VÉRONIC FORTIN

PRODUCTION *IN VITRO* DE TNF PAR DES CELLULES MONONUCLÉÉES DU SANG DE PORC EN PRÉSENCE DE PARVOVIRUS PORCIN

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

AVRIL 2000
INRS - INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

À mes parents,

Denise et Jean-Paul,

À Pierre,

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES iii

LISTE DES FIGURES v

LISTE DES TABLEAUX vii

LISTE DES ABRÉVIATIONS viii

SOMMAIRE x

INTRODUCTION 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4

1. Défenses antivirales 5
   1.1 Monocytes / Macrophages (Mo/Mϕ) 8
2. Facteur nécrosant des tumeurs (TNF) 12
   2.1 Protéine TNF 12
   2.2 Récepteurs 14
   2.3 Cellules productrices, et inducteurs, du TNF 15
   2.4 Effets biologiques du TNF 16
   2.5 Mécanismes d'action du TNF 17
3. Oxyde d'azote 18
4. Parvovirus 20
4.1 Généralités 20
   4.1.1 Structure et génome 20
   4.1.2 Infection des porcs 23
4.2 Pathologie et immunologie 23
5. Objectifs de la recherche 29

APPROCHE EXPÉRIMENTALE 30

1. Préparation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) 31
2. Stimulation des PBMC 31
3. Analyse de l'expression des ARNm 33

3.1 Extraction des ARNm 33
3.2 RT-PCR 34
3.2.1 Réaction de transcription inverse 34
3.2.2 Amorces utilisées pour la réaction PCR 35
3.2.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec et sans standard interne 36
3.3 Calculs des MIMICs 40
4. Dosage du TNF bio-actif 43
5. Dosage du monoxide d'azote 46
6. Utilisation d'une lignée continue de macrophages 46
RÉSULTATS 49
1. Effet dose-réponse du PPV sur l'expression de l'ARNm: méthode du PCR semi-quantitatif 50
2. Effet dose-réponse du PPV sur l'expression de l'ARNm: évaluation quantitative par PCR, à l'aide d'un standard interne 59
3. Effet dose-réponse du PPV sur la production de TNF bio-actif 62
4. Effet dose-réponse du PPV sur la production de NO 77
5. Effet dose-réponse du PPV sur la lignée de macrophages murins RAW 264.7 77
DISCUSSION 80
1. Effet du PPV sur l'expression de l'ARNm et la production de TNF bio-actif 81
2. Effet du PPV sur la production de NO 86
3. Effet du PPV sur la lignée de macrophages de souris RAW 264.7 87
4. Propositions d'orientation de futures recherches 88
CONCLUSION 92
REMERCIEMENTS 95
BIBLIOGRAPHIE 97
ANNEXE 107

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Interactions de différentes cellules et cytokines lors de la réponse immunitaire 10
Figure 2: Représentation de la structure de la capside du parvovirus canin 22
Figure 3: Construction d'un standard interne (MIMIC) 38
Figure 4: Exemple de graphique lors de la quantification de l'ARNm du gène TNF à l'aide du MIMIC 41
Figure 5: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF dans les cellules mononucléées du sang après 6 h de culture avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2, en présence ou en absence de LPS. 53
Figure 6: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF dans les cellules mononucléées du sang après 6 h de culture avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2 ou Kresse, en absence de LPS. 55
Figure 7: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF dans les cellules mononucléées du sang après 6 h de culture avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2 ou Kresse, en absence de LPS. 57
Figure 8: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF, par la technique du MIMIC, dans les cellules monomucléées du sang après 6 h de culture avec des concentration variables de parvovirus des souches NADL-2 ou Kresse, en présence ou en absence de LPS. 60
Figure 9: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 6 h avec des concentrations variables de parvovirus des souches NADL-2 ou Kresse, en présence de LPS. 64
Figure 10: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées pendant 3 h, 6 h et 12 h avec des concentrations variables de parvovirus porcin de la souche NADL-2. 66

Figure 11: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 1 h 30 avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2. 68
Figure 12: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 3 h avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2. 70
Figure 13: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 6 h avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2. 72
Figure 14: Comparaison des mesures du TNF bio-actif et du TNF total dans des surnageants de PBMC de porc cultivés durant 6 h en présence de LPS et de différentes concentrations de parvovirus des souches NADL-2 et Kresse. .75
Figure 15: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules RAW 264.7 cultivées pendant 3 h ou 6 h avec des concentrations variables de parvovirus des souches NADL-2 et Kresse, en présence de LPS. 78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Particularités de différentes souches virales de PPV.....25
Tableau 2: Différences entre les génomes de NADL-2 et de Kresse.....27

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.: acide aminé

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

am: attomole

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messager

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: cellules présentatrice d'antigène

CPV: "canine parvovirus", parvovirus canin

CSF: "Colony stimulating factor", facteur stimulant des colonies

DD: "death domain"

DEPC: diéthylpyrocarbonate

D.O.: densité optique

FPV: "feline parvovirus", parvovirus félin

G3PDH: glycéraldéhyde phosphate-3 déhydrogénase

G-CSF: "granulocyte colony-stimulating-factor", facteur stimulant des colonies des granulocytes

GM-CSF: "granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages

KRV: "Kilham rat virus"

HEPES: "(N-2-hydroxyethylpiperazine)N-2-ethane sulfonic acid"

IFN: interféron

Ii: "invariant chain": chaîne invariante

IL: interleukine

kb: kilobase

LPS: lipopolysaccharide

M-CSF: "macrophage colony-stimulating-factor", facteur stimulant des colonies de macrophages

mg: milligramme

ml: millilitre

Mo: monocyte

Mϕ: macrophage

MVM: "minute virus of mice"

NF-κB: "nuclear factor-kappa B"

ng: nanogramme

NK: "natural killer"

NO: "nitric oxide", oxyde d'azote

NS: protéine non-structurale

ORF: "open reading frame", cadre de lecture ouvert

PBMC: "peripheral blood mononuclear cells", cellules mononucléées du sang périphérique

PBS: "Phosphate Buffered Saline", solution saline tamponnée avec du phosphate

PCR: "Polymerase Chain Reaction", réaction en chaîne catalysée par la polymérase

PPV: "Porcine Parvovirus", parvovirus porcin

RT-PCR: "Reverse-Transcriptase Polymerase-Chain-Reaction"

TAP: "transporter associated with antigen processing": transporteur associé à l'antigène

TNF: "Tumor Necrosis Factor", facteur nécrosant des tumeurs

TNFR:"Tumor Necrosis Factor Receptor", récepteur du facteur nécrosant des tumeurs

TNFRSF: "Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily", superfamille des récepteurs du facteur nécrosant des tumeurs

VP: "viral protein", protéine virale

SOMMAIRE

Le parvovirus porcin (PPV) cause d'importants problèmes chez les truies en gestation, tels que: l'avortement spontané, la momification, la mort embryonnaire et la stérilité. Les différentes souches de PPV n'ont pas toutes la même virulence. Par exemple, il a été démontré que la souche *non-virulente* NADL-2 ne produit ces effets que chez les fœtus non-immunocompétents, lors d'une infection expérimentale dans l'utérus. Par contre, la souche *virulente* Kresse est pathologique lors d'infection par voie orale et utérine, même chez les fœtus immunocompétents. Les études structure-fonction effectuées dans le laboratoire du Dr Peter Tijssen ont permis de mettre en évidence une légère différence structurale (cinq acides aminés) entre les souches NADL-2 et Kresse. Il n'existe présentement aucune étude comparative de ces souches, en ce qui concerne leur action sur le système immunitaire. Des suspensions de PBMC de porcs ont été cultivées en présence de matériel viral vivant ou tué et la réponse en cytokine pro-inflammatoire a été évaluée: activation du gène codant pour le TNF (ARNm) et sécrétion de TNF dans le surnageant de culture en présence d'un stimulateur de ces cellules (LPS) ou en son absence.

Du matériel viral tué ou vivant est capable d'activer le gène codant du TNF, même en absence LPS. Par contre, en l'absence de LPS, aucune sécrétion de TNF n'a pu être observée. En présence de LPS, les quantités de TNF sécrété ont varié assez considérablement d'un porc à l'autre. Ces expériences montrent que le TNF peut être modulé par le PPV, au moins chez certains individus, mais aucune différence entre les souches NADL-2 et Kresse n'a pu être établie.

INTRODUCTION

Le parvovirus porcin (PPV) est l'agent impliqué dans divers troubles de fertilité chez les truies en gestation. Ces complications se traduisent par des fœtus mort-nés, des momifications de fœtus, des morts d'embryons ou bien par des problèmes de fertilité chez la truie (Dunne, *et al.*, 1965; Mengeling *et al.*, 1975). Le nombre de porcelets menés à terme chez une truie infectée est donc réduit, comparé au nombre de porcelets d'une gestation normale. Ceci entraîne des pertes économiques considérables pour les éleveurs de porcs. Il existe des vaccins mais ceux-ci ne protègent pas totalement. Par exemple, dans un groupe expérimental de truies immunisées à l'aide d'une préparation virale inactivée d'une souche de PPV en présence d'adjuvant et par la suite infectées avec la même souche vivante, le taux de mortalité a été réduit à 10,1%. Chez les truies qui n'avaient pas été préalablement immunisées, le taux de mortalité fut de 70,5% (Gualandi *et al.*, 1992).

Par ailleurs, plusieurs souches de PPV ont été identifiées et il a été démontré qu'elles n'ont pas toutes les mêmes propriétés. Plusieurs recherches sont présentement effectuées afin de comprendre les relations entre la structure et plusieurs fonctions telles que le cycle infectieux, le tropisme cellulaire et tissulaire et le spectre d'hôtes. Ce sont ces enjeux que le laboratoire du Dr Peter Tijssen et ceux de ses collaborateurs tentent de résoudre. Mais très peu d'études portent sur la réponse immunitaire contre le PPV et ses différentes souches. Ces études sont importantes afin de comprendre comment agit le système immunitaire lors d'un infection au parvovirus porcin et ainsi pouvoir se munir de stratégies de vaccination plus efficace.

Les quelques études portant sur l'immunologie du parvovirus mentionnent que la quantité de TNF, une cytokine pro-inflammatoire produite en majorité par

les monocytes et les macrophages, peut être modulée lors d'une infection. Le TNF peut aussi être impliqué dans la défense antivirale.

Les deux principaux objectifs de ce travail étaient: 1) évaluer la réponse immunitaire du PPV en mesurant la quantité de transcrits d'ARNm du TNF, ainsi que la sécrétion de TNF dans le surnageant, à partir de cultures de cellules mononucléées du sang périphérique, après exposition au PPV 2) comparer les réponses obtenues, entre deux souches de PPV: NADL-2 et Kresse.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Défenses antivirales

La défense contre les infections est primordiale pour la survie d'un organisme. Les premières barrières que rencontrent les bactéries, les parasites et les virus sont, entre autres: la peau et sa flore naturelle, le mucus des voies respiratoires associé au mouvement des cellules ciliées et les larmes. Mais lorsqu'un pathogène réussit à passer ces premières barrières, les cellules du système immunitaire "patrouillant" l'organisme entrent en jeu.

Plusieurs acteurs participent à la réponse immunitaire antivirale. Cette réponse peut être *non spécifique* à l'antigène (par exemple: interférons, cellules NK), ou bien *spécifique* à l'antigène (les anticorps et les cellules T). Les interférons de type 1, IFN α/β peuvent être induits par la présence d'ARN double brins, non détectable dans des cellules normales mais souvent produit lors de la réplication virale (Biron, 1998). Les cellules NK, activées par l'IFN α/β, peuvent lyser les cellules infectées et produire des cytokines comme l'IFN-γ et le TNF (Biron *et al*, 1999) Les cellules ne présentant pas ou très peu de molécules du CMH I suite, par exemple, à une infection virale, sont les principales cibles des cellules NK (Miller and Sedmak, 1999).

Les anticorps reconnaissent des pathogènes présent dans les fluides extracellulaires ou à la surface de cellules car ils n'ont pas accès à l'intérieur de celles-ci. Ils servent à diminuer la charge d'antigène et l'infectivité virale en agglutinant les particules virales et en les enrobant afin d'empêcher l'attachement des ces derniers aux récepteurs cellulaires (Whitton et Oldstone, 1997). Les anticorps sont produits et libérés dans le sang par les lymphocytes B. Les lymphocytes B produisent des anticorps spécifiques à un antigène lorsqu'ils sont activés, mais ils produisent aussi des anticorps dits "naturels" formant le répertoire spontané des immunoglobulines circulantes. Ces anticorps naturels sont principalement des IgM. Lors d'infections avec des virus cytopatiques

(comme les virus de la polio, l'influenza, et la rage) ces anticorps se sont montrés essentiels pour la protection contre des infections mortelles. Leur rôle ne se limiterait pas seulement à influencer la distribution initiale des virus et leur dissémination afin d'éviter l'infection d'organes vitaux , mais aussi à diriger les pathogènes dans les organes lymphatiques secondaires pour accélérer et augmenter la réponse immunitaire (Ochsenbein *et al.*, 1999). Les anticorps sont aussi importants pour la prophylaxie et les traitements.

Le rôle majeur des cellules T cytotoxiques est de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées le plus tôt possible après leur infection, réduisant ainsi le nombre de particules virales produites. Contrairement aux anticorps, les cellules T reconnaissent des peptides étrangers qui doivent être présentés par l'entremise du CMH au TCR (Wilson et Garcia, 1997). Les cellules T peuvent être divisées en différents sous-groupes. Les cellules T cytotoxiques (CTL) tuent les cellules "cibles", par exemple des cellules infectées par un virus, en induisant l'apoptose par l'exocytose de granules cytolytiques ou par l'intermédiaire du TNFRSF6 (Fas) et son ligand (Edwards *et al.*, 1999). Les T auxiliaires ou "helper", par la sécrétion de cytokines, vont influencer le cours de la réponse immunitaire et, par exemple, stimuler la synthèse d'anticorps par les cellules B.

L'activité des cellules T est corrélée par des marqueurs de surfaces (CD4/CD8). Les lymphocytes T $CD8^+$ sont principalement cytotoxiques et la grande majorité des lymphocytes T $CD4^+$ sont des cellules auxiliaires. La reconnaissance des antigènes par les cellules T se fait par leur récepteur (TCR), formé des chaînes α et β et du CD3 (Malissen et Schmitt-Verhulst, 1993), à la condition que les antigènes soient présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe deux types de CMH impliqués dans la reconnaissance d'antigène (classe I et classe II), et il existe un lien entre le type de complexe CMH/peptide reconnu par les cellules T, et les marqueurs de surface CD4 et CD8 présents sur ces cellules T. Zinkernagel et Doherty (1974) ont découvert que des cellules infectées par un virus présentaient des peptides

associés au CHM de classe I et que ceux-ci étaient reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques, aujourd'hui appelées lymphocytes T $CD8^+$. Les peptides présentés par le CMH de classe II sont reconnus par les lymphocytes T $CD4^+$ (Konig *et al.*, 1992; Unanue, 1993). La présentation des antigènes par les CMH I et II implique des mécanismes différents.

Pour le CMH classe I, présent sur presque toutes les cellules de l'organisme, l'antigène est généralement d'origine endogène comme, par exemple, les protéines virales produites à l'intérieur d'une cellule hôte. Les protéines sont dégradées par des protéasomes pour former de petits peptides de 8 à 10 résidus. Les fragments sont amenés, par la protéine de transport TAP, du cytosol au réticulum endoplasmique. La chaîne lourde du CMH I est transférée dans le réticulum endoplasmique à l'aide de la molécule chaperone "calnexine". Lorsque les fragments peptidiques sont reconnus, l'assemblage de la chaîne α du CMH I, de la β2-microglobuline et du peptide, se produit. Le complexe passe finalement par le Golgi, et par le *trans*-Golgi pour atteindre la surface de la cellule (Koopmann *et al.*, 1997; Solheim, 1999, York *et al.*, 1999).

Les antigènes d'origine exogène sont généralement présentés par le CMH de classe II, exprimé presque exclusivement sur les cellules du système immunitaire comme les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (monocytes, macrophages, cellules dendritiques) et les cellules B (Knight et Stagg, 1993). Les protéines en circulation sont ingérées par endocytose et finissent par atteindre des compartiments acides qui dégradent les protéines en peptides de 7 à 25 résidus. Les chaînes α et β du CMH II sont synthétisées à l'intérieur du réticulum endoplasmique et assemblées à l'aide de la molécule chaperone appelée "chaîne invariante" (Ii). Cette molécule Ii assure le bon repliement des chaînes du CMH II et sa région CLIP (class II-associated invariant chain peptide) bloque le sillon d'attachement du peptide et empêche tout peptide de s'y lier, à ce stade. Le complexe est transporté à travers le Golgi/*trans*-Golgi. Les vacuoles contenant les CMH II fusionnent avec les endosomes contenant les

peptides et les CMH II fixent les peptides pour lesquels ils ont une affinité, après libération du CLIP. Le complexe mature est finalement présenté à la surface cellulaire (Cresswell, 1994; Wubbolts et Neefjes, 1999).

L'importance, dans l'établissement d'une réaction immunitaire, des cellules présentatrices d'antigène (CPA) est incontestable. Les CPA peuvent être des cellules dendritiques, des macrophages et même des lymphocytes B. Les macrophages ont un rôle majeur dans la présentation de peptides antigéniques par les CMH de classe I et II et, comme mentionné au chapitre 4.2, ils peuvent être la cible du parvovirus.

1.1 Monocytes / Macrophages (Mo/Mϕ)

Les monocytes / macrophages jouent un rôle important dans la réponse immunitaire contre différents pathogènes, incluant les virus. Le rôle principal des Mo/Mϕ dans la réponse immunitaire est d'agir comme CPA. Outre leur action comme CPA, les macrophages peuvent phagocyter différents pathogènes et sécréter différents facteurs solubles, comme un certain nombre de cytokines. Durant l'infection, un certain mode d'activation du réseau de cytokines s'établit, afin de diriger et orienter l'attaque dans une certaine direction (Herbein, 1997).

