par les ORF1a et 1b du génome viral. L'ORF1a est traduit directement de l'ARN génomique en une polyprotéine d'une taille de 1463 aa (POLa). L'ORF1b, quant à lui, a besoin d'un « ribosomal shifting » ou changement de cadre de lecture en amont du codon de terminaison de l'ORF1a pour être

traduit. La polyprotéine résultante fait 3859 aa (POLab) de longueur et est constituée de la presque totalité de l'ORF1a et de la totalité de l'ORF1b (Meulenberg, 2000). Chez l'EAV, les produits des ORF1a et 1b sont clivés à dix endroits par trois différentes protéases encodées par l'ORF1a, produisant ainsi un total de 12 protéines non-structurales (nsp). Ces trois protéases sont nsp1, nsp2 et nsp4. Nsp1 et nsp2 correspondent respectivement à une cystéine protéase de type papaine (PCP) et à une cystéine protéase (CP) qui contiennent toutes deux un domaine cystéine autoprotéase permettant, par une action en *cis*, le clivage rapide de la polyprotéine (Snijder, 1992; Snijder, 1995). Quant à la sérine protéase nsp4 (SP), elle fait partie des cystéines protéases de type 3C et elle est la principale protéase du virus. Elle est responsable du clivage des nsp encodées par l'ORF1b que sont les nsp9, 10, 11 et 12 (van Dinten et al., 1999). Selon des analyses de comparaison de séquences, ces nsp consistent respectivement en un motif d'ARN polymérase ARN-dépendante (pol), un domaine de liaison au zinc, un motif hélicase de l'ARN (hel) et un domaine 3'-terminal conservé (ctd) (den Boon et al., 1991; Godeny et al., 1993; Gorbalenya, 1989; Meulenberg et al., 1993; Van Dinten, 1996). Le VSRRP et le LDV possèdent également une quatrième protéase qui est une PCP et qui se trouve à l'extrémité N-terminale de l'ORF1a : la PCP $\alpha$ .

Récemment, il a été démontré chez l'EAV que la nsp10, le domaine de liaison au métal (m où m=zinc), est essentielle pour la synthèse des ARNs viraux, donc pour la réplication et la synthèse des ARNm subgénomiques. Elle serait également impliquée dans la biogenèse du virion (Van Dinten, 2000). Il a également été démontré que les polyprotéines produites par les ORF1a et 1b sont les seules protéines nécessaires à la réplication du génome et à la synthèse des ARNm subgénomiques (Molenkamp et al., 2000).

**Figure 3 : Organisation génomique et mode de répllication du VSRRP (Tiré de la thèse de doctorat de Carl Gagnon (2001) INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, Qc, Canada)**

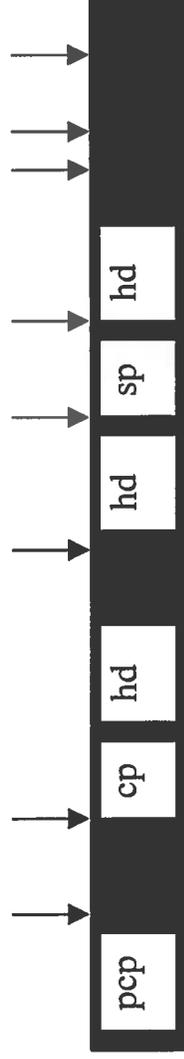
Les chiffres représentent les différents ORFs du génome viral. ST : séquence de tête.  
AAAAA : queue poly-A. ARN 1 à 7 : ARNm sous-génomiques



**Figure 4 : Représentation schématique des polyprotéines codées par les ORF1a et ORF1ab et des sites de clivage de celles-ci (Tiré de Meulenberg, 2000)**

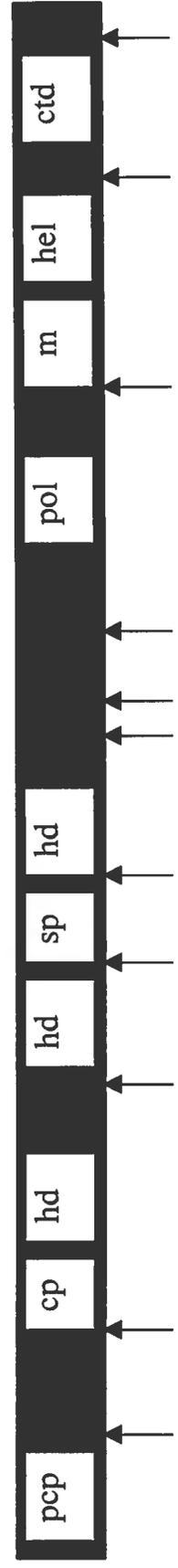
Les sites de clivage des 12 nsp sont représentés par les flèches alors que les chiffres montrent la position de chaque nsp. Pcp : cystéine protéase de type papaïne. Cp : cystéine protéase. Sp : sérine protéase. Hd : domaines hydrophobes conservés. Pol : Motif ARN polymérase ARN-dépendante. M : domaine de liaison au zinc. Hel : motif hélicase. Ctd : domaine terminal conservé en 3

ORF1a (1463 aa)



Nsp 1 $\alpha$  1 $\beta$  2 3 4 5 6 7 8

9 10 11 12



ORF1ab (3859 aa)

### **1.1.3.3.2 Protéines structurales**

Les différentes protéines structurales du VSRRP sont encodées par les ORFs 2-7 du génome viral. Elles sont divisées en deux catégories : les protéines structurales majeures et les mineures. Les premières sont celles qui sont exprimées le plus fortement et elles constituent la plus grande partie du virion. Elles sont codées par les ORF7, ORF6 et ORF5 du génome et elles correspondent respectivement à la protéine de la nucléocapside (N), la protéine de la matrice (M) et la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP<sub>5</sub>) (Benfield et al., 1992; Mardassi et al., 1994a; Nelson et al., 1993). Les protéines structurales mineures sont, quant à elles, exprimées en plus petites quantités par les ORF4, ORF3 et ORF2 et sont désignées les glycoprotéines GP<sub>4</sub>, GP<sub>3</sub> et GP<sub>2</sub> (Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996).

#### **1.1.3.3.2.1 Protéines majeures**

La protéine de la nucléocapside (N) est une petite protéine non glycosylée et hautement basique qui a une taille de 14-15 kDa (Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995). Elle est fortement exprimée et constitue environ 20-40% des protéines totales du virion (Bautista et al., 1996; Mardassi et al., 1994a; Nelson et al., 1993). Il semble que la partie N-terminale de cette protéine, qui contient 26% de résidus basiques, serait responsable de la liaison de la protéine à l'ARN génomique lors de la formation de la nucléocapside (Mardassi et al., 1994a; Meng et al., 1995a; Meulenberg et al., 1993b; Meulenberg et al., 1995).

La protéine de la matrice (M) est non glycosylée et possède une masse moléculaire de 18-19 kDa. Elle possède trois régions hydrophobes qui pourraient servir de domaines transmembranaires pour lui permettre de s'incorporer à l'enveloppe comme dans le cas de la protéine M des coronavirus (Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1993b; Rottier et al., 1986). De plus, elle pourrait également jouer un rôle important dans l'assemblage et le bourgeonnement des virions tout comme chez les coronavirus (Mardassi et al., 1996; Plogemann, 1996).

La dernière des trois protéines structurales majeures du VSRRP est la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP<sub>5</sub>). Elle est, comme son nom l'indique, glycosylée et elle fait environ 24,5-26 kDa (Mardassi et al., 1996; Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995). Le nombre de sites potentiels de N-glycosylation qu'elle possède varie selon les souches de virus. En effet, la souche de référence Européenne LV possède deux sites de N-glycosylation (Meulenberg et al., 1993), la souche de référence québécoise IAF-Klop en possède trois, alors que la souche de référence américaine en possède quatre (Mardassi et al., 1995; Murtaugh et al., 1995; Pirzadeh et al., 1998). Aussi, cette protéine possède des épitopes capables d'induire la production d'Ac pouvant neutraliser l'infectivité du virus, ce qui suggère qu'elle pourrait jouer un rôle important lors de l'interaction du virus avec le récepteur cellulaire ou lors de la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule (Murtaugh et al., 1995; Pirzadeh et Dea, 1998; Weiland et al., 1999; Zhang et al., 1998). Toutefois, rien n'a encore été démontré à ce sujet. Dans un autre ordre d'idée, la capacité de la GP<sub>5</sub> des souches européennes et nord-américaines du VSRRP à induire l'apoptose a été démontrée dans les PAMs, ainsi que dans les lignées cellulaires de reins de singe susceptibles *in vitro* (Suarez et al., 1996a; Sur et al., 1998). Ce phénomène d'apoptose a également pu être démontré *in vivo* dans les poumons et tissus lymphoïdes de porcs infectés expérimentalement (Sirinarumitr et al., 1998; Sur et al., 1998). Lors de ces expériences, les auteurs ont noté que le nombre de cellules apoptotiques était supérieur au nombre de cellules infectées par le VSRRP et que plusieurs des cellules en apoptose n'étaient pas infectées. Ce résultat suggère donc l'existence d'un phénomène d'induction de l'apoptose par une voie indirecte. Le rôle de l'apoptose et les mécanismes impliqués dans ce phénomène ne sont pas encore connus.

#### **1.1.3.3.2 Protéines mineures**

La glycoprotéine GP<sub>4</sub> possède une masse moléculaire de 31-35 kDa et 4 sites potentiels de N-glycosylation (Meulenberg et al., 1997). La GP<sub>4</sub> de la souche de référence européenne LV possède également des épitopes neutralisants. Toutefois, contrairement à la GP<sub>5</sub>, ces épitopes ne sont pas conservés parmi les différents isolats européens et nord-américains (Meulenberg et al., 1997; Weiland et al., 1999). De plus, l'efficacité des

anticorps dirigés contre ces épitopes est moindre que celle des anticorps dirigés contre la GP<sub>5</sub>, ce qui confirme que c'est la GP<sub>5</sub> et non la GP<sub>4</sub> qui est la principale cible des anticorps neutralisants, comme il a été démontré dans le cas des autres artérovirus (Weiland et al., 1999). Ainsi, la GP<sub>4</sub> pourrait, comme la GP<sub>5</sub>, jouer un rôle important lors de l'interaction avec la cellule ou lors de l'internalisation du virion.

La glycoprotéine GP<sub>3</sub> possède une masse moléculaire de 42-50 kDa, ce qui en fait la plus grosse des protéines structurales du VSRRP. Ses sept sites de N-glycosylation font en sorte qu'elle est fortement glycosylée (Gonin et al., 1998; Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995). Comparativement aux souches européennes, la GP<sub>3</sub> des isolats nord-américains du VSRRP contient une délétion de douze acides aminés dans sa portion C-terminale. Conséquemment, cette région est amphipatique pour ces isolats, alors qu'elle est hydrophile chez les isolats européens (Gonin et al., 1998; Katz et al., 1995). De plus, il a été démontré que la glycoprotéine GP<sub>3</sub> de la souche de référence québécoise IAF-Klop n'était pas exprimée à la surface du virion comme chez la souche de référence européenne LV (Meulenberg et al., 1995; van Nieuwstadt et al., 1996). La majeure partie de la GP<sub>3</sub> est retenue en amont de la région du médiane du Golgi, probablement dans le réticulum endoplasmique. Toutefois, une petite fraction de la GP<sub>3</sub> est sécrétée à l'extérieur des cellules sous une forme soluble (Mardassi et al., 1998). Ainsi, la GP<sub>3</sub> de la souche IAF-Klop serait plutôt une protéine non-structurale. La fonction de cette protéine, qu'elle soit sous sa forme membranaire ou sécrétée, est jusqu'à ce jour inconnue.

La glycoprotéine GP<sub>2</sub> (ou GP<sub>2b</sub>) est la dernière des protéines structurales du VSRRP. Elle fait 29-30 kDa et possède deux sites de N-glycosylation (Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996). Son rôle n'est pas connu, mais il a été démontré que le produit de l'ORF2 est essentiel à la réplication du virion chez l'EAV (van Dinten et al., 1997). Quant au cadre de lecture récemment découvert à l'intérieur de l'ORF2b et que l'on a nommé ORF2a, il semble qu'il code pour une petite protéine structurale de 10 kDa que l'on nommerait GP<sub>2a</sub> et qui serait essentielle à l'infectivité du virion (Wu et al., 2000).

#### **1.1.4 Caractéristiques physico-chimiques**

Les temps de demi-vie du VSRRP sont respectivement de 140 h à 4 °C, 20 h à 21 °C, 3 à 12 h à 37 °C et 7 min à 56 °C. Le virus est complètement inactivé après 48 h à une température de 37 °C ou après 45 min à 56 °C, alors qu'il est stable pendant au moins quatre mois lorsqu'entreposé à -70 °C (Benfield et al., 1992; Bloemraad et al., 1994). Le VSRRP est un virus pouvant également être très affecté par le pH de son environnement. À 37 °C, la valeur du pH optimal, permettant une meilleure conservation de l'infectivité du virion, est de 6,0. Lorsque le pH est inférieur à 5,5 ou supérieur à 6,5, le temps de demi-vie du VSRRP est réduit de moitié (Bloemraad et al., 1994). La densité du virion est de 1,18-1,20 g/mL sur un gradient de chlorure de césium et de 1,14-1,3 g/mL lorsqu'un gradient de saccharose est utilisé (Bautista et al., 1996; Benfield et al., 1992; Mardassi et al., 1994a; Ohlinger et al., 1991).

#### **1.1.5 Variabilité génomique**

Bien que les signes cliniques de la maladie causée par les virus européens et nord-américains soient similaires, il existe des différences importantes dans les séquences nucléotidiques des génomes des isolats provenant de chacun des continents (Tableau 1). Ainsi, le génome viral entier montre un pourcentage d'identité en nucléotides d'environ 63% entre les isolats européens et ceux isolés dans les élevages porcins de l'Amérique du Nord (Allende et al., 1999; Shen et al., 2000). On peut donc conclure que les isolats de chacun des continents font partie de deux génogroupes distincts. Des études phylogéniques suggèrent qu'ils sont probablement issus d'un ancêtre commun qui serait un virus apparenté au LDV (Mardassi et al., 1995; Meng et al., 1995a; Murtaugh et al., 1995; Nelsen et al., 1999). Il est également intéressant de noter que les isolats du VSRRP présents dans les différents pays asiatiques sont tous apparentés aux virus du génogroupe nord-américain.

### **1.1.5.1 Régions non-codantes en 5' et en 3'**

La région non-codante située au niveau de l'extrémité 5'-terminale, qui fait 221 pb chez la souche de référence européenne LV (Meulenberget al., 1998), est d'une longueur de 189 ou 190 pb chez les souches nord-américaines. Le pourcentage d'homologie en nucléotides de cette région est de 56 à 61% avec LV (Allende et al., 1999; Nelsen et al., 1999).

Chez la souche nord-américaine 16244B, la région non-codante située en aval de l'ORF7 (extrémité 3'-terminale) est d'une longueur de 150 nucléotides (Allende et al., 1999), ce qui représente 36 nucléotides de plus que dans le cas du virus LV (Meulenberget al., 1993a) et le pourcentage d'homologie en nucléotides entre ces deux souches est de 76%. On retrouve, dans le cas de la souche 16244B, une insertion de 26 nucléotides ainsi qu'une délétion d'un nucléotide par rapport à la souche de référence européenne. Aussi, le codon stop de l'ORF7 est situé 9 nucléotides en amont chez 16244B par rapport à LV (Allende et al., 1999). Ces insertions, délétions et changement de position du codon stop se retrouvent également chez la souche de référence américaine ATCC VR-2332 et chez une dizaine d'isolats européens (Conzelmann et al., 1993; Drew et al., 1997; Plana Duran, 1997). Les nucléotides adjacents à la queue poly(A) présentent un niveau de conservation élevé parmi les artérovirus, ce qui suggère que cette région pourrait jouer un rôle important (Godeny et al., 1993) dans la réplication du virus.

### **1.1.5.2 ORF1a et ORF1b**

Parmi ces deux ORFs, le plus variable est l'ORF1a. Le pourcentage d'homologie en nucléotides existant entre l'ORF1a des souches nord-américaines et l'ORF1a de LV est d'environ 55% (environ 47% d'homologie en aa) (Allende et al., 1999; Nelsen et al., 1999). La région la plus variable de cet ORF se retrouve dans la région nsp2. En effet, chez la souche 16244B cette région n'exhibe que 32% d'homologie en aa avec la région équivalente de LV, en plus des 120 aa de plus pour l'isolat nord-américain (Allende et al., 1999).

L'ORF1b est, quant à lui, mieux conservé parmi les différentes souches étudiées. En effet, 65% des nucléotides et près de 70% des aa sont partagés par les souches nord-américaines et la souche de référence européenne LV (Allende et al., 1999; Nelsen et al., 1999). Toutefois, la région nsp12 montre une très grande variabilité. Ainsi, les 150 derniers aa de l'ORF1b de la souche nord-américaine 16244B ne présentent que 42% d'identité avec ceux de la souche LV (Allende et al., 1999).

### **1.1.5.3 ORFs 2 à 7**

Les séquences en aa, déduites des séquences nucléotidiques des ORFs 2 à 7 des isolats européens et nord-américains du VSRRP démontrent des pourcentages de divergence de l'ordre de 21 à 48 % (Mardassi et al., 1995; Meng et al., 1995a; Murtaugh et al., 1995; Nelsen et al., 1999). Il est également intéressant de noter que l'on observe aussi une diversité génétique significative parmi les différents isolats du génogroupe nord-américain alors que les isolats regroupés dans le génogroupe européen démontrent moins de divergence entre eux (Gagnon et Dea, 1998; Kapur et al., 1996; Morozov et al., 1995; Pirzadeh et al., 1998; Suarez et al., 1996b).

Ainsi, la protéine de la matrice est la protéine structurale la mieux conservée avec un pourcentage d'identité en aa de 78 à 81% entre les virus des génogroupes européens et nord-américains et supérieur à 96% parmi les membres d'un même génogroupe (Gagnon et Dea, 1998; Meng et al., 1995a; Murtaugh et al., 1995). D'autre part, la protéine structurale la plus variable est la GP<sub>5</sub> qui montre 88-99% d'homologie en aa entre les isolats d'un même continent et seulement 52-55% d'homologie en aa entre les virus de génogroupes distincts. Ainsi, la différence entre les GP<sub>5</sub> de chacun des génogroupes est presque aussi grande qu'avec la GP<sub>5</sub> du LDV (Kapur et al., 1996; Mardassi et al., 1995; Meng et al., 1995a; Pirzadeh et al., 1998; Suarez et al., 1996b).

**Tableau 1. Pourcentage d'identité en acides aminés des ORFs 2 à 7 de la souche européenne LV avec les souches de VSRRP provenant de différents pays et aussi avec deux autres artérovirus.**

Produits des		Souches virales et origines										
Gènes du												
virus LV <sup>a</sup>	PRRSV-10 <sup>b</sup>	VR-2332 <sup>c</sup>	VR-2385 <sup>d</sup>	IAF-Klop <sup>e</sup>	DK111-92 <sup>f</sup>	Olot/91 <sup>g</sup>	CH-1a <sup>h</sup>	MD-001 <sup>i</sup>	Kitasato <sup>j</sup>	LDV <sup>k</sup>	EAV <sup>l</sup>	
	Allemagne	US	US	Canada	Danemark	Espagne	Chine	Taiwan	Japon	Strain C	Bucyrus	
ORF2	99	63	62	59	94	97	58	60	ND	32	NS	
ORF3	99	60	57	54	88	94	56	55	55	28	NS	
ORF4	99	70	69	68	91	94	68	67	67	30	NS	
ORF5	99	55	54	52	93	93	54	54	52	47	NS	
ORF6	100	79	78	81	94	97	80	79	77	53	23	
ORF7	100	64	57	59	97	99	60	59	58	44	20	

NS = non significatif (< 20%); ND = non disponible

Les séquences ont été obtenues de:

<sup>a</sup> Meulenberg et al., 1993a, EMBL/GenBank accession no. M96262.

<sup>b</sup> Conzelmann et al., 1993, EMBL/GenBank accession no. L04493.

<sup>c</sup> Murtaugh et al., 1995, EMBL/GenBank accession no. U00153.

<sup>d</sup> Meng et al., 1995a; 1995b, EMBL/GenBank accession no. U03040.

<sup>e</sup> Mardassi et al., 1995, GenBank accession no. U64928, AF003345, AF003344, AF003343.

<sup>f</sup> Madsen et al., 1998, GenBank accession no. AJ223078, avant l'introduction au Danemark de la souche vaccinale Américaine PRRSV MLV.

<sup>g</sup> Plana-Duran et al., 1997, GenBank accession no. X92942.

<sup>h</sup> Tong et al. [non publiée], GenBank accession no. AF132118.

<sup>i</sup> Chueh and Lee [non publiée], GenBank accession no. AF121131.

<sup>j</sup> Takikawa [non publiée], GenBank accession no. AB023782.

<sup>k</sup> Goodeny et al., 1993, GenBank accession no. L13298.

<sup>l</sup> Den Boon et al., 1991, GenBank accession no. X53459.

Tableau partiellement adapté de Meulenberg et al., 1997a.

**Tiré de Dea et al., 2000a.**

## 1.1.6 Morphogenèse

### 1.1.6.1 Tropisme et récepteur

*Ex vivo*, les seules cellules porcines permettant la propagation du VSRRP sont les macrophages alvéolaires porcins (PAMs) de même que certains monocytes du sang périphérique (Voicu et al., 1994; Wensvoort et al., 1991). Les PAMs récoltés chez des porcelets de moins de six semaines sont plus susceptibles à l'infection par le virus et, parmi les différents types de PAMs, le VSRRP a une préférence pour les macrophages immatures ou récemment activés (Choi, 1995; Mengeling et al., 1995). Des tests d'hybridation *in situ* ont permis de démontrer que le virus pouvait également infecter les macrophages se trouvant dans la rate, le foie, les plaques de Peyer, le thymus et les microglies. Toutefois, il est incapable d'infecter les macrophages péritonéaux ou les cellules souches de la moelle osseuse (Larochelle et al., 1996; Sur et al., 1996). Le VSRRP a également la capacité de se répliquer dans les cellules germinales testiculaires (spermatides) (Sur et al., 1997).

Les seules lignées cellulaires permettant la réplication du virus dérivent de la lignée de cellules épithéliales de rein de singe MA104. Ce sont les cellules MARC-145 et CL 2621 (Bautista et al., 1993; Kim et al., 1993). Il est intéressant de noter que deux des trois autres membres du genre arterivirus, soit l'EAV et le SHFV, ont aussi la capacité de se répliquer dans les cellules MA104. Ainsi, le fait que ces trois virus puissent infecter les cellules épithéliales de rein de singe suggère qu'ils utilisent un récepteur et une voie d'internalisation commune (Plagemann, 1996). Toutefois, le fait que, parmi ces trois virus, seul le VSRRP soit en mesure d'infecter les PAMs, et que ce dernier type cellulaire ait un rôle physiologique très différent des cellules MARC-145 suggèrent que le récepteur utilisé par le virus est différent chez ces deux types de cellules. De plus, Duan et al. (1998) ont produit deux AcMo capables de bloquer l'infection des PAMs par le VSRRP. Ces anticorps immunoprécipitent une protéine membranaire de 210 kDa se trouvant à la surface des PAMs. Ces anticorps sont toutefois incapables de bloquer l'infection des cellules MARC-145, ce qui vient appuyer l'hypothèse de l'existence de récepteurs

distincts à la surface de ces deux types de cellules permissives (Duan et al., 1998). La nature protéinique du ou des récepteurs à la surface des cellules MARC-145 et/ou de l'antirécepteur du virion a aussi été démontrée (Therrien et al., 2000). Il est également intéressant de noter que les isolats de VSRRP provenant du génogroupe européen sont habituellement assez réfractaires aux lignées cellulaires MARC-145 ou CL 2621, alors que la très grande majorité des isolats du génogroupe nord-américain se répliquent aussi bien chez ces cellules que chez les PAMs (Bautista et al., 1993; Mengeling et al., 1995).

La liaison du virion à un récepteur à la surface d'une cellule n'est toutefois pas une condition suffisante à elle seule pour permettre l'infection. En effet, il a été démontré que le VSRRP pouvait se lier à la surface de types cellulaires autres que ceux mentionnés ci-haut, malgré leur non-permissivité à l'infection par le virus (Tableau II) (Kreutz, 1998; Therrien et al., 2000). Le VSRRP est même internalisé par les cellules VERO, qui sont aussi des cellules de rein de singe, mais aucune protéine virale intracellulaire n'a pu être détectée par des tests d'immunofluorescence indirecte. Toutefois, en présence de polyéthylène glycol (PEG), qui permet la fusion des membranes, le virus peut s'internaliser et la réplication du génome viral a lieu dans les cellules VERO. Ainsi, la résistance des cellules VERO à la réplication du VSRRP se produit à une étape en aval de la liaison au récepteur et de l'internalisation, mais en amont de la synthèse des protéines (Kreutz, 1998). Le mécanisme d'internalisation implique, tant chez les cellules MARC-145 que chez les PAMs, la liaison à un ou des récepteurs spécifiques menant à un phénomène d'endocytose où les particules virales sont internalisées dans des vésicules cytoplasmiques par une voie dépendante des clathrines. Une diminution du pH est également essentielle pour libérer la nucléocapside de son enveloppe afin de permettre une réplication virale productive (Kreutz et Ackermann, 1996; Nauwynck et al., 1999).

**Tableau 2. Adhérence du VSRRP à la surface des cellules permissives et non-permissives.**

Types cellulaires	Adhérence du VSRRP <sup>a</sup>	Permissivité au VSRRP <sup>b</sup>
PAMs	+	+
MARC-145	+	+
MA-104	+	+
PBLs	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>
RK-13	+	-
BHK-21	+	-
PK-15	+	-
PT	+	-
U937	-	-
293A	+	-
Vero*	+	-

<sup>a</sup> Le VSRRP attaché aux cellules en suspension fut détecté à l'aide de l'AcMo IAF-K8 biotinylé. Par la suite, les cellules ont été incubées dans une solution de streptavidine-phycoérythrine et la fluorescence cellulaire résiduelle après lavages dans du PBS fut analysée par cytofluorométrie.

<sup>b</sup> La réplication du VSRRP dans les différentes lignées cellulaires a été déterminée par immunofluorescence indirecte avec l'AcMo IAF-K8 et par RT-PCR.

<sup>c</sup> PBL: (lymphocytes du sang périphérique - peripheral blood lymphocytes). Peu de cellules ont attaché le VSRRP ou ont permis la réplication du virus.

Tiré de: Therrien et al., 2000; et \*Kreutz, 1998

### 1.1.6.2 Réplication

Le génome libéré dans le cytoplasme, suite à la décapsidation, consiste en une molécule d'ARN de polarité positive dont les ORF1a et 1b sont directement traduits en deux polyprotéines (POL1a et POL1ab). Celles-ci ont des activités autocatalytiques, ce qui permet le clivage des enzymes nécessaires à la réplication du génome et à la synthèse des différentes protéines structurales (Snijder et Meulenberg, 1998). Ces enzymes ont été préalablement décrites dans une section précédente. Les protéines codées par les ORFs 2-7 sont traduites à partir d'ARNm subgénomiques transcrits par l'intermédiaire d'une ARN polymérase ARN-dépendante traduite à partir de l'ARN génomique infectieux. Ces ARNm sont synthétisés par un mécanisme de transcription discontinue et sont tous constitués d'une séquence de tête, provenant de la portion 5' du génome, couplée au corps de l'ARNm subgénomique. Comme il est illustré dans la figure 3, ces ARNm sont tous, à l'exception de l'ARN7, structurellement polycistroniques, bien qu'ils soient fonctionnellement monocistroniques. En effet, seul le premier ORF, situé à l'extrémité 5' de l'ARN subgénomique, est traduit en protéine. Ainsi, l'ARNm3, constitué des ORFs 3-7 ne code que pour la GP<sub>3</sub> (Snijder et Meulenberg, 1998). Le seul ARNm subgénomique semblant pouvoir être fonctionnellement polycistronique est l'ARNm2 qui permettrait la synthèse des GP<sub>2a</sub> et GP<sub>2b</sub> (Snijder et al., 1999). Les particules virales sont par la suite assemblées, puis bourgeonnent au travers de la membrane du reticulum endoplasmique pour être ensuite excrétées hors de la cellule par un mécanisme d'exocytose empruntant le système sécrétoire de la cellule (Pol et Wagenaar, 1992; Pol et al., 1997).

Il est possible de détecter des antigènes viraux dans le cytoplasme dès la sixième heure suivant l'infection, alors que l'apparition des premières capsides virales survient entre 9 et 24 heures post-infection (pi) (Pol et Wagenaar, 1992; Pol et al., 1997). Les titres viraux obtenus sont relativement faibles et varient selon les types de cellules utilisées. Les cellules MARC-145 permettent d'obtenir un titre pouvant atteindre  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml, alors que les titres obtenus sur les PAMs varient de  $10^{4.1}$  à  $10^{7.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml (Dea et al., 1992; Kim et al., 1993). Cet écart dans les titres obtenus sur les PAMs est relié à la

variabilité de la virulence des diverses souches de VSRRP ainsi qu'à la différence de susceptibilité observée chez les PAMs. En effet, des macrophages provenant de porcs différents ou d'âges variables ne permettront souvent pas d'obtenir des titres viraux identiques (Voicu et al., 1994).

## **1.2 Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin**

### **1.2.1 Signes cliniques**

Les signes cliniques du SRRP sont très variables et dépendent de plusieurs facteurs, dont la virulence des souches du VSRRP, l'âge des animaux, la géographie (Europe ou Amérique du Nord) et la présence d'infections secondaires concomitantes. Certains porcs infectés ne présentent aucun signe clinique apparent, alors que d'autres peuvent mourir de cette maladie. Ainsi, l'infection peut être subclinique ou asymptomatique et n'être détectable qu'à l'aide de tests sérologiques (Morrison et al., 1992). Mais elle peut aussi s'exprimer sous une forme aiguë, qui est la forme la plus étudiée, pouvant être suivie par la manifestation chronique de la maladie. Les signes cliniques du SRRP, lorsqu'ils sont apparents, traduisent une atteinte de deux systèmes comme l'indique le nom de la maladie : une atteinte du système reproducteur et une atteinte du système respiratoire. Ces deux composantes de la maladie peuvent se déclarer simultanément ou séparément. Dans ce dernier cas, plusieurs semaines peuvent se passer entre les manifestations cliniques de chacune des deux formes (Albina, 1997).

La forme reproductrice rencontrée lors d'une infection aiguë est responsable de la majorité des pertes économiques engendrées par le VSRRP. Cliniquement, elle se caractérise principalement par des avortements tardifs, des mises-bas prématurées, de la mommification fœtale, la naissance d'un nombre accru de porcelets mort-nés ou faibles ainsi que par une baisse de la production lactée et de la fertilité. Le nombre de naissances de porcelets mort-nés ou mommifiés est très variable, mais peut affecter jusqu'à la totalité des foetus d'une portée (Albina et al., 1994; Botner et al., 1994; Christianson et al., 1992; Gordon, 1992; Hopper et al., 1992; Keffaber, 1989; Martineau et al., 1991; Plana et al.,

1992; Terpstra et al., 1991). Le nombre maximal de porcelets mort-nés est habituellement atteint vers le début de la phase aiguë de la forme reproductrice du SRRP, alors que par la suite on observe généralement une diminution de ces cas, mais une augmentation du nombre de foetus mommifiés (Christianson et Joo, 1994; Loula, 1991). L'efficacité du VSRRP à traverser la barrière placentaire pour infecter le fœtus augmente avec le stade de la grossesse. Ainsi, au moment de la conception et avant le septième jour de grossesse, l'embryon est insensible à l'infection et le virus n'a aucun effet (Lager, 1996a; Lager et al., 1996b; Prieto, 1996a; Prieto et al., 1996b). Dans les trois premières semaines de gestation, on note le passage transplacentaire dans 18% des cas (Prieto et al., 1996a), alors qu'après le premier mois, le franchissement du placenta peut survenir dans 25% des cas, et jusqu'à 40% des truies peuvent avorter en fin de gestation. À partir de 90 jours de gestation, le virus peut franchir la barrière transplacentaire dans presque 100% des cas (Lager, 1996b; Lager et Ackermann, 1994).