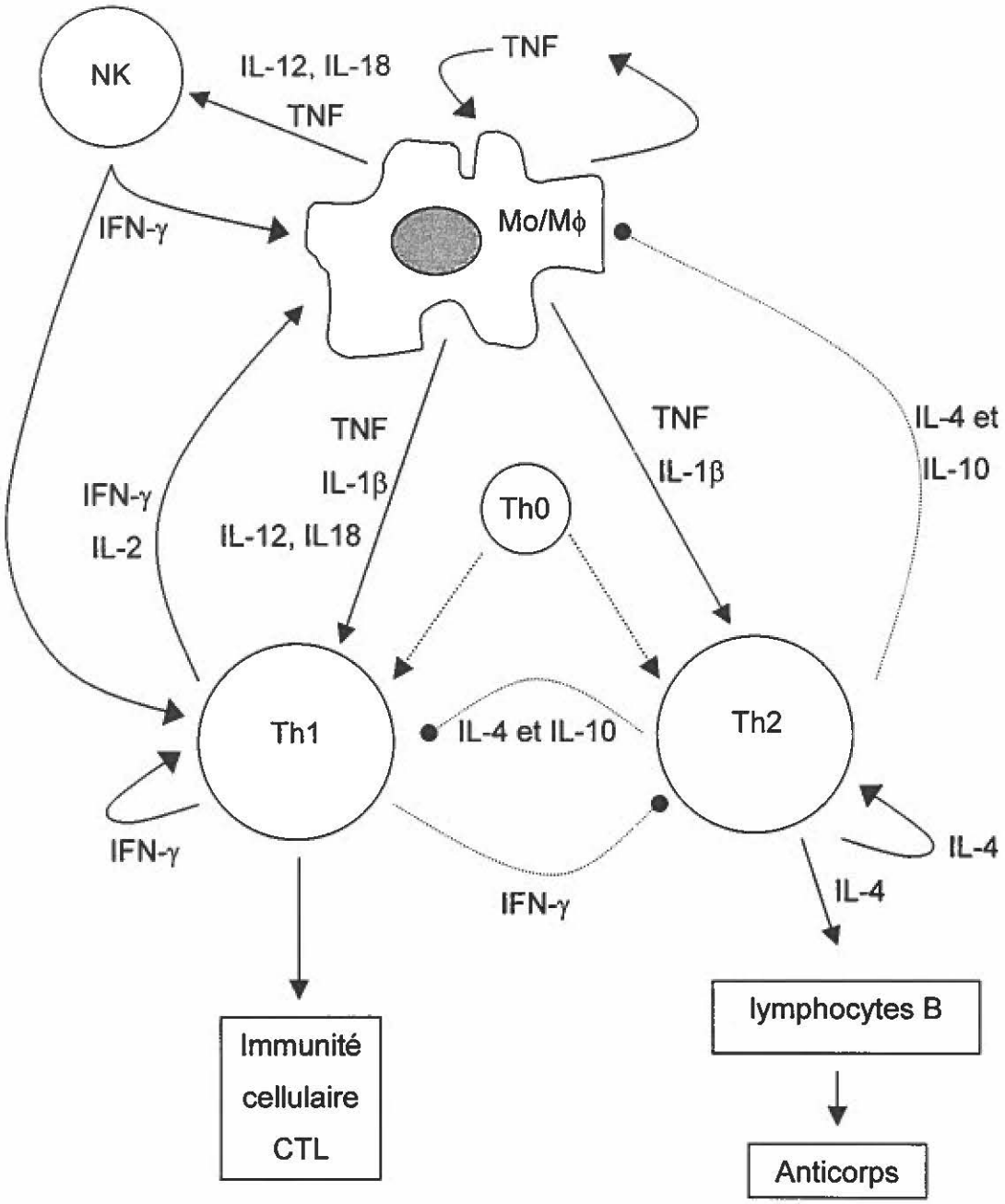
Après activation des Mo/Mϕ, les cytokines produites par ceux-ci peuvent stimuler ou inhiber la production d'autres cytokines en agissant sur les cellules environnantes (action paracrine, par exemple le TNF, l'IL-1β, l'IL-12 et l'IL-18) ou bien sur elles mêmes (action autocrine, par exemple le TNF) (Adorini, 1999; Dinarello, 1999). Un réseau complexe d'interactions entre différentes cellules est établi par la production de cytokines (voir figure 1). Selon les cytokines produites, deux types de lymphocytes T auxiliaires (Th) peuvent intervenir. Les lymphocytes Th1 produisent des cytokines plutôt impliquées dans la réponse "cellulaire" tandis que les Th2 synthétisent des cytokines plutôt impliquées dans

la réponse "humorale". Cette classification en deux populations Th1 et Th2 est quelque peu artificielle car il existe une sous-population de Th0 qui produit simultanément des cytokines Th1 et Th2. Mais en général, les cytokines produites par les Th1 (IFN-γ, IL-2) activent les monocytes/macrophages tandis que celles sécrétées par les Th2 (IL-4, IL-10) les désactivent (Herbein, 1997).

Les Mo/Mϕ activés sont les principales cellules produisant du TNF, même si d'autres cellules peuvent en produire, comme les lymphocytes T, les cellules NK. En plus de son rôle dans le déroulement de la réponse immunitaire, le TNF possède une activité antivirale qui, dans certaines conditions, peut être semblable à celle de l'interféron. De plus, le TNF peut induire la lyse de cellules infectées par un virus (Vilček et Sen, 1996). Comme, d'une part, les Mo/Mϕ peuvent être infectés par le parvovirus et que, d'autre part, la production de TNF peut en être influencée, l'étude présente s'est concentrée sur cette molécule.

Figure 1: Interactions de différentes cellules et cytokines lors de la réponse immunitaire

Après activation, les monocytes/macrophages sécrètent plusieurs cytokines ayant une activité autocrine ou paracrine. Selon les cytokines qui seront sécrétées en majorité, la réponse immunitaire se dirigera vers une immunité cellulaire par l'intervention des lymphocytes Th1 ou bien vers une immunité humorale (Th2). La sous-population de Th0 peut produire simultanement les cytokines Th1 (IFN-γ, IL-2) et Th2 (IL-4, IL-10). (D'après Adorini, 1999, Dinarello, 1999 et Heirbein, 1997)


NK
IL-12, IL-18
TNF
TNF
IFN-γ
Mo/Mϕ
TNF
IL-1β
IL-12, IL18
TNF
IL-1β
IL-4 et
IL-10
IFN-γ
IL-2
Th0
Th1
IL-4 et IL-10
Th2
IFN-γ
IFN-γ
IL-4
IL-4
Immunité
cellulaire
CTL
lymphocytes B
Anticorps
Stimulation
Inhibition
Filiation cellulaire (Th0→Th1, Th2)

2. Facteur nécrosant des tumeurs (TNF)[1]

Le TNF a été découvert il y a près d'une quinzaine d'années par Old (1985). Ce dernier a démontré qu'après une injection de LPS, in vitro et in vivo, la capacité d'induire une nécrose de certaines tumeurs chez la souris était reliée à la présence d'un facteur dans le sang qu'il a nommé: le TNF. Par la suite, et de façon indépendante, Beutler et Cerami (1988) ont identifié une protéine dans le sérum de patients subissant la "cachexie", ou lors du choc septique induit par une infection microbienne, ou bien expérimentalement par une injection de LPS. À partir du sérum de ces sujets, ils ont purifié une protéine qu'ils ont baptisé "cachectine" et qui s'est révélée être la même que le TNF (Beutler et Cerami, 1988, 1989). Aujourd'hui, en plus d'être un facteur nécrosant des tumeurs, une cachectine, un médiateur du choc toxique, le TNF est aussi connu pour stimuler la moelle osseuse, activer et différencier les macrophages, provoquer la dégranulation des neutrophiles, stimuler les lymphocytes en division, entre autres. Parce qu'il est aussi un médiateur de l'inflammation, il stimule la production d'une cascade d'autres médiateurs de la réaction immunitaire, d'autres cytokines, de métabolites et autres agents actifs (Vassalli, 1992).

2.1 Protéine TNF

Le TNF est synthétisé en une "proprotéine" transmembranaire de 26kDa. Cette molécule a été mise en évidence à la surface de cellules et elle s'est avérée être biologiquement active (Kriegler *et al.*, 1988; Karp *et al.*, 1992). Après activation de la cellule, la partie extracellulaire du TNF est clivée en une molécule de 17 kDa. La sécrétion de TNF est sous contrôle très strict, mais la protéase exacte responsable n'a pas encore été identifiée. Par contre, Aggarwal

---

[1] Selon la nouvelle nomenclature, le TNF-α est maintenant désigné par TNF ou TNFSF2. Donc, lorsqu'il est question du TNF dans le texte, il fait référence au TNF-α. (Kwon *et al.* 1999; http://www.gene.ucl.ac.uk/users/hester/tnftop.html)

et Natarajan (1996) rapportent que la "neutral serine proteinase-3" et que des métalloprotéinases comme la stromelysine, la matrilysine, la collagénase et la gélatinase ont été impliquées et que l'addition d'un inhibiteur de métalloprotéinase peut bloquer la sécrétion de TNF. Finalement, l'association de trois molécules de TNF en "trimère" est nécessaire pour former le TNF biologiquement actif (Tavernier *et al.*, 1989; Sprang *et al.*, 1992).

Le gène du TNF porcin a été localisé au sein du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur le chromosome 7 à la position p11-q11. Cette cartographie montre que l'inclusion du gène du TNF dans le CMH porcin est semblable à ce qu'on observe chez l'humain (chromosome 6) et la souris (chromosome 17) (Solinas *et al.*, 1992). L'alignement de toutes les séquences codantes du TNF porcin démontrent que le produit est une proprotéine de 232 a.a. et que la protéine mature est constituée de 156 a.a.

La longueur de la protéine TNF varie très peu d'une espèce à l'autre. Elle est de 156 a.a. chez le porc, le lapin, le rat et la souris, et de 157 a.a. chez l'humain, le bovin, le félin, l'ovin, l'équin et le simien. Ceci démontre une grande conservation lors de l'évolution révélée par les séquences d'ADN (Pauli, 1995). Entre les résidus 69 et 101, deux cystéines, il y a un pont disulfure et il n'y a pas de méthionine dans la séquence d'acides aminés du TNF (Aggarwal *et al.*, 1985). Selon les espèces, des délétions autour des a.a. –15 et –4 (précédant la séquence du TNF) ont été observées. Dans la séquence du TNF porcin, une délétion supplémentaire est observée à la position +8. De plus, des régions très hétérogènes dans les séquences d'a.a. sont situées de –20 à +10 a.a. et de +20 à +30 a.a. et ceci peut être considéré comme une spécificité d'espèce pour le TNF porcin par rapport à son activité cytotoxique (Pauli, 1995).

2.2 Récepteurs

Deux récepteurs ont été identifiés pour le TNF: TNFRSF1A (anciennement appelé TNF-RI, CD120a, p60 et p55) et TNFRSF1B (anciennement TNF-RII, CD120b, p80, p75 ou p70) qui ont des poids moléculaires respectifs de 60 kDa et 80 kDa (Kwon *et al.*, 1999; Loetscher *et al.*, 1990). La portion extracellulaire de ces récepteurs est caractérisée par des domaines riches en cystéines dont les positions sont très conservées, tout comme les autres membres de la superfamille dont ils font partie. Cette superfamille inclut, par exemple: TNFRSF16 ("Nerve Growth Factor Receptor" (NGFR)), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF5 (CD40), TNFRSF6 (Fas), TNFRSF9 (4-1BB), TNFRSF4 (OX40) et le "TNF receptor related protein" (TNFR-RP) (Tartaglia et Goeddel, 1992; Aggarwal et Natarajan, 1996). Par contre, la structure de la portion intracellulaire de ces récepteurs est très différente. Le domaine cytoplasmique du récepteur TNFRSF1A contient une courte extension de 80 a.a. appelée "Death Domain" (DD) (Tartaglia *et al.*, 1993) et qui est très semblable au récepteur TNFRSF6. Trois autres récepteurs de la superfamille du TNF contiennent un DD: TNFRSF10A (DR4), TNFRSF10B (DR5) et TNFRSF12 (DR3). (Singh *et al.*, 1998; Tartaglia et Goeddel, 1992). De plus, TNFRSF1A contient un site d'ubiquitinylation tandis que TNFRSF1B contient un site de phosphorylation (Aggarwal et Natarajan, 1996). Ainsi, les deux récepteurs induisent des signaux différents. Le récepteur TNFRSF1A serait impliqué principalement dans la cytotoxicité, l'activité antivirale, la prolifération des fibroblastes et dans l'induction du "nuclear factor-kappa B" (NF-κB; un site d'attachement de NF-κB se retrouve dans la séquence du promoteur du TNF). Le récepteur TNFRSF1B, pour sa part, serait principalement impliqué dans les signaux induisant la prolifération des thymocytes et la prolifération des CTL (Freudenberg et Galanos, 1990; Tartaglia et Goeddel, 1992; Wallach *et al.*, 1999).

Le récepteur TNFRSF1A est composé de 426 a.a. dont 182 a.a. constituent le domaine extracellulaire et 221 a.a. le domaine intracellulaire. Il est codé sur le chromosome 6 chez la souris et sur le chromosome 12 chez l'humain. Le récepteur p80 est composé de 439 a.a. dont 235 a.a. constituent le domaine extracellulaire et 174 a.a. le domaine intracellulaire. Il est codé sur le chromosome 4 chez la souris et sur le chromosome 1 chez l'humain (Ruddle, 1992; Tartaglia et Natarajan, 1992).

La majorité des cellules nucléées ont à leur surface les deux récepteurs du TNF mais la proportion de TNFRSF1A par rapport à TNFRSF1B peut varier selon le type cellulaire. De plus, les deux récepteurs ont aussi été isolés sous forme soluble dans le sérum et l'urine de patients souffrant de fièvre ou bien de certaines maladies. Les récepteurs solubles peuvent lier le TNF et, selon leur concentration, ils ont des effets différents. Lorsque leur concentration est faible, les récepteurs solubles peuvent prolonger l'effet du TNF en le stabilisant. Par contre, à forte concentration ils peuvent contrer l'effet du TNF en le neutralisant et, aussi, en favorisant l'élimination du TNF circulant (Aderka *et al.*, 1992; Ruddle, 1992; Bemelmans *et al.*, 1994; Bemelmans *et al.*, 1996).

2.3 Cellules productrices, et inducteurs, du TNF

Les macrophages sont la principale source de TNF mais plusieurs autres types de cellules peuvent aussi en produire: des cellules du système immunitaire comme les NK, les lymphocytes T stimulés et les polymorphonucléaires, des cellules de certains organes comme les fibroblastes et les astrocytes ainsi que par certaines cellules tumorales comme les mélanomes. Une particularité s'applique aux mastocytes. En effet, au lieu d'une sécrétion de type classique, ceux-ci peuvent accumuler du TNF à l'intérieur de leurs granules et libérer

rapidement le TNF, par dégranulation, lors de stimuli (Gordon et Galli, 1990; Vassalli, 1992; Aggarwal et Natarajan, 1996).

La production de TNF peut être provoquée par différents inducteurs comme l'IFN-γ, le TNF lui-même et d'autres cytokines comme IL-2, GM-CSF et CSF. Mais le plus puissant de ceux-ci est le LPS: une endotoxine de la membrane des bactéries gram-négatives. Il agit sur tous les types de monocytes et de macrophages testés (Vassalli, 1992). Il est composé d'une chaîne O-spécifique, d'un noyau d'oligosaccharides et d'une partie lipide appelée "lipide A". C'est le lipide A qui constitue l'élément bioactif du produit. Les macrophages possèdent plusieurs récepteurs pour le LPS. Lorsqu'une molécule de LPS se lie à un des récepteurs, un signal de transduction mène à l'induction de NF-κB et, par la suite, à la production de TNF et à sa libération (Freudenberg et Galanos, 1990; Rietschel *et al.*, 1994; Shames *et al.*, 1999).

2.4 Effets biologiques du TNF

Il est maintenant connu que le TNF a d'autres activités que celles d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses. Il peut aussi modifier la croissance, la différenciation et le métabolisme d'une grande variété de cellules (Aggarwal et Natarajan, 1996). Par exemple, le TNF peut être exprimé lors des premières étapes du développement et jouer un rôle majeur lors de l'embryogenèse (Wride et Sanders, 1995). Le TNF est aussi impliqué dans diverses réactions physiologiques normales comme l'hématopoïèse, la reproduction, l'inflammation et la protection contre les infections. Par contre, le TNF peut avoir des effets négatifs dans certaines situations, comme lors du choc septique et lors de maladies comme le diabète.

Il a aussi été démontré que le TNF peut avoir un effet antiviral contre différents virus à ADN ou ARN. Le TNF peut donc jouer un rôle dans le

déroulement de l'infection virale et avoir un impact sur son évolution car il est un des messagers de la réponse immunitaire. De plus, le TNF peut avoir un effet sur la réplication de certains virus par une action directe sur les cellules infectées (par exemple: le cytomegalovirus et l'herpès simplex) (Mestan *et al.*, 1986; Ramshaw *et al.*, 1997).

2.5 Mécanismes d'action du TNF

Comme mentionné précédemment, les monocytes/macrophages sont la principale source de TNF, et comme ils en expriment les récepteurs, en sont donc aussi la cible. Ainsi, la production de TNF par des macrophages peut devenir un phénomène auto-entretenu, ce qui nécessite un régulation par d'autres mécanismes. En plus, comme le TNF est un agent chimioattractant pour les monocytes (Wang *et al.*, 1990) et qu'il induit l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, il peut induire, à un site d'inflammation, une accumulation de macrophages et entraîne ainsi une plus grande production de TNF (Vassali, 1992). Le TNF peut aussi induire la différenciation des monocytes en agissant sur eux comme un facteur de croissance, mais surtout en induisant la libération du facteur de croissance CSF-1 (Warren, 1986).

Les infections virales, bien connues pour induire des IFN, dont l'IFN-γ, stimulent aussi la production de TNF ainsi que d'autres cytokines. Le TNF joue aussi un rôle dans la protection contre les infections virales et dans la lyse des cellules infectées. Le mécanisme par lequel le TNF protège contre l'infection virale n'est pas connu, mais trois protéines pouvant y contribuer ont été identifiées: 2'5'A synthase (Wong et Goeddel, 1986; Mestan *et al.*, 1986), interféron-β (Ruggiero *et al.*, 1989) et IL-6 (Kohase *et al.*, 1986). Tout comme l'interféron, le TNF peut induire la 2'5'A synthase, une enzyme qui induit indirectement des endoribonucléases qui pourraient dégrader l'ARN viral (Mestan *et al.*, 1988). Il a été suggéré que l'activité antivirale du TNF pourrait

résulter de la production d'IFN-β et/ou d'IL-6 dans certains cas. Le TNF peut aussi induire la lyse de cellules infectées par un virus. Wong *et al.*, rapportent plusieurs études où sont discutés des mécanismes par lesquels le TNF pourrait agir. La sensibilité des cellules au TNF est peut-être due au fait que les cellules infectées par un virus ne peuvent synthétiser des protéines protectrices (Wong *et al.*, 1992).

3. Oxyde d'azote

L'oxyde d'azote (NO) est une molécule très réactive produite par l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline par l'entremise de l'enzyme NO-synthase (NOS) (Nathan, 1992). Lorsque des macrophages sont stimulés par des cytokines pro-inflammatoires (tel que le TNF) ou bien du LPS, il y a synthèse de la forme "inductible" de cette enzyme NOS (iNOS) qui est une isoforme de NOS. Une fois synthétisée, iNOS permet de produire une très grande quantité de NO sur une longue période de temps (Vodovotz *et al.*, 1994; Evans et Cohen, 1996).

Le NO est reconnu comme un médiateur important dans la défense contre les bactéries, les parasites et les cellules tumorales. Plus récemment il a été démontré que le NO est aussi impliqué dans la défense antivirale. Par exemple, Croen (1993) a démontré que lors de la stimulation d'une lignée cellulaire de macrophages murins avec du LPS et de l'IFN-γ, une grande quantité de NO était produite et la réplication du virus herpès simplex (HSV-1) était inhibée par un facteur 1000 (Croen, 1993).

Le mécanisme par lequel le NO peut inhiber la réplication virale n'est pas connu. Mais il peut inhiber la réplication de divers virus à ADN (comme l'herpès simplex et Epstein-Barr), de virus à ARN et du HIV-1. Comme ces virus ont des modes de réplication variés, il est possible que le NO inhibe la réplication virale à

travers une variété de mécanismes qui pourraient varier d'un virus à l'autre. De par sa nature très réactive, l'effet antiviral du NO pourrait être induit par sa réaction avec diverses cibles cellulaires et virales (Mannick, 1995).

4. Parvovirus

4.1 Généralités

Dans la famille des parvovirus, il existe des parvovirus adéno-dépendants (AAV) qui ne contiennent pas tout le matériel nécessaire pour se répliquer: pour parvenir à cette fin, une co-infection avec un autre virus (adénovirus ou herpesvirus) est donc essentielle. D'autre part, les membres du sous-groupe des parvovirus "autonomes" possèdent, eux, tout le matériel nécessaire pour assurer leur réplication et ce, sans l'aide de co-virus. Le PPV fait partie de ce dernier sous-groupe. Chez les parvovirus autonomes, les propriétés physico-chimiques et la structure de la capside du PPV se rapprochent de parvovirus infectant d'autres espèces animales, tels que le virus H-1 du rat, du "minute virus of mice" (MVM), le parvovirus canin (CPV) et le parvovirus félin (FPV) (Cotmore et Tattersall, 1987). Un seul parvovirus humain est connu en détail, le B19.

4.1.1 Structure et génome

Le parvovirus est constitué de trois protéines virales (VP) qui forment une capside icosaédrique (voir figure 2). Cette capside n'est pas enveloppée et son diamètre est d'environ 25 nm. Son génome est constitué d'un simple brin d'ADN de polarité négative dont la longueur est d'environ 5000 nucléotides (Cotmore *et al.* 1987). Lors de la réplication, deux (ou trois) protéines virales (VP) sont synthétisées (VP1: 80-86 kDa, VP2: 64-75 kDa et VP3: 60-62 kDa). La protéine VP3 provient du clivage de VP2 et n'est pas toujours présente chez les virus isolés de cultures cellulaires. Trois protéines non-structurales (NS): NS1, NS2 et NS3 sont aussi synthétisées (Cotmore et Tattersall, 1987; Oraveerakul *et al.*, 1992; Bergeron *et al.*, 1996). Les protéines non structurales jouent un rôle lors du contrôle de la réplication.

La séquence du génome comporte des palindromes aux extrémités 5' et 3'. Ces palindromes permettent au segment d'ADN de se replier sur lui-même et de former une structure dite "épingle à cheveux" nécessaire lors de la transcription. De plus, le génome comporte deux cadres de lecture ouverts (ORFs) qui ne se chevauchent pas. Le schéma suivant montre que le premier ORF (ORF 1), couvrant la partie de gauche du génome (brin "+"), code pour les protéines NS. Le second ORF (ORF 2), couvrant la majorité de la partie droite de ce génome, code pour les protéines de la capside (VP). Toute mutation dans l'ORF couvrant la partie gauche bloque la réplication et l'expression des gènes du parvovirus, d'où l'importance des protéines NS (Rhode *et al.*, 1983; Rhode, 1985; Shull *et al.*, 1988).

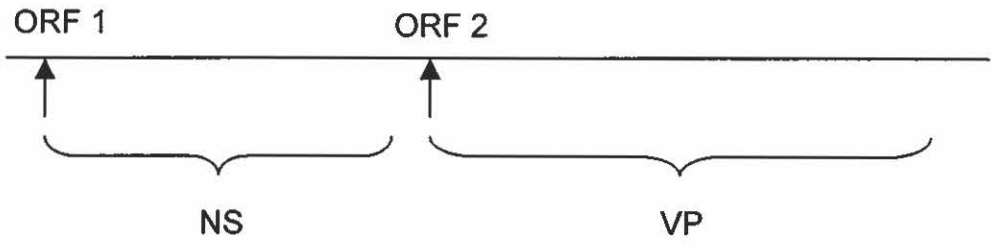
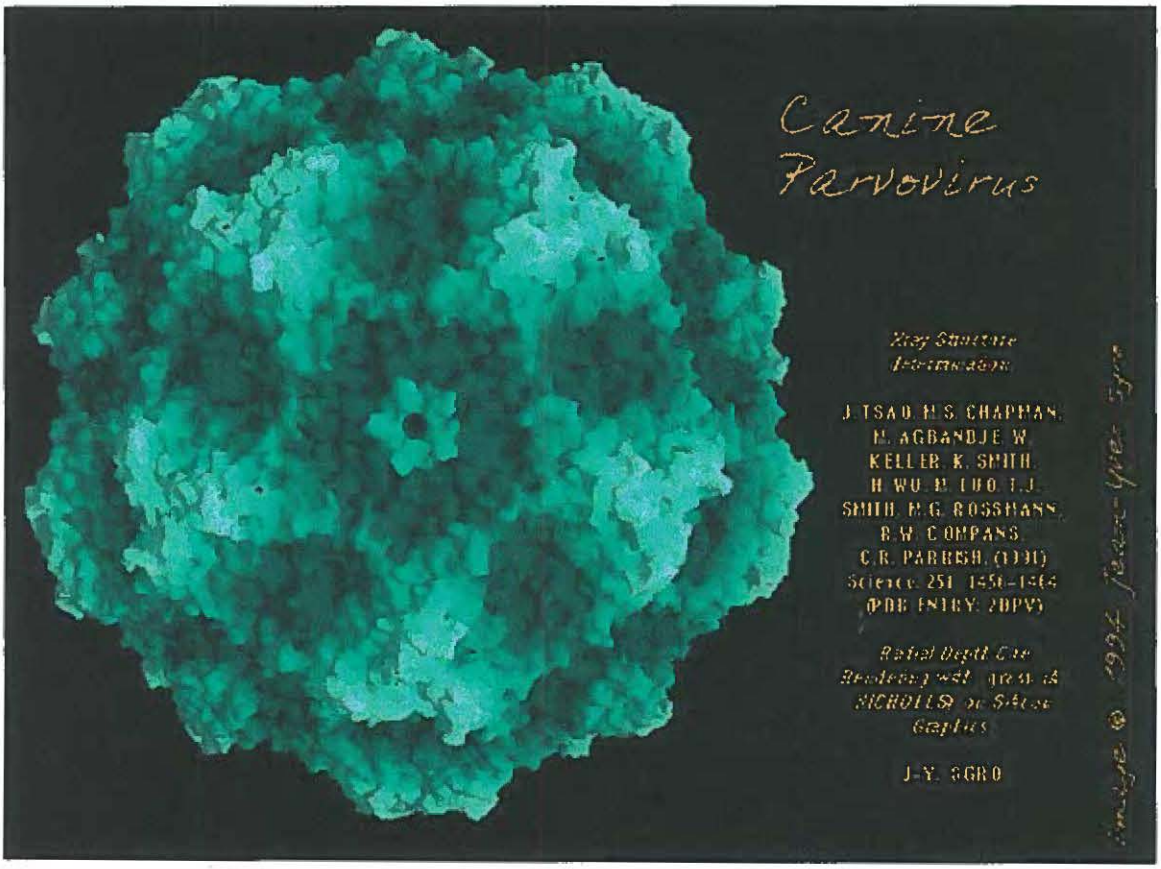


Figure 2: Représentation de la structure de la capside du parvovirus canin



4.1.2 Infection des porcs

Les animaux sont généralement infectés par voie oro-nasale. Une fois entré dans l'animal, le parvovirus infecte les cellules de différents tissus: poumon, foie, cerveau, reins, rate, coeur, thymus. De l'ADN viral a été isolé de ces cellules mais la présence de la forme réplicative de l'ADN n'est pas retrouvée partout. Par exemple, la forme réplicative n'est pas retrouvée dans le cerveau et la rate de fœtus lors d'une infection par le NADL-8 (Oraveerakul *et al.*, 1993). La réplication du parvovirus se déroule à l'intérieur du noyau des cellules car il est très dépendant des fonctions cellulaires de la cellule hôte. Cependant, pour que la réplication puisse avoir lieu, la cellule infectée doit être en phase S car le parvovirus ne peut pas par lui-même stimuler ou initier la synthèse d'ADN. Par contre, une fois la réplication commencée, le parvovirus contrôle sa propre réplication (Berns, 1996). Finalement, toutes les cellules en division ne sont pas nécessairement sujettes à l'infection au parvovirus ou à sa réplication.

4.2 Pathologie et immunologie

La pathologie associée à une infection au parvovirus diffère selon la souche de virus et selon la phase de la gestation de la truie. Tout d'abord, un fœtus est considéré non-immunocompétent lorsqu'il a 70 jours ou moins. Par conséquent, il est considéré immunocompétent, et donc capable de surmonter une infection, lorsqu'il a plus de 70 jours. De plus, lorsqu'une truie non-immunisée est infectée par le PPV, une forte virémie (décharge de virus dans le sang) est nécessaire afin que le virus puisse traverser la barrière placentaire et infecter les embryons ou les fœtus (Lager *et al.* 1992).

La souche NADL-2 (voir tableau 1) est considérée comme non pathogène car elle ne traverse pas la barrière placentaire et n'induit pas la mort fœtale. De

plus, elle ne cause qu'une très faible virémie (Molitor et Joo, 1990). Par contre, lorsque la souche NADL-2 est injectée directement *in utero*, elle occasionne la mort fœtale chez les fœtus qui ne sont pas immunocompétents (Cutlip *et al.*, 1975). Comme elle est très peu pathogène, la souche NADL-2, atténuée par 50 passages successifs dans une lignée cellulaire continue, est utilisée comme vaccin (Paul et Mengeling, 1980).

La souche NADL-8 (voir tableau 1) est une souche dite virulente. Elle a été isolée à partir de fœtus momifiés non–immunocompétents. L'infection par cette souche occasionne une virémie. Le virus traverse la barrière placentaire et infecte les fœtus (Mengeling et Cutlip, 1975).

Une autre souche, particulièrement virulente, a été isolée: la souche Kresse (voir tableau 1). Elle a été isolée cette fois chez des porcs infectés par le parvovirus, et a été associée à des dermatites chez de jeunes porcelets (Kresse *et al.*, 1985). Comme la souche NADL-8, la souche Kresse occasionne une virémie, elle traverse la barrière placentaire et infecte les fœtus. Par contre, la mort fœtale est observée non seulement chez les fœtus non-immunocompétents mais aussi chez ceux qui sont considérés immunocompétents (Choi *et al.*, 1987). De plus, lors d'examens pathologiques de fœtus infectés avec la souche Kresse, des dépôts de complexes immuns ont été observés dans les tissus. Ceci suggère que les lésions observées pourraient être dues à une maladie mettant en cause le système immunitaire (Oraveerakul *et al.*, 1993).

Tableau 1: Particularités de différentes souches virales de PPV

Les différentes souches ont été administrées à des truies en gestation soit par voie oro-nasale (*per os*) ou par infection expérimentale, directement dans l'utérus (*in utero*) . La charge virale présente dans le sang (Virémie) la capacité du virus de traverser la barrière placentaire (Placenta) sont indiquées par le signe "—" dans un cas négatif et par le signe "+" dans un cas positif. La mort foetale est indiqué par un signe "+" et la survie par le signe "—" pour des foetus non-immunocompétents (< 70 j.) et considérés immunocompétents (> 70 j.).

			Mort fœtale après infection			
			per os		*in utero*	
	Virémie	Placenta	< 70 j.	> 70 j.	< 70 j.	> 70 j.
NADL-2	—	—	—	—	+	—
NADL-8	+	+	+	—	+	—
Kresse	+	+	+	+	+	+

Même si les deux souches NADL-2 et Kresse ont des phénotypes différents, l'organisation de leur génome est identique et elles possèdent une forte homologie de séquence. Bergeron et ses collaborateurs (Bergeron *et al.*, 1996) ont comparé la séquence et l'organisation génomique de la souche Kresse à différentes autres souches, dont NADL-2. Deux différences ont été observées entre les régions non codantes des génomes de NADL-2 et de Kresse. Dans la région du génome codant pour NS, quatre différences ont été observées et elles n'ont pas d'effet sur la séquence en a.a. Dans la région du génome codant pour les protéines virales (VP1/VP2), six des huit différences observées altèrent la séquence en a.a. Toutes les différences se retrouvent dans la région codante pour VP2 à l'exception d'une qui se retrouve dans la région VP1. Des 529 a.a. constituant VP2, seulement 5 changements y ont systématiquement été retrouvés (voir tableau 2). De plus, des chimères de clones infectieux ont été construites afin de changer le phénotype de la souche Kresse en celle de NADL-2. Les fragments *Bgl*II de NADL-2 et Kresse contenant trois des mutations critiques de VP1/VP2 ont donc été interchangés. Ces changements ont interverti la capacité de production de virus sur des cellules "TV" (culture primaire de cellules de testicules de bovins), qui normalement supportent la réplication de la souche NADL-2, mais pas celle de la souche Kresse.

Tableau 2: Différences entre les génomes de NADL-2 et de Kresse

Les positions dans le génome de NADL-2 pour lesquelles il y a une différence dans la séquence nucléotidique par rapport à Kresse sont indiquées. Le changement dans la séquence en a.a. de VP2 est indiqué en parallèle. (acides aminés: D = Asparagine; G = Glycine; H = Histidine; I = Isoleucine; K = Lysine; P = Proline; Q = Glutamine; R = Arginine; S = Sérine; T = Thréonine)

Position séquence NADL-2	NADL-2	Kresse	Position séquence VP2	NADL-2	Kresse
3453	ATC	–C–	215	I	T
3942	GAT	–G–	378	D	G
3958	CAC	—A	383	H	Q
4115	TCT	C—	436	S	P
4503	AGA	–A–	565	R	K

La pathogénicité des deux souches de PPV, NADL-2 et Kresse, semble donc reposer sur des différences minimes entre leurs séquences. On peut avancer l'hypothèse que la réponse immunitaire induite par les diverses souches de PPV est peut-être différente pour chacune d'entre elles. La littérature scientifique actuelle donne très peu d'informations sur la réponse immunitaire qui s'établit contre le PPV, ainsi que d'autres parvovirus, au niveau cellulaire. La comparaison des souches NADL-2 et Kresse pourrait donc être un bon modèle de comparaison de la réponse immunitaire induite par différentes souches de parvovirus.

Harding et Molitor (1988) ont démontré que différentes souches de PPV, dont NADL-2 et Kresse, peuvent se répliquer dans les lymphocytes du sang périphérique et les macrophages alvéolaires, et que leur capacité d'inhiber les fonctions cellulaires immunitaires n'est pas en corrélation avec la différence des effets pathogènes des différentes souches.

Pour les autres parvovirus, les résultats obtenus par von Poblotzki et ses collaborateurs suggèrent qu'une infection par le parvovirus humain B19 active non seulement une réponse humorale, mais aussi une réponse cellulaire. Ces auteurs rapportent aussi que les lymphocytes T $CD4^+$ semblent former la population principale de cellules réactives (von Poblotzki *et al.*, 1996). Tsuda et ses collaborateurs (1994) ont observé chez un patient atteint d'un syndrome haemophagocytique, associé à une infection par le B19 accompagnée d'une neutrophilie évidente, que les concentrations sériques de certaines cytokines telles que le M-CSF, le G-CSF et le TNF étaient élevées. Leurs résultats suggèrent que ce type d'infection stimule la production de M-CSF, mais par des cellules qui n'ont pas encore été identifiées. La concentration élevée de M-CSF a pu activer les monocytes / macrophages à se différencier en hémophagocytes anormaux, et à produire du G-CSF et du TNF (Tsuda *et al.*, 1994). Watanabe *et al.* (1994) font aussi mention d'une concentration élevée de TNF, mais pas d'IFN-γ, dans le sérum d'un patient infecté par le parvovirus B19 (Watanabe *et al.*,

1994). Otto *et al.* (1997) ont aussi détecté du TNF dans le sérum, mais cette fois chez des chiots infectés par le parvovirus canin (CPV). Des 17 chiots infectés au CPV, seulement 7 avaient une concentration mesurable de TNF dans leur plasma. Une augmentation du TNF s'est avérée être un élément pronostique pour prédire la mort du chiot infecté (Otto *et al.*, 1997).

Finalement, il a été démontré que le parvovirus responsable de la maladie des visons aléoutiens (ADV) peut infecter les macrophages péritonéaux du vison ainsi, d'ailleurs, que certaines lignées cellulaires de macrophages humains (Kanno *et al.*, 1993). Chung *et al.* (1997) ont aussi démontré l'importance des macrophages et des cytokines sécrétées par les macrophages lors d'infection de rats "BioBreeding diabète-resistant" (DR-BB) par le parvovirus "Kilham rat virus" (KRV). Quand des rats DR-BB sont infectés par le KRV, 31% de ceux-ci développent un diabète auto-immunitaire semblable au diabète humain de type 1. L'infection par le KRV a clairement augmenté l'expression des cytokines IL-12, IL-1β et TNF, qui sont les produits caractéristiques des monocytes et macrophages après une infection virale (Chung *et al.*, 1997).

5. Objectifs de la recherche

Lors de cette recherche, nous avons évalué la réponse immunitaire contre le PPV en mesurant la quantité de transcrits d'ARNm du TNF, ainsi que la sécrétion de TNF dans le surnageant, à partir de culture de PBMC, après exposition au PPV. Par la suite, comme de minimes différences entre le génome de deux souches de PPV modifient significativement la virulence de celles-ci, nous avons comparé les réponses obtenues entre les souches de PPV suivantes: NADL-2 (non-virulente) et Kresse (virulente).

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1. Préparation des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)

Les échantillons de sang de porcs séronégatifs au PPV sont récoltés dans des tubes de 10 ml ("heparinized vacutainers", Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Pour chaque porc, le sang a été dilué 1:1 dans du PBS ne contenant ni magnésium ni calcium. Ensuite, 10 ml du sang dilué sont déposés sur 5 ml de Ficoll (Pharmacia-Biotech, Baie d'Urfé, Qc) et centrifugés 30 min à 600 x *g*. La couche de cellules à l'interface est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur. Les cellules sont lavées trois fois dans du PBS et sont mises en suspension dans du milieu de culture RPMI 1640 (Gibco-BRL, Burlington, Ont.) contenant 10% (v/v) de sérum fœtal de bovin (Gibco-BRL, Burlington, Ont.), 1% (v/v) d'antibiotiques (50 U.I./ml de pénicilline et 50 mg/ml de streptomycine) (Gibco-BRL, Burlington, Ont.) et 10 mM d'HEPES (Gibco-BRL, Burlington, Ont.). La suspension cellulaire est ajustée à 1 x 10^6 cellules/ml et répartie dans une plaque 24 puits, 1 ml par puits. Les cellules sont mises en culture à 37°C, en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 jusqu'au lendemain.

2. Stimulation des PBMC

Les suspensions virales des souches NADL-2 et Kresse sont gardées à 4°C. Lors des stimulations, des concentrations de suspensions virales de 10^8, 10^7, 10^6 et 10^5 particules virales par millilitre sont utilisées. Les dilutions sont effectuées dans du milieu RPMI 1640 et, lors de l'infection, 100 µl de la suspension sont ajoutés.

Divers témoins sont utilisés lors des stimulations. Tout d'abord, du milieu RPMI 1640 seul permet d'obtenir la réponse "normale" des PBMC. Du surnageant cellulaire (*S.C.*) provenant de cultures de cellules PFT ("Porcine Fallopian Tube") utilisées pour la production virale, mais dans ce cas-ci non infectées, est utilisé. Le *S.C.*, de préférence au milieu seul, est le témoin négatif

pour la plupart des expériences, parce que la préparation virale de PPV n'est pas pure et qu'elle contient des débris cellulaires. L'utilisation du *S.C.* permet ainsi de démontrer que l'action obtenue est attribuable au virus et non aux débris présents dans le surnageant. Du virus inactivé soit par la chaleur, soit par ultraviolets (voir annexe I), ainsi que des capsides recombinantes vides (préparées par le Dr. Zoltan Zadori, stagiaire post-doctoral du laboratoire du Dr. Peter Tijssen) ont aussi été utilisés en guise de témoins, dans certaines expériences.

Lors de la stimulation, des volumes de 100 µl provenant soit des suspensions virales à diverses concentrations, soit de milieu seul, de *S.C.*, de capsides, de virus inactivé à la chaleur ou de virus inactivé aux U.V., sont ajoutés aux cellules préalablement mises en culture. Les mêmes groupes sont reproduits, mais cette fois en ajoutant 5 µl de lipopolysaccharide (LPS, souche *E.coli* 0127:B8, Sigma, Oakville, Ont.) à 100 ng/µl au même moment. Les échantillons sont incubés à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO_2, pour une période variant entre 30 min, 1 h 30, 3 h, 6 h et 12 h selon l'expérience. Par la suite, les cellules sont décollées à l'aide d'un policeman (Sarsted, St-Laurent, Qc). Chaque échantillon est transféré dans un microtube stérile de 1.5 ml (Sarsted, St-Laurent, Qc) et centrifugé à 250 x *g* (microcentrifugeuse) pendant 5 minutes. Le surnageant est transféré dans un autre microtube stérile. Les surnageant et les culots sont conservés à –81°C et seront utilisés pour les bio-essais et les RT-PCR respectivement.

3. Analyse de l'expression des ARNm

3.1 Extraction des ARNm

Les ARN sont extraits selon la méthode développée par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987) utilisant le TRIZOL LS (Life Technologies, Burlington, Ont.). Brièvement, le culot cellulaire est dissout dans 750 µl de TRIZOL LS, et le volume est complété à 1 ml avec de l'eau. Après un incubation de 5 min à la température ambiante, 0,2 ml de chloroforme est ajouté. Le microtube est refermé et agité vigoureusement pendant 15 sec, et incubé pendant 15 min à la température ambiante. Le tube est centrifugé à 12 000 x *g* pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse est récupérée dans un autre microtube. L'ARN présent dans la phase aqueuse est précipité par l'ajout de 0,5 ml d'alcool isopropylique, et le tout est incubé pendant 20 min à la température ambiante. Suit une centrifugation à 12 000 x *g* pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est enlevé et le culot d'ARN est lavé une fois avec 1 ml d'éthanol 75%. Après avoir été agité au vortex, l'échantillon est ensuite centrifugé à 7 500 x *g* pendant 7 min à 4°C. Le surnageant est enlevé et le culot est séché à l'air libre.