La forme respiratoire observée lors d'une infection aiguë par le VSRRP se caractérise tout d'abord, chez les porcs de tous les âges, par certaines manifestations relativement bénignes qui sont la perte d'appétit, l'hyperthermie et un état léthargique. La perte d'appétit est d'une durée variable soit d'une journée à un peu plus d'une semaine; alors que l'hyperthermie se manifeste généralement par une température corporelle allant de 39,6 °C à 41,2 °C (exceptionnellement jusqu'à 42 °C) qui peut persister de 1 à 11 jours (Baron et al., 1992; Collins et al., 1992; Dea et al., 1992; Fichtner et al., 1993; Hopper et al., 1992; Keffaber, 1989; Martineau et al., 1991; Ohlinger et al., 1991; Plana et al., 1992; Pol et al., 1991; Rossow et al., 1994a; Terpstra et al., 1991; Vezina et al., 1996). Par la suite, on note l'apparition de signes cliniques respiratoires (toux, dyspnée, éternuements) chez ces animaux. Ces problèmes respiratoires sont particulièrement sévères chez les porcelets non sevrés et peuvent provoquer la mort jusqu'à chez 100% des porcelets (Baron et al., 1992; Dea et al., 1992; Hopper et al., 1992; Martineau et al., 1991; Rossow et al., 1994a; Terpstra et al., 1991). Les porcelets sevrés et au stade d'engraissement sont également affectés, mais la sévérité de la maladie est moindre. Dans ces cas, on observe également de la mortalité, mais à des niveaux plus faibles, les pertes en engraissement étant principalement dues à des retards de croissance (Halbur et al., 1995b; Halbur et al.,

1996; Keffaber, 1989; Martineau et al., 1991; Rossow et al., 1994; Yoon et al., 1992). Ces troubles respiratoires sont fréquemment aggravés par des infections respiratoires secondaires d'origine virales et bactériennes (Christianson et Joo, 1994; Goyal, 1993). D'autres signes cliniques sont également occasionnellement présents ; la cyanose des oreilles, une conjonctivite et de la diarrhée sont observés dans une minorité de cas (Baron et al., 1992; Gordon, 1992; Hopper et al., 1992; Plana et al., 1992; Terpstra et al., 1991).

Cette phase de signes cliniques aiguës dure de une à trois semaines chez l'animal (Goyal, 1993; Keffaber, 1989), alors que dans un élevage sa durée moyenne est de quatre à dix semaines (Hopper et al., 1992). Par la suite, les naissances de porcelets mort-nés et les mortalités avant sevrage diminuent alors que les naissances de porcelets vivants né-faibles augmentent, pendant une période de 16 à 20 semaines, jusqu'à ce que l'on observe des taux normaux de naissance dans les élevages (Brouwer, 1994). Toutefois, dans certains cas, la phase aiguë fait place à une forme chronique de la maladie avec développement de diverses infections secondaires (Gordon, 1992). Ainsi, les animaux peuvent rester séropositifs plusieurs mois après la fin de la phase aiguë de la maladie et peuvent aussi continuer à transmettre le virus pendant au moins six mois après la disparition des signes cliniques (Anonymus, 1991; Goyal, 1993; Zimmerman, 1992).

### **1.2.2 Lésions**

Les lésions provoquées par le virus du SRRP sont, tout comme les signes cliniques, très variables. Parfois aucune lésion n'est apparente, alors que dans d'autres cas le nombre de lésions est très important et elles sont disséminées dans l'ensemble de l'organisme. Les animaux ne présentent jamais l'ensemble des lésions pouvant être causées par le VSRRP, mais habituellement une combinaison de celles-ci. Les lésions macroscopiques observées peuvent affecter les poumons, l'appareil reproducteur, les tissus lymphoïdes, le système vasculaire, le cœur et le cerveau (Rossow, 1998).

Le poumon est le principal organe ciblé par le VSRRP. Toutefois, la gravité des lésions qui y sont observées est très variable; il peut y avoir absence totale de lésion jusqu'à la

présence d'importantes lésions aggravées par diverses infections secondaires (Collins et al., 1992; Done, 1995; Halbur et al., 1995b; Hopper et al., 1992). En conditions expérimentales, soit en absence d'infections secondaires, les lésions pulmonaires typiques consistent en une décoloration grisâtre à brunâtre ou couleur prune localisée associée histologiquement à des lésions de pneumonie interstitielle résultant d'une infiltration des septa alvéolaires par des cellules lympho-mononucléées (Collins et al., 1992; Dea et al., 1992; Halbur et al., 1996; Magar et al., 1995; Plana et al., 1992; Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995). On peut également observer une infiltration des voies respiratoires supérieures par des neutrophiles (Pol et al., 1991), une hyperplasie des pneumocytes de type II (Rossow et al., 1994a; Rossow et al., 1995) et une accumulation de macrophages et de débris de cellules épithéliales dans la lumière des alvéoles. Occasionnellement, il est possible d'observer des lésions d'alvéolite nécrotique (Halbur et al., 1995a; Halbur et al., 1995b).

Il semble que, outre le cas des spermatozoïdes et des macrophages, les cellules du système reproducteur des porcs ne soient pas susceptibles à l'infection par le VSRPP (Albina, 1997). Ainsi, chez la majorité des cas, on ne retrouve que peu ou pas de lésions au niveau du système reproducteur des porcs. Chez les truies, une leucocytose lymphoplasmocytaire légère peut être démontrée (Christianson et al., 1992; Stockhoff-Zurweiden, 1993). Des lésions au niveau du placenta ont également pu être observées en microscopie électronique et se caractérisent par une microséparation des couches épithéliales du placenta accompagnée par la nécrose et la desquamation de ces dernières (Stockhoff-Zurweiden, 1993). Chez les fœtus morts, on peut observer des lésions de pneumonie interstitielle avec infiltration de cellules lympho-monocytaires comme chez les porcelets (Botner et al., 1994).

Au niveau des autres tissus et organes, on peut noter une hypertrophie, une hyperplasie ou de la nécrose des centres germinatifs des tissus lymphoïdes (Collins et al., 1992; Cooper et al., 1995; Halbur et al., 1995a; Halbur et al., 1995b; Rossow, 1994a; Rossow et al., 1995) et des lésions de myocardite avec infiltration de cellules mononucléées (Collins et al., 1992; Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1996; Rossow et al.,

1994a; Rossow et al., 1995; Vezina et al., 1996). Exceptionnellement, il est possible d'observer des lésions cérébrales qui affectent tant la matière blanche que la matière grise du cerveau (Rossow et al., 1995).

### **1.2.3 Hôte et transmission**

Les deux seules espèces animales pouvant être infectés naturellement par le VSRRP sont le porc et le sanglier (Albina, 1997). La principale voie de transmission du virus se fait par contact direct entre animaux infectés et susceptibles. L'infection peut se transmettre par des contacts de nez à nez ou par contact avec l'urine ou les matières fécales dans lesquelles le virus peut être excrété (Christianson et al., 1993; Rossow et al., 1994). Le virus peut également se transmettre par la voie aérienne sur des distances inférieures à trois kilomètres. En effet, 45% des fermes se trouvant à 500 mètres d'un élevage contaminé peuvent devenir infectées; ce taux diminue à 10 % dans un rayon de 500 mètres à un kilomètres et il est inférieur à 2% entre un et deux kilomètres (Blanquefort, 1995). La transmission de l'infection peut également se faire via le sperme de verrats infectés. En effet, il a été démontré, par injection intrapéritonéale de semence contaminée à des porcs susceptibles, que le VSRRP peut persister dans la semence pendant 43 jours suivant l'infection (Swenson et al., 1994). Des tests de RT-PCR ont même permis d'y détecter de l'ARN viral jusqu'à 92 jours pi (Christopher-Hennings et al., 1995). De plus, au moins deux rapports épidémiologiques, l'un en France et l'autre en Grande-Bretagne, incriminent l'insémination artificielle comme étant l'une des principales sources d'infection des fermes de naisseurs ou naisseurs-engraisseurs (Albina, 1997). Une autre source potentielle de transmission du VSRRP pourrait être le lisier qui est utilisé comme fertilisant pour les terres agricoles (Albina, 1997).

## 1.2.4 Réponse immunitaire

### 1.2.4.1 Réponse humorale

L'apparition d'Ac spécifiques au VSRRP est détectable, dans le sérum, à partir du cinquième jour pi (Albina et al., 1992; Albina et al., 1994; Bilodeau et al., 1994; Loemba et al., 1996; Nelson et al., 1994; Vezina et al., 1996; Yoon et al., 1992c; Yoon et al., 1995). Ces premiers Ac sont principalement des IgM et ils sont présents à des titres variant de 16 à 256 tel qu'évalués par les tests d'immunofluorescence indirecte (IFI). Les niveaux maximum d'IgM sont détectés vers le quatorzième jour suivant l'inoculation du virus (titre de 1024), puis on note une diminution progressive des IgM sériques jusqu'à la cinquième ou sixième semaine où ils deviennent indétectables par IFI (Loemba et al., 1996). Les IgG sont, quant à eux, détectables dès le sixième jour pi (titres de 16 à 64), mais les titres maximaux n'apparaissent qu'entre la fin de la troisième et la sixième semaines (titres de 1024 à 2048) d'infection. Ces titres élevés peuvent toutefois se maintenir pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (Loemba et al., 1996; Yoon et al., 1995).

Des tests d'immunobuvardage de type Western (WB) ont permis de détecter des Ac dirigés contre la glycoprotéine majeure de l'enveloppe (GP<sub>5</sub>) dès le septième jour pi, alors que les Ac dirigés contre les protéines de la matrice (M) et de la nucléocapside (N) ne sont détectables que vers la fin de la deuxième semaine qui suit l'inoculation du virus (Loemba et al., 1996). Même si les premiers Ac ne sont pas dirigés contre la protéine N, c'est elle qui suscite la réponse immunologique humorale la plus intense, ce qui en fait une cible de choix pour la mise au point de test de diagnostic de l'infection par le VSRRP. Toutefois, les Ac dirigés contre celle-ci se sont révélés totalement inefficaces pour la neutralisation de l'infection virale, ce qui l'élimine en tant que protéine cible dans la mise au point de vaccins (Yoon et al., 1995). Des Ac dirigés contre les autres protéines structurales du virion, GP<sub>2a</sub>, GP<sub>2b</sub>, GP<sub>3</sub> et GP<sub>4</sub> ont également pu être détectés par WB, mais leur cinétique n'a pas encore été étudiée (Gonin et al., 1998; Meulenberg et Petersen-den Besten, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996; Wu et al., 2000).

La présence d'Ac neutralisant l'infectivité du VSRRP n'est habituellement détectée dans le sérum qu'après la troisième ou quatrième semaine pi (Loemba et al., 1996; Yoon et al., 1995). Les titres de neutralisation obtenus en conditions expérimentales sont généralement faibles, soit de l'ordre de 32 à 64 (Loemba et al., 1996). Un test de neutralisation modifié, où on additionne 20% de sérum de porc frais au virus dilué comme source de complément (Yoon et al., 1994) permet de détecter des Ac neutralisants dès le neuvième jour pi, avec un premier pic évident aux jours 11 à 21 pi et un deuxième aux jours 41-45 pi. En l'absence de sérum de porc normal, seul le deuxième pic peut être détecté et les titres en Ac neutralisants obtenus sont inférieurs à ceux observés en présence de sérum. Deux protéines du VSRRP sont connues à ce jour comme porteuses de déterminants antigéniques associés à la synthèse d'Ac neutralisants : la GP<sub>4</sub> et la GP<sub>5</sub>. Cette découverte a été rendue possible suite au clonage des différents ORFs du VSRRP dans divers vecteurs procaryotes et eucaryotes qui ont été utilisés afin de produire des AcMo ou pour l'immunisation expérimentale de porcs. En effet, différents groupes ont montré que la principale cible des Ac neutralisants est la GP<sub>5</sub> et que les épitopes reconnus par ceux-ci peuvent être linéaires ou conformationnels (Gonin et al., 1999; Pirzadeh et Dea, 1997; Weiland et al., 1999; Zhang et al., 1998). De plus, ces épitopes sont présents sur les virus appartenant à chacun des deux génogroupes. En ce qui concerne la GP<sub>4</sub>, des AcMo neutralisants dirigés contre les épitopes linéaires d'au moins deux souches européennes différentes ont été produits. Toutefois, ces Ac sont moins efficaces pour neutraliser l'infection que ceux qui sont dirigés contre la GP<sub>5</sub> (van Nieuwstadt et al., 1996; Weiland et al., 1999). De plus, la présence d'Ac neutralisants dirigés contre la GP<sub>4</sub> n'a pas encore pu être démontrée dans le cas d'infection avec des isolats nord-américains du VSRRP.

Dans le cas d'un virus comme le VSRRP, la sécrétion d'Ac spécifiques peut être nuisible à l'hôte. En effet, une augmentation de l'ampleur de l'infection dépendante des Ac (ADE, en anglais « antibody-dependant enhancement ») peut être observée dans certains cas. Ce phénomène, qui a été démontré chez différents virus, est provoqué par le fait que la principale cellule-cible du VSRRP, le macrophage, possède à sa surface des récepteurs

pour la portion Fc des Ac. Ainsi, la liaison des Ac spécifiques au virion avec celui-ci provoque un phénomène d'opsonisation qui favorise l'infection des macrophages. Il semble que les Ac dirigés contre la protéine GP<sub>5</sub> soient responsables du phénomène ADE (Yoon et al., 1996). Toutefois, en présence de titres élevés en Ac neutralisants, aucune activité ADE n'est détectée. Ainsi, les effets négatifs potentiels de l'ADE, pourraient être évités en utilisant des méthodes d'immunisation générant une importante activité neutralisante au niveau du sérum (Yoon et al., 1996).

#### 1.2.4.2 Réponse cellulaire

La réponse cellulaire est une composante essentielle de l'immunité antivirale qui joue un rôle primordial dans l'élimination du virus et la protection contre la maladie. Lors d'une infection avec le VSRRP, des tests de prolifération lymphocytaire spécifiques ont permis de démontrer que les réponses cellulaires n'apparaissent que vers la quatrième semaine suivant l'infection, la réponse maximale étant établie vers la septième semaine et que, par la suite, il y a une diminution progressive de la réponse jusqu'à la onzième semaine ou celle-ci devient indétectable (Bautista et Molitor, 1997). Les mêmes auteurs ont également démontré que la prolifération lymphocytaire est spécifique au VSRRP et qu'elle est dose-dépendante. De plus, cette réponse cellulaire engendre une mémoire immunologique, puisque lors d'une seconde inoculation du VSRRP, la réponse secondaire se révèle plus rapide et plus importante que la réponse primaire. Les principales cellules effectrices dans la réponse proliférative sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent également un rôle important. Les monocytes pourraient également jouer un rôle essentiel en tant que cellules présentatrices d'Ag. La réponse immunitaire de type cellulaire est aussi présente *in vivo*. Des tests d'hypersensibilité de type retardée (DTH) ont permis de démontrer que cette réponse est également spécifique et dose-dépendante.

Parmi les différentes protéines structurales du VSRRP, il a été démontré que la principale protéine responsable de l'induction de cette prolifération lymphoblastique lors de l'immunisation des porcs avec le virus complet, est la protéine M. La GP<sub>5</sub> peut

également induire la prolifération lymphocytaire, mais dans une moindre mesure, alors que la protéine N ne semble pas impliquée de façon significative (Bautista et al., 1999). La construction de virus de la vaccine recombinants exprimant les produits des ORF2 et ORFs 4-7 a permis d'étudier plus précisément le rôle des différentes protéines du virion au niveau de la réponse immunitaire de type cellulaire. À dose égale de chacun des Ag, la protéine M est toujours celle qui induit une prolifération lymphoblastique la plus importante. Suivent, à égalité, la GP<sub>5</sub> et la GP<sub>2</sub>, suivis par la GP<sub>4</sub>, alors que la protéine N n'induit toujours pas de réponse proliférative significative. Ces résultats nous indiquent donc que la protéine qui semble jouer le rôle le plus important dans l'immunité cellulaire est la protéine de la matrice (Bautista et al., 1999).

Plusieurs études ont été publiées relativement à la modification des populations cellulaires retrouvées dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) suite à l'infection par le VSRRP. Le nombre total de cellules retrouvées dans les LBA augmente significativement (5 à 10 fois) entre le cinquième et le dixième jours pi et il se maintient à un niveau élevé pendant au moins deux semaines, mais parfois plus longtemps. L'augmentation du nombre de cellules est principalement due à l'infiltration de cellules CD2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> de deux types : les cellules CD8<sup>+</sup>CD6<sup>+</sup> et les cellules CD8<sup>+</sup>CD6<sup>-</sup> qui sont respectivement les cellules T cytotoxiques et les cellules NK. Cette augmentation des cellules CD2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> provoque ainsi une diminution du ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. On note également une augmentation des monocytes et parfois des neutrophiles (Albina et al., 1998; Labarque et al., 2000; Samsom et al., 2000; Shimizu et al., 1996; Van Reeth, 1999). Selon les différentes études, il semble que l'infection par le VRSSP résulte en une baisse transitoire du nombre de PAMs (Labarque et al., 2000) ou qu'il augmente légèrement (Samsom et al., 2000). Le rétablissement des populations cellulaires pulmonaires à des niveaux normaux est recouvert après au moins trois semaines pi, sinon plus (Albina et al., 1998; Labarque et al., 2000).

### **1.2.5 Vaccination**

Plusieurs vaccins ont déjà été conçus afin de protéger les animaux contre l'infection par le VSRRP. Le premier à avoir été commercialisé est un vaccin provenant d'une souche européenne du VSRRP. Il s'agit d'un virus produit sur PAMs puis inactivé (Cyblue, Laboratorios Sobrino, S.A.). Il protège les porcs contre les troubles reproducteurs du SRRP, mais la protection qu'il confère contre l'infection est limitée (Albina, 1997; Dea et al., 2000). Divers vaccins constitués de virus vivant atténué sont également disponibles commercialement. Le RespPRRS (Boehringer Ingelheim Inc.) est un vaccin vivant qui a été atténué par plus de 87 passages successifs sur la lignée cellulaire CL 2621. Ce vaccin confère une protection contre les troubles respiratoires du SRRP et son utilisation est recommandé chez les porcs de 3-18 semaines et chez femelles non-gestantes (Albina, 1997; Christopher-Hennings et al., 1997; Meng, 2000). Ce vaccin est également utilisé chez les verrats et chez les femelles reproductrices qui ne sont pas en fin de gestation. Chez les verrats, le virus vaccinal peut être excrété dans la semence pendant au moins 50 jours et, de plus, il provoque une importante baisse de la motilité spermatique ainsi qu'une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux (Christopher-Hennings et al., 1997). Bien que chez les truies gestantes le vaccin ne semble pas affecter l'efficacité de la reproduction, il est cependant présent chez une majorité de truies 49 jours pi et peut être excrété dans l'air et les différentes sécrétions de l'animal (Mengeling et al., 1996). Un autre vaccin vivant atténué, le Prime Pac PRRS (Schering-Plough Animal Health), est également disponible. Ce dernier permet de diminuer la sévérité et la durée de la maladie lors de l'infection des animaux vaccinés. Ce virus est toutefois en mesure de se répliquer et d'être excrété chez l'animal pendant une longue période de temps (Meng, 2000). Ainsi, les vaccins vivants atténués confèrent une meilleure protection que les vaccins inactivés, mais ils comportent certains inconvénients majeurs. Ils engendrent une virémie chez les animaux vaccinés et sont excrétés dans la semence ou dans l'air. Ils nuisent également à la qualité de la semence et ne confèrent qu'une immunité de courte durée (Dea et al., 2000a; Meng, 2000). Un autre problème majeur des vaccins vivants atténués est le risque de retour à la virulence de ces vaccins. En effet, les arterivirus sont des virus à ARN, qui présentent de hauts taux de mutations et en plus ces souches vaccinales ont la capacité de se répliquer chez l'animal pendant une longue période de temps (au moins 50 jours) ce qui augmente de beaucoup le risque de retour à la virulence. Une étude a

démontré qu'un marqueur présent dans une souche vaccinale ne pouvait être isolé chez aucun des 25 isolats de champs étudiés avant la vaccination. Ce marqueur a pu être détecté à partir de 24 des 25 isolats de champs étudiés suite à l'introduction du vaccin dans les troupeaux et l'on soupçonne ces isolats d'être des descendants directs de la souche vaccinale (Mengeling et al., 1999).

Des essais de vaccination, soit avec la protéine de fusion recombinante GST-ORF5 exprimée dans *E. coli*, soit avec un plasmide recombinant dans lequel l'ORF5 a été cloné sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus humain (pRc/CMV5) ont déjà été tentés chez le porc (Pirzadeh et Dea, 1998). Dans les deux cas, des Ac spécifiques dirigés contre la GP5 ont été sécrétés, mais la synthèse d'Ac neutralisants n'a été détectée que chez les porcs vaccinés génétiquement (pRc/CMV5). Il est intéressant de noter que les titres obtenus en Ac neutralisants (64-128) étaient plus élevés que ceux observés lors d'infection expérimentale (32-64). Suite à une infection-défi avec la souche homologue virulente, les porcs vaccinés avec la protéine recombinante synthétisée chez *E. coli* ont montré, par rapport aux porcs non-vaccinés, une diminution de la virémie. Cependant, il y avait présence de lésions macroscopiques sévères typiques du SRRP et, en microscopie, des lésions de pneumonie interstitielle à proliférative plus intenses étaient visibles. Cette augmentation de la sévérité des lésions observées suite à la vaccination avec ce type d'antigène recombinant semblent plutôt avoir favorisé l'établissement du phénomène ADE discuté précédemment. Les porcs vaccinés génétiquement ont toutefois été protégés contre le SRRP. Suite à l'infection-défi, l'infection virale est demeurée localisée au niveau des voies respiratoires et n'a pas engendré de virémie. Aussi, les poumons de ces porcs ne présentaient pas de lésions macroscopiques typiques du SRRP, alors que seulement des lésions de pneumonie interstitielles légères furent détectées lors des examens histopathologiques. Selon les auteurs, les porcs vaccinés avec la protéine recombinante eucaryotique exprimée dans les cellules de l'hôte, suite à l'injection intradermique d'ADN plasmidique recombinant, ont été protégés par les Ac neutralisants générés suite à ce type de vaccination. La GP5 semble donc être la principale protéine associée à la protection, d'où elle représenterait la principale cible pour la mise au point d'un vaccin recombinant.

## **CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Avant de procéder à la description du matériel et des méthodes utilisées lors de nos expérimentations; voici un bref rappel des problématiques et objectifs de ce travail. Normalement, les isolats du génogroupe nord-américain se répliquent aussi bien sur les cellules dérivées de la lignées MA104 (MARC-145 et CL 2621) que sur les PAMs. Cependant, des isolats nord-américains du VSRRP ayant perdu la capacité d'infecter les cellules MARC-145 ont récemment été isolés par le service de diagnostic virologique de l'INRS-Institut Armand-Frappier. De plus, l'existence d'Ac dirigés contre la GP<sub>4</sub> et la GP<sub>5</sub> du VSRRP qui sont capables de neutraliser l'infectivité indiquent que ces deux glycoprotéines d'enveloppe pourraient jouer un rôle essentiel dans la liaison du virus à son récepteur et, par le fait même, être impliquées dans la détermination du tropisme du VSRRP. Le premier objectif de ce travail consistait donc à identifier, chez ces protéines, les régions impliquées dans la modification du tropisme du VSRRP. Afin de mettre en évidence une telle région chez les deux gènes incriminés, des isolats nord-américains du VSRRP, associés à des épidémies de SRRP au Québec et ayant perdu la capacité de se propager sur les cellules MARC-145 ont été sélectionnés de façon aléatoire. Par la suite, les gènes codant pour la GP<sub>4</sub> et la GP<sub>5</sub> de ces isolats ont été amplifiés par RT-PCR avant de procéder aux travaux de séquençage. Les séquences en acides aminés de ces protéines ont ensuite été déduites à partir des séquences nucléotidiques obtenues pour chaque isolat et furent comparées entre elles et avec les souches de référence nord-américaines, qui ont la capacité de se propager sur les cellules MARC-145 et sur les PAMs, afin de tenter d'identifier des régions qui pourraient être responsables de leur tropisme particulier.

La deuxième grande problématique de ce travail est la relative inefficacité des vaccins actuellement commercialisés contre le SRRP et les risques associés à l'utilisation de certains d'entre eux. Tout d'abord, les vaccins inactivés présentement disponibles sur le marché sont plus ou moins efficaces pour protéger les animaux contre les signes cliniques de la maladie en plus de ne conférer qu'une protection limitée contre l'infection. La faible efficacité de ces vaccins pourrait être due en partie à la méthode utilisée pour l'inactivation des virions si les protéines portant les principaux déterminants antigéniques sont en partie dénaturées. La deuxième catégorie de vaccins disponibles sur le marché, les vaccins vivants atténués, s'avèrent plus efficaces, mais ils comportent des

inconvenients majeurs. Ces vaccins confèrent habituellement une bonne protection contre les signes cliniques respiratoires du SRRP et offrent habituellement une protection assez efficace contre l'infection par le VSRRP. Toutefois, ces vaccins engendrent une virémie chez les animaux vaccinés et sont excrétés dans la semence ou dans l'air. Ils provoquent également des troubles reproducteurs comme des avortements, lorsqu'ils sont administrés aux truies gestantes, et une baisse de la qualité de la semence des verrats. De plus, la protection qu'ils confèrent contre l'infection n'est que de courte durée et il est impossible de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés. Toutefois, le problème le plus important est le retour possible à la virulence de ces virus atténués (Albina, 1997; Christopher-Hennings et al., 1997; Dea et al., 2000; Meng, 2000; Mengeling et al., 1996).

Ainsi, l'inefficacité et les risques des vaccins actuels font en sorte que la production de vaccins plus efficaces et sécuritaires est essentielle et il semble que la GP<sub>5</sub> pourrait être une cible de choix pour la mise au point de vaccins sous-unitaires ou recombinants. Le fait que cette protéine soit la principale cible des Ac neutralisants suggère qu'une bonne réponse immunitaire contre cette protéine pourrait jouer un rôle majeur dans la protection de l'hôte contre l'infection par le VSRRP. Des travaux d'immunisation de porcelets ont déjà été réalisés utilisant comme antigène la protéine de fusion recombinante GST-ORF5 exprimée dans *E.coli* et par immunisation génétique avec l'ADN du plasmide pRc/CMV dans lequel avait été cloné l'ORF5 d'une souche Nord-Américaine (Pirzadeh et Dea, 1998). Les résultats obtenus lors de ces expériences ont permis de démontrer que la présence de titres élevés en Ac neutralisants est essentielle afin d'obtenir une protection efficace.

Donc, dans la deuxième partie de ce projet de recherche des porcelets ont tout d'abord été infectés expérimentalement afin de confirmer la virulence de la souche IAF-Klop utilisée. Par la suite, des porcelets ont été immunisés avec un vaccin inactivé à l'éthylenimine binaire (BEI), un agent ne dénaturant pas les protéines, puis soumis à une infection-défi. Finalement, une infection-défi a aussi été réalisée chez des porcelets ayant été préalablement immunisés avec des adénovirus humains recombinants non-réplicatifs et

inductibles véhiculant soit le gène de l'ORF5 de type sauvage, soit le gène de l'ORF5 de type synthétique. Ce dernier est le gène de l'ORF5 de type sauvage dont certains codons ont été modifiés, dans le laboratoire du Dr Serge Dea, pour faire en sorte que l'ARNm soit traduit de façon optimale par les cellules de mammifères. Des échantillons de sérums ont été prélevés à différents temps chez ces animaux afin d'évaluer la réponse humorale de ceux-ci et la présence du VSRRP. Des échantillons de poumons ont également été récoltés lors de l'euthanasie des animaux afin de procéder à des analyses histologiques et virologiques.

## **2.1. Étude du tropisme du VSRRP**

### **2.1.1 Sélection des souches à tropisme restreint pour les cellules PAMs**

Des échantillons de poumons de porc et des surnageants de culture de cellules PAMs infectées, que le service de diagnostic virologique de l'INRS-Institut Armand-Frappier avait identifiés comme étant positifs à des isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les PAMs, mais non sur les cultures de cellules MARC 145, ont été sélectionnés. La spécificité du tropisme a par la suite été recertifiée. Dans le cas des échantillons de poumons, environ 0,5 mL de poumon était prélevé puis trituré pour être ensuite resuspendu dans un volume total de 5 mL de milieu de culture minimal de Dulbecco avec une base saline de Earle (DMEM, Gibco BRL) supplémenté avec 100 U/ml (1%) de pénicilline et 100 µg/ml (1%) de streptomycine, 250 µg/mL (0,4%) d'amphotéricine B (fungizone) et 25 µg/ml (0.2%) de gentamycine. Par la suite, le mélange était vortexé, puis centrifugé pendant 45 min à 3000 rpm et 4°C dans un rotor H-1000B (Sorvall). Le surnageant était ensuite conservé à -70°C.

Les tests de propagation ont été fait en parallèle sur des feuillettes de cellules MARC 145 et PAMs en culture dans des plateaux de 24 puits (Costar). Le milieu de culture était tout d'abord enlevé et remplacé soit par 250 µL/puits de surnageant de broyat de poumon, soit par 250 µL/puits de surnageant de culture infectieux dilué 1/10 dans du milieu de culture. Après, une période d'adsorption de 1h15 min à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub> les

surnageants infectieux étaient remplacés par 1mL/puits de milieu de maintien ne contenant que 2% sérum fœtal bovin (SFB). Les plateaux étaient ensuite incubés à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à l'apparition de l'effet cytopathique ou pendant 5 jours. À ce moment, les plateaux de PAMs étaient fixés à l'acétone/méthanol (1 :1) pendant 30 min à 4°C. Les surfaces des puits des plateaux de cellules MARC-145 qui ne démontraient pas d'effet cytopathique étaient grattées avec un policeman (Starstedt), puis les cellules étaient récoltées avec le surnageant afin de procéder à un deuxième passage du virus. Ce surnageant, non dilué, était donc remis en contact avec d'autres cellules MARC-145 et le protocole d'infection décrit ci-haut était repris. Après 5 jours, s'il y avait toujours absence d'effet cytopathique, ces cellules étaient fixées. Des tests d'IFI étaient ensuite effectués sur les plateaux de cellules fixées afin de détecter la présence d'antigènes du VSRRP. Les échantillons contenant un isolat du VSRRP capable de se propager sur les PAMs, mais ne pouvant se propager sur les cellules MARC 145 ont été conservés à -80° C et sélectionnés pour cette étude.

#### **2.1.1.1 Lignées cellulaires établies**

Les PAMs ont été récoltés par des lavages broncho-alvéolaires faits à partir de poumons de porcelets de 4-8 semaines. Les porcelets ont été euthanasiés et leurs poumons ont été prélevés de manière aseptique, puis remplis avec un tampon phosphate-saline à pH 7,2 (PBS; Gibco BRL) supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine, 0,2% de gentamycine et 0,5% d'amphotéricine B (fungizone). Les poumons remplis de liquide ont ensuite été massés légèrement, puis le liquide a été récolté. Ces lavages ont été refaits à 2 ou 3 reprises. Une partie de ce liquide a par la suite été centrifugé à une vitesse de 2000 rpm, pendant 10 min, à une température de 4°C (rotor H-1000B de Sorvall) dans deux tubes stériles de 200mL (Falcon). Les culots obtenus ont été conservés et les centrifugations ont été répétées jusqu'à ce que tout le liquide récolté ait été centrifugé et que l'on se retrouve avec deux gros culots de cellules. Celles-ci ont ensuite été resuspendues dans le PBS, puis lavées de 4 à 6 fois avec la même solution de PBS enrichie ayant servie aux lavages pulmonaires. Les 2 culots ont, par la suite, été resuspendus dans un volume total de 50 mL de milieu de culture. Ce milieu était composé

de DMEM auquel étaient ajoutés 10% de SFB (Gibco BRL), 1% de glutamine, 1% de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non-essentiels, 1% d'HEPES, 1% de pénicilline-streptomycine, 1% de tylosine, 0,4% d'amphotéricine B (fungizone) et 0,2% de gentamycine. Cette suspension cellulaire a été récoltée dans une seringue 60 cc et passée doucement au travers d'une aiguille 22G ½ (Becton Dickinson). Par la suite, les cellules ont été comptées sur un hémacitomètre, puis mises en culture à une concentration de  $10^6$  cellules/mL.

Les cellules MARC-145 consistent en un clone de la lignée de rein de singe MA 104 et sont permissives au virus du VSRRP. Elles étaient cultivées dans un milieu composée de MEM avec des sels d'Earle (Gibco BRL) auquel on ajoutait 8% de SFB, 1% de glutamine, 1% d'HEPES et 1% de pénicilline/streptomycine.

#### **2.1.1.2 Immunofluorescence indirecte (IFI)**

Les ascites contenant les anticorps monoclonaux (AcMo) K8 et 2B4 (Dea et al., 1996; Dea et al., 2000b), dirigés contre la protéine N du VSRRP, étaient toutes deux diluées 1/100 dans du PBS et 250 µL étaient déposés dans chaque puits de cellules ayant été fixées, tel que décrit à la section 1.1. Le tout était incubé pendant 45 min à 37°C. Les puits étaient ensuite rincés cinq fois avec du PBS, puis le conjugué était ajouté. Ce conjugué, spécifique aux immunoglobulines (Ig) murines, consistait en une suspension d'IgG monospécifiques de chèvre conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC; Boehringer Mannheim) diluée 1/50 dans du PBS, puis distribuée à raison de 200 µL/puits. Après 30 min à 37°C, les puits étaient lavés cinq fois au PBS, puis deux fois à l'eau distillée. La fluorescence était observée à l'aide d'un microscope inversé (Leica DM IRB) sous rayonnement UV.

#### **2.1.2 Extraction d'ARN génomique**

L'extraction d'ARN a été réalisée selon la méthode en une étape de Chomczynski et Sacchi (1987) utilisant l'isothiocyanate de guanidine comme agent dénaturant mélangé au

phénol pour l'extraction. On prélevait soit 50-100 mg de poumon ou 200  $\mu$ L de surnageant de cultures infectées. Les échantillons étaient tout d'abord triturés et homogénéisés, dans le cas des poumons, ou resuspendus, dans le cas des surnageants de culture, dans un volume total de 1 mL de Tripure Isolation Reagent (Roche, Laval, Qué., Canada) dans des tubes eppendorf d'une capacité de 1,5 mL (Fisher). Ils étaient ensuite incubés 5 min à la température ambiante, puis on ajoutait 200  $\mu$ L de chloroforme dans chaque tube, que l'on vortexait avant de réincuber 10 min à la température ambiante. Après une centrifugation à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C, la phase aqueuse obtenue était récoltée et transférée dans un nouveau tube de 1,5 mL, auquel on ajoutait 500 $\mu$ L d'isopropanol avant de vortexer et d'incuber 10 min à la température ambiante. Par la suite, les tubes étaient centrifugés à 12 000 x g pendant 10 min à 4°C (centrifugeuse Biofuge Fresco; Mandel Scientific), et le culot d'ARN était resuspendu dans 1,2 mL d'éthanol 75% pour ensuite être recentrifugé à 7500 x g pendant 5 min à 4°C. Le culot était ensuite séché, puis resuspendu dans 26  $\mu$ L d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) contenant 1 $\mu$ L d'inhibiteur de Rnase (RNA guard; Amersham Pharmacia) et finalement incubé 10-15 min à 65°C.

### **2.1.3 Amorces**

Le choix des amorces pour le RT-PCR a été basé sur la séquence nucléotidique des ORFs 3 à 6 de la souche IAF-Klop du VSRPP. Les amorces ont été choisies de façon à ce qu'elles puissent s'apparier de 30 à 100 nucléotides en amont et en aval des gènes à séquencer, de sorte que l'on puisse obtenir la séquence entière de chaque ORF. Ainsi, les paires d'amorces, qui ont été synthétisées pour amplifier l'ORF4 et l'ORF5, s'hybridaient au niveau de l'ORF3 et de l'ORF5, ou au niveau de l'ORF4 et l'ORF6, respectivement. Ces amorces ont été synthétisées par le service de synthèse des oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier, Centre de microbiologie et biotechnologie. Les séquences des amorces pour amplifier l'ORF4 étaient 5' CAA CAT TTC AGC CGT GTT TCA GACC- 3' (ORF4.GEN.S; amorce sens dans l'ORF3) et 5' ACG GCA CGA TAC ACC ACA- 3' (ORF4.GEN.AS; amorce antisens dans l'ORF5) et celles pour amplifier l'ORF5 étaient 5' CCA TTC TGT TGG CAA TTT GA- 3' (ORF5.GEN.S; amorce sens

dans l'ORF4) et 5' GGC ATA TAT CAT CAC TGG CG- 3' (ORF5.GEN.AS; amorce antisens dans l'ORF6).

#### **2.1.4 Transcription inverse (RT)**

Quatre  $\mu\text{L}$  d'ARN obtenus à la section 1.2 étaient mélangés à 6  $\mu\text{L}$  d'eau traitée au DEPC et 25 pmol d'oligonucléotides antisens (ORF4 .GEN.AS ou ORF5.GEN.AS), puis dénaturés 10 minutes à 70°C avant d'être immédiatement refroidis sur glace. Par la suite, 9  $\mu\text{L}$  d'un mélange constitué de 4  $\mu\text{L}$  de tampon pour l'enzyme transcriptase inverse 5x (« first strand buffer»; Gibco BRL), de 1 $\mu\text{L}$  d'inhibiteur de Rnase (RNA guard, Amersham Pharmacia), de 2 $\mu\text{L}$  de dTT 0,1M (Gibco BRL) et de 2 $\mu\text{L}$  d'une solution contenant 10mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) (Pharmacia Biotech) étaient ajoutés à chaque tube. Les tubes étaient par la suite incubés 3 min à 37°C, puis 200 U de transcriptase inverse (Gibco BRL) étaient ajoutés à chaque tube. Après une incubation de 1 h à 42°C, la transcriptase inverse était inactivée en chauffant les tubes pendant 5 min à 95°C, puis les tubes étaient rapidement refroidis sur glace.

#### **2.1.5 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Trois réactions PCR ont été réalisées à partir de 20 $\mu\text{L}$  d'ADNc obtenu lors de la réaction de RT, afin d'obtenir une plus grande quantité totale d'ADN. Pour une réaction de PCR, le mélange réactionnel déposé dans des tubes eppendorf de 1,5 ml consistait en une solution composée de 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc, de 77,5  $\mu\text{L}$  d'eau, de 25 pmol d'oligonucléotides sens et antisens complémentaires (ORF4.GEN.S et ORF4.GEN.AS ou ORF5.GEN.S et ORF5.GEN.AS) et de 2 $\mu\text{L}$  d'une solution de dNTPs contenant 10mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP). Après avoir refroidi cette première solution sur la glace, 13,3  $\mu\text{L}$  d'une deuxième solution composée de 10  $\mu\text{L}$  de tampon PCR 10x (200mM Tris-HCl [pH 8.0], 500mM KCl; Gibco BRL), de 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50mM (Gibco BRL) et de 0,3  $\mu\text{L}$  de *Taq* ADN polymérase (Gibco BRL) étaient rajoutés dans les tubes. À l'aide d'un thermocycleur (PTC-100; MJ Research Inc), l'ADNc était soumis à 35 cycles d'amplification qui consistaient en 1 min de dénaturation, 1 min d'appariement des

amorces et 1 min d'élongation. Pour les 5 premiers cycles, les températures étaient respectivement de 94, 42 et 72°C, puis, pour les 30 derniers cycles, la température d'appariement des amorces était plutôt de 50°C. Après ces 35 cycles, une étape d'élongation finale de 10 min à 42°C était effectuée. Les produits d'amplification étaient révélés suite à l'électrophorèse de 10 µL du produit d'amplification sur un gel composé de 1% d'agarose dans du tampon TAE (0,04M Tris-acétate [pH 8.5], 0,001M EDTA) en présence de 0,5 mg/mL de bromure d'éthidium. Les produits d'amplification, et la préparation Ladder, où des marqueurs de différentes longueurs d'ADN que l'on faisait migrer parallèlement (1 Kb Plus DNA ladder; Gibco BRL), étaient, préalablement au chargement dans les puits du gel d'agarose, mélangés à une gouttelette de tampon d'échantillon 6X (0,25% d'orange G, 30% de glycérol, 1mM Tris-HCl et 0,1 mM EDTA). La migration sur gel était effectuée sous un potentiel de 110 V (générateur de courant Biorad) pendant environ 40 min, puis le gel était exposé aux rayons ultraviolets de courte longueur d'onde sur un transilluminateur FBTIV (Fisher), puis finalement photographié.

### **2.1.6 Purification, concentration et dosage de l'ADN**

Les produits d'amplification (3 tubes de PCR par réaction RT) étaient ensuite purifiés et concentrés sur une colonne de gel de silice « QIAquick PCR Purification Kit » de QIAGEN selon les instructions du fabricant. Cinq volumes de tampon PB étaient ajoutés à chaque tube de produits de PCR et le tout était bien mélangé. Ensuite, une colonne de centrifugation QIAquick, composée d'une membrane de gel silice, était insérée dans un tube collecteur de 2 mL et le contenu d'un tube de PCR était introduit dans cette colonne. Après une centrifugation de 60 secondes à 13 000 rpm (centrifugeuse Biofuge Fresco; Mandel Scientific), le liquide recueilli dans le tube collecteur était rejeté et ces étapes étaient répétées avec le contenu des deux autres tubes de PCR. Le lavage des colonnes se faisait en mettant 750 µL de tampon PE dans la colonne suivi d'une centrifugation de 60 secondes à 13 000 rpm. Le liquide du tube collecteur était vidangé, puis la colonne était recentrifugée dans les mêmes conditions. La colonne était ensuite mise dans un tube eppendorf 1,5 mL sans couvercle. L'élution de l'ADN se faisait en

mettant 30  $\mu$ L de tampon EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) au centre de la colonne pendant 60 secondes, puis en centrifugeant celle-ci pendant 60 secondes. La migration du produit d'amplification ainsi purifié et concentré était ensuite effectuée sur un gel composé d'1% d'agarose dans du tampon TAE contenant 0,5 mg/mL de bromure d'éthidium. La concentration en ADN était déterminée visuellement en comparant, sur la photo prise sous rayonnement UV, l'intensité de la bande d'ADN à partir de 2 $\mu$ L de la solution d'ADN concentrée et purifiée avec l'intensité des bandes obtenues à partir de 4  $\mu$ L de la préparation de marqueurs de longueur d'ADN (Low DNA Mass Ladder; Gibco BRL) ayant été migrée en parallèle sur le gel. Dans les deux cas, les échantillons étaient mélangés avec une gouttelette de tampon d'échantillon 6X avant d'être chargés sur le gel.

### **2.1.7 Séquençage et analyse des séquences**

Les ORFs 4 et 5 ont été séquencés par le service de séquençage de l'INRS-Institut-Armand-Frappier utilisant un séquenceur automatisé « ALF » (Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer; Pharmacia Biotech). Afin de s'assurer que des erreurs ne s'étaient pas introduites dans les séquences lors du RT-PCR, chaque fragment d'ADN a été séquencé à au moins deux reprises sur chaque brin à partir d'extraction d'ARN différentes. Les séquences obtenues ont été comparées à celles des ORFs 4 et 5 de la souche de référence américaine ATCC VR2332 (EMBL/GenBank accession number U00153) et de la souche de référence canadienne IAF-Klop (EMBL/GenBank accession number AF003345 pour l'ORF4 et U64928 pour l'ORF5), deux souches du VSRRP ayant la capacité de croître sur les deux types de cellules (MARC-145 et PAMs). La séquence des ORFs 4 et ORF5 de la souche québécoise IAF-EXP91 a quant à elle servie de comparaison en tant que souche ayant un tropisme restreint aux PAMs (EMBL/GenBank accession number L40898). Les analyses de séquences nucléotidiques et en aa ont été faites par ordinateur à l'aide du programme d'analyse GeneWorks 2.5 (Intelligenetics Inc).

## **2.2 Infection expérimentale**

### **2.2.1 Animaux**

Huit porcelets hybrides F1 castrés F1 (Landrace x Yorkshire), exempts de pathogènes spécifiques (SPF) et âgés de 4-5 semaines, ont été obtenus d'une ferme d'élevage du sud du Québec, Canada. Avant la livraison, les porcelets avaient été testés pour confirmer leur statut d'animaux séronégatifs pour le VSRRP, l'EMCV, le PPV, le HEV, le virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV) et pour *Mycoplasma hyopneumoniae*. Les porcelets ont été divisés en un groupe contrôle (2 porcelets) et en deux groupes expérimentaux (3 porcelets chacun).

### **2.2.2 Virus**

La souche de référence canadienne IAF-Klop du VSRRP, ayant été propagée pour 15 à 20 passages sur les cellules MARC-145 a été utilisée. Avant l'inoculation expérimentale, cette souche a été repropagée deux fois sur des PAMs en culture primaire (récolte : voir section 2.1.1.1) afin d'en augmenter la virulence pour les porcs. Pour le premier passage, des PAMs sur plaques de 6 puits (Costar) ont été infectés avec le surnageant de culture de cellules MARC-145 des passages précédents du virus dilué 1/10 dans du milieu de culture et distribué à raison de 2 mL/puits. Après une période d'adsorption de 1h15 à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>, le surnageant infectieux a été vidangé et remplacé par du milieu de maintien. Après 5 jours d'incubation, ou au moment de l'apparition d'ECP affectant plus de 95% des cellules, les plaques ont été congelées et décongelées à deux reprises afin de permettre la libération des virions présents dans les cellules, puis les cellules encore adhérentes au plastique ont été grattées dans le milieu à l'aide d'un policeman stérile (Starstedt). Le tout a été récolté et 1,5 mL/puits de cette suspension virale clarifiée ont été mis en contact pour un second passage sur les cellules PAMs. Après une période d'adsorption de 1h15 à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>, le surnageant a été remplacé par du milieu de culture frais et ces plaques ont été réincubées jusqu'à l'apparition d'ECP (48-72h). Les cellules ont ensuite été grattées suite à deux étapes de congélation-

décongélation et la suspension virale finale a été clarifiée par centrifugation pendant 20 min à 3000 rpm (centrifugeuse 6000D et rotor H-1000B; Sorvall).

### **2.2.2.1 Titrage du virus**

Le titrage des particules virales infectieuses a été effectué sur des plaques 96 puits contenant des feuillets de cellules MARC-145. Des dilutions décimales des surnageants de cultures infectées ont été préparées dans du milieu de culture sans sérum, mais contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA), puis 100 µL/puits de chaque dilution ont été déposés sur les plaques (6 puits/dilution). Après une période d'incubation de cinq jours à 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>, la mise en évidence d'un effet cytopathique a été vérifiée pour chaque dilution, puis les cellules ont été fixées à l'acétone/méthanol (1 :1) pendant 30 min à 4°C. Afin de confirmer les résultats basés sur la mise en évidence d'ECP, un test d'IFI a été effectué (idem 2.1.1.2) en utilisant 100 µL/puits d'AcMo et 60 µL/puits de conjugué anti-Ig de souris. Le titre viral a ensuite été déterminé par la formule de Reed-Muench :

$$TCID_{50} = 10^{\text{Dilution avec ECP} > 50\% + (\% \text{ positifs} > 50\%) - 50\% / (\% \text{ positifs} > 50\%) - (\% \text{ positifs} < 50\%)}$$

### **2.2.3 Infection des porcelets**

Le virus a été inoculé par voie intratrachéale, sous sédation à l'acépromazine/kétamine, en utilisant un laryngoscope. Chaque porcelet a reçu une dose virale totale de 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> diluée dans 8 mL de milieu de culture sans sérum. Trois animaux ont été euthanasiés après 7 jours et 3 autres après 14 jours. Chez chacun de ces porcelets, du sérum et les poumons ont été prélevés afin d'effectuées les analyses histopathologiques, sérologiques et virologiques. Les deux porcelets servant de contrôles négatifs ont reçu du milieu de culture exempt de virus.

### **2.2.4 Examens histologiques**

Des échantillons de tissu pulmonaire ont été prélevés chez tous les animaux euthanasiés. Les prélèvements ont été effectués préférentiellement au niveau des lésions

macroscopiques lorsque celles-ci étaient apparentes. Les tissus ont tout d'abord été fixés, pendant une semaine, dans une solution composée de 10% de formaline dans du PBS. Par la suite, les tissus étaient déshydratés dans des bains d'éthanol dont la concentration augmentait progressivement de 70% à 100%. Après avoir imprégné les tissus de toluène, benzène ou xylène (soit des solvants de la paraffine), ces derniers étaient finalement enrobés dans de la paraffine. Des coupes de 5µm ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microtome et elles ont été déparaffinées dans deux bains successifs, de 5 min, de xylène. Les tissus ont, par la suite, été réhydratés progressivement à l'aide de bains d'éthanol d'une concentration allant de 100% à 70% avant d'être traités à l'eau courante. Ils ont finalement été colorés à l'hématoxyline-éosine (H&E) selon un protocole de routine (Dea et al., 1991).

### **2.2.5 Détection et isolement du virus**

Des essais d'isolement du virus à partir des poumons et des sérums ont été réalisés sur des feuillets de cellules MARC-145 et la présence du virus dans ces échantillons fut aussi suivie par des tests de RT-PCR. Pour les essais d'isolement du virus sur les cellules MARC-145, la technique était similaire à celle décrite dans la section 2.1.1. Pour les réactions RT-PCR, la technique utilisée était similaire à celle décrite dans les sections 2.1.2, 2.1.4 et 2.1.5, à la seule différence que les amorces utilisées étaient plutôt dirigées contre l'ORF7 codant pour la protéine N (amorce sens 1008 PS : 5' TAA ATA TGC CAA ATA ACA AC- 3' et amorce antisens 1009 PR : 5' TAG GTG ACT TAG AGG CAC- 3').

### **2.2.6 Analyses sérologiques**

#### **2.2.6.1 Immunofluorescence indirecte**

Des plateaux de 96 puits de cellules MARC-145 ont tout d'abord été infectés avec le virus IAF-Klop. Dès l'apparition d'ECP, les plateaux ont été fixés à l'acétone/méthanol (1:1) pendant 30 min à 4°C. Des dilution sérielles (1/16 à 1/1024) des sérums prélevés

chez les porcelets ont été faites dans du PBS et un volume final de 100  $\mu$ L/puits fut déposé sur ces plaques. Le tout était incubé pendant 45 min à 37°C. Les puits étaient ensuite lavés cinq fois avec du PBS, puis le conjugué était ajouté. Ce conjugué, spécifique aux immunoglobulines (Ig) porcines, consistait en une préparation d'Ig purifiées de chèvre anti-Ig porcin marquées à l'isothiocyanate de florescéine (FITC; Boehringer Mannheim) et était préalablement dilué 1/50 dans du PBS et distribué à raison de 60  $\mu$ L/puits. Après une période d'incubation de 30 min à 37°C, les puits étaient lavés cinq fois au PBS puis deux fois à l'eau distillée. La fluorescence était observée à l'aide d'un microscope inversé (Leica DM IRB) sous rayonnement UV.

#### **2.2.6.2 ELISA HerdChek de IDEXX**

Ce test consiste en une épreuve ELISA indirecte (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) commerciale pour le diagnostic sérologique de l'infection par le VSRRP qui tient compte du bruit de fond qui peut être occasionné par la présence de protéines des cellules MARC-145 dans les préparations de virus ayant servi à l'enrobage des plateaux ou dans les différents vaccins faits de virus inactivé ou atténué ayant été inoculés aux animaux. Les Ag adsorbés au fond du plateau sont donc, en alternance, des Ag cellulaires (NHC) provenant d'un lysat de cellules MARC-145 et des Ag cellulaires et viraux (PRRS) provenant d'un lysat de cellules MARC-145 infectées par le VSRRP auquel un supplément de protéine N recombinante est ajouté. Ainsi, ce test peut détecter les Ac dirigés contre toutes les protéines du VSRRP, mais il est particulièrement sensible aux Ac dirigés contre la protéine de la nucléocapside. Les manipulations ont été faites selon les recommandations du manufacturier. Ainsi, tous les témoins et échantillons ont été distribués parallèlement dans les puits NHC et PRRS. Sur la microplaque, on retrouvait, en duplicata, 100  $\mu$ L/puits du témoin négatif (donc 2 puits NHC et 2 puits PRRS), puis il en était de même avec le témoin positif. Ensuite, les sérums de porcs infectés préalablement dilués 1/40 dans du PBS étaient aussi distribués à raison de 100  $\mu$ L dans les puits NHC et PRRS. Après une période d'incubation de 30 min à température ambiante, les microplaques étaient lavées 5 fois avec la solution de lavage tamponnée au phosphate. Par la suite, 100  $\mu$ L/puits du conjugué anti-Ig porcin marqué à la peroxydase

de raifort (HRPO) étaient ajoutés à chacun des puits et les microplaques étaient réincubées 30 min à température ambiante. Après avoir lavé les microplaques 5 fois avec la solution de lavage tamponnée au phosphate, la solution de substrat préparée pendant l'incubation (5,5 mL de concentré de TMB + 5,5 mL de diluant de TMB) était distribuée à raison de 100 µL/puits. Après une incubation finale de 15 min à la température de la pièce, la réaction enzymatique était interrompue en ajoutant 100 µL/puits de la solution d'arrêt (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La densité optique (DO) de chacun des puits était finalement déterminée à une longueur d'onde de 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Titerteck Multiskan MCC/340; Flow Laboratories). Le test est considéré comme positif lorsque la valeur obtenue selon la formule suivante est supérieure à 0,4 :

$$E/P = (DO \text{ PRRS}) - (DO \text{ NHC}) / (CP \text{ PRRS}) - (CP \text{ NHC})$$

DO PRRS = densité optique de l'échantillon dans les puits avec le virus du PRRS

DO NHC = densité optique du même échantillon dans les puits NHC

CP PRRS = valeur moyenne du contrôle positif dans les puits avec le virus PRRS

CP NHC = valeur moyenne du contrôle positif dans les puits NHC

### 2.2.6.3 Séroneutralisation (SN)

Tous les sérums ont été au moins testés en duplicata et ils ont tout d'abord été décomplémentés en les chauffant à 56°C pendant 1h. Ensuite, 100 µL de chacun des sérums ont été dilués en série, de 1/8 à 1/1024, dans du milieu DMEM supplémenté de 0,2% de pénicilline/streptomycine et 2% d'HEPES pour être ensuite mis en contact, pendant 1h à 37°C en présence de 200 TCID<sub>50</sub> (dans 100 µL ) de virus IAF-Klop dilué dans du DMEM supplémenté de 0,2% de pénicilline/streptomycine, 2% d'HEPES et 10% de SFB. Par la suite, les mélanges ont été mis en contact en duplicata sur des feuillets confluents de cellules MARC-145 préparées dans des plaques de 96 puits (Costar). Après une période d'incubation de 5 jours à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, les titres en SN étaient exprimés comme étant la réciproque de la dilution la plus grande du sérum testé pouvant neutraliser l'effet cytopathique causé par 200 TCID<sub>50</sub> de virus.

## **2.3 Vaccination avec virus inactivé**

### **2.3.1 Animaux**

Dix porcelets hybrides F1 castrés (Landrace x Yorkshire), exempts de pathogènes spécifiques (SPF) et âgés de 4-5 semaines, ont été obtenus d'une ferme du sud du Québec, Canada. Avant la livraison, les porcelets ont été testés et prouvés séronégatifs pour le VSRRP, l'EMCV, le PPV, le HEV, le virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV) et pour *Mycoplasma hyopneumoniae*. Les porcelets ont été divisés en un groupe contrôle d'animaux non vaccinés (3 porcelets) et en un groupe d'animaux vaccinés (7 porcelets).

### **2.3.2 Virus inactivé et vaccination**

La souche IAF-Klop du VSRRP a été propagée en infectant des cellules MARC-145 à une faible multiplicité d'infection (MOI) (MOI = 0,01-0,05). Le virus a été récolté lorsque 80% des cellules démontrèrent des signes de dégénérescence. Le virus a été inactivé suite au traitement avec l'éthylenimine binaire (BEI). Pour ce faire, nous avons tout d'abord préparé une solution de NaOH 0,175 M à laquelle nous avons ajoutée 0,1 M de 2-bromoéthylamine (BEA). Après une incubation d'une heure à 37°C, pendant laquelle le BEA a été transformé en BEI, une solution faite de 3% de BEI et de 97% de virus ( $10^6$  particules virales/mL) a été préparée. Cette solution a été incubée avec agitation pendant 24 h à une température de 26°C, puis nous y avons ajoutée du thiosulfate de sodium 1M jusqu'à obtention d'une concentration finale de 0,01M afin d'inactiver le BEI. Finalement, nous avons procédé au titrage de cette préparation virale (voir section 2.2.2.1) afin de vérifier l'inactivation des virus. Un adjuvant breveté, commercialisé par la compagnie Vetrpharm Inc. (London, Ontario, Canada) a été ajouté à la préparation virale. Le titre viral, estimé d'après les titres avant inactivation, était de  $10^{7.1}$  TCID<sub>50</sub> par dose de vaccin (2 mL dans du milieu de culture). Les 7 porcelets vaccinés ont reçus 2 doses de virus inactivé par voie intramusculaire à trois semaines d'intervalle, alors que les porcelets non vaccinés n'ont reçu que du milieu de culture.

### **2.3.3 Virus et infection-défi**

La souche IAF-Klop du VSRRP a été utilisée pour l'infection-défi. Le virus a tout d'abord été passé à trois reprises sur les cellules PAMs (voir section 2.2.2). Ensuite, sa virulence a été accrue par deux passages successifs chez des porcelets, exempts de pathogènes spécifiques, âgés de trois à cinq semaines. Le premier passage a été réalisé par inoculation intratrachéale de 10 mL de suspension virale obtenue lors des passages sur PAMs, alors que le second passage a été fait en inoculant, par voie intratrachéale à l'aide d'un laryngoscope, 10 mL d'une dilution de 5% d'un homogénat de poumons des porcelets ayant été inoculés avec le virus propagé sur les PAMs.

Vingt et un jours après la dernière dose vaccinale, tous les porcs ont reçu, par voie intratrachéale à l'aide d'un laryngoscope, 10 mL d'homogénat de poumons du deuxième passage chez des porcelets. La dose de virus totale inoculée à chaque animal était d'environ  $10^7$  TCID<sub>50</sub> (pour titrage, voir section 2.2.2.1). Des prises de sang ont été faites chez tous les animaux à tous les 7 jours à partir du moment de la vaccination. Tous les animaux ont été euthanasiés au jour 63, soit 14 jours après l'infection-défi. À ce moment, les poumons de ces animaux ont été prélevés afin de déterminer la présence, ou l'absence, de lésions macroscopiques et microscopiques, de même que la présence de virus.

### **2.3.4 Examens histologiques**

Idem section 2.2.4

### **2.3.5 Détection et isolement du virus**

Idem section 2.2.5

### **2.3.6 Analyses sérologiques**

Pour IFI, ELISA HerdCheck de IDEXX et séroneutralisation : voir section 2.2.6

### 2.3.6.1 Immunobuvardage de type Western (WB)

Du virus IAF-Klop concentré par ultracentrifugation sur coussin de saccharose 30% a été resuspendu dans un tampon dénaturant et réducteur 5X de Laemmli (62,5 mM tris-HCl [pH 6,8], 20% glycérol, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0,025% de bleu de bromophénol) pour un volume total de 200 $\mu$ L. Parallèlement, 8  $\mu$ L d'un marqueur de poids moléculaire de type « Rainbow » (Amersham Pharmacia Biotech) a été resuspendu dans 22  $\mu$ L du même tampon dénaturant et réducteur 5X. Après avoir été bouillis pendant 5 min, ils ont été déposés dans les puits d'un grand gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) d'une épaisseur de 0,75 mm. Ce gel a été préparé entre deux plaques de verre et en deux temps; soit la préparation du gel de séparation et, en second lieu, la préparation du gel de concentration ou de reroupage. Le gel de séparation, contenant 12% de polyacrylamide, était composé de 6,6 mL d'eau, de 8 mL d'une solution d'acrylamide/Bis (30% T, 2,67% C), de 5 mL de 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, de 200  $\mu$ L de SDS 10%, de 200  $\mu$ L de persulfate d'ammonium (APS) 10% et de 8  $\mu$ L de TEMED. Lorsque ce premier gel était polymérisé, un peigne (Bio-rad), constitué d'un puit pour la marqueur de poids moléculaire et d'un seul autre grand puit pour l'échantillon de virus à analyser, a été inséré entre les deux plaques de verre. Ensuite, un gel de concentration, contenant 4% de polyacrylamide et composé de 2,7 mL d'eau, de 670  $\mu$ L de solution d'acrylamide/Bis, de 500  $\mu$ L de 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, de 40  $\mu$ L de SDS 10%, de 40  $\mu$ L d'APS 10% et de 4  $\mu$ L de TEMED était coulé par dessus le premier et le peigne y était inséré. Par la suite, l'électrophorèse était effectuée dans un tampon de migration composé de 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS. La migration était réalisée en appliquant une tension de 200 V à l'aide d'un générateur de courant (EPS 600; Pharmacia).

Le transfert des protéines migrées sur le gel sur une membrane de nitrocellulose a été fait en utilisant le système « Trans-Blot® Electrophoretic Transfer cell » (Bio-rad). Du coté négatif du support, les éléments suivants ont été superposés l'un par dessus l'autre après avoir été préalablement saturés de tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol) : une membrane poreuse, un papier filtre no 3 (Whatmann), le gel, une

membrane de nitrocellulose, un papier filtre no 3 et une membrane poreuse. Le support a ensuite été fixé verticalement dans le bac d'électrophorèse contenant du tampon de transfert. Le transfert a été fait pendant 2 h sous une tension de 60 V générée par un générateur de courant (EPS 600; Pharmacia).

Après le transfert, la membrane a été bloquée pendant 2 h à température ambiante sous agitation dans un tampon de blocage consistant en du TBS, supplémenté de 5% de blotto, 5% de sérum de chèvre et 0,05% de Tween 20. La membrane a ensuite été découpée verticalement en plusieurs languettes. Par la suite, ces languettes ont été incubées, pendant 1h30 à température pièce sous agitation, en présence des différents sérums de porc à tester dilués 1/100 dans le tampon de blocage. Après avoir été lavées à 3 reprises avec le tampon de lavage (TBS + 0,05% Tween 20), les languettes ont été incubées pendant 1h30 à température de la pièce sous agitation en présence d'un sérum conjugué, consistant en une préparation purifiée d'Ig de chèvre anti-IgG de porc couplées à la peroxydase de raifort (HRP), diluée 1/1000 dans du tampon de blocage. Après trois lavages dans le tampon de lavage et deux autres avec du TBS seul; la réaction immune fut révélée en incubant les languettes dans une solution de révélation composée d'une base de 80% de TBS à laquelle avait été ajoutée 20% de méthanol, 0,06% de chloro-1-naphtol et 0,3 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les membranes ont été incubées jusqu'à l'apparition de bandes pourpres puis la réaction fut stoppée en lavant les languettes dans une solution de TBS-EDTA 20 mM, pH 8,0.

## **2.4 Immunisation avec ORF5 recombinants**

### **2.4.1 Gène ORF5 synthétique (ORF5-SYN)**

Le gène ORF5 du VSRRP a été modifié dans le laboratoire du docteur Serge Dea de façon à ce que l'ARNm soit traduit de façon optimale. Certains codons de l'ARNm généré par le gène ORF5 de type sauvage (ORF5-WT) ont été remplacés par les codons, codant pour les mêmes acides aminés, les plus souvent utilisés chez les cellules de

mammifères. Le gène obtenu fut désigné ORF5 synthétique (ORF5-SYN) (déposé pour brevet).

#### **2.4.2 Vecteurs adénovirus recombinants**

Des adénovirus humains recombinants (hAdVreCs) portant les gènes de l'ORF5-WT et de l'ORF5-SYN ont été utilisés afin d'immuniser les porcelets. Ces vecteurs ont été construits dans le laboratoire du Dr Serge Dea et les techniques réalisées pour les obtenir sont décrites dans la thèse de doctorat du Dr Carl A. Gagnon (Gagnon, 2000). Le vecteur viral dans lequel ont été insérés les transgènes est un hAdV non-répliquatif dont les régions E1 et E3 du génome ont été délétées. Ces gènes ont été placés sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline (TR5) dans un système dicistronique, entraînant ainsi la co-transcription de la GFPq simultanément à celle du gène d'intérêt. Le codon d'initiation de la transcription de ces gènes était aussi précédé par un triple motif GCC mimant la séquence de Kozak nécessaire pour le bon positionnement des ribosomes et pour permettre une traduction efficace (Kozak, 1987). Ces vecteurs, qui ont été désignés hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq ont été propagés sur des feuillettes de cellules 293 (ATCC CRL-1573) qui complètent la région délétée en E1 et permettent ainsi la répllication efficace du virus recombinant. Le milieu de culture pour cette lignée cellulaire était le milieu DMEM supplémenté avec 5% de SVF, 1% de glutamine, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% d'HEPES. Les titres infectieux de ces virus recombinants ont été déterminés en utilisant la technique de plages sur des monocouches de cellules 293.