Les culots d'ARN sont dissouts dans 25 µl d'eau Milli-Q traitée au DEPC. L'absorbance est mesurée à 260 nm et à 280 nm, ce qui correspond aux absorptions maximales des acides nucléiques et des protéines respectivement. La quantité d'ARN total présent dans les échantillons est déterminée en sachant qu'une absorbance de "1" à 260 nm (chemin optique de 1 cm) représente 40 µg/ml. Les échantillons d'ARN sont conservés à –81°C.

3.2 RT-PCR

3.2.1 Réaction de transcription inverse

L'amplification de gènes par la technique du PCR exige, comme matériel de base, de l'ADN. Il est donc essentiel de transformer en ADN les ARN extraits des échantillons. La réaction de transcription inverse (RT) permet de transcrire l'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc).

Dans un microtube stérile, un échantillon de 10 µl d'ARN à 0,1 µg/µl est chauffé 5 min à 70°C. Par la suite, les réactifs suivants sont ajoutés et mélangés: 3 µl d'eau Milli-Q stérile, 2 µl de tampon de réaction 10X (500 mM Tris pH 8,0, 625 mM KCl, 30 mM $MgCl_2$ et 100 mM DTT), 1 µl d'oligo poly-dT à 0,2 µg/µl (Pharmacia, Baie d'Urfé, Qc), 1 µl d'enzyme inhibitrice de ribonucléase 28,9 U/µl (RNAguard, Pharmacia, Baie d'Urfé, Qc), 2 µl d'une solution 10 mM de désoxyribonucléotide triphosphate (10 mM de chaque: dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (Pharmacia, Baie d'Urfé, Qc) et 1 µl d'enzyme de transcriptase inverse (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) à 15,6 U/µl (Pharmacia, Baie d'Urfé, Qc). Ensuite, le mélange est incubé à 37°C pendant une heure, et à 94°C pendant 5 min. Finalement, le mélange est refroidi sur glace et 30 µl de tampon de réaction 1X est ajouté (volume final de 50 µl).

3.2.2 Amorces utilisées pour la réaction PCR

Pour l'amplification de gènes d'intérêt lors d'une réaction PCR, des amorces oligonucléotidiques spécifiques sont essentielles. Les amorces des gènes TNF (gene bank # U48832) et G3PDH (GenBank # X57321) ont été mises au point et voici leurs séquences:

Gène	Sens	Séquence 5' – 3'	Standard interne "MIMIC" (pb)	Gène (pb)
TNF	+	GCT GTA CCT CAT CTA CTC CC 20 nt	320	291
	-	TAG ACC TGC CCA GAT TCA GC 20 nt		
G3PDH	+	CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T 22 nt	365	400
	-	CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC 21 nt		

Les longueurs des fragments amplifiés sont représentés pour le gène recherché et pour le standard interne développé (voir MIMIC)

D'autres amorces ont été développées pour d'autres gènes de cytokines de porcs, mais ces dernières n'ont pas été utilisées dans le présent travail. (voir annexe II)

3.2.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec et sans standard interne

Pour tous les PCR, la technique de démarrage à chaud a été utilisée. Cette technique consiste à séparer les réactifs en deux phases afin d'augmenter la spécificité d'amplification des gènes recherchés. Pour y parvenir, l'huile N-hexadecane (ICN, St-Laurent, Qc) a été déposée sur la première phase et, comme cette huile a la propriété de durcir à 4°C, les tubes ont été déposés sur de la glace et la seconde phase a été ajoutée sur l'huile durcie. De plus, l'utilisation du N-hexadecane permet de couvrir le mélange et d'en empêcher l'évaporation lors de la réaction dans le thermocycleur.

Pour les PCR sans standard interne, dans un microtube de 500 µl sont mélangés: 21 µl d'eau Milli-Q stérile, 5 µl de tampon de réaction PCR 10X (KCl 500 mM, $MgCl_2$ 15 mM, et Tris-HCl 100 mM, pH 9), 2 µl du mélange de dNTP 10 mM et 1 µl de chaque amorce du gène cible à 20 pmol/µl. Un volume de 30 µl d'huile est déposé à la surface et le tube est placé sur la glace. La deuxième phase est ensuite ajoutée soit: dans le cas du TNF, 17,75 µl d'eau, 0,25 µl d'enzyme Taq polymérase 5 U/ml (Pharmacia, Baie d'Urfé, Qc) et 2 µl du produit de transcription inverse; dans le cas de la G3PDH, 15,75 µl d'eau, 0,25 µl d'enzyme Taq polymérase 5 U/ml et 4 µl du produit de transcription inverse. Les amplifications ont été effectuées dans un thermocycleur programmable (Hybaid, Franklin, MA). Le programme se déroulait comme suit: une première dénaturation de 2 min à 95°C suivie de 30 cycles consistant en une dénaturation de 30 sec à 95°C, un appariement de 1 min à 58°C et une synthèse d'ADN de 1 min à 72°C. À la toute fin, la synthèse d'ADN est poursuivie pendant 7 autres minutes, et la température est ramenée à 4°C.

Pour l'analyse des différents produits d'amplification, 10 µl de ceux-ci sont mélangés à 4 µl de tampon de chargement et déposés dans un gel d'agarose

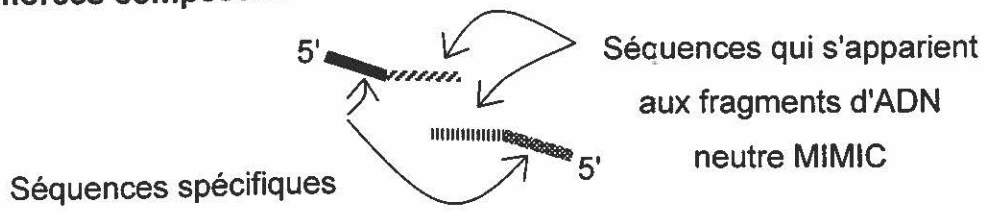
1,5%. Après migration dans un tampon TBE 1X à un voltage de 100 volts (BioRad modèle 500/200, Mississauga, Ont.) pendant environ une heure trente minutes, le gel est trempé dans une solution contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium pendant trente minutes. Le gel est photographié sous une lumière ultraviolette. L'intensité des bandes obtenues est évaluée à l'aide d'un densitomètre (BioRad, modèle GS-670, Mississauga, Ont.). Par la suite, le rapport des valeurs de densitométrie TNF/G3PDH a été calculé pour chacun des échantillons.

Pour les réactions de PCR avec standard interne, à partir d'ADN "neutre" d'origine commerciale, le standard interne a été fabriqué et celui-ci a été ajouté au mélange réactionnel. Le standard interne a été fabriqué à partir de la trousse PCR MIMIC (CLONTECH Laboratories Inc, Palo Alto, CA) (figure 3). Lors de l'amplification où se trouvent simultanément l'ADNc du gène d'intérêt et le standard interne, deux produits de longueurs différentes sont recueillis, ce qui se traduira par la présence de deux bandes: l'une correspondant à l'amplification du gène d'intérêt et l'autre correspondant à celle du standard interne.

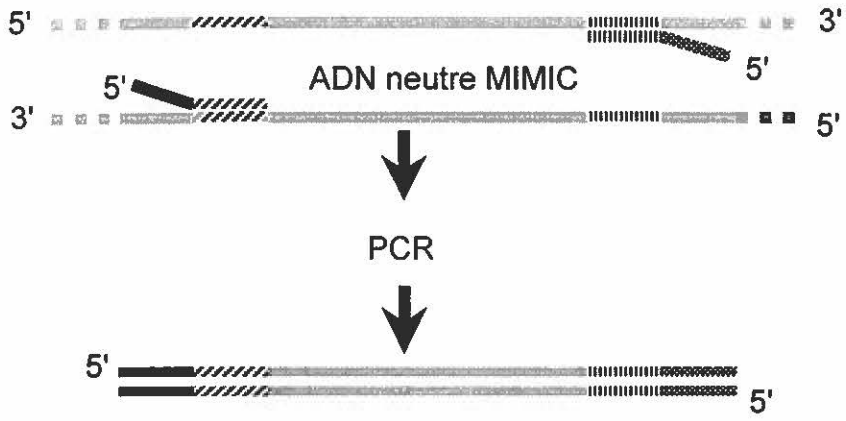
Figure 3: Construction d'un standard interne (MIMIC)

Une première série "d'amorces composées" est synthétisée. Elles comportent à une extrémité la séquence spécifique d'appariement au gène recherché et à l'autre, la séquence d'appariement au fragment d'ADN neutre MIMIC. Le choix de la séquence d'appariement au MIMIC est déterminé en fonction de l'obtention, après amplification, d'un brin dont la longueur aura un différence de l'ordre de 10% de celle du gène amplifié recherché. La première étape permet d'obtenir le brin d'ADN neutre MIMIC comportant aux extrémités les séquences complémentaires des amorces du gène d'intérêt. La deuxième étape permet d'amplifier cet ADN neutre MIMIC afin d'en obtenir une grande quantité de ce qui sera le standard interne, le MIMIC. Par la suite, le MIMIC est purifié sur une colonne CHROMA SPIN+TE-100 (CLONTECH Laboratories Inc, Palo Alto, CA). Il est quantifié par densitométrie et dilué à 100 attomoles/ml dans une solution de glycogène, 10 µg/ml.

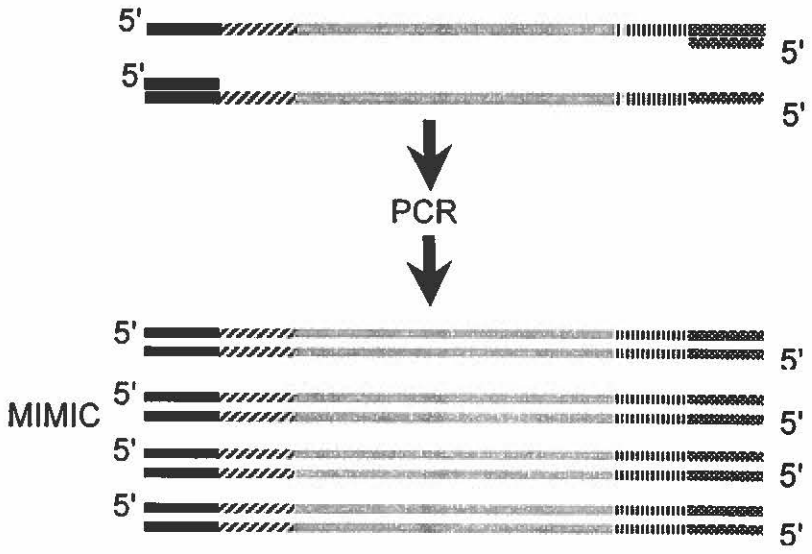
"Amorces composées"



Étape 1: Amplification avec les amorces composées (Séquences spécifiques et d'appariement à l'ADN neutre MIMIC)



Étape 2: Amplification avec les amorces spécifiques seulement

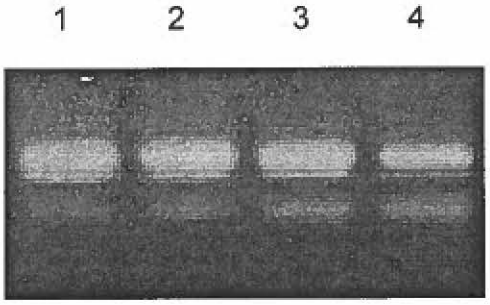


3.3 Calculs des MIMICs

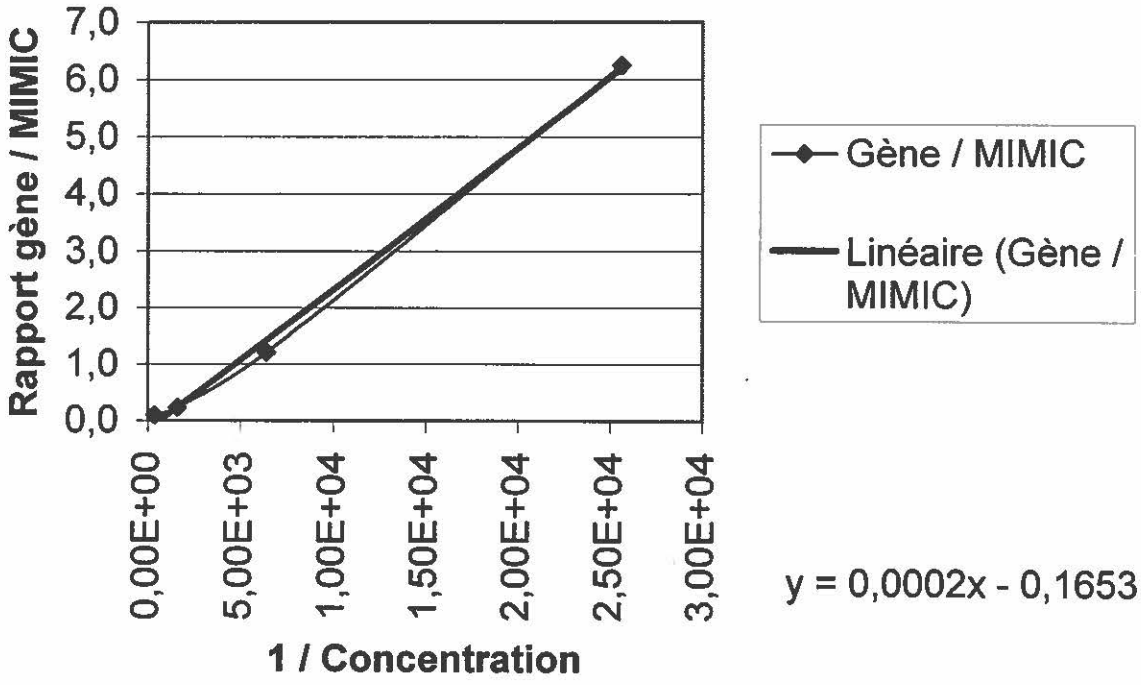
Par densitométrie, les intensités des bandes du MIMIC et du gène d'intérêt sont mesurées. Pour chaque échantillon, le rapport de l'intensité de la bande du gène d'intérêt sur celle du MIMIC est calculé. Sur un graphique, les valeurs inverses des dilutions de MIMIC sont portées en abscisse et les valeurs des rapports gène/MIMIC sont portées en ordonnée. La quantité de gène recherché pourra être évaluée en sachant que lorsque le rapport gène/MIMIC est égal à 1, il y a autant de gène que de MIMIC. Par conséquent, l'inverse de la dilution y correspondant permet de calculer la quantité de gène dans l'échantillon. La figure 4 en donne un exemple. Comme le graphique donne une droite, et que l'équation de la courbe est de la forme $Y = aX + b$, en posant $Y = 1$ (rapport gène / MIMIC lors de l'équimolarité) , et en isolant X , l'équation devient: $X = (1-b)/a$. Comme X est l'inverse de la dilution, 1/X donne la dilution exprimée en attomole/µl.

Figure 4: Exemple de graphique lors de la quantification de l'ARNm du gène TNF à l'aide du MIMIC

À partir des données recueillies pour le TNF, le graphique peut être construit après les calculs de l'inverse de la concentration du MIMIC et du rapport de l'intensité des bandes pour le gène et le MIMIC. À l'aide du logiciel Microsoft Excel 97, l'équation de la pente est calculée. Les calculs qui en découlent peuvent être faits à partir de celle-ci.



	Concentration du MIMIC amol/µl	1/concen-tration µl/amol	Intensité de la bande gène TNF	Intensité de la bande MIMIC TNF	Rapport gène/MIMIC
1	$2,05 \times 10^{-3}$	$4,00 \times 10^{2}$	9	89	0,101
2	$6,25 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^{3}$	15	65	0,231
3	$1,56 \times 10^{-4}$	$6,40 \times 10^{3}$	29	24	1,208
4	$3,91 \times 10^{-5}$	2.56×10^{4}	25	4	6,250



4. Dosage du TNF bio-actif

Le dosage du TNF de porc peut être effectué par un test de cytoxicité à l'aide des cellules PK15 (cellules de rein de porc). Ces cellules, contrairement aux cellules L929 habituellement employées pour doser le TNF d'origine murine ou humaine, sont plus sensibles au TNF bio-actif d'origine porcine. (Pauli *et al.*, 1994)

Les PK15 sont mises en culture dans du milieu E-MEM contenant 10% (v/v) de sérum fœtal de bovin, 1% (v/v) d'antibiotiques (50 U.I./ml de pénicilline et 50 mg/ml de streptomycine) (Gibco-BRL, Burlington, Ont.), 10 mM d'HEPES (Gibco-BRL, Burlington, Ont.), 1X d'acides aminés non-essentiels (Gibco-BRL, Burlington, Ont.), 1X glutamine (Gibco-BRL, Burlington, Ont.) et 1X pyruvate de sodium (Gibco-BRL, Burlington, Ont.) (milieu E-MEM complet). Elles sont ensuite incubées à 37°C dans un flacon de 75 cm^2 (Sarsted, St-Laurent, Qc) jusqu'à l'obtention d'un feuillet confluent.

Le surnageant est enlevé et le feuillet cellulaire est lavé avec du PBS. Un mélange de Trypsine-EDTA (0,05% (p/v) trypsine; 0,53 mM EDTA; Gibco-BRL, Burlington, Ont.) est ajouté en quantité minimale pour couvrir le feuillet cellulaire, et le flacon est incubé environ 7 min à 37°C, jusqu'à ce que les cellules soient décollées. L'usage d'une pipette Pasteur permet, à cette étape, de complètement décoller les cellules et d'obtenir une suspension de cellules isolées. À cette suspension, 2 ml de milieu E-MEM complet sont ajoutés pour chaque 0,5 ml de trypsine-EDTA ajoutée. Un échantillon de 50 µl de la suspension cellulaire est mélangé à 50 µl de Bleu Trypan afin de compter les cellules viables à l'aide d'un hémacymètre. La concentration cellulaire est ensuite ajustée à 4,0 x 10^5 cellules par millilitre et, dans une plaque de 96 puits à fond plat (Sarsted, St-Laurent, Qc), 75 µl sont distribués dans chacun des puits, sauf pour la première colonne qui servira de blanc. La plaque est incubée à 37°C pendant 24 h ou jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire confluent. Ensuite,

25 µl d'actinomycine-D (Boehringer Ingelheim, Laval, Qc) à 2 µg/ml est ajouté dans les puits, sauf pour les colonnes 1 et 2. La colonne 2 sert de témoin de croissance des cellules PK15 et la colonne 3 sert de témoin négatif nécessaire lors du calcul du pourcentage de cytotoxicité (Maximum). Les échantillons sont ajoutés en triplicata, par exemple, 100 µl dans le premier puits des colonnes 4, 5 et 6. Des dilutions consécutives "1 dans 2" ou "1 dans 4" sont effectuées à partir des trois puits de la première ligne jusqu'à la huitième. Après une incubation à 37°C, 5% CO_2 pour une période de 16 à 20 h, le couvercle est enlevé, la plaque retournée au dessus d'un récipient et, d'un seul coup vif, la plaque est secouée afin d'enlever le surnageant. Par la suite, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de formaldéhyde (Fisher, Montréal, Qc) à 5% (v/v), 100 µl par puits, pendant 5 min. La solution est ensuite enlevée de la même manière que pour le surnageant, et la plaque est rincée 2 à 3 fois avec l'eau du robinet. Les cellules sont colorées avec une solution de cristal violet 1% (p/v), 50 µl par puits, pendant 5 min. La plaque est ensuite rincée 2 à 3 fois avec de l'eau. Lorsque la plaque est complètement sèche, 100 µl d'une solution d'acide acétique (Fisher, Montréal, Qc) 33% sont ajoutés dans chacun des puits, et la plaque est agitée doucement pendant quelques minutes (jusqu'à ce que le cristal violet soit complètement dissout). La plaque est lue au spectrophotomètre à 540 nm. Le pourcentage de cytotoxicité se calcule à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ cytotoxicité} = 1 - \left(\frac{\text{Moyenne des tests}}{\text{Moyenne du maximum}} \right) \times 100$$

Par la suite, sur un graphique en échelle probit, en abscisse sont placées les valeurs des dilutions (log en base de la dilution: dans ce cas-ci, les dilutions sont de 1 dans 2 donc le log sera en base 2), et en ordonnée sont placés les pourcentages de cytotoxicité. L'unité de TNF est définie lorsque la cytotoxicité

est de 50%. Le graphique permet donc de trouver la dilution correspondant à une cytotoxicité de 50%.