#### **2.4.3 Vérification de l'expression de l'ORF5**

L'expression des gènes clonés dans les hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq était dépendante de l'expression d'un transactivateur régulé par la tétracycline (tTA). Ainsi, ces gènes pouvaient être exprimés, soit lors de l'infection par les AdreCs de la lignée cellulaire 293 rtTA en présence de 1 µg/mL de doxycycline dans le

milieu de culture, ce qui permet d'induire la synthèse du tTA cellulaire; soit en faisant une co-infection avec l'hAdVrec hAdCMV/tTA qui exprime le tTA de façon constitutive.

#### **2.4.3.1 GFP et Immunofluorescence indirecte**

Deux plaques de 24 puits de cellules MARC-145 à confluence ont tout d'abord été co-infectées avec l'un des deux hAdVreCs (ORF5-WT et ORF5-SYN) à une MOI de 100 PFU par cellule et avec l'hAdVrec hAdCMV/tTA à une MOI de 500. Après une incubation de 24 h, la première plaque fut fixée à l'acétone/méthanol (1 :1) pendant 30 min à 4°C. alors que la deuxième plaque fut fixée après 48 h. Avant la fixation des plaques, le niveau de GFP a été évalué au microscope inversé sous un rayonnement UV. Les plaques ont ensuite été soumises à l'IFI selon le protocole décrit à la section 2.1.1.2, sauf qu'un sérum de lapin monospécifique anti-ORF5 fut utilisé, de même qu'un conjugué IgG (fragment F(ab')<sub>2</sub>) reconnaissant spécifiquement les Ac de lapin (Boehringer Mannheim) et marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

#### **2.4.3.2 Marquage et immunoprécipitation des protéines recombinantes**

Des cellules 293rtTA ont été mises en culture dans des flacons F25 (Corning). Ces cultures cellulaires ont été infectées avec les hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq en présence de doxycycline. Pour ce faire, les cellules ont été lavées à deux reprises avec du PBS stérile, puis le virus recombinant, à une MOI de 1 et dilué dans un volume total de 2 mL de milieu de culture sans SFB, mais supplémenté de 1µg/mL de doxycycline, a été mis en contact avec les cellules. Les flacons de cellules ont alors été incubés pour la nuit à 37°C sous une légère agitation. Le lendemain matin, 2 mL de milieu de culture complet supplémenté de 1µg/mL de SFB a été ajouté au surnageant infectieux et les cellules ont été réincubées à 37°C pour 24 h. Les témoins négatifs consistaient en des cellules n'ayant reçu que du surnageant sans virus, alors que le témoin positif consistait en des cellules MARC-145 infectées par le virus IAF-Klop.

Ensuite, pour le marquage radioactif, ces différents feuillets cellulaires ont été lavés 2 fois avec du PBS stérile et ont été recouverts avec 3mL de milieu de culture sans méthionine. Après une heure d'incubation à 37°C, 250 µCi de [<sup>35</sup>S]méthionine (ICN) ont été ajoutés à chaque F25 qui ont par la suite été réincubés pour une période de 5 h. Les cellules ont été récoltées à l'aide d'un policeman (Starstedt) et elles ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 10 min (Centrifugeuse RT 6000D et rotor H-1000B; Sorvall). Le culot a ensuite été resuspendu dans 1 mL de tampon de lyse (voir section 2.4.3.2.2) et le tout a été passé à la seringue avec une aiguille 22G (Becton Dickinson) une dizaine de fois. Après une centrifugation de 3 min à 13 000 rpm (centrifugeuse Biofuge Fresco; Mandel Scientific), le surnageant a été récolté. Quarante µL de ce surnageant ont été dilués dans 8 mL de liquide à scintillation (Cytoscint; ICN Radiochemicals) et le comptage de la radioactivité a été déterminé à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman LB-7000).

Ensuite,  $1 \times 10^7$  coups par minute (cpm) de chaque échantillon ont été mis en contact, toute la nuit à 4°C sous légère agitation, avec 20 µL de sérum de lapin monospécifique anti-ORF5. Le lendemain, 70 µL de protéine A-sépharose CL4B (Pharmacia) (100 µg/mL dans 20mM tris-HCl [pH 7,5]) ont été ajoutés à chaque tube et l'incubation s'est poursuivie pendant 2 h. Après avoir rejeté le surnageant suite à une centrifugation de 2 min à 13 000 rpm, le culot a été lavé 4 fois avec le tampon I (20 mM tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl et 0,1% NP-40), puis 2 fois avec le tampon II (20 mM tris-HCl [pH 7,5] et 0,1% NP-40). Le culot a par la suite été resuspendu dans 80 µL de tampon dénaturant et réducteur 5x et a été chauffé à 100°C pendant 5 min avant d'être recentrifugé. Dix µL du surnageant (ou 30µL dans un cas) ont ensuite été déposés dans un puits d'un petit gel SDS-PAGE 12% d'une épaisseur de 0,75 mm. La description de la méthodologie pour la réalisation d'un grand gel de 12% polyacrylamide-SDS et de la technique d'électrophorèse se trouve à la section 2.3.6.1. Pour ce petit gel, il suffit de réduire par 4 fois la quantité des réactifs utilisés. Un marqueur de poids moléculaire composé de protéines marquées au <sup>14</sup>C (Amersham Life Science) a également été traité en condition dénaturante et réductrice avant d'être incorporé parallèlement dans un autre puits du même gel. Après l'électrophorèse, le gel a été fixé pendant 30 min avec agitation à la température de la pièce dans une solution composée de 50% eau bi-distillée, 40%

méthanol et 10% acide acétique. Le gel a ensuite été incubé pendant 30 min avec agitation à la température de la pièce dans une solution amplifiant le signal radioactif (Amplify; Pharmacia). Le gel a par la suite été séché sur un papier filtre no 3 (Whatmann) et sous une membrane de plastique transparente utilisant un séchoir à gels « Model 583 Gel Dryer » (Bio-rad) combiné à une « Hydrotech Vacuum Pump » (Biorad) pendant une heure à 80°C. Après une période d'exposition de 5 jours à -80°C, le film a été développé dans une chambre noire en l'incubant pendant 5 min dans une solution de développement (GBX Developer and replenisher; Kodak). Après avoir été rincé à l'eau pendant 30 secondes, le gel a ensuite été fixé dans une solution de fixation (GBX Fixer and replenisher; Kodak) pendant 5-10 min. Le film a ensuite été bien rincé à l'eau puis séché. Une analyse densitométrique a été faite sur les films afin de comparer l'intensité des bandes de la GP<sub>5</sub> WT et SYN de façon à estimer la différence dans le niveau d'expression de la GP<sub>5</sub> selon l'hAdVrec utilisé. Cette analyse a été effectuée à l'aide d'un densitomètre (Biorad, modèle GS-670) et du programme informatique (Molecular Analyst version 1.3; Biorad).

#### **2.4.4 Animaux**

Neuf porcelets hybrides F1 castrés (Landrace x Yorkshire), exempts de pathogènes spécifiques (SPF) et âgés de 4-5 semaines, ont été obtenus d'une ferme d'élevage du sud du Québec, Canada. Avant la livraison, les porcelets ont été testés afin de confirmer leur statut de séronégatifs pour les virus VSRRP, EMCV, PPV, HEV, et le virus de la gastroentérite transmissible du porc (TGEV) et pour *Mycoplasma hyopneumoniae*. Les porcelets ont été divisés en un groupe contrôle et en deux groupes expérimentaux (3 porcelets par groupe).

#### **2.4.5 Protocole d'immunisations**

Chacun des groupes de trois porcelets a été immunisé par voie intradermique au niveau de la surface dorsale de l'oreille à l'aide d'une aiguille 30G 1/2 (Becton Dickinson) avec l'une des trois préparations suivantes : 1)  $1 \times 10^9$  pfu d'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et

5 x 10<sup>9</sup> pfu d'hAdCMV/tTA dilués dans un volume total de 100 µL de PBS par porc; 2) 1 x 10<sup>9</sup> pfu d'hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq et 5 x 10<sup>9</sup> pfu d'hAdCMV/tTA dilués dans un volume total de 100 µL de PBS par porc; 3) Les porcs témoins négatifs ont reçu 5 x 10<sup>9</sup> pfu d'hAdCMV/tTA dilués dans un volume total de 100 µL de PBS par porc. À la préparation inoculée pour chaque porcelet, 100 µL de SP1017 ont été ajoutés, soit une combinaison de poloxamères facilitant la transfection et l'expression des gènes, ce qui donnait un volume final de 200 µL pour chaque animal. Un rappel a été donné à chaque animal au jour 33 suivant l'inoculation initiale.

#### **2.4.6 Virus et infection-défi**

Trente jours après la dose de rappel, les animaux ont été soumis à une infection-défi avec le virus IAF-Klop. Le virus utilisé a été préparé et titré de la façon décrite dans les sections 2.2.2 et 2.2.2.1. Le virus a été inoculé, à chaque animal, par voie intranasale, sous sédation à l'acépromazine/kétamine, en utilisant un tube de caoutchouc introduit dans les narines des porcelets. Chaque animal a reçu une dose virale de 10<sup>5,5</sup> TCID<sub>50</sub> diluée dans un volume de 8 mL de milieu de culture. Du sérum a été prélevé aux deux semaines avant le rappel, puis 2 semaines après le rappel et finalement au dixième et au 24<sup>ème</sup> jour suivant l'infection-défi. La dernière prise de sang coïncidait avec l'euthanasie des animaux. À ce moment, des échantillons de poumons ont été prélevés pour permettre leurs examens histologiques.

#### **2.4.7 Examens histologiques**

Idem section 2.2.4

#### **2.4.8 Analyses sérologiques**

Pour l'IFI, l'ELISA commerciale HerdCheck de IDEXX et les test de séroneutralisation : voir section 2.2.6. Pour le WB, la technique utilisée fut identique à celle décrite à la section 2.3.6.1 à quelques détails près. Premièrement, il s'agissait d'un petit gel et non

d'un grand gel, donc la quantité de virus utilisé pour l'électrophorèse était de 50  $\mu$ L de virus IAF-Klop purifié dilué dans 50  $\mu$ L du tampon réducteur et dénaturant. Aussi, les sérums de porcs qui ont été testés en WB ont été dilués par un facteur de seulement 1/25.

#### 2.4.8.1 ÉLISA anti-N

L'ORF7 de la souche IAF-Klop du VSRRP, codant pour la protéine N avait préalablement été clonée dans le plasmide pGEX-4T1 et des stocks de la protéine de fusion recombinante glutathione *S*-transférase-N (GST-N) avaient été produits (Mardassi et al., 1996). Pour l'ELISA, 100  $\mu$ L/puits (0,5  $\mu$ g/puits) de GST-N de la dilution 1/1000 de la préparation initiale dans le tampon 100 mM carbonate-bicarbonate de sodium (pH 9,6) ont été distribués dans des plaques de 96 puits à fond plat (Flow Laboratories). Après une incubation de 18 h à 4°C, les plateaux avec antigène ont été rincés 3 fois avec du PBS contenant 0,05% de Tween 80 (PBS-T) puis ils ont été saturés, pendant 2 h à 37°C, avec du PBS contenant 0,5% de Tween 80 et 5% de sérum de chèvre (PBS-TG). Les sérums récoltés chez les porcs immunisés ont ensuite été dilués 1/40 dans du PBS-TG et distribués à raison de 100  $\mu$ L/puits dans les plateaux. Après une période d'incubation de 45 min à 37°C, les plateaux ont été lavés 5 fois au PBS-T, puis le conjugué anti-IgG de porc marqué à la peroxydase de Raifort (Boehringer Mannheim) dilué 1/10 000 dans PBS-TG a été ajouté à chaque puits (100  $\mu$ L/puits). La plaque a ensuite été incubée à 37°C pendant 45 min puis, lavée 3 fois avec du PBS-T et 2 fois avec du PBS. Ensuite, des quantités égales de tampon TMB et de tampon substrat ont été mélangées et distribuées à raison de 100  $\mu$ L par puits. La base de ces 2 tampons était constituée de tampon citrate (0,05 M d'acide citrique anhydre et 0,05M de citrate de sodium dibasique anhydre). Ainsi, le tampon TMB consistait en une solution de 0,02% de TMB et 25% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) dans du tampon citrate, alors que le tampon substrat consistait en une solution 0,1% de peroxyde d'urée dans du tampon citrate. Après une incubation de 20 min à température pièce et à l'obscurité, la réaction fut arrêtée par l'ajout de 50  $\mu$ L/puits d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 N et la densité optique du milieu fut mesurée à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Titerteck Multiskan MCC/340; Flow Laboratories).

## **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

### **3.1 Étude du tropisme du VSRRP**

#### **3.1.1 Sélection des souches et isolats de VSRRP**

Parmi les différents échantillons, fournis par le service de diagnostic virologique de l'INRS-Institut-Armand-Frappier, ayant été présentés en tant qu'isolats du VSRRP incapables de se propager sur les cellules MARC-145, plusieurs ont pu être adaptés sur ces cellules après deux passages sur les PAMs ou directement sur les MARC-145. Finalement, trois des isolats fournis par le service de diagnostic, ont été sélectionnés pour leur capacité à croître efficacement sur les PAMs tout en étant incapables de se propager sur les cellules MARC-145 en culture. Ces isolats ont été identifiés par les numéros 481, 528 et 537. Une souche québécoise connue du VSRRP, ayant les mêmes caractéristiques au niveau du tropisme, a également été utilisée comme souche de référence de VSRRP à tropisme restreint aux PAMs. Cette souche, connue sous le nom d'IAF-Exp91, représente en fait la première souche du VSRRP à avoir été isolée au Canada (Dea et al., 1992) et il semble selon la littérature qu'elle est la seule souche du génogroupe nord-américain à avoir été référée comme ayant ce tropisme restreint aux cellules PAMs. En effet, tous les autres isolats nord-américains, ayant été comparés par d'autres auteurs entre eux ou à la souche de référence européenne LV ont pu être propagés sur l'une des lignées cellulaires de reins de singe mentionnées dans la revue de la littérature.

Les souches IAF-Klop et ATCC VR-2332 du VSRRP, qui sont respectivement les souches de référence canadienne et américaine, ont également été utilisées. En tant que souches de VSRRP ayant la capacité de se propager sur les cellules MARC-145 et sur les PAMs, elles ont servi de références lors des analyses de séquences afin d'identifier des changements d'acides aminés spécifiques et communs aux isolats ayant apparemment un tropisme restreint au PAMs.

### **3.1.2 Amplification des ORF4 et ORF5 des divers isolats par RT-PCR**

Afin de pouvoir procéder au séquençage des ORF4 et 5 des isolats cliniques et des isolats utilisés à titre de références, l'ARN génomique des différents isolats a été extrait à partir des cellules PAMs et/ou MARC-145 infectées par ces derniers. À partir de ces préparations d'ARN génomique, des fragments d'ADN englobant entièrement leur ORF4 ou leur ORF5 ont été amplifiés par RT-PCR. Les amplicons obtenus et contenant l'ORF4 pour tous les isolats testés avaient une longueur de 683 pb, alors que les ORF4 seuls n'étaient constitués que de 537 pb. Les amplicons contenant l'ORF4 correspondaient à un fragment d'ADN qui débutait 70 pb avant le codon d'initiation de la traduction (ATG) et se terminait 77 pb en aval du codon de terminaison (TGA). Dans le cas de l'ORF5, qui est d'une longueur de 603 pb, les amplicons avaient une longueur de 716 pb dans le cas de tous les isolats étudiés, contenant 29 nucléotides en amont et 84 nucléotides en aval de l'ORF5. La figure 5 représente le profil électrophorétique typique des produits d'amplification, ou amplicons, obtenus par RT-PCR, contenant les ORF4 et ORF5 des différents isolats du VSRRP. Tel que prévu, la longueur du produit d'amplification de l'ORF5 dépassait légèrement celle du produit d'amplification de l'ORF4.

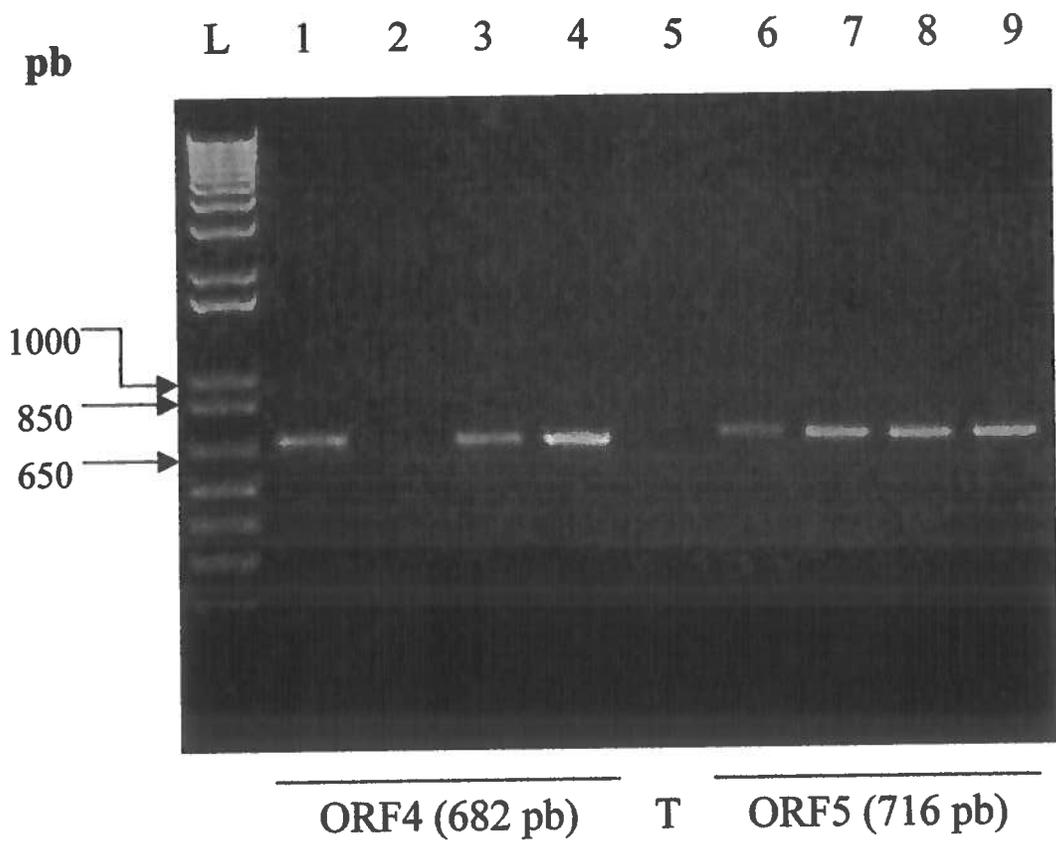
### **3.1.3 Comparaison des séquences en acides aminés**

Les produits d'amplification obtenus par RT-PCR, et présentés dans la section précédente, ont ensuite été purifiés, concentrés et dosés avant d'être finalement séquencés. Cette étape a permis de déterminer les séquences nucléotidiques des ORF4 et ORF5 de chaque isolat. À partir de celles-ci, à l'aide du programme informatique GeneWorks 2.5 (Intelligenetics), il a été possible de déduire la séquence en aa des GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> de chaque isolat et souches d'intérêts. À partir de ces séquences, des tentatives ont été faites afin d'identifier des aa, ou des régions, où il était possible de retrouver des mutations communes et uniques aux souches ne pouvant se propager que sur les cellules PAMs.

**Figure 5 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose des produits d'amplification des régions d'ARN génomique englobant l'ORF4 et l'ORF5 du VSRRP.**

L'ARN génomique des différents isolats de VSRRP a été extrait par la technique à l'isothiocyanate de guanidine. Ensuite, des amplicons englobant entièrement l'ORF4 et l'ORF5 ont été obtenus par RT-PCR en utilisant des amorces s'hybridant en amont et en aval de ces gènes. 10 µL de chacun des produits d'amplification obtenus ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose 1% et la migration a été effectuée sous une tension de 110 V pendant environ 40 min. Le témoin négatif (T), situé dans le puits 5, contient les deux paires d'amorces (ORF4 et ORF5) et l'ARN y a été remplacé par de l'eau. Dans les puits 1 à 4, les amorces spécifiques à l'ORF4 (ORF4.GEN.S et ORF4.GEN.AS) ont été utilisées, alors que celles spécifiques à l'ORF5 (ORF5.GEN.S et ORF5.GEN.AS) ont été utilisées dans les puits 6 à 9.

L = marqueurs étalon de fragments d'ADN en pb (1 Kb DNA Ladder).



### 3.1.3.1 ORF4

Les séquences entières, en aa, déduites pour la GP<sub>4</sub> des différents virus analysés, sont présentées à la figure 6. La longueur des séquences obtenues était la même dans tous les cas, soit 178 aa. En comparant les isolats à tropisme restreint aux PAMs avec les souches IAF-Klop et ATCC VR-2332, il fut possible d'identifier 2 régions où existaient divers changements d'aa uniques aux isolats ne pouvant croître que sur les cellules PAMs. Ces régions ont été retrouvées au niveau des aa 40-43 et 55-63 et elles ont été mises en évidence dans la figure 7. En utilisant le profil d'hydrophobicité généré à l'aide du programme GeneWorks 2.5 (Intelligenetics) à partir de la séquence en aa du virus IAF-Klop, la région 40-43 s'est avérée correspondre à une portion hydrophobe de la protéine, alors que la région 55-63 se trouvait dans une portion hydrophile.

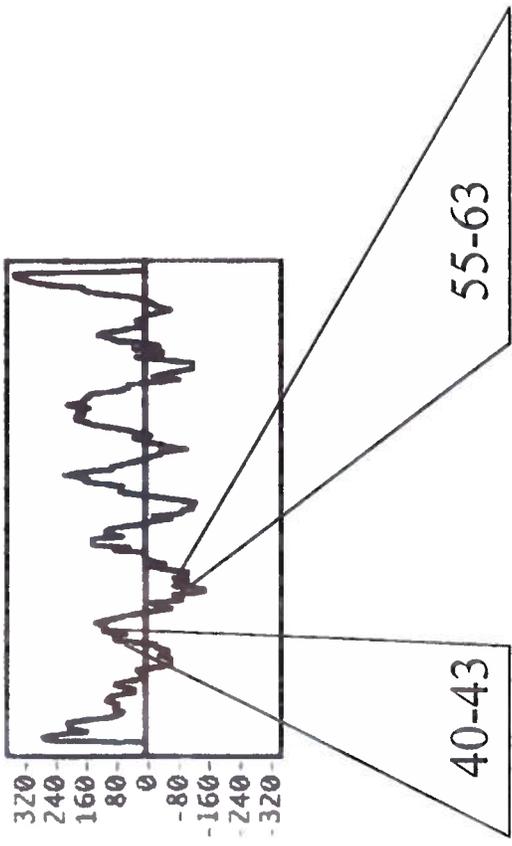
Dans la région déterminée par les aa 40-43, aucun changement d'aa commun à tous les isolats n'a pu être identifié. À la position 40, un changement ponctuel d'un aa fut identifié pour l'isolat 528 (une glycine plutôt qu'une thréonine ou une alanine) par rapport à IAF-Klop et ATCC VR-2332. Un autre changement a été identifié en position 42 de l'isolat 481; il s'agissait de la présence d'une sérine à la place d'une alanine. Toutefois, la modification peptidique partagée par le plus d'isolats a été retrouvée en position 43 où pour 3 des 4 isolats testés (481, 537 et IAF-Exp91) une glycine fut identifiée plutôt qu'une sérine.

La région des aa 55-63 a, quant à elle, présenté un nombre de changements d'aa uniques aux souches à tropisme restreint pour les PAMs beaucoup plus important que la région précédente. En effet, selon les résultats de séquençage, les isolats étudiés démontraient dans cette région 3 (537 et IAF-Exp91) ou 5 (481 et 528) changements d'aa par rapport aux souches de VSRRP pouvant aussi être propagées sur les lignées de cellules de rein de singe. Également, il fut noté qu'en position 56, les glycine et arginine, retrouvés respectivement chez les souches IAF-Klop et ATCC VR-2332, ont été remplacés chez toutes les souches étudiées par une sérine.

**Figure 6 : Séquences en aa des GP<sub>4</sub> de divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs, par rapport à celles des souches de référence nord-américaines IAF-Klop et ATCC-VR2332, déduites à partir des séquences nucléotidiques déterminées pour les ORF4 amplifiés par RT-PCR.**

IAF-K1op	.....R.....	.....E.....T	..SSV.....	50
ATCC VR-2332	..S.....V..K.....	.....A.....	..S.A.....	50
481	.....F.....	.....G.....	..SG.A.....V	50
528	.....R.....	.....E.....	..SSV.....	50
537	.....	.....	..G.A.....	50
IAF-EXP91	.....	.....	..G.V.....	50
Consensus	MAASLLFLV GFECLLVSQA FACKPCFSSS	LSDIKTNTTA AA.F.VLQDI		50
IAF-K1op	.....GY.S..T.....	.....A.....	.....	100
ATCC VR-2332	.....RD.A.....	.....V..I.....	.....	100
481	.....Y.D.PH P.....SR.....	.....	.....	100
528	.....NPS. A.F.....	..L...A... I.....	.....	100
537	.....H.S..F.....	.....S.....	.....	100
IAF-EXP91	.....H.P..T.....	.....	.....	100
Consensus	SCLRHS.S.S EAIRKIPQCR TAIGTPVYIT	VTANVTDENY LHSSDLLMLS		100
IAF-K1op	.....	.....S.....	.....I....	150
ATCC VR-2332	.....V.....	.....	.....D.....	150
481	.....	.....	.....	150
528	.....	.....	.....	150
537	.....F.....	..V.....	.....	150
IAF-EXP91	.....	.....	.....	150
Consensus	SCLFYASEMS EKGFKVIFGN VSGIVAVCVN	FTSYVQHVK E FTQRSLVVDH		150
IAF-K1op	.....	.....	.....	178
ATCC VR-2332	.....	.....	.....	178
481	.....	.....	.....	178
528	.....I.....	.....	.....	178
537	.....	.....	.....	178
IAF-EXP91	.....	.....	.....	178
Consensus	VRLLFHMTPE TMRWATVLAC LFAILLAI			178

**Figure 7 : Mise en évidence de deux régions des séquences en aa des GP<sub>4</sub> où des changements d'aa uniques aux divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs ont été identifiés et positionnement de ces régions sur un profil d'hydrophobicité généré à partir de la séquence en aa de l'isolat de référence IAF-Klop.**



Klop  
 VR-2332

	TAA S	HGY SSS ETI
	AAA S	HRD SAS EAI

481	AAS G	YSD SPH PAI
528	GAA S	HSN PSS AAF
537	AAA G	HSH SSS EAF
Exp91	AAA G	HSH SPS ETI

### 3.1.3.2 ORF5

Les séquences entières en aa, déduites pour la GP<sub>5</sub> des différents virus analysés, sont présentées à la figure 8. Dans tous les cas, la longueur en aa de la GP<sub>5</sub> était de 200 aa. En comparant les isolats dont le tropisme était restreint pour les PAMs aux souches IAF-Klop et ATCC VR-2332, il fut possible d'identifier un site où il y avait un changement d'aa unique et commun à l'ensemble des isolats, ainsi qu'une région où se localisaient des changements d'aa uniques, mais différents selon les isolats (figure 9). En utilisant le profil d'hydrophobicité généré à l'aide du programme GeneWorks 2.5 (Intelligenetics) à partir de la séquence en aa du virus IAF-Klop, il fut déterminé que le premier site correspondait au résidu d'aa localisé en position 10, se retrouvant dans une portion hydrophobe de la protéine, alors que la région représentée par les résidus d'aa 25 à 40 correspondait plutôt à une portion hydrophile.

Ainsi, à la position 10, dans tous les cas cliniques étudiés, la cystéine retrouvée chez les souches de référence était remplacée par une tyrosine. Dans le cas de la région 25-40, plusieurs changements d'aa uniques furent déterminés selon un profil spécifique à chaque isolat clinique étudié. En effet, le nombre de variations uniques par rapport aux souches de référence était différent d'un isolat à l'autre. Ainsi, un seul changement d'aa fut déterminé dans le cas de l'isolat 537, alors que 3, 4 et 6 changements de résidus d'aa furent identifiés respectivement dans le cas des isolats IAF-Exp91, 528 et 481.

### 3.2 Infection expérimentale

Lors de cette expérience visant à étudier une infection typique par le VSRRP, des porcelets ont été infectés, par la voie intratrachéale, avec la souche de référence canadienne IAF-Klop à raison de  $10^7$  TCID<sub>50</sub> par animal. Les porcelets ont par la suite été euthanasiés aux jours 7 et 14 et des analyses histologiques, sérologiques et virologiques ont été effectuées sur les poumons et le sérum de ces animaux.

**Figure 8 : Séquences en aa des GP<sub>5</sub> de divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs, par rapport à celles des souches de référence nord-américaines IAF-Klop et ATCC-VR2332, déduites à partir des séquences nucléotidiques déterminées pour les ORF5 amplifiés par RT-PCR.**

IAF-K1op  
 ATCC VR-2332  
 481  
 528  
 537  
 IAF-EXP91  
 Consensus

.....C.....  
 ..E.....C..R.LS.....V.A..ND.....L.....  
 .....LV.....DNN.F.....L.....  
 .....R.....V.....NSN...FH S.....  
 .....L.....NS.....  
 .....V.....NSY.....  
 MLGKCLTAGY CSQLPFLWCI VPCFCAALVN AS..SSHLQ LIYNLTICEL

50  
 50  
 50  
 50  
 50  
 50  
 50

IAF-K1op  
 ATCC VR-2332  
 481  
 528  
 537  
 IAF-EXP91  
 Consensus

.....NKN.....  
 .....AN...S.....A.....  
 .....KE..A.....  
 .....E..GQH. G. I.....A.....  
 .....NN.....  
 .....NG.....  
 NGTDWL..KF DWAVETFVIF PVLTHIVSYG ALTTSHFLDT VGLITVSTAG

100  
 100  
 100  
 100  
 100  
 100  
 100

IAF-K1op  
 ATCC VR-2332  
 481  
 528  
 537  
 IAF-EXP91  
 Consensus

..Y.....V.....  
 FV.....I.....T.....FA.....A.....S.....  
 .Y.....I.....V.....  
 .Y.S.F...G V.....V.....S.....  
 .F.....V.....  
 .L.....I.....  
 Y.HGRYVLSS .YAVCALAAL ICFVIRLTKN CMSWRYSCTR YTNFLLDTKG

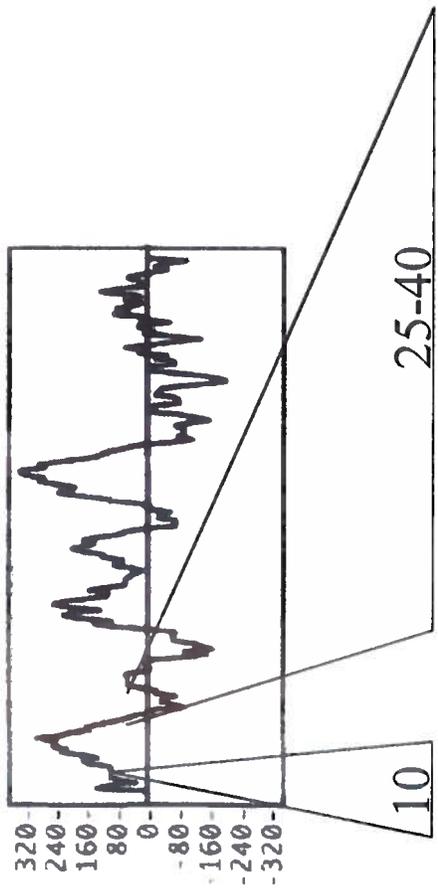
150  
 150  
 150  
 150  
 150  
 150

IAF-K1op  
 ATCC VR-2332  
 481  
 528  
 537  
 IAF-EXP91  
 Consensus

.....D.....C.....  
 R.....R.....E.....V...I. R.....G.....  
 .....S...Q.....G.....P.....R.....A.....  
 .....N.....L.....D.....  
 .....D.G.....I.....G.....  
 .....E.....C.....  
 KLYRWRSPI IEKGGKVEV. GHLIDLKRVV LDGSAATPVT KVSAEQW.RP

200  
 200  
 200  
 200  
 200  
 200

**Figure 9 : Mise en évidence de deux régions des séquences en aa des GP<sub>5</sub> où des changements d'aa uniques aux divers isolats du VSRRP ne pouvant être propagés que sur les cellules PAMs ont été identifiés et positionnement de ces régions sur un profil d'hydrophobicité généré à partir de la séquence en aa de l'isolat de référence IAF-Klop.**



Klop C FAA LVN ASS SSS SQL Q  
 VR-2332 C FAV LANASN DSS SHL Q

481 Y LVA LVN ASD NNS FHL Q  
 528 Y FAV LVN ANS NSS SHF H  
 537 Y LAA LVN ASN SSS SHL Q  
 Exp91 Y FVA LVN ANS YSS SHL Q

### **3.2.1 Histologie**

Afin de confirmer la présence de lésions compatibles avec un diagnostic de SRRP chez les animaux infectés expérimentalement, des coupes histologiques ont été préparées pour la mise en évidence de lésions microscopiques sur les tissus pulmonaires. Ces tissus ont été fixés à la formaline puis enrobés de paraffine, avant que des coupes minces ne soient préparées au microtome et fixées sur lames pour la coloration à l'hématoxyline et éosine (H & E). L'infection par le VSRRP a induit, chez tous les porcelets, des lésions de pneumonie interstitielle proliférative caractérisées par des infiltrations des septa alvéolaires, périvasculaires et péribranchiolaires par des cellules lymphomonocytaires observées lors de l'infection par ce virus (figure 10). Une légère pneumonie interstitielle, ainsi qu'une hyperplasie légère des pneumocytes de type II au niveau des épithéliums bronchiolaires et vacuolaires, ont été observées au jour 7 pi. Au jour 14 pi, la pneumonie était devenue plus sévère.

### **3.2.2 Analyses sérologiques**

Des analyses ont été effectuées sur les sérums provenant des porcelets infectés afin de confirmer l'infection par le virus et afin de vérifier l'ampleur de la réponse immunitaire humorale. Les résultats des divers examens sérologiques qui ont été réalisés sur les sérums prélevés chez les animaux euthanasiés aux jours 0, 7 et 14 sont regroupés dans le tableau 3.

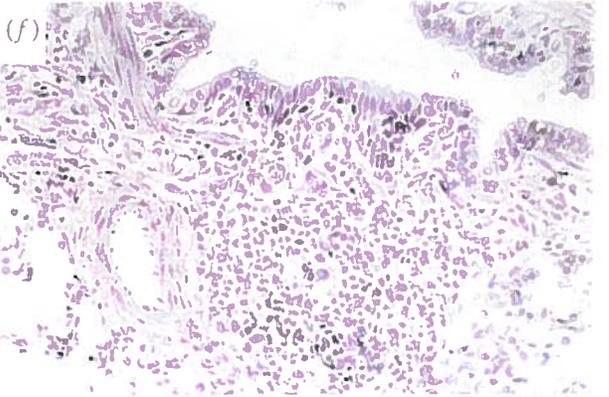
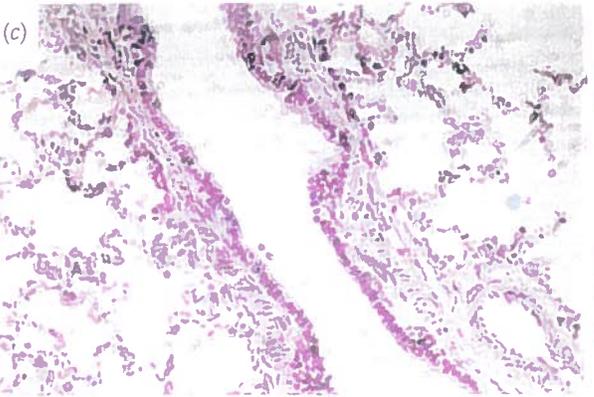
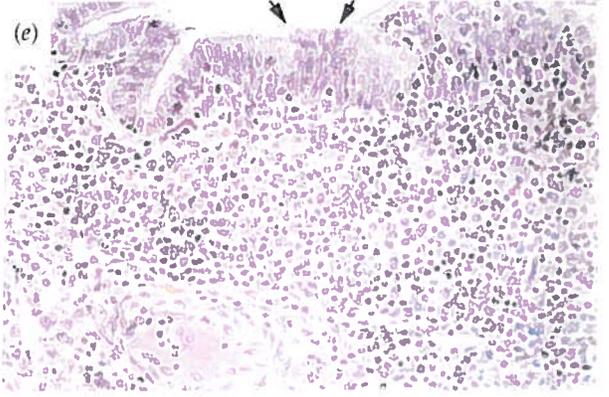
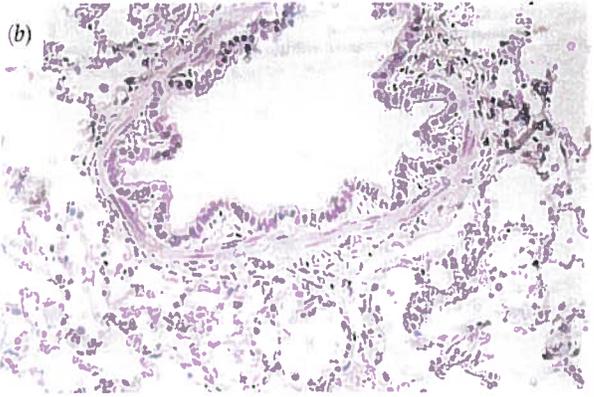
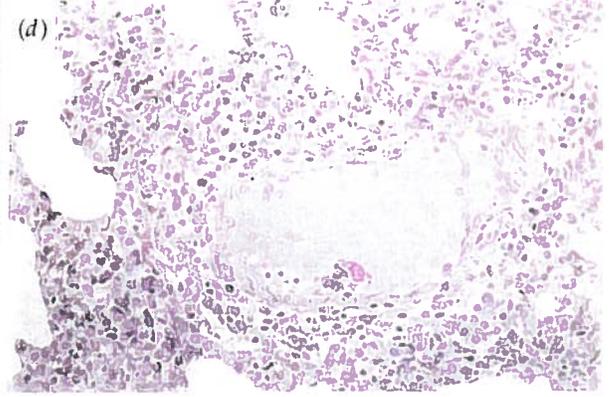
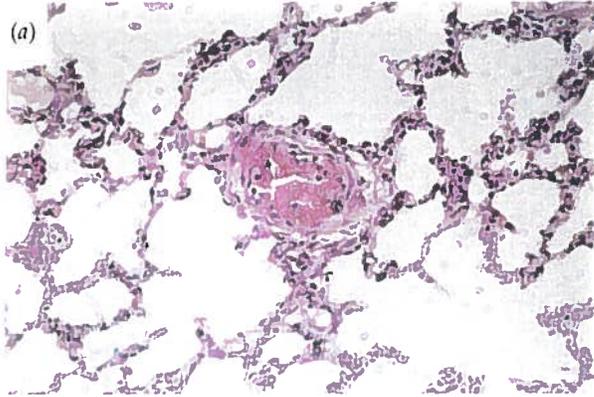
#### **3.2.2.1 Immunofluorescence indirecte**

L'IFI est un test permettant la détection d'Ac anti-VSRRP (IgG et IgM), dirigés contre des épitopes conformationnels, dans les sérums récoltés chez les porcelets infectés. Dès le jour 7 pi, tous les porcelets infectés ont démontré une séroconversion. En effet, les titres obtenus en analysant les sérums des trois porcelets se situaient entre les valeurs 64

**Figure 10 : Photos comparatives de coupes histologiques de poumons de porcelets contrôles (a-c) versus celles de porcelets infectés par le VSRRP (d-f) colorées par H & E (Tiré de Girard et al., 2001; voir appendice A)**

- a) Aspect spongiforme du poumon d'un porcelet normal montrant des septa alvéolaires minces et bien définis avec un aspect normal des petits vaisseaux sanguins.
- b) Aspect général d'une bronchiole normale avec épithélium cuboïdal et absence d'infiltration lymphomonocytaire de la muscularis mucosa et absence de pneumonie interstitielle.
- c) Aspect normal d'une bronchiole terminale (coupe longitudinale) avec absence de pneumonie interstitielle.
- d) Infiltration lymphomonocytaire périvasculaire massive. Les septa alvéolaires sont également épaissis par le même type d'infiltration.
- e) Infiltration lymphomonocytaire marquée au niveau péribronchiolaire et hyperplasie de l'épithélium bronchiolaire (flèche).
- f) Coupe longitudinale d'une bronchiole terminale montrant une infiltration lymphomonocytaire péribronchiolaire.

Grossissement, x 100 (a) et x 250 (b-f)



et 256. Sept jours plus tard, ce test a permis de détecter des titres en Ac anti-VSRRP qui ont atteint la valeur de 1024 dans tous les cas soit une augmentation d'un facteur de 4 et plus, confirmant la séroconversion.

### **3.2.2.2 ELISA Herdcheck de IDEXX**

Ce test permet également de détecter les Ac dirigés contre des épitopes conformationnels du VSRRP. Il est particulièrement sensible aux Ac dirigés contre la protéine de la nucléocapside. Les résultats de ce tests sont exprimés sous forme du rapport E/P (voir section 2.2.6.2) et sont considérés positifs seulement lorsque ce ratio est supérieur à une valeur de 0,4. Le ratio E/P des trois sérums de porcelets récoltés au jour 7 pi s'est révélé inférieur à 0,4, donc négatif, avec des valeurs variant de 0,136 à 0,257. Cependant, au jour 14 pi, tous les sérums récoltés se sont avérés positifs avec des ratios E/P de l'ordre de 0,853 à 1,204.

### **3.2.2.3 Séroneutralisation**

Ce test permet de détecter, dans les sérums, la présence d'Ac ayant la capacité de neutraliser l'infection des cellules par le VSRRP. Les titres en Ac neutralisants étaient exprimés selon la réciproque de la dilution optimale du sérum pouvant empêcher l'infection (inhibition de l'ECP) des cellules MARC-145 par 200 TCID<sub>50</sub> de la souche IAF-Klop du VSRRP. Lors de l'infection expérimentale, aucun des animaux infectés n'a produit d'Ac neutralisants à des niveaux significatifs (ie > 1:8) au cours de la période de 14 jours suivant l'infection par le VSRRP.

**Tableau 3. Analyses sérologiques effectuées sur les sérums prélevés, aux jours 0, 7 et 14, chez les porcelets infectés expérimentalement par la voie intratrachéale avec la souche IAF-Klop du VSRRP**

Jour	J0	J7	J14
Porc #	86 97	83 84 85	88 90 91
IFI <sup>1</sup>	<16 <16	64 64 256	1024 1024 1024
IDEXX +>0,4	0 0	0,136 0,257 -	0,939 1,204 +
SN <sup>2</sup>	<8 <8	<8 <8 <8	<8 <8 <8

<sup>1</sup> Les titres ont été exprimés selon la réciproque de la plus haute dilution du sérum où de la fluorescence spécifique a été observée chez les cellules infectées par le VSRRP.

<sup>2</sup> Les titres ont été exprimés selon la réciproque de la plus haute dilution du sérum pouvant inhiber l'ECP produit par 200 TCID<sub>50</sub> de la souche IAF-Klop du VSRRP sur des feuilletts de cellules MARC-145.

### **3.2.3 Détection et isolement du virus**

Le premier test à avoir été effectué fut le test de détection virale par RT-PCR en utilisant des amorces capables d'amplifier la protéine N du VSRRP. Ainsi, le virus du VSRRP a pu être détecté chez tous les animaux infectés et ce tant au niveau des poumons qu'au niveau sérique aux jours 7 et 14 pi. Afin de confirmer la présence de virus infectieux, des échantillons de poumons et de sérums prélevés chez les animaux euthanasiés ont été mis en culture sur des feuillets de cellules MARC-145 qui ont par la suite été examinés par le test d'IFI utilisant des Ac monoclonaux spécifiques à la protéine N du VSRRP. Le VSRRP a ainsi pu être isolé à partir de tous les échantillons provenant des animaux euthanasiés aux jours 7 et 14. Les échantillons prélevés chez les porcelets non infectés se sont révélés négatifs tant par RT-PCR que par la technique d'isolement sur cultures de cellules MARC-145.

### **3.3 Vaccination avec virus inactivé**

Les porcelets de cette expérience ont été divisés en deux groupes, soit les témoins ( $T_1$  à  $T_3$ ) et les vaccinés ( $V_1$  à  $V_7$ ). Les porcelets du groupe vacciné ont, à priori, reçu chacun deux doses, par voie intramusculaire, du vaccin correspondant à  $10^{7,1}$  TCID<sub>50</sub> de virus IAF-Klop inactivé au BEI. Ces doses ont été administrées à 21 jours d'intervalle. Un adjuvant breveté de la compagnie Vetrapharm Inc. avait été ajouté à la préparation de virus inactivé (une émulsion). Parallèlement, les porcs du groupe témoin n'ont reçu que du milieu de culture. Trois semaines après l'administration de la dernière dose vaccinale, tous les porcelets ont reçu, par voie intratrachéale, une préparation d'homogénat de poumons infectés par le virus IAF-Klop. La dose virale totale administrée à chaque animal a été estimée à  $10^{7,1}$  TCID<sub>50</sub>. Du sérum a été prélevé chez tous les animaux à tous les 7 jours à partir de l'inoculation de la première dose vaccinale et ce jusqu'au quatorzième jour suivant l'infection-défi, jour où les porcelets furent euthanasiés et leurs poumons prélevés afin d'y déceler la présence, ou l'absence, de lésions et de virus.

### **3.3.1 Histologie**

Les poumons de tous les animaux ont été prélevés lors de leur euthanasie au quatorzième jour suivant l'infection-défi et des coupes minces de ceux-ci ont été préparées, puis fixées sur lame et colorées par la coloration H&E afin de permettre leur analyse histologique. Les porcelets du groupe témoin, donc non vaccinés, ont présenté des lésions de pneumonie interstitielle sévères associées à une infiltration lymphomonocytaire des septa alvéolaires. Une accumulation de macrophages, de débris cellulaires et d'exudat inflammatoire a également été observée dans les alvéoles et dans la lumière des bronchioles. Ces lésions, typiques du VSRRP, sont visibles sur la figure 10 présentée dans le cadre de l'infection expérimentale. Les seuls changements qui ont été observés chez les porcelets du groupe vacciné sont une infiltration lymphomonocytaire moins sévère des septa alvéolaires. Les épithéliums alvéolaire et bronchiolaire des animaux de ce groupe sont demeurés intacts.

### **3.3.2 Analyses sérologiques**

Les diverses analyses sérologiques qui ont été effectuées sur les sérums récoltés chez les porcelets sont présentés dans le tableau 4 et dans la figure 11. Dans le tableau 4, les résultats des différents tests sont présentés en deux rangées : pré et J14. La première présente les résultats des tests effectués sur les sérums récoltés avant (pré) l'infection-défi. En effet, pour chacun de ces tests, les résultats obtenus entre l'inoculation de la première dose vaccinale et l'infection-défi étaient comparables. Dans la deuxième rangée (J14) sont présentés les résultats des tests effectués sur les sérums récoltés lors de l'euthanasie des animaux, soit 14 jours après l'infection-défi.

#### **3.3.2.1 Immunofluorescence indirecte**

Les analyses sérologiques qui ont été effectuées par IFI sur les sérums récoltés avant l'infection-défi (pré) n'ont pas permis de détecter des titres en Ac à des niveaux significatifs chez aucun les échantillons testés (tableau 4). Les résultats obtenus sur les

sérums des animaux vaccinés avec le virus inactivé ( $V_1$  à  $V_7$ ) étaient comparables à ceux qui ont été obtenus avec les sérums des animaux non vaccinés ( $T_1$  à  $T_3$ ). Les tests effectués sur les échantillons récoltés à J14 post infection-défi ont également mis en évidence le fait que les titres en Ac détectés chez les animaux des deux groupes (T et V) étaient encore une fois identiques; les titres variant, dans tous les cas, entre 1024 et 4096.

### **3.3.2.2 ELISA Herdcheck de IDEXX**

Tout comme dans le cas de l'IFI, les tests effectués sur les sérums récoltés avant l'infection-défi (pré) se sont révélés négatifs dans tous les cas (T et V) en utilisant la technique ELISA Herdcheck de IDEXX (Tableau 4). Les sérums des animaux non vaccinés qui ont été récoltés deux semaines après l'infection (J14;  $T_1$  à  $T_3$ ) ont tous démontré un ratio E/P supérieur à 0,4, donc étaient tous positifs. Ainsi, les valeurs obtenues, variant de 0,67 à 0,77, suggéraient la présence d'Ac dirigés contre des épitopes conformationnels du VSRRP chez ces échantillons. Toutefois, les analyses effectuées sur les sérums des animaux vaccinés ( $V_1$  à  $V_7$ ), ont révélé des valeurs de ratio E/P supérieures à celles des animaux témoins. En effet, les valeurs obtenues se situaient entre 1,06 et 2,09.

### **3.3.2.3 Séroneutralisation**

Des titres significatifs en Ac neutralisants n'ont pu être détectés chez aucun des échantillons prélevés préalablement à l'inoculation de virus infectieux (Tableau 4). Par contre, les sérums des porcelets non vaccinés ( $T_1$  à  $T_3$ ) prélevés deux semaines après l'infection-défi ont présenté des titres en Ac neutralisants variant de 8 à 128. De façon similaire, les analyses effectuées sur les sérums des animaux vaccinés ( $V_1$  à  $V_7$ ) récoltés au même moment (J14) ont révélé leur capacité à neutraliser l'infectivité du virus IAF-Klop. Les titres obtenus variaient de 64 à 256 selon les échantillons.

**Tableau 4 : Résumé des analyses sérologiques effectuées sur les sérums des porcelets vaccinés et non-vaccinés avec le virus IAF-Klop inactivé, avant l'infection-défi (Pré) et après celle-ci (J14)**

Porc <sup>1</sup>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>4</sub>	V <sub>5</sub>	V <sub>6</sub>	V <sub>7</sub>
IFI <sup>2</sup>	Pré	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	J14	1024	1024	4096	1024	1024	4096	4096	4096	1024
IDEXX	Pré	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	J14	0,70	0,67	0,77	1,61	1,13	1,64	1,06	1,13	1,22
SN <sup>3</sup>	Pré	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	J14	8	64	128	256	96	256	128	256	64

<sup>1</sup> T<sub>1</sub> à T<sub>3</sub> : porcelets non vaccinés et V<sub>1</sub> à V<sub>7</sub> : porcelets vaccinés

<sup>2</sup> Les titres ont été exprimés selon la réciproque de la plus haute dilution du sérum permettant la détection d'une fluorescence spécifique chez les cellules infectées par le VSRRP.

<sup>3</sup> Les titres ont été exprimés selon la réciproque de la plus haute dilution du sérum pouvant inhiber l'ECP produit par 200 TCID<sub>50</sub> de la souche IAF-Klop du VSRRP sur des feuillettes de cellules MARC-145.

### **3.3.2.4 Immunobuvardage de type Western**

Cette technique permet de démontrer la spécificité polypeptidique des Ac produits chez les animaux infectés ou vaccinés, mais ces Ac sont normalement dirigés contre des épitopes linéaires des protéines du VSRRP. Les analyses par WB effectuées sur les sérums récoltés préalablement à l'infection-défi se sont tous révélés négatifs chez les animaux non-vaccinés. Toutefois, les profils de WB obtenus pour les sérums prélevés le jour de l'inoculation de l'infection-défi chez les porcelets vaccinés ont démontré que 3 des 7 porcelets avaient développé des Ac réagissant contre la protéine N (V<sub>4</sub>, V<sub>5</sub>, et V<sub>6</sub>) et que cinq porcelets réagissaient contre la GP<sub>5</sub> (V<sub>1</sub>, V<sub>2</sub>, V<sub>4</sub>, V<sub>5</sub> et V<sub>7</sub>) (résultats non présentés). Les profils de WB des sérums récoltés le quatorzième jour suivant l'infection-défi sont présentés à la figure 11. Les sérums des porcelets non vaccinés (T<sub>1</sub> à T<sub>3</sub>), ont tous clairement réagi contre la protéine N et, dans une moindre mesure, contre la GP<sub>5</sub>. Toutefois, aucun d'entre eux ne semble avoir réagi contre la protéine M ou contre les différentes protéines structurales mineures que sont la GP<sub>2</sub>, la GP<sub>3</sub> et la GP<sub>4</sub>. Les sérums des animaux vaccinés (V<sub>1</sub> à V<sub>7</sub>) ont, quant à eux, réagit contre la protéine N de façon similaire ou supérieure aux sérums précédents. Par contre, leur réactivité anti-GP<sub>5</sub> s'est révélée beaucoup plus intense que celle des sérums des animaux non-vaccinés. Aussi, contrairement à ces derniers, quatre des sept sérums (V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub>, V<sub>6</sub> et V<sub>7</sub>) provenant de porcelets préalablement immunisés avec du VSRRP inactivé ont faiblement réagi contre la protéine M du VSRRP.

### **3.3.3 Détection et isolement du virus**

Les tests de détection et d'isolement du VSRRP ont été effectués sur les sérums et poumons récoltés deux semaines après l'infection-défi. La technique de RT-PCR a permis de détecter l'ARN du VSRRP dans le sérum et les poumons de deux des trois porcs non-vaccinés (T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub>) alors que les résultats pour T<sub>1</sub> étaient négatifs. Toutefois, les essais d'isolement sur les cultures de cellules MARC-145 ont permis de détecter le VSRRP dans les poumons de ce dernier porcelet, alors qu'elle n'a pas permis l'isolement du virus à partir du sérum de celui-ci. Cette technique n'a pas non plus permis d'isoler le

**Figure 11 : Profils d'immunobuvardage de type Western obtenus pour les sérums récoltés 14 jours après une infection-défi avec la souche IAF-Klop du VSRRP chez des porcelets vaccinés et non vaccinés avec le virus inactivé**

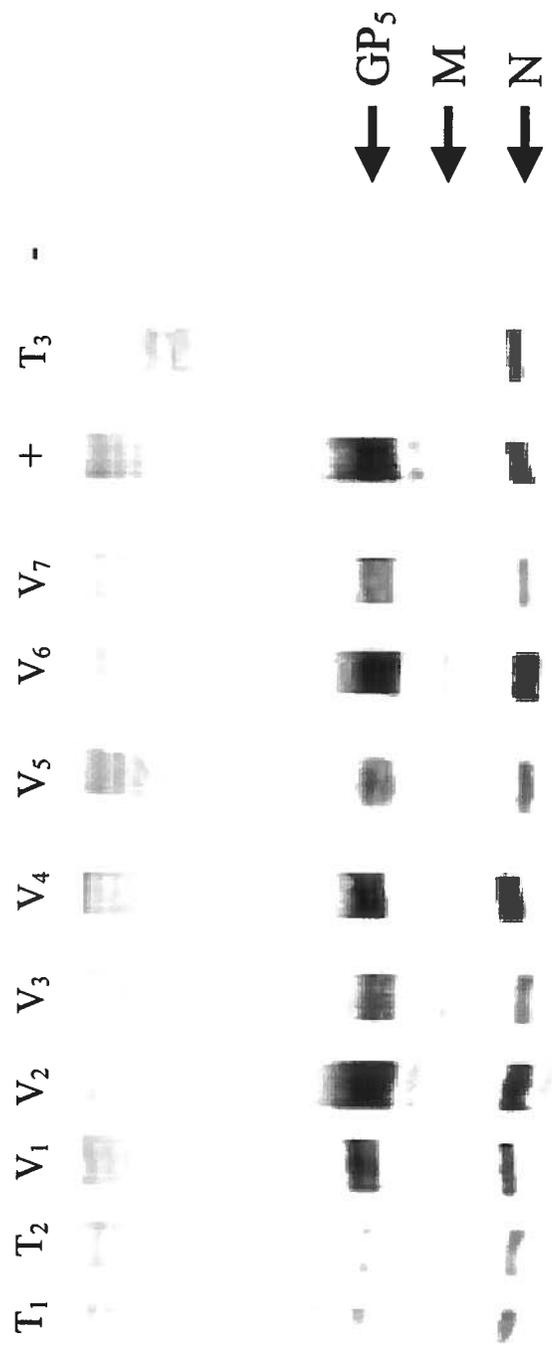
Les languettes de nitrocellulose ont été préparées avec les protéines natives de la souche IAF-Klop du VSRRP.

T<sub>1</sub> à T<sub>3</sub> : sérums des porcelets non vaccinés

V<sub>1</sub> à V<sub>7</sub> : sérums des porcelets vaccinés avec le virus IAF-Klop inactivé

+ : contrôle positif; sérum polyclonal de porc anti-VSRRP

- : contrôle négatif; sérum de porc normal



VSRRP à partir des poumons et sérums des porcelets T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub>. D'autre part, le génome du virus a pu être détecté, par RT-PCR, chez les trois porcelets non vaccinés. Finalement, le virus a pu être mis en évidence chez les trois porcs témoins par l'une des deux techniques pré-citées. Chez les porcelets vaccinés, il ne fut pas possible d'isoler le virus sur cultures cellulaires à partir du sérum ou des poumons des différents animaux. Toutefois, par RT-PCR, le virus a pu être détecté dans les poumons du porcelet V<sub>4</sub> ainsi que dans les poumons et le sérum du porcelet V<sub>3</sub>. Ainsi, du matériel viral a été détecté chez deux des sept porcelets vaccinés, et ce, quatorze jours après l'infection.

### **3.4 Immunisation avec ORF5 recombinants**

L'effet protecteur contre l'infection par le VSRRP, de la réponse immunitaire induite suite à l'immunisation génétique avec des adénovirus recombinants humains (hAdTR5/DC/GFPq) non-rélicatifs et inductibles par l'addition de tétracycline (doxycycline) dans le milieu de culture des cellules infectées fut étudiée. Ces hAdVrec étaient porteurs soit du gène ORF5 de type sauvage (ORF5-WT) de la souche IAF-Klop ou du gène ORF5 synthétique (ORF5-SYN), ie modifié tel que décrit à la section 2.4.1.

#### **3.4.1 Expression des protéines recombinantes**

Avant de procéder à l'immunisation des porcelets, il a fallu préalablement vérifier le niveau d'expression des gènes ORF5-WT et ORF5-SYN introduits dans le vecteur hAdVrec. Les hAdVrec utilisés comme vecteurs pour les gènes ORF5-WT et ORF5-SYN (hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq) étaient non-rélicatifs et inductibles. En effet, ces gènes, sous le contrôle d'un promoteur régulé par la tétracycline (TR5), ne pouvaient s'exprimer qu'en présence d'un transactivateur régulé par la tétracycline (tTA). Afin d'étudier l'expression des gènes, deux systèmes cellulaires furent utilisés: un système réplicatif consistant en des cellules 293 rtTA infectées en présence de doxycycline, un analogue de la tétracycline, et un système non réplicatif. Le système est dit réplicatif puisque les cellules de type 293 complètent la région E1 déléetée des hAdVrecs et il permet l'expression des inserts puisque la

doxycycline permet d'induire la synthèse du tTA cellulaire. L'autre système, non-répliatif, consistait en une co-infection avec un hAdVrecs exprimant le tTA de façon constitutive, soit l' hAdCMV/tTA. Il est également à noter que les gènes ORF5-WT et ORF5-SYN ont été insérés dans un système dicistronique entraînant ainsi la co-expression de la protéine GFPq (protéine donnant une fluorescence verte) simultanément à la GP<sub>5</sub>. Ainsi, le niveau de GFPq exprimé était proportionnel au niveau d'expression de la GP<sub>5</sub>.

#### **3.4.1.1 Expression de la GFP et IFI**

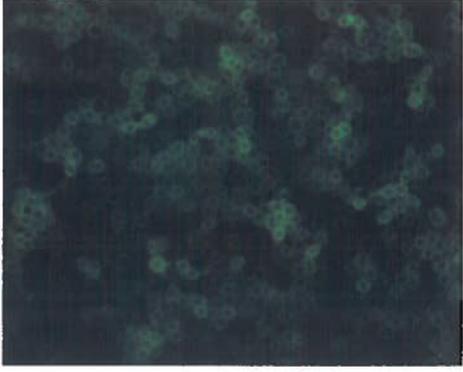
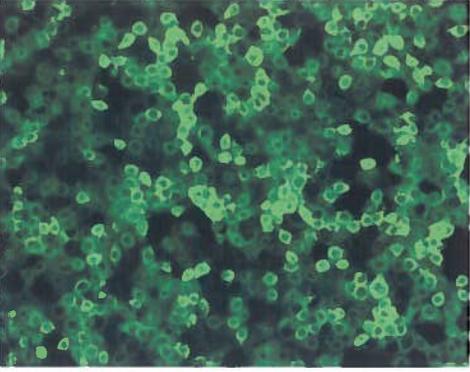
Des cellules MARC-145 ont été co-infectées avec les hAdVrecs portant les gènes ORF5-WT ou ORF5-SYN (MOI=100) et le virus-vecteur hAdCMV/tTA (MOI=500) afin de vérifier l'expression de la GP<sub>5</sub>. Les cultures cellulaires témoins n'ont été infectées qu'avec le virus-vecteur hAdCMV/tTA. Les cellules ont ensuite été fixées à 24 et 48 h pi, puis testées pour l'expression de la GP<sub>5</sub> par IFI en utilisant un sérum de lapin monospécifique anti-ORF5. La figure 12 démontre clairement que le niveau d'expression de la GP<sub>5</sub> était nettement plus élevé dans le cas des cellules infectées avec l'hAdVrec véhiculant le gène ORF5-SYN que dans le cas des cellules infectées avec l'hAdVrec véhiculant le gène ORF5-WT, et ce autant à 24 qu'à 48 h pi. Avant la fixation des cellules, l'expression de la GFP par les cellules infectées avec les deux types d'hAdVrecs avait été observée et les résultats obtenus étaient comparables à ceux démontrés dans la figure 12.

#### **3.4.1.2 Radioimmunoprécipitation (RIPA)**

Des expériences de RIPA ont également été réalisées afin de comparer le poids moléculaire des protéines recombinantes avec celui de la GP<sub>5</sub> du VSRRP ainsi que pour estimer quantitativement la différence entre les niveaux d'expression de la GP<sub>5</sub> obtenus avec l'hAdVrec exprimant le gène ORF5-WT et celui exprimant le gène ORF5-SYN. Des cellules 293 rtTA ont été infectées, en présence de doxycycline, à une MOI de 1, avec l'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et l'hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq.

**Figure 12 : Expression de la glycoprotéine GP<sub>5</sub> recombinante dans les cellules MARC-145 infectées par les hAdVreps exprimant le gène ORF5-WT ou ORF5-SYN**

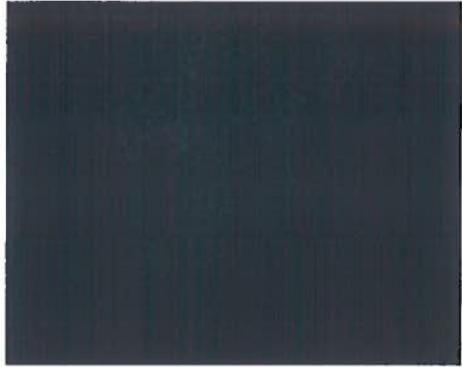
Les cellules MARC 145 ont été co-infectés soit avec l'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq (MOI=100) et l'hAdCMV/tTA (MOI= 500), soit avec l'hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq (MOI=100) et l'hAdCMV/tTA (MOI= 500). Les cellules témoins ont été infectés seulement avec l'hAdCMV/tTA (MOI=500). Les cellules ont été fixées à 24 et 48h pi et l'expression de la GP<sub>5</sub> a été confirmée par IFI utilisant un sérum de lapin monospécifique anti-ORF5 (souche IAF-Klop).