5. Dosage du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote produit par des macrophages activés est retrouvé dans le milieu de culture sous la forme de nitrite (NO_2^-) et de nitrate (NO_3^-). Le réactif de Greiss permet de déterminer la quantité de nitrite présent et ainsi, indirectement, le monoxyde d'azote produit peut être dosé. Le réactif de Greiss est composé d'un volume de sulfonamide 1% (Sigma, Oakville, Ont.) dans de l'acide phosphorique 2,5% (Fisher, Montréal, Qc) et d'un volume de (1-naphthyl)ethylenediamine 0,1% (Sigma, Oakville, Ont.) dans l'eau. À 100 µl d'échantillon, 100 µl du réactif de Greiss ont été ajoutés et mélangés dans une plaque 96 puits à fond plat (Sarsted, St-Laurent, Qc). La plaque est incubée 30 min à la température de la pièce, et est lue à 540 nm. La concentration en nitrite dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe standard de nitrite, et est exprimée en µM NO / ml par nombre de cellules en culture.

6. Utilisation d'une lignée continue de macrophages

Afin de poursuivre les études comparatives entre les souches de PPV NADL-2 et Kresse, l'utilisation d'une lignée cellulaire continue aurait été souhaitable. Malheureusement, il n'existe pas de lignée continue de macrophage chez le porc. L'utilisation d'une lignée cellulaire continue de souris a été envisagée pour comparer l'action de deux souches différentes de parvovirus porcin. La justification de cet essai d'infection au parvovirus vient d'observations publiées. En effet, Schlehofer *et al.* (1992) ont montré qu'en infectant des cellules de rongeurs ou humaines avec les parvovirus MVM (Minute mice virus), H-1 (rat) et AAV type 2 ou 5, il y a eu une faible réponse pour le TNF, ce qui ouvre la porte à la possibilité de l'action d'un parvovirus agissant sur des cellules d'une espèce animale qui n'est pas son hôte habituel d'infection. Une lignée de macrophage de souris, les RAW 264.7, a été utilisée pour être infectée avec les souches de PPV Kresse et NADL-2.

Les RAW 264.7 sont mises en suspension dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% (v/v) FBS, 1X glutamine, 1% (v/v) d'antibiotiques (50 U.I./ml de pénicilline et 50mg/ml de streptomycine) et 10 mM d'HEPES (Gibco-BRL, Burlington, Ont.) à une concentration de 5 x 10^5 cellules/ml. Dans une plaque 24 puits, 1 ml de la suspension est distribué dans chacun des puits. La plaque est ensuite incubée à 37°C, en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 jusqu'au lendemain. Par la suite, 100 µl du témoin surnageant cellulaire (*S.C.*) et des différentes suspensions virales sont ajoutés, comme dans l'exemple suivant. Dans certains puits, 5 µl de LPS (100 ng/µl) sont ajoutés.

Exemple de distribution d'une plaque 24 puits

S.C.	NADL-2 10^7	NADL-2 10^6	NADL-2 10^5	NADL-2 10^4	
S.C. LPS	NADL-2 10^7 LPS	NADL-2 10^6 LPS	NADL-2 10^5 LPS	NADL-2 10^4 LPS	
S.C.	Kresse 10^7	Kresse 10^6	Kresse 10^5	Kresse 10^4	
S.C. LPS	Kresse 10^7 LPS	Kresse 10^6 LPS	Kresse 10^5 LPS	Kresse 10^4 LPS	

La plaque est ensuite incubée pour une période de 3 ou 6 h pour la mesure de la production de TNF bio-actif et pour un période de 24 h pour mesurer la production de NO.

Pour la quantification de TNF de souris présent dans ce surnageant, les cellules L929 ont été utilisées. La méthode est la même que pour les PK15 mais les cellules de départ sont les L929 ajustées à $3,3 \times 10^5$ cellules/ml.

RÉSULTATS

1. Effet dose-réponse du PPV sur l'expression de l'ARNm: méthode du PCR semi-quantitatif

Des échantillons de sang ont été prélevés pour les porcs portant les numéros 2651 et 2654. Pour chacun de ceux-ci, les PBMC ont été isolées et mis en culture. Les cellules ont été incubées pendant 6 h avec différentes quantités de virus de la souche NADL-2 en présence ou en absence de LPS. À titre de témoin négatif, la suspension virale a été remplacée par du milieu RPMI.

Pour chacun des échantillons, deux PCR ont été effectués: un pour le gène TNF et l'autre pour la G3PDH. Pour un même échantillon, le rapport de l'intensité des bandes du TNF et de la G3PDH a été calculé et les résultats sont présentés à la figure 5.

Pour le porc 2651, en absence de LPS, le rapport TNF/G3PDH est en général augmenté (sauf pour la dilution 1/1000) lorsqu'il y a infection virale mais il n'y a pas de variation dose-dépendante. En présence de LPS, il ne semble pas y avoir de modulation significative du TNF lorsqu'il y a infection virale.

Pour le porc 2654, en absence de LPS, contrairement au porc 2651, le rapport TNF/G3PDH est diminué lorsqu'il y a infection virale pour les dilutions "1/10", "1/100" et "1/10 000". En présence de LPS, la réponse du témoin est plus faible que la réponse sans LPS. En présence de NADL-2, il ne semble pas y avoir eu de réponse sauf pour l'échantillon "1/10".

Les expériences sur ces deux porcs donnent des résultats très variables et ne permettent pas de voir l'effet de la concentration de la suspension virale lors d'une infection avec NADL-2 sur la concentration de transcrits d'ARNm du TNF.

Lors de l'expérience suivante, les PBMC d'un échantillon de sang du porc 2660 ont été mis en culture pour une période de 6 h en présence de différentes dilutions de suspensions virales des souches NADL-2 et Kresse, en absence de LPS. Deux témoins ont été utilisés: RPMI seul, comme précédemment, et PPV des deux souches inactivées à la chaleur ("Mock"). Ce témoin supplémentaire permet de voir l'effet antigénique du virus sans que ce dernier ne puisse se répliquer. La figure 6 montre les résultats obtenus pour le porc 2660 sans stimulation au LPS, et avec les deux souches virales NADL-2 et Kresse. Il n'y a pas de différence majeure observée entre le mock et les dilutions virales (sauf pour la dilution N 1/10). Par contre, par rapport au témoin négatif (RPMI), il y a eu stimulation de la production d'ARNm lors de l'infection avec NADL-2 et une diminution des transcrits d'ARNm en présence de Kresse. Il n'y a pas de réponse dose-dépendante dans les deux cas mais NADL-2 semble stimuler la production de transcrit d'ARNm du TNF alors que Kresse semble l'inhiber. Par contre, comme la stimulation a été faite sur une même suspension de PBMC, les valeurs obtenues pour le témoin milieu RPMI sont étranges. Par contre, l'extraction des ARNm et les réactions de RT-PCR n'ont pas été effectuées au même moment.

Comme les suspensions virales qui ont été fournies ne sont pas pures, et que ces dernières peuvent donc contenir des débris cellulaires ou autres métabolites produits lors de l'activité cellulaire, il était nécessaire d'ajouter le témoin "*S.C.*", c'est à dire un surnageant de culture de cellules PFT non infectées. Les PBMC d'un échantillon de sang du porc 2658 ont été mis en culture en absence de LPS. Le témoin négatif, le mock , le *S.C.* et trois dilutions des suspensions virales ont été utilisés pour une infection de 6 h. Les rapports de densitométrie sont calculés pour chacun des échantillons et sont présentés à la figure 7.

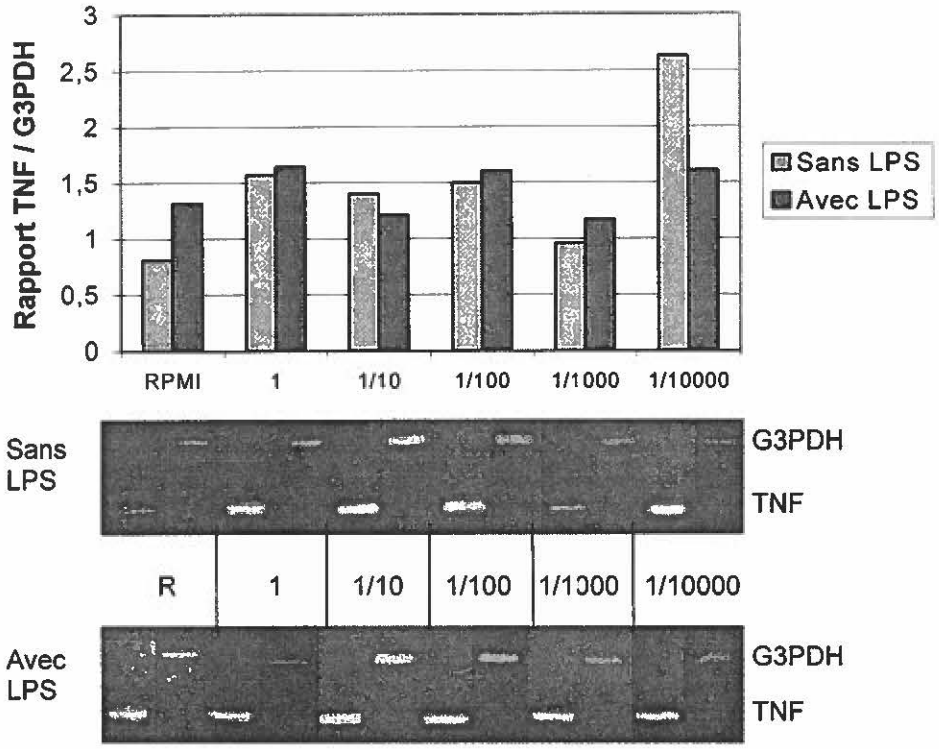
Le "*S.C.*" et le "Mock" semblent avoir le même effet l'un par rapport à l'autre. Mais par rapport au témoin négatif "RPMI", il y a une légère inhibition du rapport TNF/G3PDH du "Mock" en présence de NADL-2 et du "*S.C*", et une augmentation de ceux-ci dans l'expérience en présence de Kresse. Par rapport au "Mock" et au "*S.C.*", il y a une augmentation de la production de transcrit d'ARNm en présence de NADL-2 et une diminution en présence de Kresse comme avec le porc 2660 de l'expérience précédente. Afin d'augmenter la précision des résultats, les même échantillons ont été repris en ajoutant un standard interne lors de la réaction PCR.

Figure 5: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF dans les cellules mononucléées du sang après 6 h de culture avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2, en présence ou en absence de LPS.

Les dilutions sériées de la souche virale identifiées en abscisse ont été effectuées à partir d'une suspension contenant 10^8 particules/ml. À chaque puits contenant 1 x 10^6 cellules ont été ajoutés 100 µl de la dilution indiquée. Les valeurs en ordonnées correspondent au rapport d'intensité des bandes obtenues par RT-PCR pour le TNF et la G3PDH mesurées par densitométrie. Les photographies obtenues sont présentées et "R" indique le témoin milieu RPMI.

*: échantillon non disponible

porc 2651



porc 2654

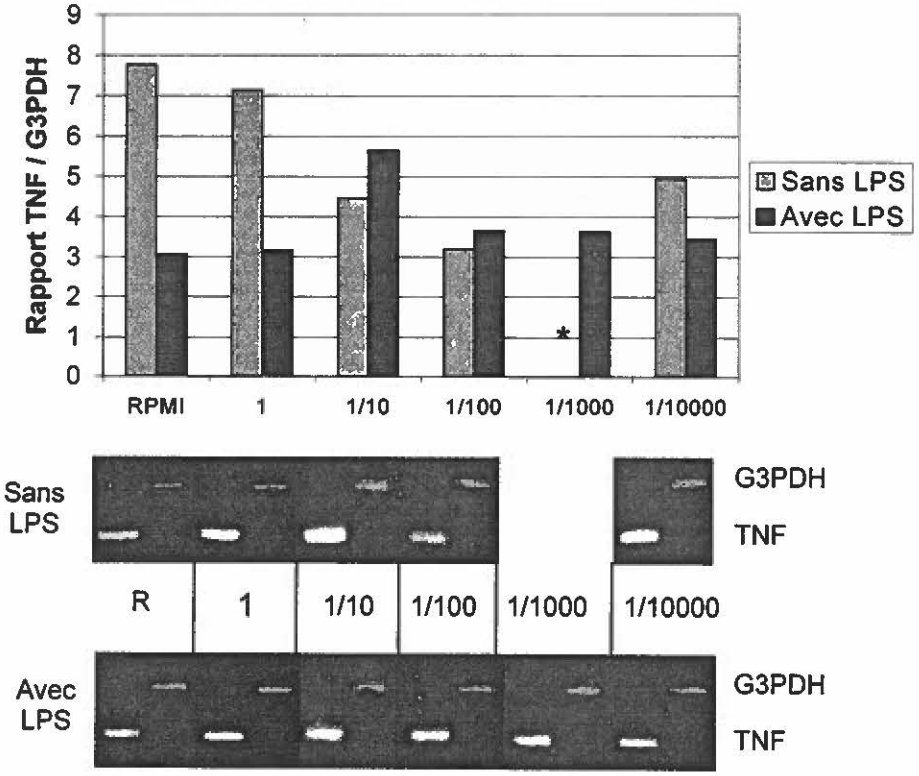
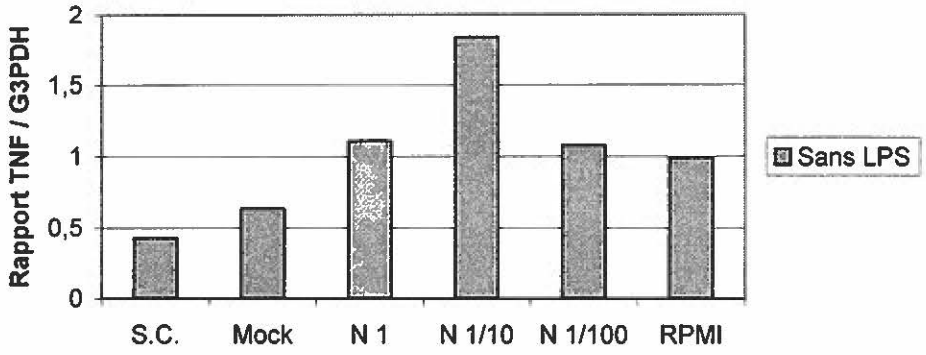
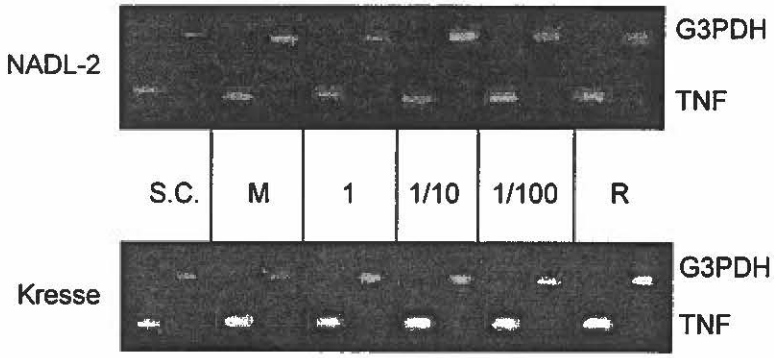


Figure 6: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF dans les cellules mononucléées du sang après 6 h de culture avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2 ou Kresse, en absence de LPS.

Les dilutions sériées des souches virales NADL-2 (N) ou Kresse (K) identifiées en abscisse ont été effectuées à partir d'une suspension contenant 10^8 particules/ml. À chaque puits contenant 1 x 10^6 cellules ont été ajoutés 100 µl de la dilution indiquée, de milieu RPMI (RPMI ou "R") ou de virus inactivé à la chaleur (Mock ou "M"). Les valeurs en ordonnées correspondent au rapport d'intensité des bandes obtenues par RT-PCR pour le TNF et la G3PDH mesurées par densitométrie. Les photographies des gels sont présentées.

porc 2658 avec NADL-2





porc 2658 avec Kresse

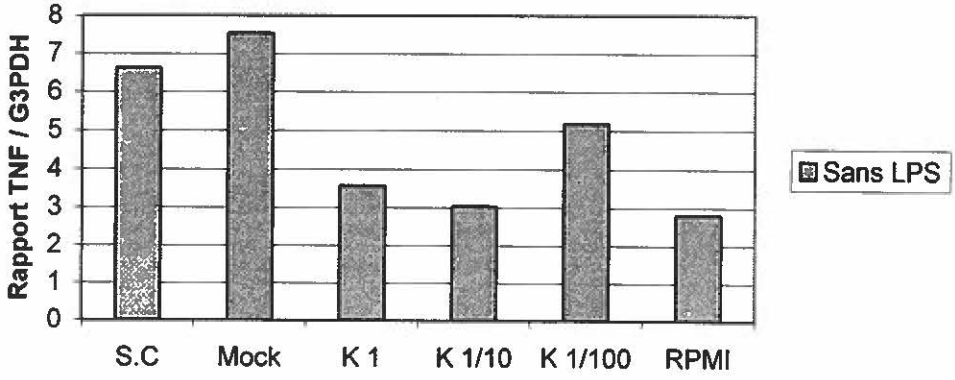
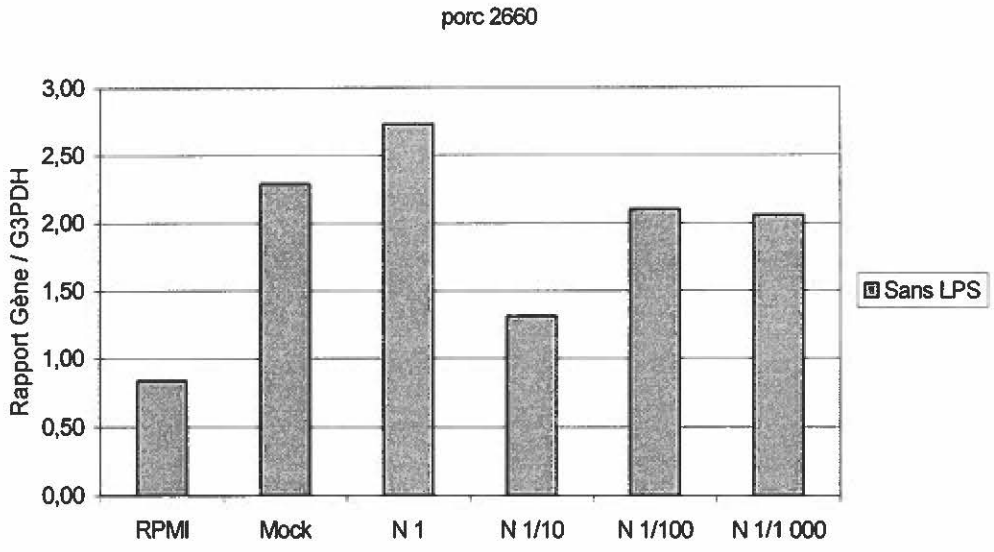
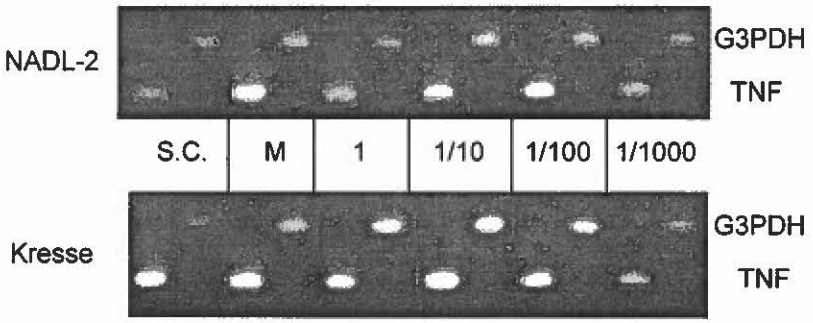
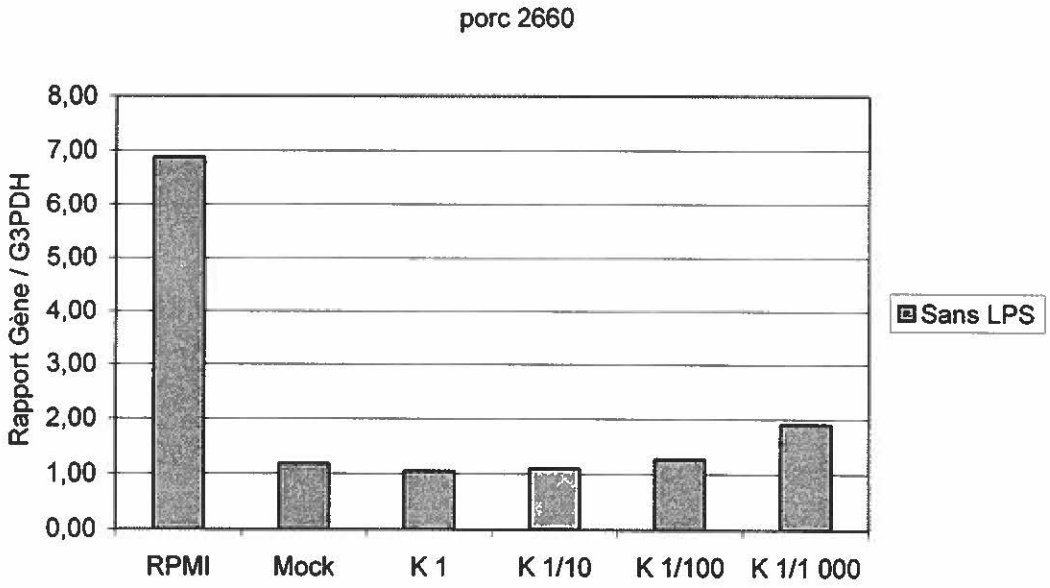


Figure 7: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF dans les cellules mononucléées du sang après 6 h de culture avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2 ou Kresse, en absence de LPS.