NYS



WT



T

48h

24h

Parallèlement, un témoin négatif consistant en des cellules 293 rtTA normales radiomarquées et cultivées en présence de doxycycline a été analysé de façon similaire, alors que des cellules MARC-145 ont été infectés par le VSRRP, souche IAF-Klop, afin de confirmer que le poids moléculaire des GP<sub>5</sub> recombinantes était bien le même que celui de la GP<sub>5</sub> native de la souche homologue du VSRRP. Ainsi, les protéines synthétisées dans les cellules infectées et non infectées ont été marquées radioactivement à la [S<sup>35</sup>]méthionine. Les cellules ont par la suite été récoltées, lysées tel que décrit à la section 2.4.3.2. Le dosage de la radioactivité dans les différents lysats cellulaires a été déterminé en cpm/ $\mu$ l à l'aide d'un compteur à scintillation (Beckman LB-7000). Par la suite, des aliquotes de chacun des lysats, avec des niveaux égaux de radioactivité, ont été incubés en présence de sérum de lapin monospécifique anti-ORF5, puis en présence de protéine A-sépharose CL4B. Les échantillons ont ensuite été lavés, puis analysés par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 13. Du côté gauche de cette figure sont illustrés les profils d'électrophorèse obtenus avec des aliquotes de 10  $\mu$ L des lysats non-dilués et clarifiés des cultures cellulaires infectées avec les vecteurs hAdVreCs porteurs des gènes ORF5-WT et ORF5-SYN. Ainsi, seule une bande très faible correspondant à la masse moléculaire de la GP<sub>5</sub> (24,5-26 kDa) native était visible dans le cas des lysats de cellules infectées avec l'hAdVrec vecteur du gène ORF5-WT, comparativement à une bande d'intensité supérieure observée au même niveau dans le cas des lysats de cellules infectées avec l'hAdVrec vecteur du gène ORF5-SYN. Une analyse densitométrique a révélé une aire sous la courbe relative (intensité et volume) de 0,15 pour la bande de la colonne WT et de 1,60 pour celle de la colonne SYN, soit une intensité environ 11 fois supérieure. Aucune bande ne fut observée à ce niveau dans le cas des cellules non-infectées, tandis que dans la colonne V, correspondant aux cellules MARC-145 infectées avec l'isolat IAF-Klop du VSRRP, une bande correspondant à la GP<sub>5</sub> (24,5-26 kDa) native était présente. Ainsi, les deux hAdVreCs ont permis l'expression de la GP<sub>5</sub>, mais l'hAdVrec vecteur du gène ORF5-SYN l'exprimait beaucoup plus fortement que celui du vecteur du gène ORF5-WT, confirmant ainsi les résultats obtenus par IFI. Afin de pouvoir faire une analyse densitométrique plus précise de l'intensité de l'expression de la GP<sub>5</sub> obtenue dans les différents cas, il était nécessaire pour permettre de bien mettre en évidence la différence d'intensité des bandes d'avoir au

préalable une bande plus intense dans le cas des lysats de cellules infectés avec le virus recombinant vecteur du gène ORF5-WT. Dans cette optique, un aliquote de 30  $\mu$ L de lysat des cellules exprimant le produit de l'ORF5-WT fut migré sur gel comparativement à des aliquotes de 10  $\mu$ L du lysat de cellules exprimant le produit de l'ORF5-SYN et 10  $\mu$ L du lysat des cultures cellulaires témoins (-), pour un ratio final de ORF5-WT : ORF5-SYN de 3 : 1. Les profils électrophorétiques obtenus se retrouvent à droite dans la figure 13. Sur cette illustration, il est possible de noter que, malgré le fait que trois fois plus de lysat des cellules infectées par le virus hAdV/ORF5-WT/DC/GFPq ait été utilisé, la bande correspondant à la GP<sub>5</sub>, quoique beaucoup plus intense que dans la cas où un lysat cellulaire non-dilué avait été analysé, demeurait beaucoup moins intense que la bande obtenue avec un aliquote 3 fois moindre du lysat des cellules infectées par le virus hAdV/ORF5-SYN/DC/GFPq. L'analyse densitométrique a révélé une aire sous la courbe relative (intensité et volume) de 0,31 pour la bande de la colonne WT et de 0,61 pour celle de la colonne SYN, soit une intensité deux fois supérieure. En tenant compte du fait qu'au départ il existait un ratio de 3 : 1 (WT : SYN) entre les deux échantillons, selon l'intensité des bandes apparentes, l'expression du gène ORF5-SYN s'est avérée au moins de six fois supérieure à celle du gène ORF5-WT.

### **3.4.2 Résultats suite à l'immunisation et à l'infection-défi**

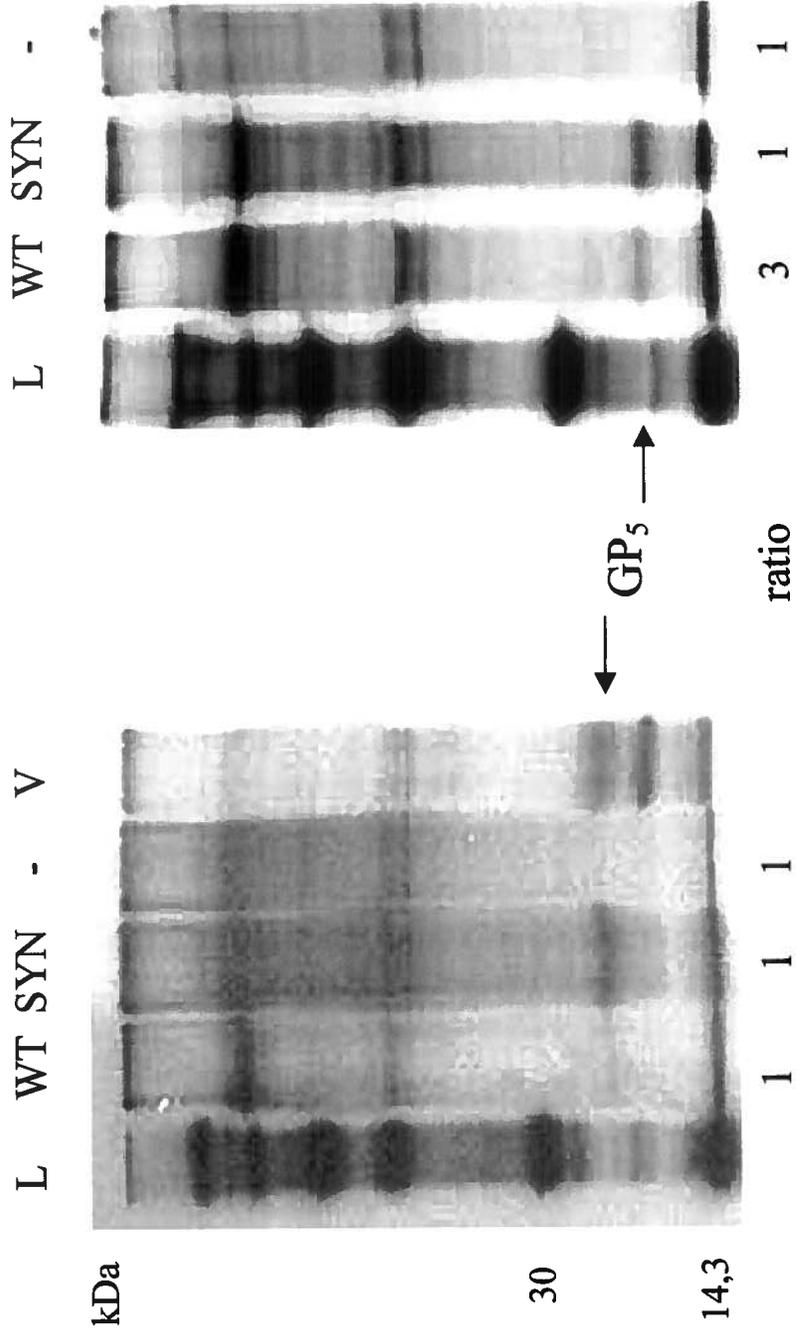
Avant l'immunisation, les porcelets ont été divisés en trois groupes distincts. Les animaux de chacun de ces groupes ont tous été immunisés par la voie intradermique. Les porcelets des deux premiers groupes ont été co-infectés avec l'hAdCMV/tTA et, soit l'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq, soit l'hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq et ce à un ratio de 5 : 1. Parallèlement, le dernier groupe n'a reçu que des doses d'hAdCMV/tTA identiques à celles qu'ont reçu les porcelets des groupes précédents. Dans tous les cas, un volume égal de SP1017 (Supratek Pharme Inc., Laval, Québec, Canada), un agent facilitant la transfection et l'expression des gènes, a été ajouté au volume injecté aux animaux. Trente-trois jours plus tard, une injection de rappel a été administrée à chaque animal. Un mois après le rappel, tous les porcelets ont reçu, par la voie intranasale, une dose de  $10^{5,5}$ TCID<sub>50</sub> de virus IAF-Klop. Des prises de sang ont été effectuées chez tous les

**Figure 13 : Profil de radioimmunoprécipitation de la glycoprotéine GP<sub>5</sub> exprimée dans les lysats de cellules 293 rTA infectées, en présence de doxycycline, avec les virus recombinants hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq ou hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq**

Les cellules 293 rTA ont été infectées, en présence de doxycycline, à raison d'une MOI de 1, puis les protéines synthétisées par les cellules infectées ont été radiomarquées à la [S<sup>35</sup>]méthionine. Les protéines ont été récupérées par immunoprécipitation en incubant les lysats cellulaires clarifiés en présence d'un sérum de lapin monospécifique anti-ORF5 et les complexes immuns ont été récoltés par adsorption sur des billes de protéine A-sépharose CL4B. Ils ont ensuite été analysés par SDS-PAGE et révélés par autoradiographie. Les témoins positifs (V) consistaient en des cellules MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop du VSRRP, alors que les contrôles négatifs consistaient en des cellules 293 rTA non-infectées.

L : marqueur de poids moléculaire

Ratio : quantité d'échantillon mis sur le gel en comparaison avec le témoin négatif (-)



animaux aux deux semaines suite à l'immunisation primaire, puis deux semaines après le rappel et finalement au dixième et au 24<sup>ème</sup> jour après l'infection-défi. Cette dernière prise de sang a coïncidé avec l'euthanasie des animaux où des échantillons pulmonaires ont été prélevés afin d'en permettre leurs analyses histologiques.

#### **3.4.2.1 Histologie**

Les analyses des coupes de poumons prélevés au 28<sup>ème</sup> jour suivant l'infection-défi puis colorées par la technique H & E n'ont pas permis de détecter de lésions ou d'altérations des tissus et ce, tant chez les animaux non-immunisés (témoins) que chez les animaux immunisés avec les plasmides recombinants ou les hAdVreCs.

#### **3.4.2.2 Analyses sérologiques**

Les diverses analyses sérologiques qui ont été effectuées sur les sérums récoltés chez les porcelets sont présentés dans le tableau 5 et dans la figure 14. Dans le tableau 5, les résultats des différents tests sont présentés en trois colonnes : pré, J10 et J28. La première présente les résultats des tests effectués sur les sérums récoltés avant (pré) l'infection-défi. En effet, pour chacun de ces tests, les résultats obtenus entre la première immunisation et l'infection-défi étaient comparables. Les résultats des tests effectués sur les sérums récoltés, respectivement, 10 et 28 jours après l'infection-défi sont présentés dans les deuxième et troisième colonnes (J10 et J28).

##### **3.4.2.2.1 Immunofluorescence indirecte**

Lors des immunisations avec les hAdVreCs, les analyses sur les différents sérums récoltés avant l'infection-défi ont révélé que tous les titres obtenus étaient non-significatifs (<16) (tableau 5). Toutefois, les titres obtenus suite à l'infection-défi se sont, eux, avérés significatifs. En effet, au dixième jour suivant l'infection-défi, les sérums du groupe de porcelets témoins avaient développé des titres en IFI variant de 64 à <512. Au même temps, les sérums des porcelets immunisés avec les hAdreCs ont présenté des titres d'IFI

inférieurs à ces derniers. Ceux ayant été injectés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq ont démontré des titres variant de 16 à <64, alors que les animaux ayant été injectés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq avaient des titres en Ac variant de 64 à <128. Toutefois, les sérums récoltés 28 jours après l'infection-défi chez les animaux des trois différents groupes ont tous présenté, en IFI, des titres en Ac supérieurs à 1024.

#### **3.4.2.2.2 ELISA Herdcheck de IDEXX**

Tous les sérums récoltés avant l'infection-défi, et testés par ELISA Herdcheck de IDEXX, ont démontré des ratio E/P égal à 0, donc ne démontrant aucune réactivité contre le VSRRP. Toutefois, dix jours après l'inoculation de la souche IAF-Klop du VSRRP aux animaux, tous sont devenus séropositifs exhibant des ratio E/P positifs, donc supérieurs à 0,4. Ainsi, les sérums des porcelets du groupe témoin (tTA) ont montré des rapports E/P variant de 0,49 à 1,05. Parallèlement, dans le cas des animaux immunisés, avant l'infection-défi, avec les vecteurs hAdVreco véhiculant le gène ORF5-WT ou ORF5-SYN, des ratio respectifs de 0,48 à 0,73 et 0,67 à 1,24 ont été calculés. Finalement, les ratios E/P mesurés sur les sérums récoltés 28 jours après l'infection-défi se sont révélés similaires chez tous les porcelets, peu importe le groupe choisi. En effet, les sérums des animaux des trois groupes présentaient des valeurs de ratio supérieures à ceux obtenus 10 jours après l'infection-défi; les valeurs à J28 se situant entre 1,21 et 1,53.

#### **3.4.2.2.3 ELISA anti-N**

Puisque les ratios E/P obtenus lors de l'ELISA Herdcheck de IDEXX se sont révélés comparables pour les différents groupes de porcelets aux jours 10 et 28 suivant l'infection-défi, et étant donné que ce test est reconnu comme étant particulièrement sensible aux Ac dirigés contre la protéine N du VSRRP, les sérums de tous les animaux ont tous été testés par ELISA utilisant la protéine N recombinante comme antigène.

**Tableau 5 : Résultats des analyses sérologiques effectuées, avant et après l'infection-défi, sur les sérums des porcelets ayant été pré-immunisés avec l'hAdCMV/tTA seul, ou simultanément avec l'hAdCMV/tTA et l'hAdTRS/ORF5-WT/DC/GFPq ou avec l'hAdCMV/tTA et l'hAdTRS/ORF5-SYN/DC/GFPq**

	IFI <sup>1</sup>			IDEXX						ELISA anti-N <sup>2</sup>				SN <sup>3</sup>			
	Pré	J10	J28	Pré	J10	J28	Pré	J10	J28	Pré	J10	J28	Pré	J10	J28	Pré	J10
tTA	<16	64	1024	0	0,49	1,24	-	+++	+++	+++	+++	+++	<8	<8	<8	<8	16
tTA	<16	>256	<512	0	1,05	1,40	-	+++	+++	+++	+++	+++	<8	<8	<8	<8	<8
tTA	<16	256	1024	0	0,77	1,48	-	+++	+++	+++	+++	+++	<8	<8	<8	<8	12
tTA	<16	>16	<64	0	0,61	1,28	-	++	++	++	++	++	<8	<8	<8	<8	<8
+ WT	<16	>16	<64	0	0,73	1,51	-	++	++	++	++	++	<8	<8	<8	<8	8
tTA	<16	16	1024	0	0,48	1,27	-	+	+	+	+	+	<8	<8	<8	<8	16
tTA	<16	128	1024	0	1,24	1,44	-	++	++	++	++	++	<8	<8	<8	<8	256
+ SYN	<16	>64	<128	0	0,67	1,21	-	+	+	+	+	+	<8	<8	<8	<8	128
tTA	<16	64	1024	0	0,70	1,53	-	+	+	+	+	+	<8	<8	<8	<8	256

<sup>1</sup> Les titres en Ac ont été exprimés selon la réciproque de la plus haute dilution du sérum où la fluorescence spécifique a été observée chez les cellules infectées par le VSRRP.

<sup>2</sup> + = 0,1 - 0,5; ++ = 0,5 - 0,75; +++ = 0,75 - 1,00; ++++ = >1,00

<sup>3</sup> Les titres en Ac ont été exprimés selon la réciproque de la plus haute dilution du sérum pouvant inhiber l'ECP produit par 200 TCID<sub>50</sub> de la souche IAF-Klop du VSRRP sur des cellules MARC-145.

Évidemment, les sérums pré-infection-défi se sont tous révélés négatifs puisqu'aucun des animaux n'avait encore été mis en contact avec la protéine N par le biais d'une infection par le virus complet (tableau 5). Les résultats obtenus sur les sérums récoltés au dixième jour suivant l'inoculation du VSRRP ont été d'une intensité de +++ (0,75 – 1,00) chez les trois échantillons témoins (tTA), alors que les sérums des porcelets immunisés préalablement avec les hAdVreps exprimant les gènes ORF5-WT ou ORF5-SYN se sont révélés plus faibles. En effet, les sérums de ces deux groupes ont présenté une intensité de + (0,1 – 0,5) et ++ (0,5 – 0,75). Dans le cas du groupe de porcelets ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq, deux des sérums avaient une valeur de ++ (0,5 – 0,75) et un seul avait une valeur de + (0,1 – 0,5), alors que l'inverse fut déterminée dans le cas des porcelets pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq. Vingt-huit jours après l'infection-défi, les valeurs pour chacun des animaux sont, soit demeurés stables, ou avaient légèrement augmenté. Ainsi, ces résultats ont permis de mettre en évidence le fait que, dans les sérums des animaux exposés à la GP<sub>5</sub> avant l'infection-défi, le niveau d'Ac dirigés contre la protéine N est plus faible que celui observé dans les sérums des animaux n'ayant pas été préalablement exposés aux protéines du VSRRP.

#### 3.4.2.2.4 Séroneutralisation

Comme pour toutes les autres analyses sérologiques présentées jusqu'à maintenant, les résultats de SN sur les sérums récoltés avant l'infection-défi se sont révélés négatifs (Tableau 5). À J10 après l'infection-défi, les titres des sérums provenant des porcelets des groupes témoin (tTA) et ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq se sont pratiquement révélés négatifs avec des valeurs oscillant entre <8 et 16. Par contre, les sérums du groupe de porcelets ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq ont, quant à eux, démontré des titres en Ac neutralisants très élevés de l'ordre de 128 à 256.

#### 3.4.2.2.5 Immunobuvardage de type Western

Les résultats des expériences d'immunobuvardage conduites sur les sérums datant d'avant l'inoculation de la souche IAF-Klop du VSRRP se sont tous révélés négatifs. Les analyses d'immunobuvardage réalisées avec les sérums collectés à J10 après l'infection-défi n'ont pas permis de déceler d'Ac (bande) contre la GP<sub>5</sub> chez les sérums provenant des porcelets du groupe témoin. Toutefois, pour les animaux ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq, la présence d'une faible réactivité contre la GP<sub>5</sub> n'a été observée que dans le cas d'un seul des trois sérums, tandis que pour les animaux ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq, les 3 sérums ont démontré une réactivité contre la GP<sub>5</sub>. Il fut possible de noter aussi qu'au J10 post infection-défi, seulement deux sérums ont réagi contre la protéine N, soit deux des trois sérums des porcelets du groupe témoin (résultats non présentés). Au J28 après l'infection-défi, aucun des sérums du groupe témoin n'a démontré de réactivité contre la GP<sub>5</sub>. Toutefois, tous les autres sérums ont réagi contre cette protéine. En effet, dans le cas des porcelets ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq, une faible réactivité a été observée dans le cas de deux des trois sérums et une forte réactivité fut notée pour le troisième sérum, alors que dans le cas des animaux ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq, les trois sérums testés ont clairement réagi contre la GP<sub>5</sub>. De plus, tous les sérums du groupe témoin ont engendré des bandes claires contre la protéine N, de même que les deux premiers sérums du groupe de porcelets ayant été pré-immunisés avec le vecteur hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq.

**Figure 14 : Profils d'immunobuvardage de type Western obtenus pour les sérums récoltés 10 et 28 jours après l'infection-défi avec la souche IAF-Klop du VSRRP chez des porcelets ayant été pré-immunisés ou non avec les hAdVreps non-réplicatifs et inductibles portant les gènes ORF5-WT ou ORF5-SYN**

Les languettes de nitrocellulose ont été préparées avec les protéines natives de la souche IAF-Klop du VSRRP.

T : porcelets pré-immunisés avec l'hAdCMV/tTA seulement.

WT : porcelets pré-immunisés simultanément avec l'hAdCMV tTA et l'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq

SYN : porcelets pré-immunisés simultanément avec l'hAdCMV/tTA et l'hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq

+ : contrôle positif; sérum polyclonal de porc anti-VSRRP

w : réactivité faible



## **CHAPITRE IV : DISCUSSION**

Comme mentionné préalablement dans l'introduction de ce mémoire, les hypothèses postulées étaient basées sur le fait de l'existence d'Ac neutralisants dirigés contre les protéines GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> du VSRRP (Meulenberg et al., 1997; Weiland et al., 1999). La neutralisation de l'infectivité du VSRRP en présence d'Ac dirigés contre ces deux protéines virales indique qu'elles ont probablement un rôle essentiel à jouer dans les interactions virus-cellules permissives, l'infectivité et la virulence, aussi bien que dans l'établissement d'une immunité protectrice. De plus, il est probable que l'une ou l'autre de ces protéines, sinon les deux, soit impliquée dans la reconnaissance et l'attachement au récepteur, ou co-récepteur cellulaire (Snijder and Meulenberg., 1998; Therrien et al., 2000). Si ces deux glycoprotéines de l'enveloppe virale jouent un rôle d'antirécepteur, des mutations au niveau de leur ectodomaine pourraient donc entraîner un changement dans le tropisme du virus et, puisque leur rôle est essentiel dans la protection contre l'infection, particulièrement la GP<sub>5</sub> (Pirzadeh and Dea, 1998), une optimisation de la réponse immune contre leurs principaux déterminants antigéniques pourrait engendrer une protection efficace contre l'infection. Conséquemment, les deux objectifs de ce projet étaient 1) l'identification, au niveau des GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> des isolats sélectionnés, de régions susceptibles d'être impliquées dans la modification du tropisme du VSRRP et; 2) la comparaison de la réponse immune humorale de porcelets contre l'infection par le VSRRP suivant, ou non, leur pré-immunisation avec deux types de vaccins : un vaccin fait de virus tué et adjuvanté et l'immunisation génétique à l'aide d'adénovirus recombinants non-réplicatifs et inductibles véhiculant le gène ORF5 natif du VSRRP ou modifié de façon à utiliser les codons s'exprimant de façon optimale chez les mammifères (André et al., 1998; Hass et al., 1998).

#### **4.1 Étude du tropisme du VSRRP**

Quatre isolats cliniques du VSRRP ont été sélectionnés, pour leur capacité à pouvoir se propager sur les cultures primaires de cellules PAMs, mais pas sur les cultures de cellules MARC-145 ou autres lignées de cellules de reins de singe ayant été rapportées pour leur permissivité au VSRRP (Benfield et al., 1992; Kim et al., 1993; Therrien et al., 2000). Trois d'entre eux (481, 528 et 537) étaient des isolats fournis par le service de diagnostic

de l'INRS-Institut Armand-Frappier, donc provenant de cas de champs et le dernier était une souche de référence québécoise isolée au début des années 90's, la souche IAF-exp91, reconnue comme étant la seule souche du génogroupe nord-américain à n'avoir pu être adaptée jusqu'à présent sur les cellules MARC-145 (Dea et al., 1992; Mardassi et al., 1994a). La souche IAF-Exp91 fut utilisée dans les études comparatives des séquences nucléotidiques et des séquences en aa étant donné son tropisme restreint aux PAMs. Afin de mettre en évidence les changements d'aa spécifiques au niveau des GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> de ces isolats du VSRRP à tropisme restreint aux PAMs, les séquences en aa de ces deux protéines déduites des séquences nucléotidiques des gènes ORF4 et ORF5 furent aussi comparées à celles de souches de référence nord-américaines IAF-Klop et ATCC VR-2332 ayant pu être propagées aussi bien sur les PAMs que sur les cellules MARC-145 (Benfield et al., 1992; Mardassi et al., 1994a). Aucune étude comparative n'a été effectuée avec les séquences de ces deux glycoprotéines de souches de référence européennes, bien que la majorité d'entre elles ne puissent pas se répliquer sur les cellules MARC-145 (Mengeling et al., 1999). Il aurait été certainement alors impossible d'identifier des régions d'intérêt chez les GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> étant donné la très grande variabilité génomique existant au préalable entre les virus définissant chacun de ces deux génogroupes (Murtaugh et al., 1995; Dea et al., 2000a). En effet, il a été préalablement démontré par plusieurs auteurs des deux continents que les pourcentages d'identité en aa existant entre les GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> des souches du VSRRP Européennes et Nord-Américaines sont respectivement de 67-70% et 52-55% (voir Tableau 1). Lors des alignements des séquences en aa des GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> des isolats cliniques étudiés, des changements d'aa communs et uniques aux isolats à tropisme restreint aux PAMs ont été recherchés en premier lieu. En second lieu, des régions ou plusieurs changements d'aa ponctuels distribués de façon aléatoire par rapport aux souches de référence, ont été recherchées. Divers changements d'aa dans une même région pourraient engendrer une modification de la conformation de la protéine de sorte que celle-ci ne pourrait plus interagir avec, par exemple, le récepteur du VSRRP se trouvant à la surface des cellules MARC-145, d'où une modification du tropisme cellulaire chez certains isolats.

Les régions délimitées par les aa 40-43 et 55-63 de la GP<sub>4</sub> (figures 6 et 7) répondaient à ces critères. La première région (40-43) est une région où divers changements d'aa, ont été identifiés chez tous les isolats, mais aucun de ces changements ne s'est avéré commun à l'ensemble de ceux-ci, contrairement aux changements ayant été identifiés au niveau de la région délimitée par les résidus d'aa 55 à 63. Au niveau de cette région de la GP<sub>4</sub>, divers changements d'aa ont été retrouvés chez tous les isolats à tropisme restreint aux PAMs, mais ces changements n'étaient pas communs à l'ensemble de ces isolats, sauf le changement de l'aa commun aux quatre isolats étudiés ayant été identifié en position 56. En effet, à cette position, une sérine a été retrouvée chez tous les isolats ne pouvant croître que sur les cellules PAMs, alors qu'à cette même position, chez les souches IAF-Klop et ATCC VR-2332 se trouvait respectivement une glycine et une arginine. Cette sérine, présente en position 56 chez tous les isolats étudiés, combinée au fait que la région 55-63 se trouve dans une portion hydrophile de la protéine, suggèrent que cette région pourrait être exposée à la surface du virion et pourrait ainsi avoir un rôle déterminant dans le changement du tropisme du VSRRP observé pour les quatre isolats cliniques étudiés. De plus, des travaux de Meulenbergh et collaborateurs (1997) ont permis d'identifier cette région comme étant celle où se lient les AcMo neutralisants dirigés contre la GP<sub>4</sub> de la souche de référence européenne LV. Ces auteurs ont préalablement démontré que tous les Ac neutralisants obtenus contre la GP<sub>4</sub> se liaient à la région délimitée par les résidus d'aa 59 à 67 de la souche européenne de référence LV (SAAQEKISF). Il est intéressant de noter que cette équipe a identifié, en comparant les séquences de LV et ATCC VR-2332, une délétion de quatre aa au niveau de cette région chez la souche ATCC VR-2332. En effet, la souche LV contient quatre aa de plus que la GP<sub>4</sub> (aa QEKI) de la souche vaccinale ATCC VR-2332 dans la région située entre les aa 61 et 62 de cette dernière. Cette délétion, qui pourrait avoir un impact sur la conformation de la GP<sub>4</sub>, peut probablement expliquer le fait qu'aucun AcMo neutralisant dirigé contre la GP<sub>4</sub> des isolats nord-américains n'ait été isolé à ce jour. Cette équipe a également étudié la réactivité de leurs AcMo neutralisants anti-GP<sub>4</sub> envers d'autres isolats européens, et il s'est avéré que ces derniers pouvaient neutraliser l'infectivité de seulement deux des sept isolats testés. En comparant les séquences de la GP<sub>4</sub> de ces différents isolats, ces auteurs ont aussi déterminé que la région délimitée par les aa 59 à

70 de cette protéine était beaucoup plus sujette à des variations que les résidus d'aa situés ailleurs sur la protéine GP<sub>4</sub>; probablement à cause de la pression sélective exercée sur cette région qui semble immunodominante (Meulenberg et al., 1997). La région délimitée par les aa en positions 40 à 43, pour laquelle beaucoup moins de changements d'aa ont été observés, se trouve en plus dans une portion hydrophobe de la protéine, ce qui suggère que cette région n'est pas exposée à la surface du VSRRP. Ces deux observations suggèrent aussi que cette dernière région ne joue probablement pas un rôle majeur dans le changement du tropisme du VSRRP.

Dans le cas de la GP<sub>5</sub>, deux régions représentées d'une part par l'aa en position 10 et, d'autre part, par les aa en positions 25 à 40 (figures 8 et 9), ont répondu aux critères énumérés plus haut. Tout d'abord, les analyses de séquençage ont permis de démontrer que tous les quatre isolats cliniques étudiés possédaient une tyrosine en position 10, alors qu'à cet endroit on retrouve, chez les souches de référence nord-américaines, une cystéine. Ce changement doit probablement jouer un rôle très important dans la modification du tropisme puisqu'il se retrouve chez chacun des isolats étudiés et ce même si cet aa se retrouve dans une portion hydrophobe de la protéine. La deuxième région ayant été identifiées au niveau de la GP<sub>5</sub> fut la région délimitée par les aa en positions 25 à 40. Aucun changement d'aa commun aux quatre souches étudiées n'a été observé au niveau de cette région, mais tous les isolats ont présenté des changements d'aa uniques par rapport aux souches de référence. Toutefois, une grande variabilité de la séquence en aa a également été démontrée entre les souches de référence nord-américaines IAF-Klop et ATCC VR-2332. En fait, il a déjà été démontré que cette portion de la GP<sub>5</sub> correspond à une région hypervariable (Pirzadeh et al., 1998). Cette région de la GP<sub>5</sub> délimite probablement un domaine antigénique majeur de cette glycoprotéine d'enveloppe du VSRRP et on y retrouve un nombre variable de sites de N-glycosylation potentiels selon les souches. Par exemple, la souche IAF-Klop possède un site de N-glycosylation au niveau de cette région tandis que la souche vaccinale ATCC VR-2332 en possède deux (Meng et al., 1995b; Pirzadeh et al., 1998). Ainsi, malgré le fait que cette région se retrouve dans une portion hydrophile de la GP<sub>5</sub>, sa très grande variabilité fait en sorte qu'il serait peu probable qu'elle soit impliquée dans la

détermination du tropisme ou la liaison au récepteur. Si c'était le cas, le nombre d'isolats cliniques nord-américains ayant perdu la capacité de se propager sur les cellules MARC-145 serait fort probablement plus important.

Il existe des régions au niveau des glycoprotéines d'enveloppe GP<sub>4</sub> et GP<sub>5</sub> du VSRRP qui apparemment sont susceptibles d'influencer le tropisme cellulaire du virus tel qu'observée dans le cas des quatre isolats cliniques ayant été reconnues responsables d'épidémies de problèmes respiratoires affectant les porcelets au stade de post-sevrage de quatre fermes du sud du Québec. Au moins une région de chacune de ces deux glycoprotéines démontraient de façon plus importante des changements d'aa uniques et communs à tous isolats n'ayant pu être propagés que sur les cellules PAMs.

Le VSRRP, comme le virus de l'artérite équine, reconnu comme le prototype des *arterivirus*, est un virus à ARN monocaténaire sujet à une plus grande fréquence de mutations étant donné l'absence de mécanismes de réparation de l'ARN dans les cellules eucaryotes (Dea et al, 2000a; Plagemann, 1996; Snidjer et Meulenberg, 1998). Il est fort probable que les mutations responsables de ces changements d'aa entraînent conséquemment un changement de conformation des glycoprotéines d'enveloppe impliquées dans l'attachement aux récepteurs cellulaires ou engendrent un encombrement stérique au niveau des régions se liant aux récepteurs cellulaires. Il serait intéressant de procéder à des études plus approfondies de ces deux régions pour définir exactement leur implication au niveau du tropisme cellulaire, notamment des études de mutagenèse dirigée effectuées sur les clones de cDNA infectieux récemment développées dans le cas de la souche LV ou par des expériences de troncation des gènes (Meulenberg et al., 1998).

#### **4.2 Modulation de la réponse immune contre l'infection par le VSRRP chez les porcs**

Puisqu'une virémie s'installe rapidement chez les porcs infectés, un vaccin stimulant une réponse immunitaire systémique et locale, avec production d'Ac neutralisants, devrait

empêcher la dissémination du virus vers les organes cibles. Les différents vaccins présentement utilisés pour protéger les porcs contre l'infection par le VSRRP sont plus ou moins efficaces. Il en existe deux types : les vaccins inactivés utilisant des souches virales propagées sur les cellules PAMs (CyBlue®, Cyanamid) ou les cellules MARC-145 (Merrial, Vetrepharm Inc.) et les vaccins vivants atténués utilisant des souches dont la virulence a été atténuée suite à plusieurs passages sur les lignées cellulaires de reins de singe.

Les vaccins inactivés confèrent une certaine protection contre les problèmes reproducteurs, mais sont inefficaces pour enrayer les problèmes respiratoires subséquents (Albina, 1997 (revue); Pol, 1999). L'immunité induite de nature systémique est inadéquate puisqu'ils ne stimulent pas la réponse immune de type mucoale, et les porcs ainsi immunisés ne développent pas d'Ac neutralisants. La protection qu'ils confèrent contre l'infection est limitée et de courte durée. Le peu d'efficacité de ces vaccins est due, en partie, à la méthode utilisée pour l'inactivation des virions qui pourrait résulter en la dénaturation des protéines du virus, donc des déterminants antigéniques indispensables pour l'induction d'une réponse immune protectrice.

Le deuxième type de vaccin commercialisé, les vaccins vivants atténués, sont plus efficaces que les premiers, mais ils comportent des inconvénients majeurs. Les vaccins vivants atténués administrés oro-nasalement stimulent davantage une réponse immune protectrice dans le cas des infections localisées aux muqueuses, la production d'IgA sécréteurs étant indispensables pour l'élimination des VRSSP (Enjuannes, 1995). Ces vaccins induisent une infection mitigée stimulant ainsi les mêmes mécanismes de défense que l'infection naturelle. Ces vaccins confèrent habituellement une bonne protection contre les signes cliniques respiratoires du SRRP et offrent habituellement une protection assez efficace contre une ré-infection par le VSRRP. Cependant, ces vaccins engendrent une virémie chez les animaux vaccinés et les virions sont excrétés dans la semence ou dans l'air. Ils provoquent également des troubles reproducteurs comme des avortements, lorsqu'ils sont administrés aux truies gestantes, et une baisse de la qualité de la semence des verrats. De plus, la protection qu'ils confèrent contre l'infection n'est que de courte

durée et il est impossible de distinguer les animaux infectés des animaux vaccinés. Toutefois, le problème le plus important est le retour possible à la virulence de ces virus atténués suite à des mutations ou recombinaisons avec les souches pathogènes (Albina, 1997; Christopher-Hennings et al., 1997; Dea et al., 2000a; Meng, 2000; Mengeling et al., 1996).

Deux vaccins atténués sont disponibles commercialement (Dea et al, 2000a); Pol, 1999; Nelson et al., 1999). Le succès de la vaccination contre les problèmes reproducteurs et les problèmes post-sevrages varie considérablement. Dans bien des cas, on a rapporté une recrudescence de problèmes reproducteurs suite à la vaccination des truies gestantes; c'est le cas notamment au Danemark où des épisodes très sévères de SRRP ont été rapportées en 1998 suite à l'utilisation d'un vaccin atténué Nord-Américain (Madsen et al., 1998). D'autres pays ont adopté des mesures restrictives afin de prévenir les risques d'infection par les porcs ou produits porcins importés. Il est donc peu probable que l'utilisation de vaccins conventionnels dans les troupeaux destinés à l'exportation soit permise, due à l'impossibilité de différencier les animaux vaccinés de ceux infectés de façon naturelle.

Dans cette partie du projet, deux types de vaccins ont été testés pour leur efficacité à protéger contre l'infection par le VSRRP chez les porcelets. Tout d'abord, une infection expérimentale des porcelets a été réalisée afin de confirmer la virulence de la souche IAF-Klop du VSRRP, utilisée pour les infections-défis subséquentes. La capacité de cette souche à induire la production de lésions au niveau des voies respiratoires des porcelets fut donc vérifiée et confirmée, de même que la capacité de cette souche à induire une réponse humorale significative contre le VSRRP.

Par la suite, une infection expérimentale fut réalisée pour tester l'efficacité d'un vaccin fait à l'aide de VSRRP inactivé à l'aide de BEI, un agent ne dénaturant pas les protéines. Ce vaccin était adjuvanté avec une préparation de parois de *Mycobacterium* de différentes espèces. L'effet protecteur de ce vaccin a été vérifié en procédant à une infection-défi à l'aide de la souche IAF-Klop. La dernière étape du projet consistait à

vérifier et comparer l'effet protecteur de deux hAdVreCs non-réplicatifs et inductibles portant le gène ORF5-WT ou ORF5-SYN.

#### **4.2.1 Infection expérimentale**

Les porcelets, qui ont reçu, par voie intratrachéale, une dose de  $10^7$  TCID<sub>50</sub> de la souche IAF-Klop du VSRRP ayant été propagée pour deux passages sur les cellules PAMs, ont tous développé l'infection par le virus, ainsi que les manifestations cliniques (fièvre, respiration abdominale) et pathologiques du SRRP. Dans tous les cas, des lésions histopathologiques typiques d'une infection par le VSRRP, principalement des lésions de pneumonie interstitielle avec infiltration massive des septa alvéolaires par des cellules lymphomonocytaires, ont pu être observées au niveau des voies respiratoires des porcelets (Figure 10). Les lésions étaient présentes dès le septième jour suivant l'infection, mais elles étaient de sévérité beaucoup plus importante vers la fin de la deuxième semaine pi. Ainsi, la souche IAF-Klop du VSRRP a démontré sa capacité à induire la forme respiratoire aiguë du SRRP chez les porcelets, et ce, en moins de deux semaines.

Les analyses sérologiques (Tableau 3) effectuées par IFI ont permis de mettre en évidence la présence d'Ac anti-VSRRP dès le septième jour suivant l'inoculation du virus, les titres variant de 64 à 256. Une semaine plus tard, les titres obtenus atteignaient 1024 chez tous les animaux. Ces résultats, qui sont en accord avec la littérature, confirment la capacité de la souche IAF-Klop de susciter une réponse immunitaire humorale spécifique chez les porcelets infectés expérimentalement. Les résultats obtenus à l'aide du test ELISA Herdcheck de IDEXX étaient tous négatifs à J7 puisqu'aucune des valeurs des ratio établis n'étaient supérieures à 0,4, considéré comme le seuil de positivité. Ce résultat n'est pas surprenant et est probablement attribuable à deux raisons. Premièrement, il a déjà été rapporté dans la littérature (Dea et al., 2000) que ce test est moins spécifique que l'IFI d'où un seuil de positivité de 0,5 est préférable à la valeur de 0,4 suggérée par le fabricant. Deuxièmement, ce test est surtout sensible aux Ac dirigés contre la protéine de la nucléocapside (N) du VSRRP, bien qu'il puisse détecter les Ac dirigés contre toutes les protéines du VSRRP, et les Ac anti-N ne font

habituellement leur apparition que vers la fin de la première semaine, les titres optimaux étant présents vers la fin de la deuxième semaine suivant l'infection (Loemba et al., 1996). La combinaison de ces deux facteurs fait donc en sorte que, à 7 jours pi, la sensibilité de ce test est beaucoup moindre que celle de l'IFI. Toutefois, les résultats obtenus à J14, où tous les sérums ont été clairement diagnostiqués comme étant séropositifs au VSRRP, confirment la validité de ce test. La dernière analyse sérologique effectuée consista en la détermination du pouvoir neutralisant de ces Ac. Aucun des sérums testés n'a démontré de capacité à neutraliser significativement l'infection des cellules MARC-145 par le VSRRP. Selon la littérature, la présence d'Ac neutralisants n'est détectable que vers la fin de la troisième semaine suivant l'infection (Loemba et al., 1996; Yoon et al., 1995). Toutefois, un test modifié, dans lequel 20% de sérum de porc frais est ajouté au milieu de dilution des sérums comme source de complément, a permis de détecter la présence des Ac neutralisants dès le neuvième jour pi avec un premier pic évident aux jours 11 à 21 et un deuxième aux jours 41 à 45 (Yoon et al., 1994). Le test SN a été utilisé dans ces expériences, mais le pourcentage de sérum de porc frais ajouté au milieu de dilution a été ramené à 10%, étant donné l'effet toxique observé, au pourcentage recommandé, pour les cellules MARC-145. Ainsi, la raison pour laquelle il ne fut pas possible de détecter la présence d'Ac neutralisants 14 jours après le début de l'infection expérimentale était probablement due à une perte de sensibilité du test de SN utilisée, mais ces résultats étaient tout de même possibles considérant les résultats d'infection réalisées par d'autres auteurs avec d'autres souches virulentes du virus (Benfield et al., 1992; Mengeling et al., 1995; Nelson et al., 1994; Yoon et al., 1995).

La présence du génome viral ainsi que de particules infectieuses du VSRRP dans les poumons et dans le sérum, tant au jour 7 qu'au jour 14 a été démontrée par les tests de détection moléculaires et d'isolement viral en cultures cellulaires chez tous les porcelets infectés. Ces résultats confirment que le virus se réplique au niveau des poumons des animaux infectés et qu'une virémie d'une durée de plus de deux semaines caractérise cette infection virale.

#### 4.2.2 Vaccination avec le virus inactivé

Il est probable que l'efficacité des vaccins constitués de VSRRP inactivé soit due au fait que les agents utilisés pour l'inactivation des virions affectent la structure de ses protéines structurales et, par le fait même, peuvent conduire à la dénaturation des principaux déterminants antigéniques. Pour vérifier cette hypothèse, un vaccin inactivé à l'aide du BEI, qui est un agent pouvant inactiver le virus sans affecter la structure des protéines, a été testé chez un autre groupe de porcelets. Les porcelets vaccinés ( $V_1$  à  $V_7$ ) ont reçu deux doses, à 21 jours d'intervalle, de ce vaccin inactivé et adjuvanté. Par la suite, tous les porcelets ( $T_1$  à  $T_3$  et  $V_1$  à  $V_7$ ) ont reçu une dose de  $10^{7,1}$  TCID<sub>50</sub> de la souche IAF-Klop du VSRRP administrée par voie intratrachéale.

Les analyses sérologiques (Tableau 4) effectuées sur les sérums récoltés avant l'infection-défi ont toutes révélé qu'aucun des sérums testés, tant dans le groupe des porcs témoins que dans le groupe des porcs vaccinés, ne présentaient des niveaux significatifs en Ac anti-VSRRP. Toutefois, des analyses d'immunobuvardage de type Western effectuées sur les sérums récoltés le jour de l'infection-défi ont révélé que, parmi les sérums des porcelets vaccinés, le sérum  $V_6$  réagissait faiblement contre la N, ceux des porcelets  $V_1$ ,  $V_2$  et  $V_7$  réagissaient faiblement contre la GP<sub>5</sub>, alors que ceux des porcelets  $V_4$  et  $V_5$  réagissaient faiblement contre la N et la GP<sub>5</sub>. Ces résultats indiquaient que la vaccination n'avait donc généré qu'une réponse immunitaire humorale très faible, à la fois dirigée contre les protéines N et GP<sub>5</sub>, et seulement détectable par WB, chez la majorité des porcelets.

Les analyses sérologiques effectuées sur les sérums récoltés deux semaines après l'infection-défi (J14) ont montré que les titres en Ac tel que déterminés par IFI pour les sérums des animaux témoins ( $T_1$  à  $T_3$ ) et vaccinés ( $V_1$  à  $V_7$ ) étaient identiques, les titres variant de 1024 à 4096. Les titres en Ac obtenus pour les sérums du groupe de porcelets témoins étaient comparables à ceux obtenus lors de l'infection expérimentale, indiquant que l'infection-défi avait stimuler chez ces porcs la synthèse d'Ac anti-VSRRP. Bien que des titres en Ac plus élevés pour les sérums des porcelets vaccinés que ceux

déterminés pour les sérums des porcelets témoins étaient attendus, ce ne fut pas le cas en IFI. Toutefois, les analyses sérologiques effectuées à l'aide du test ELISA Herdcheck de IDEXX ont révélé, quatorze jours après l'infection-défi, une réponse en Ac chez les porcs vaccinés supérieure à celle des porcs du groupe témoin. Ainsi, les sérums des porcelets non vaccinés ont montré, quatorze jours après l'infection-défi, des ratios E/P variant entre 0,67 et 0,77, ce qui est comparable, bien qu'un peu plus faible, avec les ratios obtenus lors de l'infection expérimentale et ce qui confirme, tout comme l'IFI, que l'infection-défi a généré une réponse humorale. Les sérums des porcelets vaccinés ont, quant à eux, montré des ratios E/P variant entre 1,06 et 2,09. Cette augmentation des ratios E/P chez les porcs vaccinés suggère que la vaccination aurait généré une mémoire immunologique chez ces animaux, d'où les titres en Ac supérieurs déterminés pour les porcelets vaccinés suite à l'infection-défi qui sont le reflet d'une réponse immunologique anamnétique plutôt que le reflet d'une réponse primaire observée chez les animaux du groupe témoin. Ceci fut confirmé par les tests de WB qui ont été réalisés avec les sérums prélevés au quatorzième jour suivant l'infection-défi. Dans ce test, tous les sérums provenant des porcelets non-vaccinés (T<sub>1</sub> à T<sub>3</sub>) ont réagi clairement contre la protéine N et plus faiblement contre la GP<sub>5</sub>. Ces résultats correspondent au profil WB des sérums collectés le même jour lors d'une infection expérimentale ou naturelle (Loemba et al., 1996; Nelson et al., 1994; Yoon et al., 1995). En effet, il est clairement établi dans la littérature que la protéine N du VSRRP est celle qui suscite la plus forte réponse en Ac, bien que ceux-ci n'aient aucun pouvoir neutralisant. De leur côté, les sérums provenant des porcelets vaccinés (V<sub>1</sub> à V<sub>7</sub>) ont également tous réagi en WB, avec une intensité similaire ou supérieure aux sérums provenant des porcelets du groupe témoin, contre la protéine N. De plus, leur réactivité contre la GP<sub>5</sub> s'est également avérée beaucoup plus intense que celle des sérums collectés chez les animaux non-vaccinés, confirmant ainsi l'établissement d'une mémoire immunologique contre les déterminants antigéniques de la glycoprotéine majeure de l'enveloppe du VSRRP. De plus, 4 des 7 sérums d'animaux vaccinés (V<sub>2</sub>, V<sub>3</sub>, V<sub>6</sub> et V<sub>7</sub>) ont montré une faible réactivité contre la protéine M comparativement à aucun des sérums des animaux du groupe témoin venant ainsi appuyer encore davantage l'affirmation de l'établissement d'une mémoire immunologique.

Habituellement, on observe une corrélation entre la présence de titres élevés en Ac dirigés contre la GP<sub>5</sub> et la capacité à neutraliser le virus, puisque les Ac neutralisants sont principalement dirigés contre des déterminants antigéniques de cette glycoprotéine d'enveloppe (Gonin et al., 1999; Pirzadeh et Dea, 1997). Étonnamment, les sérums récoltés 14 jours après l'infection-défi, chez les porcelets non-vaccinés ont présenté des titres en Ac neutralisants variant entre 8 et 128. Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par d'autres auteurs dans le cadre d'une infection expérimentale avec le VSRRP démontrant que les titres en Ac neutralisants sont habituellement considérés significatifs (> 8) que vers la fin de la troisième semaine suivant l'infection (Loemba et al., 1996; Yoon et al., 1995). Ces résultats font en sorte qu'aucune conclusion significative ne peut être postulée quant aux titres en Ac neutralisants obtenus à partir des sérums provenant des animaux vaccinés variant de 64 à 256, si ce n'est que cette réponse hâtive pourrait être attribuable à l'adjuvant utilisé dans le vaccin tué qui a été évalué.

Il est connu que la présence de titres élevés en Ac neutralisants est essentielle afin d'assurer la protection des animaux contre l'apparition des lésions typiques du SRRP et les résultats obtenus lors des examens histologiques des poumons des porcelets de cette expérience suggèrent que les titres en Ac neutralisants étaient certainement plus élevés chez les animaux vaccinés que chez les animaux non-vaccinés. En effet, les lésions de pneumonie interstitielle sévère associées à une infiltration lymphomonocytaire des septa alvéolaires observée chez les animaux non-vaccinés étaient similaires à celles ayant été mises en évidence lors de l'infection expérimentale où des titres significatifs en Ac neutralisants n'avaient pas été détectés. Par ailleurs, les seules modifications notées au niveau des poumons des porcelets vaccinés, par rapport à des poumons normaux, étaient une infiltration lymphomonocytaire des septa alvéolaires beaucoup moins sévère que celle observée dans les coupes des poumons des porcelets non-vaccinés. Il est également intéressant de noter que le VSRRP n'a pu être détecté ou isolé à partir d'aucun échantillon sérique provenant des porcelets vaccinés, et que le virus n'a pu être détecté que dans deux des sept échantillons pulmonaires provenant de ces animaux. En comparaison, le VSRRP a pu être, soit isolé en cultures cellulaires, soit détecté par RT-PCR dans le sérum et les poumons de chacun des porcelets n'ayant pas été vaccinés.

Ainsi, il semble que la vaccination ait pu empêcher la dissémination du virus en inhibant la virémie. Ainsi, les résultats de WB montrant des niveaux élevés d'Ac dirigés contre la GP<sub>5</sub> chez les porcelets vaccinés, les résultats histologiques contrastants obtenus entre les animaux des deux groupes et les résultats de détection et d'isolement viral suggèrent que, dans l'ensemble, il y avait présence de faibles titres en Ac neutralisants chez les porcelets non-vaccinés, tandis que des titres élevés en Ac neutralisants étaient présents chez les porcelets vaccinés. Dans l'ensemble, les résultats obtenus des autres analyses suggèrent que les valeurs déterminées pour les titres en Ac neutralisants étaient erronées, probablement à cause de la toxicité des basses dilutions des sérums de porcs convalescents pour les cellules MARC-145 due au sérum ajouté comme source de complément.

En conclusion, la vaccination avec le virus inactivé au BEI n'induit qu'une très faible production d'Ac détectables surtout par les analyses d'immunobuvardage de type Western. Néanmoins, ce vaccin confère une mémoire immunologique pour la production d'Ac contre les déterminants antigéniques de la GP<sub>5</sub> qui sont impliqués dans la production d'Ac neutralisants et, dans une moindre mesure, contre les Ac dirigés contre la protéine M. Toutefois, ce type de vaccination ne prévient pas l'infection des animaux au niveau local, soit pulmonaire, bien qu'il confère une protection contre la virémie, ainsi qu'une protection partielle contre l'apparition de lésions au niveau du système respiratoire. Le virus n'est pas éliminé des poumons dans tous les cas, ainsi les animaux vaccinés peuvent servir de source d'infection pour les autres porcs de la ferme. Ainsi, dans les conditions utilisées, ce vaccin est relativement efficace pour protéger les porcelets contre les lésions typiques du SRRP quoique la protection qu'il confère contre l'infection soit limitée.

#### **4.2.3 Immunisation avec les vecteurs viraux recombinants exprimant le gène ORF5**

La GP<sub>5</sub> représente la principale cible des Ac neutralisants dirigés contre le VSRRP, ce qui suggère qu'elle pourrait être une bonne candidate pour la mise au point de vaccins

sous-unitaires ou recombinants (Gonin et al., 1999; Pirzadeh et al., 1997 et 1998). Des travaux d'immunisation génétique à l'aide du plasmide recombinant pRc/CMV5, où avait été inséré l'ORF5 de la souche IAF-Klop du VSRRP, ont permis d'obtenir des résultats intéressants relativement à la réponse immunitaire protectrice contre l'infection par ce virus. En effet, suite à une infection-défi avec la souche virale virulente, les porcelets qui avaient été immunisés avec ce plasmide recombinant ont présenté des lésions pulmonaires beaucoup moins sévères que les porcelets naïfs. De plus, aucune virémie n'a pu être détectée chez ces porcelets qui avaient, en plus, produit des titres élevés en Ac neutralisants de l'ordre de 64 à 128 (Pirzadeh et Dea, 1998). La présence de titres élevés en Ac neutralisants semble donc essentielle tant pour l'obtention d'une protection efficace que pour contrer le phénomène d'ADE et éliminer les dangers de dissémination du virus persistant au niveau des poumons des animaux vaccinés, et ce malgré une protection contre l'établissement des signes cliniques et des lésions histopathologiques.

Ainsi, afin de permettre la génération de vecteurs viraux recombinants pouvant induire la synthèse de titres élevés en Ac neutralisants, un ORF5 synthétique (ORF5-SYN) a été construit dans le laboratoire du Dr Serge Dea. Pour ce faire, certains codons du gène de l'ORF5 de la souche IAF-Klop du VSRRP ont été remplacés par les codons, codant pour les mêmes aa, les plus utilisés chez les cellules de mammifères afin de permettre une traduction optimale de l'ARNm (André et al., 1998; Hass et al., 1998). Ainsi, le gène ORF5-SYN devrait s'exprimer à des niveaux plus élevés chez l'hôte lors d'une immunisation et ainsi susciter une réponse humorale neutralisante probablement plus importante et plus efficace. L'équipe du Dr Dea a ensuite procédé au clonage de ce gène synthétique (ORF5-SYN), ainsi qu'à celui de l'ORF5 de type sauvage (ORF5-WT), dans des vecteurs adénoviraux humains (hAdVreco) non-réplicatifs et inductibles. Les vecteurs adénoviraux ont été choisis, tout d'abord, parce qu'il a été démontré antérieurement, que ce type de vecteur était capable d'induire la synthèse d'Ac neutralisants ainsi qu'une immunité protectrice chez le porc (Torres et al., 1995). Un autre avantage des adénovirus est leur capacité d'infecter les cellules des muqueuses respiratoire et intestinale des porcs (Torres et al., 1995). De tels virus recombinants

pourraient ainsi jouer un rôle important dans l'induction d'une immunité mucoale (Papp et al., 1998) ayant un tropisme marqué pour les cellules lymphomonocytaires des systèmes BALT (« Bronchus associated lymphoid tissue ») et GALT (Gut associated lymphoid tissue) (Rosenthal et al., 1996). Cette propriété pourrait être très importante puisque lors de l'expérience d'immunisation génétique avec pRc/CMV5, l'importance d'une réponse immunitaire locale pour l'élimination de la persistance virale dans les poumons avait été remarquée (Pirzadeh et Dea, 1998). Plusieurs autres raisons ont motivé le choix des hAdVreCs; ces virus ont un génome ADN stable (Lutze-Wallace et al., 1995), leur propagation en cultures cellulaires est facile (Lamarche et al., 1990) et permet d'obtenir des titres infectieux de l'ordre de  $10^9$ - $10^{10}$  PFU/mL. De plus, avec ce type de vecteur, les protéines recombinantes peuvent représenter jusqu'à 20 % des protéines totales cellulaires et la glycosylation et maturation des protéines recombinantes s'effectuent sans modification importante par rapport aux protéines natives (Massie et al., 1995). Finalement, les adénovirus sont faiblement pathogènes pour l'homme et les animaux, mais, pour encore plus de sécurité, un vecteur non-répliatif peut être utilisé.

Dans un premier temps, il a fallu vérifier et comparer les niveaux d'expression des deux hAdVreCs utilisés : hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq. Les résultats d'expression de la GFPq, servant de marqueurs des cellules infectées, d'IFI et de RIPA ont clairement démontré l'expression de la GP<sub>5</sub> dans les cellules 293 infectées par ces deux hAdVreCs. Ces résultats ont également mis en évidence une expression beaucoup plus importante du gène ORF5-SYN par rapport au gène ORF5-WT confirmant ainsi la traduction beaucoup plus importante de l'ARNm transcrit à partir du gène synthétique. De plus, le fait que dans les expériences de RIPA, le poids moléculaire des GP<sub>5</sub> codées par les gènes ORF5-WT et ORF5-SYN soit le même que celui de la GP<sub>5</sub> native suggérerait que ces trois protéines avaient subi des modifications post-traductionnelles similaires.

Par la suite, des porcelets ont été immunisés avec ces vecteurs recombinants par la voie intradermique. Ceux-ci ont été divisés en trois groupes; un groupe de porcelets témoins ayant été injectés avec l'hAdCMV/tTA, un groupe de porcelets ayant été injectés avec

l'hAdTR5/ORF5-WT/DC/GFPq et l'hAdCMV/tTA et un dernier groupe de porcelets ayant été injectés avec l'hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq et l'hAdCMV/tTA. Tous les animaux ont reçu une dose de rappel trente-trois jours plus tard et l'infection-défi a eu lieu un mois après le rappel. Cet infection-défi consistait en l'administration, par voie intranasale, d'une dose de  $10^{5,5}$  TCID<sub>50</sub> de virus IAF-Klop aux porcelets des différents groupes. Le mode d'inoculation et la dose virale ont été modifiés par rapport aux expériences précédentes, où l'inoculation d'une dose de  $10^7$  TCID<sub>50</sub> de virus se faisait par voie intratrachéale, afin de mimer des conditions se rapprochant le plus des conditions naturelles. Des prises de sang ont été prélevées deux semaines après la première immunisation, puis deux semaines après le rappel et, pour finir, dix et 24 jours après l'infection-défi. Au moment de la dernière prise de sang, les animaux furent euthanasiés et des échantillons de poumons ont été prélevés pour des fins d'analyses histologiques.

Les résultats des analyses histologiques s'avèrent négatifs dans tous les cas. En effet, aucune lésion pulmonaire importante ne fut observée chez les porcelets du groupe témoin, signifiant que ces animaux n'avaient pas développé les lésions typiques du SRRP. Ce résultat est probablement dû au fait que la voie d'inoculation avait été modifiée et la dose de VSRRP utilisée lors de l'infection-défi étaient 100 X inférieure à la dose utilisée lors des expériences antérieures. Ainsi, l'absence de lésions pulmonaires chez les animaux ayant été immunisés avec les vecteurs portant les gènes ORF5-WT ou ORF5-SYN ne permet pas d'énoncer de conclusion quant à l'effet protecteur de ces immunisations contre l'apparition des lésions ou contre l'établissement de la virémie, puisque ces phénomènes ne furent pas observés chez les animaux naïfs.

Toutes les analyses sérologiques effectuées sur les sérums récoltés avant l'infection-défi (pré) se sont avérées négatives. Ainsi, il semble que l'immunisation des porcelets avec les hAdvrecs exprimant les gènes ORF5-WT et ORF5-SYN n'ait pas engendré la synthèse d'Ac à des niveaux significatifs. Toutefois, les analyses effectuées sur les sérums prélevés chez les porcelets du groupe témoin (tTA) dix jours après l'inoculation de la souche IAF-Klop du VSRRP ont permis d'obtenir des résultats significatifs. En effet, les titres obtenus en IFI (entre 64 et  $>256 < 512$ ) et les valeurs du ratio E/P (0,49 à

1,05) pour le test ELISA indirecte de IDEXX confirment que l'infection-défi a permis l'infection de l'hôte et qu'elle a résulté en l'induction d'une réponse immunitaire humorale, bien qu'elle n'ait pas permis de reproduire le SRRP. Les valeurs élevées obtenues avec le test ELISA utilisant la protéine N comme source d'antigène, ainsi que l'obtention, en WB, de bandes correspondant à la protéine N pour les deux sérums présentant les titres d'IFI les plus élevés, sont une indication que les Ac présents dans ces sérums étaient principalement dirigés contre la protéine de la nucléocapside. Les résultats obtenus en WB pour les sérums collectés chez les porcelets du groupe témoin 28 jours après l'infection-défi étaient inattendus. En effet, selon la littérature, une réactivité contre les trois protéines structurales majeures du VSRRP (N, M et GP<sub>5</sub>), auraient du être obtenue, alors qu'une seule bande correspondant à la protéine N a été observée. Ce résultat est probablement la conséquence d'une dose trop faible de virus virulent administrée lors de l'infection-défi. En effet, le quantité de virus inoculé étant trop faible, la seule réponse immunitaire humorale significative à avoir eu lieu fut celle dirigée contre la protéine la plus antigénique du virion.

Les analyses par IFI et ELISA Herdcheck effectuées sur les sérums prélevés au dixième jour suivant l'infection-défi chez les porcelets ayant été immunisés avec l'hAdVrec portant le gène ORF5-WT ont révélé un faible niveau d'Ac. En effet, les titres obtenus en IFI (16 à >16<64) et les valeurs des ratios E/P (0,48 à 0,73) étaient plus faibles que ceux obtenus à partir des sérums du groupe de porcelets témoins. Les résultats du test ELISA spécifique à la protéine N étaient en accord avec les résultats des deux tests précédents indiquant que peu d'Ac étaient dirigés contre cette protéine. Les très faibles niveaux d'Ac obtenus sont probablement dû à l'établissement d'une réponse mémoire faible dirigée contre la GP<sub>5</sub>. Ceci a été confirmé par les résultats obtenus par les tests de WB. Au J10 de l'infection-défi, le premier sérum du groupe des porcelets immunisés contre l'ORF5-WT a démontré une faible réactivité contre la GP<sub>5</sub>, alors qu'à J28, les trois sérums de ce groupe de porcelets ont réagi contre cette protéine (deux faiblement et un fortement) alors qu'au même moment aucune réactivité contre la GP<sub>5</sub> n'a pu être démontrée à partir des sérums des porcelets du groupe témoin. Il est également intéressant de noter que les deux premiers sérums du groupe des porcelets immunisés

contre l'ORF5-WT ont présenté une réactivité contre la protéine N à J28, ce qui nous suggère qu'une réponse primaire contre le virion a été associée à la réponse mémoire contre la GP<sub>5</sub>.

Les sérums du groupe de porcelets immunisés contre l'ORF5-SYN, prélevés 10 jours après l'infection-défi, ont démontré des titres d'IFI (64 à >64<128) intermédiaires à ceux des deux groupes précédents. Par ailleurs, les résultats de l'ELISA anti-N indiquaient que leur réponse en Ac, anti-N était relativement importante, mais que la réponse humorale de ces porcelets n'était pas principalement dirigée contre cette protéine. Comme dans le cas du groupe des porcelets immunisés contre l'ORF5-WT, une réponse mémoire dirigée contre les déterminants antigéniques de la GP<sub>5</sub> a été établie suite aux immunisations avec l'ORF5-SYN, mais chez ces porcelets la réponse anti-GP<sub>5</sub> était beaucoup plus intense en réponse à l'infection-défi. En effet, les résultats obtenus par les tests WB effectués avec les sérums des porcelets de ce groupe, récoltés 10 jours après l'inoculation du VSRRP, ont révélé la présence d'Ac spécifiques à la GP<sub>5</sub> chez les trois porcelets de ce groupe. A J28, contrairement à ce qui a été observé pour les porcelets du groupe témoin et ceux ayant été immunisés avec l'ORF5-WT, aucune réactivité n'a été observée envers la protéine N. Par contre, une forte réactivité contre la GP<sub>5</sub> a été observée pour les sérums des 3 porcelets de ce groupe. Ainsi, les trois porcelets de ce groupe (ORF5-SYN) avaient développé une très bonne réponse mémoire envers la GP<sub>5</sub> mais pas contre les autres protéines du virion d'où ils n'ont même pas généré de réponse primaire contre ces dernières suite à l'infection-défi. Ceci peut s'expliquer par la présence de titres en Ac neutralisants très élevés (128 à 256) dans les sérums des porcelets de ce groupe, alors que ceux des autres groupes n'avaient pas généré des titres en Ac neutralisants significatifs. Il est fort probable qu'étant donné l'ampleur de la réponse mémoire anti-GP<sub>5</sub>, résultant en des titres élevés en Ac neutralisants, combinée à la faible dose de virus inoculée lors de l'infection-défi, celle-ci a permis aux porcelets de ce groupe d'éliminer le virus infectieux très rapidement, ce qui n'a pas permis la génération d'une réponse significative contre les autres protéines structurales du virion.

L'immunisation des porcelets avec un hAdVrec portant le gène ORF5-SYN s'est avérée plus efficace que celle réalisée avec un hAdVrec portant le gène ORF5-WT pour générer une réponse mémoire humorale contre les déterminants antigéniques associés à la production des Ac neutralisants. Ainsi, l'immunisation avec le gène ORF5-SYN, bien qu'elle n'ait pas permis de générer la synthèse d'Ac à des niveaux significatifs, a induit une réponse mémoire contre la GP<sub>5</sub>. Cependant, il est impossible de conclure quant à l'effet protecteur généré suite à ce type d'immunisation puisque l'infection-défi n'a pas engendrée le SRRP chez les animaux naïfs. Dans un avenir rapproché, cette expérience devra être recommencée en utilisant le mode d'inoculation intratrachéal et une dose de virus infectieux plus importante afin de vérifier l'efficacité de l'ORF5-SYN à générer une réponse humorale protégeant contre l'établissement des lésions et la persistance du virus au niveau des voies respiratoires.

Les résultats obtenus lors de la vaccination avec le virus inactivé au BEI ainsi que ceux obtenus suite aux essais d'immunisation génétique à l'aide d'adénovirus non-réplicatifs et inductibles portant le gène de l'ORF5 (Pirzadeh et Dea, 1998) ont permis de démontrer que la présence de titres élevés en Ac neutralisants est essentielle pour protéger les porcelets contre le SRRP. Toutefois, la seule présence de ces Ac n'est pas suffisante pour empêcher l'infection des animaux ainsi que pour inhiber totalement l'apparition des lésions pulmonaires. Il est probable que l'immunisation des porcelets avec l'hAdTR5/ORF5-SYN/DC/GFPq conduise à des résultats similaires ou légèrement supérieurs à ceux obtenus lors de ces expériences.