Les dilutions sériées des souches virales NADL-2 (N) ou Kresse (K) identifiées en abscisse ont été effectuées à partir d'une suspension contenant 10^8 particules/ml. À chaque puits contenant 1 x 10^6 cellules ont été ajoutés 100 µl de la dilution indiquée, de milieu RPMI (RPMI ou "R"), de surnageant cellulaire provenant de la culture de cellules PFT on infectées au PPV (S.C.) ou de suspension virale inactivée à la chaleur (Mock ou "M"). Les valeurs en ordonnées correspondent au rapport d'intensité des bandes obtenues par RT-PCR pour le TNF et la G3PDH mesurées par densitométrie. Les photographies des gels sont présentées.


porc 2660
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Rapport Gène / G3PDH
RPMI
Mock
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1 000
Sans LPS


NADL-2
G3PDH
TNF
S.C.
M
1
1/10
1/100
1/1000
Kresse
G3PDH
TNF


porc 2660
8,00
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
Rapport Gène / G3PDH
RPMI
Mock
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1 000
Sans LPS

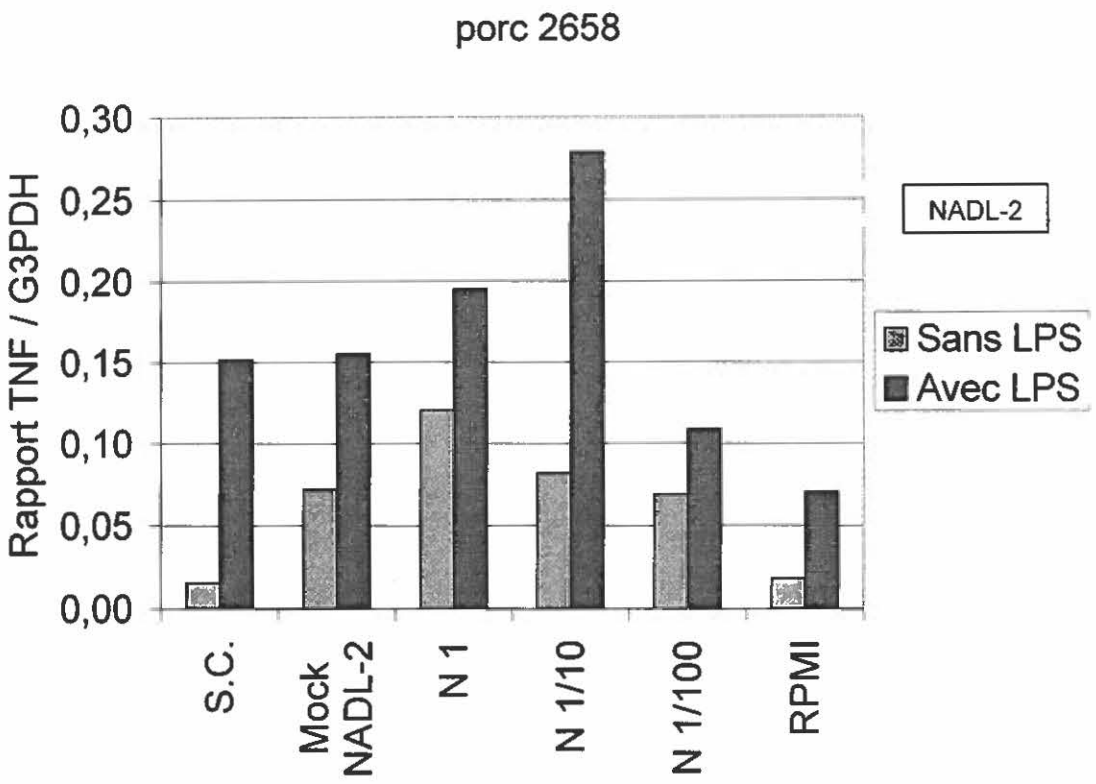
2. Effet dose-réponse du PPV sur l'expression de l'ARNm: évaluation quantitative par PCR, à l'aide d'un standard interne

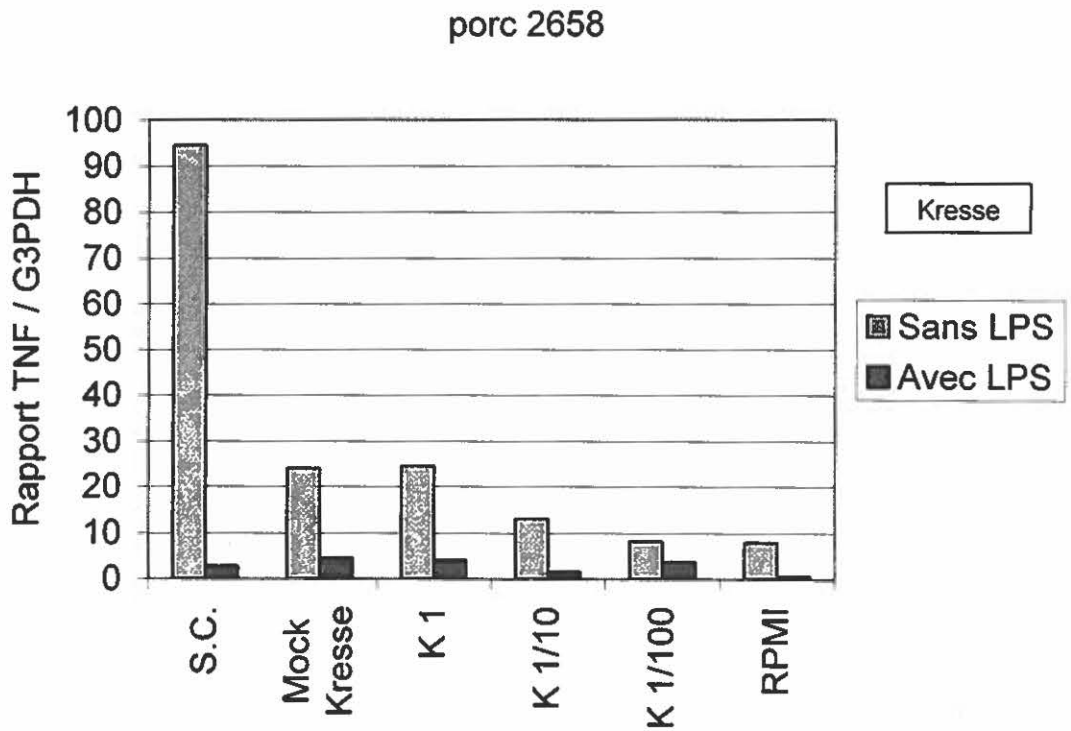
L'utilisation d'un standard interne par la technique de PCR quantitatif "MIMIC" permet d'estimer le nombre de transcrits d'ARNm d'un gène recherché qui sont présents dans un échantillon donné. Les échantillons du porc 2658 ont été repris avec cette technique. La figure 8 montre les résultats obtenus. En absence de LPS, autant pour NADL-2 que pour Kresse, il y a un effet dose-réponse. En effet, le rapport TNF/G3PDH diminue lorsque la concentration de la suspension virale correspondante diminue. Par contre, dans le cas de Kresse, il y a quelques résultats aberrants. En absence de LPS, le "*S.C.*" a énormément stimulé, et en présence de LPS les rapports sont plus faibles que ceux obtenus en absence de LPS.

Comme la technique du MIMIC exige un grand nombre de manipulations et que seulement quelques échantillons peuvent être traités à la fois, une autre technique de dosage du TNF a été mise au point: et a été utilisée: le bio-essai.

Figure 8: Mesure de la concentration intracellulaire de l'ARNm du TNF, par la technique du MIMIC, dans les cellules monomucléées du sang après 6 h de culture avec des concentration variables de parvovirus des souches NADL-2 ou Kresse, en présence ou en absence de LPS.

Les dilutions sériées des souches virales NADL-2 (N) ou Kresse (K) identifiées en abscisse ont été effectuées à partir d'une suspension contenant 10^8 particules/ml. À chaque puits contenant 1 x 10^6 cellules ont été ajoutés 100 µl de la dilution indiquée, de milieu RPMI, de surnageant cellulaire provenant de la culture de cellules PFT on infectées au PPV (S.C.) ou de suspension virale inactivée à la chaleur (Mock). Les valeurs en ordonnées correspondent au rapport des concentrations obtenues pour le TNF et la G3PDH mesurées par la technique du MIMIC.


porc 2658
Rapport TNF / G3PDH
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
S.C.
Mock NADL-2
N 1
N 1/10
N 1/100
RPMI
NADL-2
Sans LPS
Avec LPS


porc 2658
Rapport TNF / G3PDH
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
S.C.
Mock Kresse
K 1
K 1/10
K 1/100
RPMI
Kresse
Sans LPS
Avec LPS

3. Effet dose-réponse du PPV sur la production de TNF bio-actif

Contrairement à la technique du RT-PCR qui permet d'observer la présence de transcrits d'ARNm, le bio-essai permet de mesurer le TNF bio-actif qui a été synthétisé, et sécrété dans le surnageant sous une forme fonctionnelle. Cette technique a permis d'obtenir beaucoup de résultats, et ceci beaucoup plus rapidement que la technique de RT-PCR. En absence de stimulation par le LPS, tous les échantillons étaient "négatifs" (quantité de TNF inférieure au seuil de détection du bio-essai) quels qu'aient été les traitements dans les puits. Les résultats présentés ont donc tous été obtenus en présence d'une stimulation par le LPS. Pour tous les résultats obtenus par bio-essai, seulement le témoin "*S.C.*" a été utilisé et les résultats sont exprimés en multiple par rapport à ce dernier, sauf dans le cas de la cinétique, où les résultats sont exprimés en unités de TNF par millilitre (U TNF / ml).

Les surnageants de culture des PBMC du porc 2658 de l'expérience précédente ont été testés et les résultats sont présentés à la figure 9. Pour ce porc, la présence de TNF dans le surnageant augmente lorsque la concentration virale diminue, qu'il s'agisse de NADL-2 ou de Kresse. La réponse obtenue en présence de Kresse est plus faible qu'en présence de NADL-2. De plus, la variation observée semble, curieusement, inversement dépendante de la dose.

Comme il a été difficile de reproduire ces résultats avec d'autres porcs, une cinétique a été effectuée, afin de déterminer si les conditions utilisées dans l'expérience précédente étaient vraiment optimales. Un échantillon de sang du porc sacrifié 2689 a été prélevé et les PBMC ont été mis en culture dans des plaques de 24 puits, en présence de LPS, avec le témoin "*S.C.*" et trois dilutions de suspensions virales de NADL-2. Trois plaques ont été préparées et elles ont été incubées pour des périodes de 3 h, 6 h et 24 h respectivement. Les résultats obtenus, présentés à la figure 10, montrent un effet dose-réponse inversé, comme c'était le cas avec le porc 2658 présenté précédemment. Par contre, la

réponse est deux fois plus forte lors de la cinétique de 3 h comparativement à celle de 6 h. À 12 h, la réponse est très faible et il n'y a pas de différences observables entre les diverses stimulations. Mais de nouveau, il n'a pas été possible de reproduire ces résultats avec un autre porc, pourtant de la même portée, et l'expérience n'a pas pu être réalisée avec Kresse sur ce porc, qui avait été sacrifié au moment de la première récolte de sang.

Les surnageants de culture de PBMC, stimulés comme précédemment, pour des périodes d'incubation de 1 h 30 min, 3 h ou 6 h, ont été récoltés lors des expériences avec différents porcs et le TNF bio-actif a été mesuré. Les résultats sont présentés aux figures 11, 12 et 13 respectivement. À la figure 11, les résultats des différents porcs démontrent une grande variabilité d'un porc à l'autre. Le porc 2692 semble ne pas avoir répondu du tout. À la figure 12, les résultats du porc 2689 obtenus lors de la cinétique avec NADL-2 sont présentés (figure du bas) comme référence. Encore là, les résultats sont différents pour chacun des porcs, autant pour NADL-2 que pour Kresse. À la figure 13, les résultats obtenus précédemment avec le porc 2689 (cinétique avec NADL-2) et le porc 2658 sont présentés en références. Les trois autres porcs présentés (2634, 2695 et 2696) ne permettent pas de confirmer les résultats obtenus avec les porcs 2689 et 2658. En conclusion, la réponse immunitaire au niveau de la sécrétion de TNF dans le surnageant est très variable d'un porc à l'autre et, s'ils permettent d'affirmer qu'il y a très probablement une réponse au niveau du TNF lors d'une infection avec NADL-2 ou Kresse, ils ne permettent pas de montrer une différence de réponse entre les deux souches virales de PPV.

Figure 9: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 6 h avec des concentrations variables de parvovirus des souches NADL-2 ou Kresse, en présence de LPS.

Les suspensions virales sont ajoutée à raison de 100 µl/puits de la dilution indiquée pour NADL-2 (N) et Kresse (K) préparées à partir d'une suspension initiale contenant 10^8 particules/ml. Les résultats sont exprimés sous forme de rapport en référence au surnageant provenant de la culture des cellules PFT non infectées (S.C.)

porc 2658

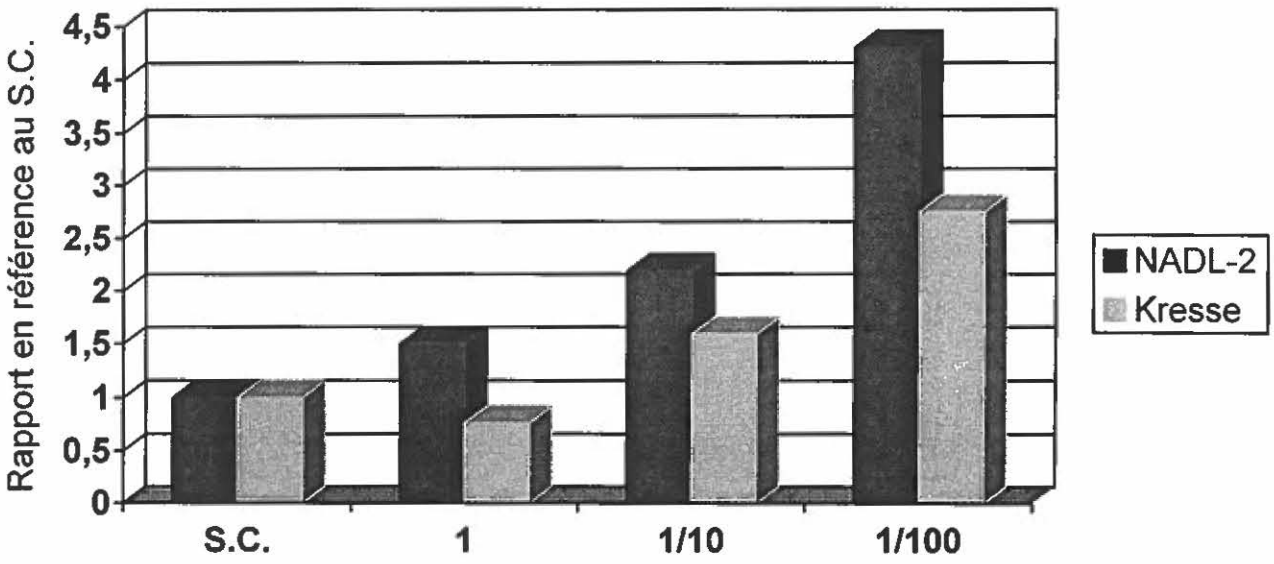

Rapport en référence au S.C.
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
S.C.
1
1/10
1/100
NADL-2
Kresse

Figure 10: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées pendant 3 h, 6 h et 12 h avec des concentrations variables de parvovirus porcin de la souche NADL-2.