Pour une meilleure protection, la stimulation de l'immunité mucoale pourrait être essentielle. Il est connu que les hAdVrecs peuvent jouer un rôle important dans l'induction de l'immunité mucoale (Papp et al., 1998) puisqu'ils ont un tropisme pour les cellules lymphomonocytaires des système BALT et GALT (Rosenthal et al., 1996) et qu'ils ont la capacité d'infecter les muqueuses porcines (Torres et al., 1995). Il serait également intéressant d'évaluer et de déterminer l'impact de l'immunité cellulaire dans la protection contre l'infection par le VSRRP. Il a été démontré que la principale protéine du VSRRP impliquée dans l'induction de la réponse immunitaire à médiation

cellulaire est la protéine M (Bautista et al., 1999). La GP<sub>5</sub> est également impliquée, mais de façon moins importante. La co-immunisation de porcelets avec les protéines M et GP<sub>5</sub> recombinantes serait également une avenue envisageable. L'utilisation d'hAdVrecs pouvant exprimer constitutivement les protéines d'intérêt serait également une avenue intéressante puisqu'elle éliminerait l'obligation de procéder à une co-infection avec l'hAdCMV/tTA.

## **APPENDICE A**

**Increased proteolytic activity and matrix metalloprotease expression in lungs during infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus**

**Manon Girard, Patrick Cléroux, Pierre Tremblay, Serge Dea et Yves St-Pierre**

**Journal of General Virology (2001), 82 : 1253-1261**

Les travaux réalisés dans le cadre de cette publication ne sont pas directement liés, outre le fait qu'ils portent sur le VSRRP, aux autres résultats présentés dans ce mémoire. Toutefois, j'ai participé activement à la réalisation de ces expériences ayant conduit à la réalisation d'une publication dans la revue *Journal of General Virology* et je crois que l'ajout de cette publication en appendice de ce mémoire est pertinente. Ma contribution a tout d'abord été la récolte des PAMs, chez des porcelets de 3 à 4 semaines d'âge, et leur mise en culture en vue de procéder à deux passages successifs, sur ces cultures primaires, de la souche IAF-Klop afin d'en augmenter la virulence. Par la suite, j'ai été en charge de la préparation des stocks de virus virulent à inoculer aux animaux (gels-dégels des cellules infectées, clarification des surnageants et détermination des titres infectieux. Le Dr Serge Dea, Manon Girard et moi-même avons ensuite procédé à l'infection des porcelets en inoculant le surnageant infectieux par voie intratrachéale. Nous avons aussi procédé à l'euthanasie et au prélèvement du sérum et de divers organes des porcelets. Finalement, en compagnie du Dr Dea, j'ai procédé aux lavages broncho-alvéolaires (LBA) sur lesquelles les diverses analyses furent effectuées et à la préparation de virus purifié par ultracentrifugation isopycnique sur gradients de CsCl ayant servi de contrôle lors des analyses par RT-PCR, des tests d'ELISAs indirectes et des analyses des fonctions immunitaires.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Girard, M, Cléroux, P. Tremblay, P., Dea, S. St-Pierre, Y. (2001). Increased proteolytic activity and matrix metalloprotease expression in lungs during infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of General Virology*: 82, 1253-1261  
doi: 10.1099/0022-1317-82-6-1253

## RÉFÉRENCES

- ALBINA, E. (1997) "Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview." Vet Microbiol **55**(1-4): 309-16.
- ALBINA, E. (1997) "[Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection]." Vet Res **28**(4): 305-52.
- ALBINA, E., Y. LEFORBAN, T. BARON, J. P. PLANA DURAN et P. VANNIER (1992) "An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus." Ann Rech Vet **23**(2): 167-76.
- ALBINA, E., F. MADEC, R. CARIOLET et J. TORRISON (1994) "Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units." Vet Rec **134**(22): 567-73.
- ALBINA, E., L. PIRIOU, E. HUTET, R. CARIOLET et R. L'HOSPITALIER (1998) "Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)." Vet Immunol Immunopathol **61**(1): 49-66.
- ALLENDE, R., T. L. LEWIS, Z. LU, D. L. ROCK, G. F. KUTISH, A. ALI, A. R. DOSTER et F. A. OSORIO (1999) "North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions." J Gen Virol **80**(Pt 2): 307-15.
- ANONYMUS (1991) Porcine respiratory and reproductive syndrome. Meet PRRS-New Pig Dis, Comm Eur Commun.
- BARON, T., E. ALBINA, Y. LEFORBAN, F. MADEC, H. GUILMOTO, J. PLANA DURAN et P. VANNIER (1992) "Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation [published erratum appears in Ann Rech Vet 1992;23(3):335]." Ann Rech Vet **23**(2): 161-6.
- BAUTISTA, E. M., S. M. GOYAL, I. J. YOON, H. S. JOO et J. E. COLLINS (1993) "Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of

- porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody.” J Vet Diagn Invest **5**(2): 163-5.
- BAUTISTA, E. M., J. J. MEULENBERG, C. S. CHOI et T. W. MOLITOR (1996) “Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” Arch Virol **141**(7): 1357-65.
- BAUTISTA, E. M. et T. W. MOLITOR (1997) “Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine.” Viral Immunol **10**(2): 83-94.
- BAUTISTA, E. M., P. SUAREZ et T. W. MOLITOR (1999) “T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” Arch Virol **144**(1): 117-34.
- BENFIELD, D. A., E. NELSON, J. E. COLLINS, L. HARRIS, S. M. GOYAL, D. ROBISON, W. T. CHRISTIANSON, R. B. MORRISON, D. GORCYCA et D. CHLADEK (1992) “Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332).” J Vet Diagn Invest **4**(2): 127-33.
- BILODEAU, R., D. ARCHAMBAULT, S. A. VEZINA, R. SAUVAGEAU, M. FOURNIER et S. DEA (1994) “Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation.” Can J Vet Res **58**(4): 291-8.
- BILODEAU, R., S. DEA, R. A. SAUVAGEAU et G. P. MARTINEAU (1991) “Porcine reproductive and respiratory syndrome' in Quebec [letter] [see comments].” Vet Rec **129**(5): 102-3.
- BLANQUEFORT, P. (1995) “Évaluation globale du programme de lutte contre le Syndrome Dysgénique et Respiratoire Porcin dans les Pays de la Loire.” Épidémiologie et Santé Animale **28**: 47-60.
- BLOEMRAAD, M., E. P. DE KLUIJVER, A. PETERSEN, G. E. BURKHARDT et G. WENSVOORT (1994) “Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs.” Vet Microbiol **42**(4): 361-71.
- BOTNER, A., J. NIELSEN et V. BILLE-HANSEN (1994) “Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and

- experimental infection of pregnant gilts with the virus." Vet Microbiol **40**(3-4): 351-60.
- BROUWER, J., FRANKENA, K., DE JONG, M.F., VOETS, R., DIJKHUIZEN, A., VERHEIJDEN, J., KOMIJN, R.E. (1994) "PRRS : effect on herd performance after initial infection and risk analysis." Vet Q **16**: 95-100.
- CARMAN, S., SANFORD, S.E., DEA, S. (1996) Antibodies to PRRS virus in serum bank of Ontario swine (1978-1982). 14th Int Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy.
- CAVANAGH, D. (1997) "Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae." Arch Virol **142**(3): 629-33.
- CHOI, C., FLORES, L., JOHNSON, J.L., BAUTISTA, E.M., XIAO, J., MOLITOR, T.W. (1995) "Effect of maturation/activation stage of porcine macrophages to susceptibility on virus replication." Vet Immunol Symp **4**: 208.
- CHRISTIANSON, W. et H. JOO (1994) "Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review." Swine Health Production **2**: 10-28.
- CHRISTIANSON, W. T., C. S. CHOI, J. E. COLLINS, T. W. MOLITOR, R. B. MORRISON et H. S. JOO (1993) "Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses." Can J Vet Res **57**(4): 262-8.
- CHRISTIANSON, W. T., J. E. COLLINS, D. A. BENFIELD, L. HARRIS, D. E. GORCYCA, D. W. CHLADEK, R. B. MORRISON et H. S. JOO (1992) "Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows." Am J Vet Res **53**(4): 485-8.
- CHRISTOPHER-HENNINGS, J., E. A. NELSON, J. K. NELSON et D. A. BENFIELD (1997) "Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars." Am J Vet Res **58**(1): 40-5.
- CHRISTOPHER-HENNINGS, J., E. A. NELSON, J. K. NELSON, R. J. HINES, S. L. SWENSON, H. T. HILL, J. J. ZIMMERMAN, J. B. KATZ, M. J. YAEGER, C. C. CHASE et ET AL. (1995) "Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR." J Clin Microbiol **33**(7): 1730-4.

- COLLINS, J. E., D. A. BENFIELD, W. T. CHRISTIANSON, L. HARRIS, J. C. HENNINGS, D. P. SHAW, S. M. GOYAL, S. MCCULLOUGH, R. B. MORRISON, H. S. JOO et ET AL. (1992) "Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs." J Vet Diagn Invest 4(2): 117-26.
- CONZELMANN, K. K., N. VISSER, P. VAN WOENSEL et H. J. THIEL (1993) "Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group." Virology 193(1): 329-39.
- COOPER, V. L., A. R. DOSTER, R. A. HESSE et N. B. HARRIS (1995) "Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens." J Vet Diagn Invest 7(3): 313-20.
- DEA, S., R. BILODEAU, R. ATHANASEOUS, R. A. SAUVAGEAU et G. P. MARTINEAU (1992) "PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus [letter]." Vet Rec 130(8): 167.
- DEA, S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU et G. P. MARTINEAU (1991) "Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus." J Vet Diagn Invest 3(4): 275-82.
- DEA, S., C. A. GAGNON, H. MARDASSI et G. MILANE (1996) "Antigenic variability among strains of PRRs virus as defined by monoclonal antibody to the matrix protein." J Clin Microbiol 34: 1488-1493.
- DEA, S., C. A. GAGNON, H. MARDASSI, B. PIRZADEH et D. ROGAN (2000a) "Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates." Arch Virol 145(4): 659-88.
- DEA, S., L. WILSON, D. THERRIEN et E. CORNAGLIA (2000b) "Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant E. coli-expressed nucleocapsid protein as antigen." J Virol Methods 87(1-2): 109-22.

- DEN BOON, J. A., E. J. SNIJDER, E. D. CHIRNSIDE, A. A. DE VRIES, M. C. HORZINEK et W. J. SPAAN (1991) "Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily." J Virol **65**(6): 2910-20.
- DONE, S. H., PATON, D.J. (1995) "Porcine reproductive and respiratory syndrome : clinical disease, pathology and immunosuppression." Vet Rec **136**: 32-35.
- DREW, T. W., J. P. LOWINGS et F. YAPP (1997) "Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK." Vet Microbiol **55**(1-4): 209-21.
- DUAN, X., H. J. NAUWYNCK, H. W. FAVOREEL et M. B. PENSAERT (1998) "Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages." J Virol **72**(5): 4520-3.
- FICHTNER, D., J. BEYER, D. LEOPOLDT, H. SCHIRRMIEIER, S. BERGMANN et U. FISCHER (1993) "[Experimental reproduction of the respiratory form of infection with the agent of epidemic late abortion of swine]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **106**(5): 145-9.
- GAGNON, C. A. et S. DEA (1998) "Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes." Can J Vet Res **62**(2): 110-6.
- GODENY, E. K., L. CHEN, S. N. KUMAR, S. L. METHVEN, E. V. KOONIN et M. A. BRINTON (1993) "Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV)." Virology **194**(2): 585-96.
- GONIN, P., H. MARDASSI, C. A. GAGNON, B. MASSIE et S. DEA (1998) "A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Arch Virol **143**(10): 1927-40.
- GONIN, P., B. PIRZADEH, C. A. GAGNON et S. DEA (1999) "Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein." J Vet Diagn Invest **11**(1): 20-6.
- GORBALENYA, A. E., KOONIN, E.V., DONCHENKO, A.P., BLINOV, V.M. (1989) "Coronavirus genome : prediction of putative functional domains in the non-

- structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis.” Nucleic Acids Res **17**: 4847-4861.
- GORDON, S. C. (1992) “Effects of blue-eared pig disease on a breeding and fattening unit.” Vet Rec **130**(23): 513-4.
- GOYAL, S. M. (1993) “Porcine reproductive and respiratory syndrome.” J Vet Diagn Invest **5**(4): 656-64.
- HALBUR, P. G., L. D. MILLER, P. S. PAUL, X. J. MENG, E. L. HUFFMAN et J. J. ANDREWS (1995a) “Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs.” Vet Pathol **32**(2): 200-4.
- HALBUR, P. G., P. S. PAUL, M. L. FREY, J. LANDGRAF, K. EERNISSE, X. J. MENG, M. A. LUM, J. J. ANDREWS et J. A. RATHJE (1995b) “Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus.” Vet Pathol **32**(6): 648-60.
- HALBUR, P. G., P. S. PAUL, X. J. MENG, M. A. LUM, J. J. ANDREWS et J. A. RATHJE (1996) “Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model.” J Vet Diagn Invest **8**(1): 11-20.
- HILL, H. (1990) Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome). Proc Mystery Swine Dis Comm Meet, Livest Conserv Inst.
- HOPPER, S. A., M. E. WHITE et N. TWIDDY (1992) “An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain.” Vet Rec **131**(7): 140-4.
- KAPUR, V., M. R. ELAM, T. M. PAWLOVICH et M. P. MURTAUGH (1996) “Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States.” J Gen Virol **77**(Pt 6): 1271-6.
- KATZ, J. B., A. L. SHAFER, K. A. EERNISSE, J. G. LANDGRAF et E. A. NELSON (1995) “Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the

- carboxyterminal portion of viral open reading frame 3.” Vet Microbiol **44**(1): 65-76.
- KEFFABER, K. K. (1989) “Reproductive failure of unknown etiology.” A.A.S.P. Newsletter **1**: 1-10.
- KIM, H. S., J. KWANG, I. J. YOON, H. S. JOO et M. L. FREY (1993) “Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line.” Arch Virol **133**(3-4): 477-83.
- KOZAK, M. (1987) “At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells.” J Mol Biol **196**(4): 947-50.
- KREUTZ, L. C. (1998) “Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism.” Virus Res **53**(2): 121-8.
- KREUTZ, L. C. et M. R. ACKERMANN (1996) “Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway.” Virus Res **42**(1-2): 137-47.
- LABARQUE, G. G., H. J. NAUWYNCK, K. VAN REETH et M. B. PENZAERT (2000) “Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs.” J Gen Virol **81**(Pt 5): 1327-34.
- LAGER, K. M. et M. R. ACKERMANN (1994) “Pulmonary lesions in fetuses exposed in utero to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” J Vet Diagn Invest **6**(4): 480-3.
- LAGER, K. M., W. L. MENGELING et S. L. BROCKMEIER (1996a) “Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts.” Vet Rec **138**(10): 227-8.
- LAGER, K. M., MENGELING, W.L., BROCKMEIER, S.L. (1996b) Pathogenesis of fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection during early and late gestation. Proc 14th Int Pig eterinary Society Congress, Bologna, Italy.
- LAROCHELLE, R., H. MARDASSI, S. DEA et R. MAGAR (1996) “Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe.” J Vet Diagn Invest **8**(1): 3-10.

- LINDHAUS, W. et B. LINDHAUS (1991) "Rätselhafte Schweinekrankheit." Prakt. Tarzt. **5**: 423-425.
- LOEMBA, H. D., S. MOUNIR, H. MARDASSI, D. ARCHAMBAULT et S. DEA (1996) "Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Arch Virol **141**(3-4): 751-61.
- LOULA, T. (1991) "Mystery pig Disease." Agri-Practice **12**: 23-34.
- MAGAR, R., Y. ROBINSON, C. DUBUC et R. LAROCHELLE (1995) "Isolation and experimental oral transmission in pigs of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate." Adv Exp Med Biol **380**: 139-44.
- MARDASSI, H., R. ATHANASSIOUS, S. MOUNIR et S. DEA (1994a) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome." Can J Vet Res **58**(1): 55-64.
- MARDASSI, H., P. GONIN, C. A. GAGNON, B. MASSIE et S. DEA (1998) "A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form." J Virol **72**(8): 6298-306.
- MARDASSI, H., B. MASSIE et S. DEA (1996) "Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Virology **221**(1): 98-112.
- MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA (1994b) "Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." J Gen Virol **75**(Pt 3): 681-5.
- MARDASSI, H., S. MOUNIR et S. DEA (1995) "Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain." Arch Virol **140**(8): 1405-18.
- MARTINEAU, G. P., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU, C. MOORE et S. DEA (1991) Syndrome Hyperthermie-anorexie-avortement de la truie et de pneumonie

- interstitielle virale au Québec. Journées de Recherche Porcine en France. **23**: 179-188.
- MARTINEAU, G. P., BILODEAU, R., SAUVAGEAU, R., DEA, S. (1992) “Le syndrome reproducteur et respiratoire porcine (SRRP) au Québec : Données cliniques, pathologiques et virologiques.” Journées rech. porcine en France(24): 127-136.
- MENG, X. J. (2000) “Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development.” Vet Microbiol **74**(4): 309-29.
- MENG, X. J., P. S. PAUL, P. G. HALBUR et M. A. LUM (1995a) “Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe.” Arch Virol **140**(4): 745-55.
- MENG, X. J., P. S. PAUL, P. G. HALBUR et I. MOROZOV (1995b) “Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” J Gen Virol **76**(Pt 12): 3181-8.
- MENGELING, W. L., K. M. LAGER et A. C. VORWALD (1995) “Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome.” J Vet Diagn Invest **7**(1): 3-16.
- MENGELING, W. L., A. C. VORWALD, K. M. LAGER et S. L. BROCKMEIER (1996) “Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure.” Am J Vet Res **57**(6): 834-9.
- MENGELING, W. L., A. C. VORWALD, K. M. LAGER, D. F. CLOUSER et R. D. WESLEY (1999) “Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” Am J Vet Res **60**(3): 334-40.
- MEULENBERG, J. J. (2000) “PRRSV, the virus.” Vet Res **31**(1): 11-21.
- MEULENBERG, J. J., J. N. BOS-DE RUIJTER, R. VAN DE GRAAF, G. WENSVOORT et R. J. MOORMANN (1998) “Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” J Virol **72**(1): 380-7.

- MEULENBERG, J. J., E. J. DE MEIJER et R. J. MOORMANN (1993a) "Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence." J Gen Virol **74**(Pt 8): 1697-701.
- MEULENBERG, J. J., M. M. HULST, E. J. DE MEIJER, P. L. MOONEN, A. DEN BESTEN, E. P. DE KLUYVER, G. WENSVOORT et R. J. MOORMANN (1993b) "Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV." Virology **192**(1): 62-72.
- MEULENBERG, J. J. et A. PETERSEN-DEN BESTEN (1996) "Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles." Virology **225**(1): 44-51.
- MEULENBERG, J. J., A. PETERSEN-DEN BESTEN, E. P. DE KLUYVER, R. J. MOORMANN, W. M. SCHAAPER et G. WENSVOORT (1995) "Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus." Virology **206**(1): 155-63.
- MEULENBERG, J. J., A. P. VAN NIEUWSTADT, A. VAN ESSEN-ZANDBERGEN et J. P. LANGEVELD (1997) "Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus." J Virol **71**(8): 6061-7.
- MOLENKAMP, R., H. VAN TOL, B. C. ROZIER, Y. VAN DER MEER, W. J. SPAAN et E. J. SNIJDER (2000) "The arterivirus replicase is the only viral protein required for genome replication and subgenomic mRNA transcription [In Process Citation]." J Gen Virol **81**(Pt 10): 2491-6.
- MOROZOV, I., X. J. MENG et P. S. PAUL (1995) "Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Arch Virol **140**(7): 1313-9.
- MORRISON, R. B., J. E. COLLINS, L. HARRIS, W. T. CHRISTIANSON, D. A. BENFIELD, D. W. CHLADEK, D. E. GORCYCA et H. S. JOO (1992) "Serologic evidence incriminating a recently isolated virus (ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS)." J Vet Diagn Invest **4**(2): 186-8.

- MURTAUGH, M. P., M. R. ELAM et L. T. KAKACH (1995) "Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus." Arch Virol **140**(8): 1451-60.
- NAUWYNCK, H. J., X. DUAN, H. W. FAVOREEL, P. VAN OOSTVELDT et M. B. PENSAERT (1999) "Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis." J Gen Virol **80**(Pt 2): 297-305.
- NELSEN, C. J., M. P. MURTAUGH et K. S. FAABERG (1999) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents." J Virol **73**(1): 270-80.
- NELSON, E. A., J. CHRISTOPHER-HENNINGS et D. A. BENFIELD (1994) "Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus." J Vet Diagn Invest **6**(4): 410-5.
- NELSON, E. A., J. CHRISTOPHER-HENNINGS, T. DREW, G. WENSVOORT, J. E. COLLINS et D. A. BENFIELD (1993) "Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies." J Clin Microbiol **31**(12): 3184-9.
- OHLINGER, V. F., F. WEILAND, B. HAAS, N. VISSER, R. AHL, T. C. METENLEITTE, E. WEILAND, H. J. RZIHA, A. SAALMULLER et O. C. STRAUB (1991) "The epidemic late abortion in pigs: a contribution to the etiology of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)." Tierärztl Umschau **46**: 703-708.
- PIRZADEH, B. et S. DEA (1997) "Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants." J Gen Virol **78**(Pt 8): 1867-73.
- PIRZADEH, B. et S. DEA (1998) "Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." J Gen Virol **79**(Pt 5): 989-99.
- PIRZADEH, B., C. A. GAGNON et S. DEA (1998) "Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein." Can J Vet Res **62**(3): 170-7.

- PLAGEMANN, P. G. W. (1996) Lactate dehydrogenase elevating virus and related viruses. Field's Virology. B. N. Fields, Knipe, D.M., Howley, P.M. Philadelphia, Lippincott-Raven: 1105-1120.
- PLANA DURAN, J., CLIMENT, I., SARRASECA, J., URNIZA, A.,CORTES, E., VELA, C., CASAL, J.I. (1997) "Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection." Virus Genes **14**: 19-29.
- PLANA, J., M. VAYREDA, J. VILARRASA, M. BASTONS, R. ROSELL, M. MARTINEZ, A. SAN GABRIEL, J. PUJOLS, J. L. BADIOLA, J. A. RAMOS et ET AL. (1992) "Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease." Vet Microbiol **33**(1-4): 203-11.
- POL, J. M., J. E. VAN DIJK, G. WENSVOORT et C. TERPSTRA (1991) "Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS))." Vet Q **13**(3): 137-43.
- POL, J. M. et F. WAGENAAR (1992) "Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages." Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. **4**: 29.
- POL, J. M., F. WAGENAAR et J. E. REUS (1997) "Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains." Vet Microbiol **55**(1-4): 203-8.
- PRIETO, C., R. SANCHEZ, S. MARTIN-RILLO, P. SUAREZ, I. SIMARRO, A. SOLANA et J. M. CASTRO (1996a) "Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Vet Rec **138**(22): 536-9.
- PRIETO, C., SUAREZ, P., MARTIN-RILLO, S., SIMARRO, I., SOLANA, A., CASTRO, J.M. (1996b) "Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilized ova in vitro." Theriogenology **46**: 687-693.
- PRINGLE, C. R. (1996) "a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem." Arch Virol(141): 2251-2256.
- ROSSOW, K. D. (1998) "Porcine reproductive and respiratory syndrome." Vet Pathol **35**: 1-20.

- ROSSOW, K. D., E. M. BAUTISTA, S. M. GOYAL, T. W. MOLITOR, M. P. MURTAUGH, R. B. MORRISON, D. A. BENFIELD et J. E. COLLINS (1994a) "Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs." J Vet Diagn Invest 6(1): 3-12.
- ROSSOW, K. D., J. E. COLLINS, S. M. GOYAL, E. A. NELSON, J. CHRISTOPHER-HENNINGS et D. A. BENFIELD (1995) "Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs." Vet Pathol 32(4): 361-73.
- ROSSOW, K. D., MORRISON, R.B., GOYAL, S.M., SINGH, G.S., COLLINS, J.E. (1994b) "Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus." J Vet Diagn Invest 6: 368-371.
- ROTTIER, P. J., G. W. WELLING, S. WELLING-WESTER, H. G. NIESTERS, J. A. LENSTRA et B. A. VAN DER ZEIJST (1986) "Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1." Biochemistry 25(6): 1335-9.
- SAMSOM, J. N., T. G. DE BRUIN, J. J. VOERMANS, J. J. MEULENBERG, J. M. POL et A. T. BIANCHI (2000) "Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8(+) cells." J Gen Virol 81(Pt 2): 497-505.
- SHEN, S., J. KWANG, W. LIU et D. X. LIU (2000) "Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion." Arch Virol 145(5): 871-83.
- SHIMIZU, M., S. YAMADA, K. KAWASHIMA, S. OHASHI, S. SHIMIZU et T. OGAWA (1996) "Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus." Vet Immunol Immunopathol 50(1-2): 19-27.
- SIRINARUMITR, T., Y. ZHANG, J. P. KLUGE, P. G. HALBUR et P. S. PAUL (1998) "A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo." J Gen Virol 79(Pt 12): 2989-95.

- SNIJDER, E. J. et J. J. MEULENBERG (1998) "The molecular biology of arteriviruses." J Gen Virol **79**(Pt 5): 961-79.
- SNIJDER, E. J., H. VAN TOL, K. W. PEDERSEN, M. J. RAAMSMAN et A. A. DE VRIES (1999) "Identification of a novel structural protein of arteriviruses." J Virol **73**(8): 6335-45.
- SNIJDER, E. J., WASSENAAR, A.L.M., SPAAN, W.J.M. (1992) "The 5' end of the equine arteritis virus replicase gene encodes a papainlike cysteine protease." Journal of virology **66**: 7040-7048.
- SNIJDER, E. J., WASSENAAR, A.L.M., SPAAN, W.J.M., GORBALENYA, A.E. (1995) "The arterivirus nsp2 protease : an unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases." Journal of biological chemistry **270**: 16671-16676.
- STOCKHOFF-ZURWEIDEN, N., NAVARRE CAMARRO, J.A., GROSSE-BEILAGE, E., CHAVEZ, J., POHLENZ, J. (1993) "Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)." J Vet Med B **40**: 261-271.
- SUAREZ, P., M. DIAZ-GUERRA, C. PRIETO, M. ESTEBAN, J. M. CASTRO, A. NIETO et J. ORTIN (1996a) "Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis." J Virol **70**(5): 2876-82.
- SUAREZ, P., R. ZARDOYA, M. J. MARTIN, C. PRIETO, J. DOPAZO, A. SOLANA et J. M. CASTRO (1996b) "Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes." Virus Res **42**(1-2): 159-65.
- SUR, J. H., V. L. COOPER, J. A. GALEOTA, R. A. HESSE, A. R. DOSTER et F. A. OSORIO (1996) "In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection." J Clin Microbiol **34**(9): 2280-6.
- SUR, J. H., A. R. DOSTER, J. S. CHRISTIAN, J. A. GALEOTA, R. W. WILLS, J. J. ZIMMERMAN et F. A. OSORIO (1997) "Porcine reproductive and respiratory

- syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis.” J Virol **71**(12): 9170-9.
- SUR, J. H., A. R. DOSTER et F. A. OSORIO (1998) “Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” Vet Pathol **35**(6): 506-14.
- SWENSON, S. L., H. T. HILL, J. J. ZIMMERMAN, L. E. EVANS, J. G. LANDGRAF, R. W. WILLS, T. P. SANDERSON, M. J. MCGINLEY, A. K. BREVIK, D. K. CISZEWSKI et ET AL. (1994) “Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars.” J Am Vet Med Assoc **204**(12): 1943-8.
- TERPSTRA, C., G. WENSVOORT et J. M. POL (1991) “Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled.” Vet Q **13**(3): 131-6.
- THERRIEN, D., Y. ST-PIERRE et S. DEA (2000) “Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells.” Arch Virol **145**(6): 1099-116.
- VAN DINTEN, L. C., J. A. DEN BOON, A. L. WASSENAAR, W. J. SPAAN et E. J. SNIJDER (1997) “An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation that abolishes discontinuous mRNA transcription.” Proc Natl Acad Sci U S A **94**(3): 991-6.
- VAN DINTEN, L. C., S. RENSEN, A. E. GORBALENYA et E. J. SNIJDER (1999) “Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication.” J Virol **73**(3): 2027-37.
- VAN DINTEN, L. C., VAN TOL, H., GORBALENYA, A.E., SNIJDER, E.J. (2000) “The predicted metal-binding region of the arterivirus helicase protein is involved in subgenomic mRNA synthesis, genome replication and virion biogenesis.” Journal of virology **74**(11): 5213-5223.
- VAN DINTEN, L. C., WASSENAAR, A.L.M., GORBALENYA, A.E., SPAAN, W.J.M., SNIJDER, E.J. (1996) “Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b

- protein : identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains.” Journal of virology **70**: 6625-6633.
- VAN NIEUWSTADT, A. P., J. J. MEULENBERG, A. VAN ESSEN-ZANBERGEN, A. PETERSEN-DEN BESTEN, R. J. BENDE, R. J. MOORMANN et G. WENSVOORT (1996) “Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion.” J Virol **70**(7): 4767-72.
- VAN REETH, K., LABARQUE, G., NAUWYNCK, H., PENSAERT, M. (1999) “Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections : correlations with pathogenicity.” Res Vet Sci **67**: 47-52.
- VEZINA, S. A., H. LOEMBA, M. FOURNIER, S. DEA et D. ARCHAMBAULT (1996) “Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.” Can J Vet Res **60**(2): 94-9.
- VOICU, I. L., A. SILIM, M. MORIN et M. A. ELAZHARY (1994) “Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes.” Vet Rec **134**(16): 422-3.
- WEILAND, E., M. WIECZOREK-KROHMER, D. KOHL, K. K. CONZELMANN et F. WEILAND (1999) “Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4.” Vet Microbiol **66**(3): 171-86.
- WENSVOORT, G., E. P. DE KLUYVER, J. M. POL, F. WAGENAAR, R. J. MOORMANN, M. M. HULST, R. BLOEMRAAD, A. DEN BESTEN, T. ZETSTRA et C. TERPSTRA (1992) “Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad.” Vet Microbiol **33**(1-4): 185-93.
- WENSVOORT, G., C. TERPSTRA, J. M. POL, E. A. TER LAAK, M. BLOEMRAAD, E. P. DE KLUYVER, C. KRAGTEN, L. VAN BUITEN, A. DEN BESTEN, F. WAGENAAR et ET AL. (1991) “Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus.” Vet Q **13**(3): 121-30.

- WHITE, M. (1991) "Blue ear disease of pigs." Vet Rec **128**: 574.
- WU, W. H., J. CHRISTOPHER-HENNINGS et E. A. NELSON (2000) Expression of a small structural protein from ORF2 transcript of PRRSV. VIIIth International Symposium on Nidoviruses (Coronaviruses and Arteriviruses). Lake Harmony, Pennsylvania, USA.
- YOON, I. J., H. S. JOO, W. T. CHRISTIANSON, H. S. KIM, J. E. COLLINS, J. H. CARLSON et S. A. DEE (1992a) "Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome." J Vet Diagn Invest **4**(2): 139-43.
- YOON, I. J., H. S. JOO, W. T. CHRISTIANSON, H. S. KIM, J. E. COLLINS, R. B. MORRISON et G. D. DIAL (1992b) "An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera." J Vet Diagn Invest **4**(2): 144-7.
- YOON, I. J., H. S. JOO, S. M. GOYAL et T. W. MOLITOR (1994) "A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera." J Vet Diagn Invest **6**(3): 289-92.
- YOON, I. J., JOO, H.S., CHRISTIANSON, W.T., KIM, H.S., COLLINS, J.E., MORRISON, R.B., DIAL, G.D. (1992c) Serologic response of pigs following experimental and natural infection with virus of epidemic abortion and respiratory syndrome. 12th Int pig veterinary Society Congress, The Hague, The Netherlands.
- YOON, K. J., L. L. WU, J. J. ZIMMERMAN, H. T. HILL et K. B. PLATT (1996) "Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs." Viral Immunol **9**(1): 51-63.
- YOON, K. J., J. J. ZIMMERMAN, S. L. SWENSON, M. J. MCGINLEY, K. A. EERNISSE, A. BREVIK, L. L. RHINEHART, M. L. FREY, H. T. HILL et K. B. PLATT (1995) "Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection." J Vet Diagn Invest **7**(3): 305-12.

ZHANG, Y., R. D. SHARMA et P. S. PAUL (1998) "Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus." Vet Microbiol **63**(2-4): 125-36.

ZIMMERMAN, J., SANDERSON, T., EERNISSE, K., ET AL. (1992) "Transmission of SIRS virus in convalescent animals to commingled penmates under experimental conditions." Am Assoc Swine Pract Newsl **4**: 25.