À chaque puits contenant 1 x 10^6 cellules/ml provenant d'une même suspension, 100 µl des dilutions indiquées, préparées à partir d'une suspension initiale de la souche NADL-2 contenant 10^8 particules/ml, ont été ajoutés. Les échantillons ont été stimulés et dosés en même temps. Les résultats sont présentés unité (U) de TNF/ml qui est défini par la dilution permettant d'obtenir une cytotoxicité de 50%.

porc 2689

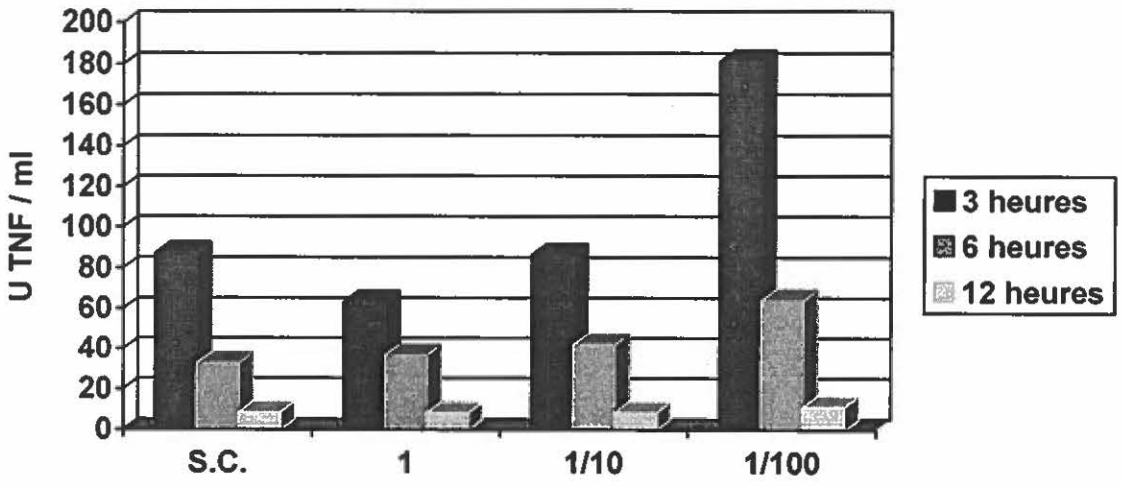
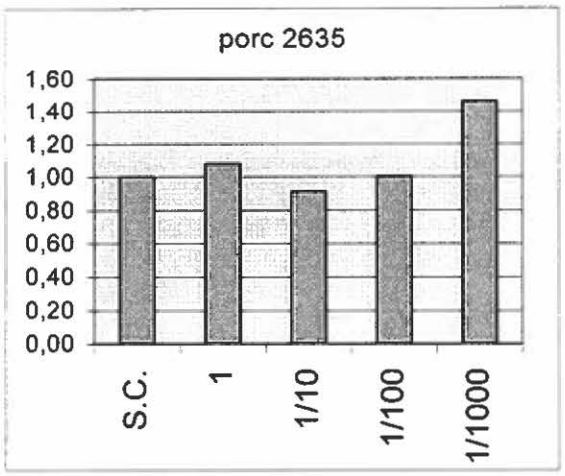
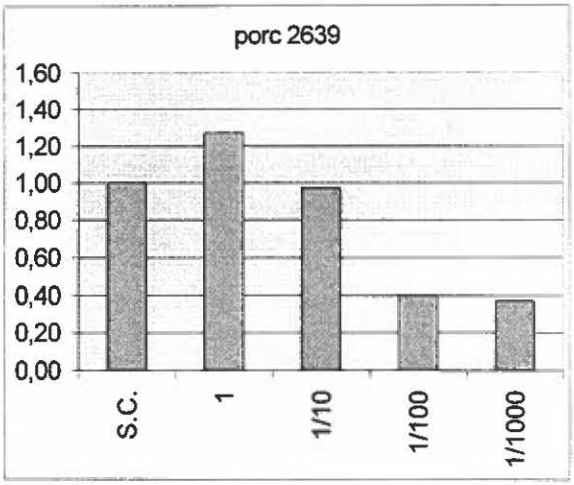
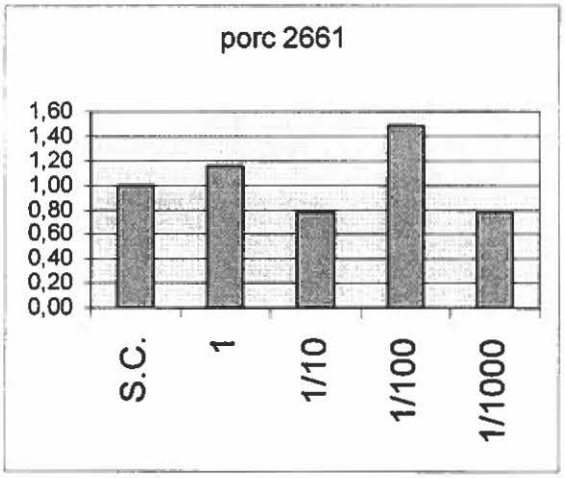

200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
U TNF / ml
S.C.
1
1/10
1/100
3 heures
6 heures
12 heures

Figure 11: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 1 h 30 avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2.

La suspension virale a été ajoutée à raison de 100 µl/puits de la dilution indiquée préparée à partir d'une suspension initiale contenant 10^8 particules/ml. Toutes les cultures contenaient du LPS. Les valeurs en ordonnées correspondent au rapport en référence au S.C. (surnageant cellulaire provenant de la culture de cellules PFT non infectées au PPV).


porc 2635
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
1
1/10
1/100
1/1000


porc 2639
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
1
1/10
1/100
1/1000


porc 2661
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
1
1/10
1/100
1/1000

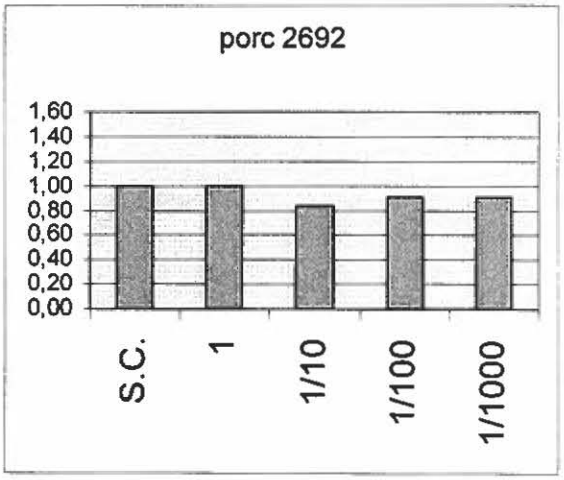
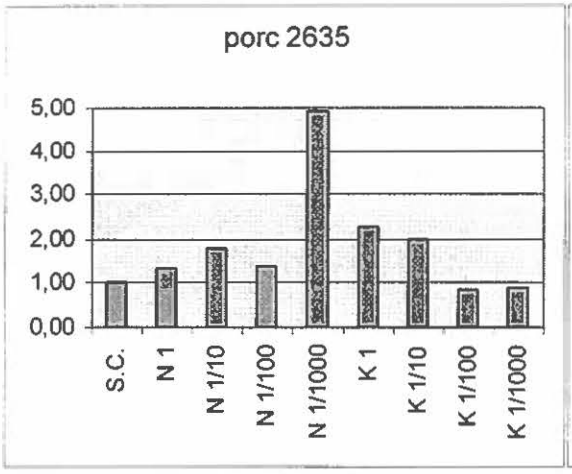
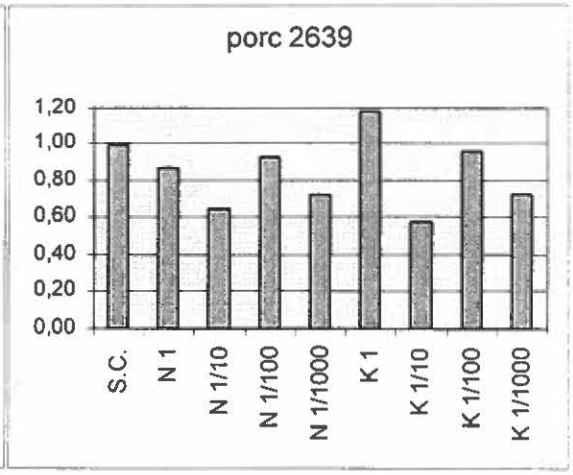
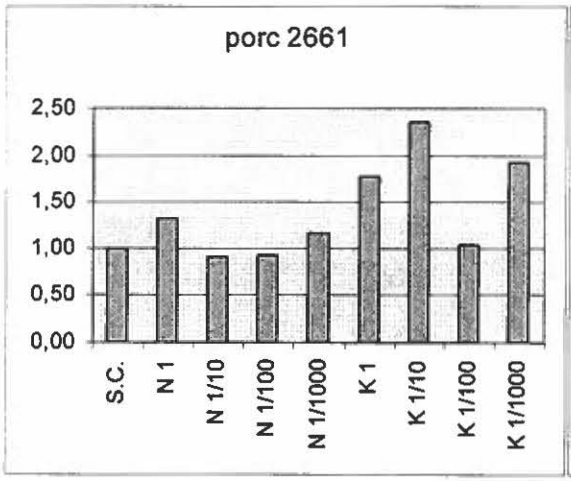

porc 2692
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
1
1/10
1/100
1/1000

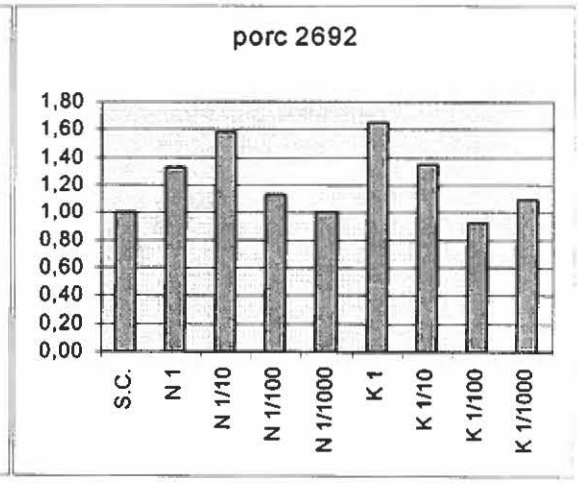
Figure 12: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 3 h avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2.

La suspension virale a été ajoutée à raison de 100 µl/puits de la dilution indiquée préparée à partir d'une suspension initiale contenant 10^8 particules/ml. Toutes les cultures contenaient du LPS. Les valeurs en ordonnées correspondent au ratio par rapport au S.C. (surnageant cellulaire provenant de la culture de cellules PFT non infectées au PPV).


porc 2635
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000


porc 2639
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000


porc 2661
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000


porc 2692
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000

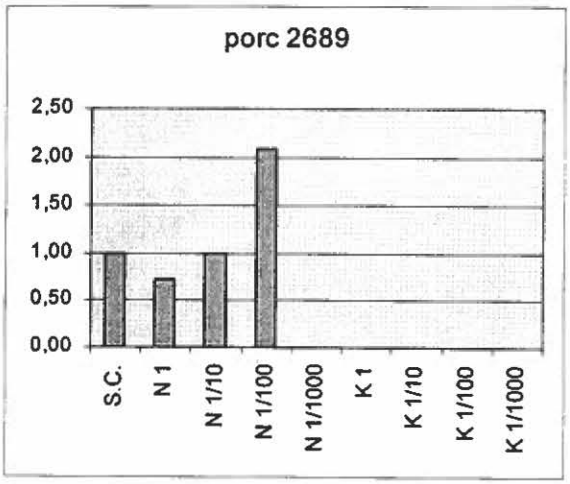
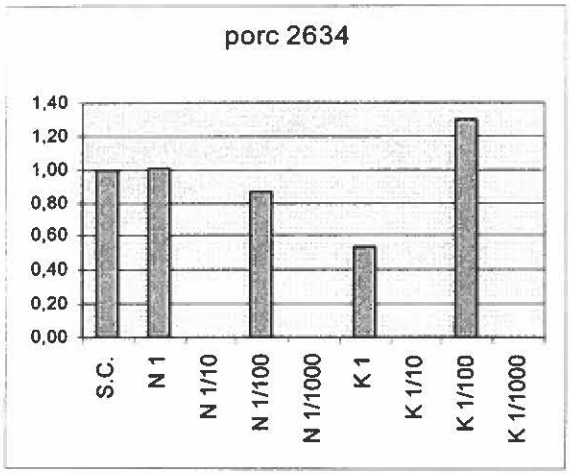
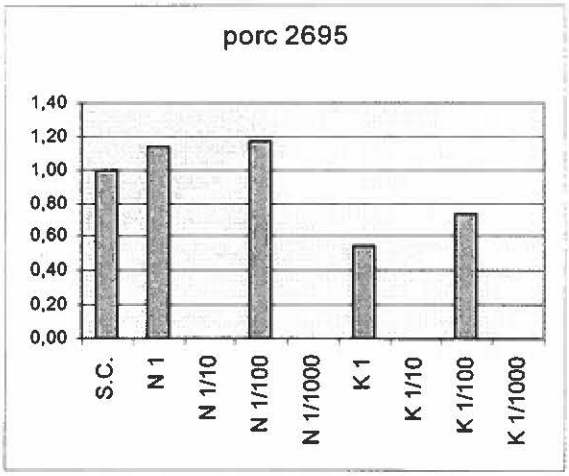
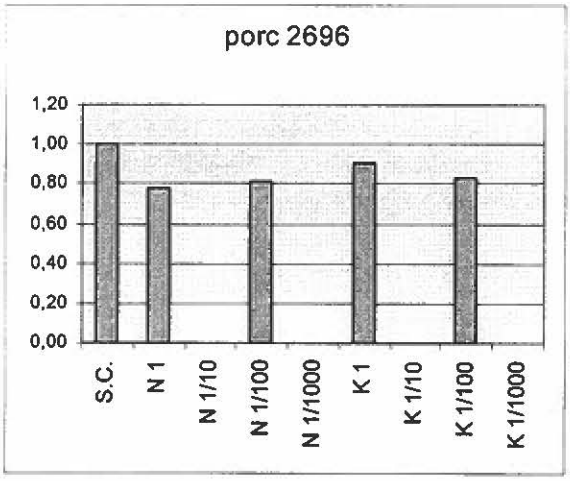

porc 2689
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000

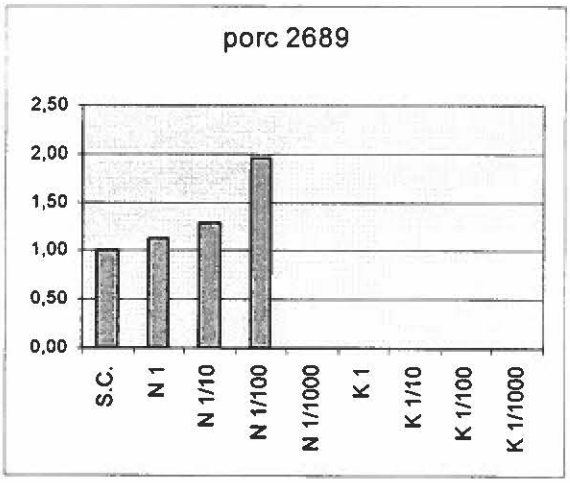
Figure 13: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules mononucléées du sang cultivées 6 h avec des concentrations variables de parvovirus de la souche NADL-2.

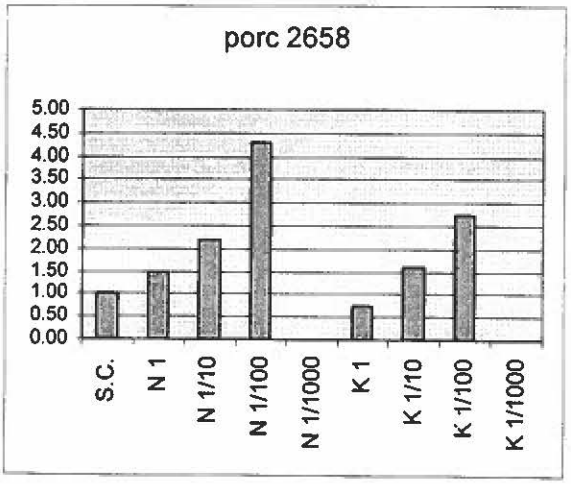
La suspension virale a été ajoutée à raison de 100 µl/puits de la dilution indiquée préparée à partir d'une suspension initiale contenant 10^8 particules/ml. Toutes les cultures contenaient du LPS. Les valeurs en ordonnées correspondent au ratio par rapport au S.C. (surnageant cellulaire provenant de la culture de cellules PFT non infectées au PPV).


porc 2634
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000


porc 2695
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000


porc 2696
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000


porc 2689
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000


porc 2658
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000

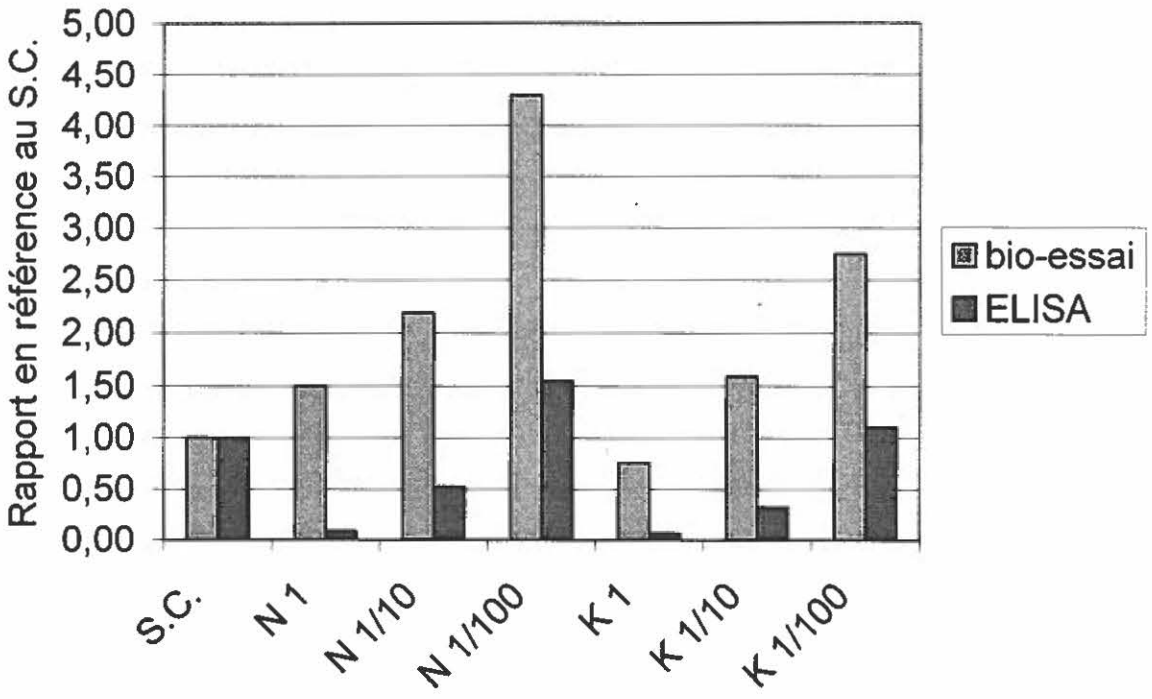
Comme expérience complémentaire à celles effectuées pour le porc 2658 (celui qui a bien répondu aux stimulations), les surnageants ont été envoyés au laboratoire du Dr Martin Lessard d'Agriculture-Canada à Lennoxville pour un test ELISA. En effet, une technique d'ELISA pour le TNF de porc a été mise au point dans son laboratoire.

Le test ELISA permet de mesurer tout le TNF présent dans le surnageant, **qu'il soit actif ou non**, contrairement au bio-essai qui permet de mesurer seulement de TNF bio-actif. Les résultats obtenus par ELISA sont comparés à ceux obtenus par bio-essai à la figure 14. Les résultats sont exprimés en proportion par rapport au surnageant cellulaire. Pour l'ELISA comme pour le bio-essai, la réponse est dose-dépendante. La quantité de TNF augmente lorsque la concentration de la suspension virale diminue. De plus, les réponses obtenues avec Kresse sont plus faibles qu'avec NADL-2. Par contre, les réponses obtenues pour l'ELISA sont beaucoup plus faibles que pour le bio-essai en référence à l'activité par rapport au "*S.C.*", ce qui est surprenant. Comme l'ELISA mesure le TNF bio-actif en plus des autres molécules de TNF qui ne sont pas actives, on se serait attendu à ce que les résultats aient été supérieurs à ceux obtenus avec le bio-essai. Ceci laisse penser qu'il pourrait y avoir d'autres molécules sécrétées dans le surnageant lors de la réaction immunitaire et que ces molécules pourraient se lier à des récepteurs de la "famille" des récepteurs pour le TNF chez les cellules PK15 utilisées pour le bio-essai, entraînant la mort des cellules PK15.

Figure 14: Comparaison des mesures du TNF bio-actif et du TNF total dans des surnageants de PBMC de porc cultivés durant 6 h en présence de LPS et de différentes concentrations de parvovirus des souches NADL-2 et Kresse.

Les dosages ont été effectués par un test de lyse des cellules PK15 pour le dosage du *TNF bio-actif* et par ELISA pour celui du *TNF total*. Les résultats des mesures sont exprimés sous forme de rapport en référence au surnageant provenant de la culture des cellules PFT non infectées (S.C.). Les dilutions de virus NADL-2 (N) et Kresse (K) ont été préparées à partir d'une suspension initiale contenant 10^8 particules/ml. Toutes les cultures contenaient du LPS.

porc 2658


Rapport en référence au S.C.
5,00
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
K 1
K 1/10
K 1/100
bio-essai
ELISA

4. Effet dose-réponse du PPV sur la production de NO

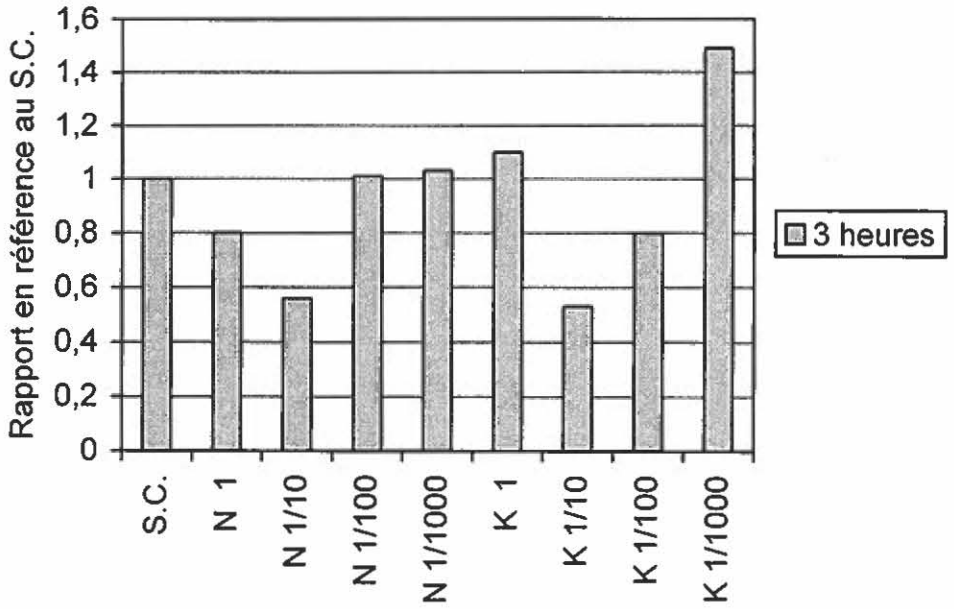
Pour chacun des surnageants des cultures mentionnées précédemment, lors de stimulations de 1 h 30, 3 h et 6 h, aucune trace de nitrite (NO_2^-) n'a pu être détectée (test de Greiss). Comme la production d'oxyde d'azote est plus tardive, les même expériences ont été effectuées pour des temps de stimulation de 12 h et de 24 h. Encore là, aucune trace de nitrite (NO_2^-) n'a pu être détectée.

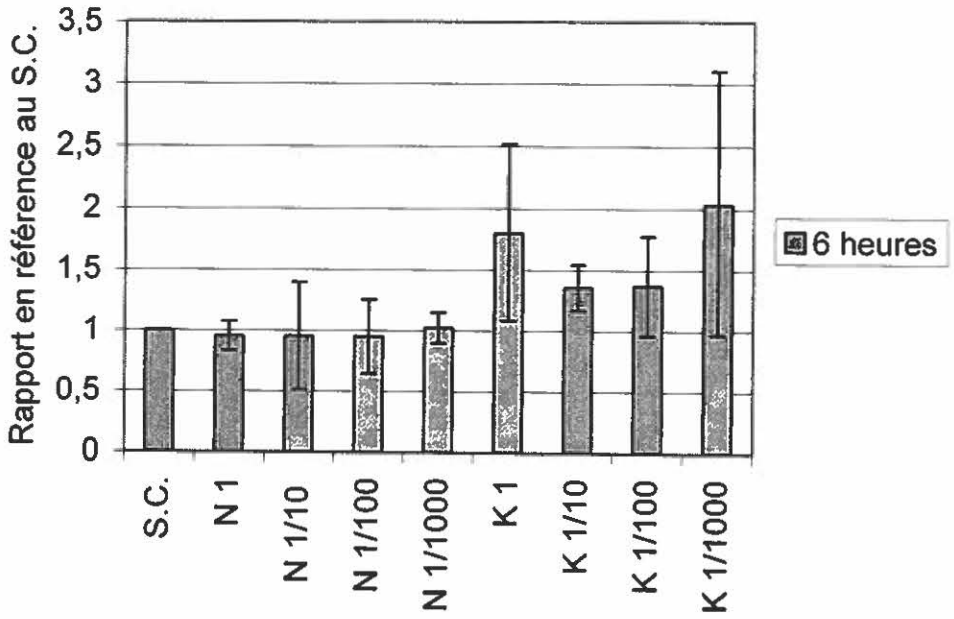
5. Effet dose-réponse du PPV sur la lignée de macrophages murins RAW 264.7

La lignée continue RAW 264.7 de macrophages murins a été mise en culture pour une période de 3 h ou de 6 h en présence de LPS et diverses concentrations de suspensions virales de NADL-2 ou de Kresse. Les surnageants ont été récoltés et les bio-essais pour le TNF utilisant les L929 ont été effectués. Les résultats sont présentés à la figure 15. Les deux souches de parvovirus ont peu ou pas induit la production de TNF chez les RAW 264.7. Il n'a pas été possible de démontrer clairement une différence de production de TNF entre les souches NADL-2 et Kresse.

Figure 15: Dosage du TNF bio-actif dans les surnageants de cellules RAW 264.7 cultivées pendant 3 h ou 6 h avec des concentrations variables de parvovirus des souches NADL-2 et Kresse, en présence de LPS.

Les résultats des mesures sont exprimés sous forme de rapport en référence au surnageant provenant de la culture des cellules PFT non infectées (S.C.). Les dilutions de virus NADL-2 (N) et Kresse (K) ont été préparées à partir d'une suspension initiale contenant 10^8 particules/ml. Le temps "6 heures" a été testé au cours de trois expériences indépendantes, et les barres représentent les écart-types.


Rapport en référence au S.C.
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000
3 heures


Rapport en référence au S.C.
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
S.C.
N 1
N 1/10
N 1/100
N 1/1000
K 1
K 1/10
K 1/100
K 1/1000
6 heures

DISCUSSION

Au départ, beaucoup de temps a été consacré à mettre au point plusieurs outils afin d'étudier la réponse immunitaire du porc contre le PPV, en plus des amorces permettant les RT-PCR du TNF et de la G3PDH (voir annexe II). Mais la variété des réponses, observées d'un porc à l'autre, nous avait déjà amenés à restreindre notre étude à un petit nombre de paramètres. La décision de considérer uniquement le TNF repose d'abord sur son importance dans la réponse immunitaire et, ensuite, sur le fait qu'un deuxième test, le bio-essai, était disponible et permettait d'obtenir des résultats supplémentaires sur la forme sécrétée de cette cytokine.

1. Effet du PPV sur l'expression de l'ARNm et la production de TNF bio-actif

Les macrophages jouent un rôle important dans la réponse immunitaire car ils peuvent présenter les antigènes aux cellules T $CD4^+$, libérer différentes cytokines et influencer le déroulement de la réponse immunitaire. Une des principales cytokines sécrétées par le macrophage est le TNF. Lors d'une infection au parvovirus B-19, au KRV ou au CPV, il a été démontré que certains sujets présentaient des concentrations élevées de TNF dans leur sérum (Watanabe *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997). Il paraissait donc possible que le PPV induise la production de TNF chez les monocytes du porc, et que le TNF produit puisse être détecté dans des cultures de PBMC. C'est ce que nous avons essayé de démontrer.

La technique du RT-PCR a initialement été choisie car elle est très sensible et permet d'observer la production de transcrits d'ARNm à l'intérieur de la cellule, parfois même avant que la protéine ne soit produite. Cependant, les résultats obtenus ici par la technique du RT-PCR semi-quantitatif laissent un peu

perplexe. Si certains porcs semblaient répondre à l'infection virale, ce n'était pas le cas de tous. Certains montrent une moins grande concentration de transcrits d'ARNm lorsque les PBMC sont stimulés au LPS. De plus, pour un même porc, les expériences ont été effectuées sur une même suspension de cellules. Les résultats obtenus pour les témoins RPMI auraient dû être semblables. Devant cette série de résultats aberrants, et afin d'essayer d'obtenir des résultats plus précis, nous nous sommes donc tournés vers la technique du RT-PCR quantitatif.

La technique du RT-PCR quantitatif à l'aide d'un standard interne s'est avérée très sensible car elle a permis de mesurer l'ARNm du TNF, même sans stimulation par le LPS, ce que ne permettait pas le bio-essai. Mais les résultats obtenus n'ont pas permis d'obtenir des informations supplémentaires par rapport à ceux obtenu par RT-PCR semi-quantitatif. De plus, cette technique a le désavantage d'entraîner un très grand nombre de manipulations et ne permet de traiter qu'un petit nombre d'échantillons à la fois. Comme elle nécessite aussi une consommation de réactifs très importante, elle est donc dispendieuse.

La technique du bio-essai pour le TNF s'est avérée être moins sensible car, afin d'obtenir une quantité de TNF supérieure au seuil de détection, la stimulation par le LPS s'est toujours avérée nécessaire. Comme des concentrations mesurables de TNF bio-actif (supérieurs au seuil de détection de la technique) ont pu être obtenues seulement en présence de LPS, ceci confirme qu'il y avait une stimulation des PBMC par le LPS. Une expérience permettant de vérifier la stabilité de l'ARNm dans les PBMC aurait peut-être permis d'expliquer ces résultats contradictoires. Par contre, cette méthode est beaucoup plus rapide et permet de générer des résultats pour plusieurs échantillons à la fois avec une plus grande précision. En effet, les points de la courbe, permettant de déterminer le 50% de cytotoxicité, sont la moyenne de trois puits et les valeurs obtenues dans les puits individuels d'un même point expérimental étaient du même ordre de grandeur. Mais en utilisant l'une ou l'autre de ces méthodes, le

point commun fut l'observation d'une grande variation entre les porcs. Certains ont montré une sensibilité à l'infection virale selon la concentration de la suspension utilisée, tandis que d'autres n'ont pas "répondu" du tout. Lors de la cinétique, la concentration de TNF bio-actif diminuait dans le temps. Ceci a peut être été causé par la présence d'inhibiteurs du TNF, comme des récepteurs solubles, ou par sa "consommation": fixation du TNF sur son récepteur présent sur d'autres cellules, comme les lymphocytes T auxiliaires.

Une telle variation entre les réponses avait déjà été observée par Watanabe et ses collaborateurs (1994), vis à vis du parvovirus humain. Ils ont montré que chez un enfant atteint de sphérocytose héréditaire et infecté par le parvovirus humain B19, la quantité de TNF retrouvée dans le sérum était de 4 à 8 fois plus élevée que la normale. Chez la mère de cet enfant, elle aussi diagnostiquée pour la sphérocytose héréditaire et infectée au B19, la quantité de TNF dans le sérum était d'environ 1,5 fois plus élevé que la normale. Ils n'ont cependant pas trouvé d'autres résultats dans la littérature sur le taux de TNF chez des patients atteints de sphérocytose héréditaire. Dans leur cas, un effet génétique pourrait être un facteur important expliquant la variation de la production de TNF (Watanabe *et al.*, 1994). Comme pour les différents porcs utilisés lors de la présente recherche, dont le bagage génétique est diffèrent de l'un à l'autre, ceci pourrait avoir une influence sur la réponse immunitaire. Otto et ses collaborateurs (1997) ont aussi mesuré le TNF présent dans le sérum de chiots infectés au CPV. Parmi les 17 chiots infectés, de race différente, seulement 7 présentaient des taux mesurables de TNF dans leur sérum.

Chez le porc, Van Reeth *et al.* (1998) ont montré que la quantité de TNF présent dans le liquide recueilli par lavage broncho-alvéolaire après une infection au virus influenza, et mesuré par la technique du bio-essai utilisant les cellules PK15, était différente entre les animaux. Par exemple, pour les porcs 1, 2, 3 et 4, respectivement, des concentrations de TNF de 370, 225, 175 et 25 U TNF/ml ont été mesurées. Ils mentionnent que la différence observée dans la production

de TNF bio-actif ne peut pas être attribuée à une différence dans la multiplication virale pendant l'infection. Il est plutôt possible qu'elle soit attribuable à un facteur génétique car le quatrième porc fait partie d'une famille différente de celle des trois autres.

Pour expliquer l'inhibition ou la non stimulation du TNF, en présence de LPS, Whittall et Parkhouse (1997) ont démontré que les réponses obtenues après stimulation à l'IFN-γ ou au LPS étaient supprimées chez les macrophages alvéolaires de porc infectés par la souche Malawi Lil/20 du virus de la fièvre africaine porcine (African swine fever virus: ASFV). Cette inhibition est aussi observée à une faible multiplicité d'infection. Comme les animaux utilisés lors de cette expérience provenaient de fermes d'élevage, il est fort possible qu'ils aient été en contact avec différents pathogènes. Aucun test, autre que la détection de PPV, n'a été fait. Il se pourrait qu'un agent pathogène, différent du PPV, ait pu affecter la réponse au LPS car, lorsque stimulé au LPS, les PBMC de trois porcs (2689, 2632, 2634) ont donné des concentrations de TNF bio-actif de 274, 26 et 9 U/ml (résultats non montrés).

De plus, le stress causé à l'animal, lors de la récolte des échantillons de sang, pourrait peut-être lui aussi avoir une influence sur la variabilité des résultats obtenus. L'apparition de plaques rouges sur la peau de certains sujets a été observée, au cours de leur manipulation, par le Dr Serge Dea. Le stress psychologique peut avoir un effet sur les fonctions immunitaires. Chez l'humain, par exemple, le stress psychologique peut augmenter la production de TNF, d'IL-6, du récepteur antagoniste d'IL-1(IL-1Ra), d'IFN-γ et d'IL-10 (Maes *et al.*, 1998). Chez le porc, McGlone *et al.* (1993) et Hicks *et al.* (1998) ont montré que le stress occasionné lors du transport, et la relation entre le "statut social" (dominant, intermédiaire et dominé), peuvent avoir un effet sur l'activité des cellules NK.

En ce qui concerne le test ELISA effectué avec les surnageant du porc 2658, ce test mesure la quantité *totale* de TNF, bio-actif ou non: les résultats auxquels on s'attendait, exprimés par rapport au témoin, auraient dû être supérieurs à ceux obtenus avec le bio-essai. Mais contrairement à cette attente, les résultats obtenus par ELISA furent inférieurs à ceux obtenus avec le bio-essai. Ceci laisse présager la présence d'une ou d'autres molécules pouvant occasionner la mort des cellules PK15 utilisées dans le bio-essai. L'ajout d'un anticorps spécifique bloquant l'activité du TNF bio-actif, ainsi que contre d'autres ligands pouvant entraîner l'apoptose, aurait peut-être permis de mettre en évidence une telle activité, différente de celle du TNF. La spécificité du bio-essai utilisant les cellules PK15 a été confirmée pour le TNF de porc (Pauli *et al.*, 1994), mais on ne peut évidemment pas exclure l'existence d'autres facteurs cytotoxiques auxquels seraient sensibles les cellules PK15, par exemple par l'expression d'un récepteur apparenté à celui du TNF.

2. Effet du PPV sur la production de NO

Le NO peut être un médiateur dans l'inhibition intracellulaire de la réplication virale, ce qui résulte en un titre viral moins élevé et, par conséquent, une plus grande facilité à éliminer l'infection. Par contre plusieurs virus à ARN ou ADN sont soit sensibles, soit résistants, à l'action du NO (Reiss et Komatsu, 1998). Lors des stimulations effectuées dans ce travail, aucune trace du dérivé du NO, le nitrate (NO_2^-), n'a pu être détectée dans les surnageants par le réactif de Greiss. Des stimulations supérieures à 24 h n'ont pas été effectuées en référence à Jesch *et al.* (1997). Peut être qu'une période de stimulation de plus de 24 h aurait permis d'en mesurer. Dans une publication de Pampush et de ses collaborateurs (Pampush, 1998), il a été observé que, chez le porc, lors de la stimulation *in vitro* de PBMC, de splénocytes ou de macrophages alvéolaires en combinaison avec de la ConA et du LPS, ou bien d'INF-γ recombinant de porc et de LPS, on ne détecte ni activité de l'enzyme iNOS, ni formation de produits NO lors de stimulations de 12 à 96 h. La quantité d'ARNm d'iNOS détectée dans les cellules, stimulées et non stimulées, des témoins et de cellules d'animaux infectés suggèrent que chez le porc la iNOS est constitutivement exprimée ne laissant place à pas, ou peu, de possibilité de surexpression au cours d'une stimulation cellulaire. Les résultats de leur étude suggèrent également que les intermédiaires du NO ne jouent probablement pas un rôle vital dans la réponse immunitaire du porc.

3. Effet du PPV sur la lignée de macrophages de souris RAW 264.7

La stimulation de macrophages de souris RAW 264.7, par le PPV en présence de LPS, a très peu modifié la production de TNF. Ceci est comparable avec les résultats obtenus par Schlehofer et ses collaborateurs (Schlehofer *et al.*, 1992). Ces derniers ont testé, entre autres, l'induction du TNF par les parvovirus AAV et H-1 sur des cellules RAW 264.7. Leurs résultats montrent une induction limitée du TNF, similaire à la stimulation au LPS (utilisé comme témoin positif). Ils en concluent que les parvovirus sont de faibles inducteurs du TNF dans les cultures cellulaires testées. Mais à en juger par certaines réponses observées avec certains porcs, nous pensons qu'il demeure possible que les infections au parvovirus "aident" à la synthèse de certaines cytokines. Bien entendu, il faudra d'autres recherches pour préciser avec un peu d'exactitude une telle possibilité, si vraiment elle existe.

4. Propositions d'orientation de futures recherches

Le TNF n'est pas la seule cytokine produite lors de la réaction immunitaire. Comme le TNF ne nous a pas permis d'observer une différence entre les deux souches de PPV (NADL-2 et Kresse) parce qu'une grande variabilité a été observée d'un porc à l'autre, l'étude d'autres cytokines pourrait s'avérer une alternative en permettant, peut-être, de minimiser cette variabilité dans la réponse immunitaire de différents porcs contre le PPV. En présumant qu'il existe une différenciation des cellules lymphocytaires T $CD4^+$ de type Th1 et Th2 chez le porc, comme chez l'humain et la souris, l'étude des cytokines produites par ces lymphocytes pourrait peut-être permettre d'observer une réponse immunitaire dont la variabilité, d'un individu à l'autre, serait moindre que celle observée avec le TNF.

Parmi ces autres cytokines produites, certaines sont associées aux lymphocytes Th1 induisant une réponse de type "cellulaire" (IL-2, IFN-γ) et d'autres sont associées au Th2 induisant une réponse de type "humorale" (IL-4, IL-10). Selon les cytokines qu'elles produisent, les sous-populations de Th1 et Th2 exercent une régulation négative l'une sur l'autre. Par conséquent, la quantité de cytokines produite lors de la réponse immunitaire détermine le profil des cellules T au cours de la différenciation en cellules effectrices (Sedlik, 1996; Herbein, 1997), et le profil pourrait peut-être être différent après une stimulation par NADL-2 ou Kresse.

L'étude comparative des cytokines produites par les Th1 et Th2 est aussi importante pour comprendre l'évolution de l'infection virale et, par la suite, pour pouvoir manipuler les réponses T afin de mettre au point des vaccins ou des traitements. De tels résultats permettraient donc d'améliorer les vaccins présentement disponibles ou d'en créer de nouveaux qui seront efficaces contre les différentes souches de PPV.

Afin de rendre les prochaines expériences plus valides, certaines modifications devraient être apportées au protocole. Premièrement, une plus grande disponibilité et un plus grand nombre d'animaux seraient nécessaires. La cueillette d'échantillons sanguins chez le porc devait être effectuée par un vétérinaire et la quantité prélevée était restreinte aux témoins négatifs de son expérience. Des 4 ou 5 porcs de chaque livraison, seuls ceux qui étaient séronégatifs au PPV pouvaient être saignés (ce qui pouvait représenter 1 ou 2 porcs par expérience). En plus, lors des stimulations, une grande quantité de cellules étaient nécessaires afin de réaliser toutes les conditions expérimentales sur une même suspension. Une grande quantité de sang ne pouvant pas être prélevée chez de jeunes porcelets, les échantillons étaient prélevés lorsque les animaux étaient plus âgés mais surtout lors du sacrifice de l'animal. Dans ce dernier cas, il est difficile de reprendre l'expérience avec le même animal ! Afin de remédier à ce problème, un nombre plus restreint de conditions expérimentales aurait nécessité de moins grands volumes de sang et aurait permis d'obtenir des duplicatas sur une même suspension de PBMC. Il n'aurait pas été nécessaire, non plus, d'attendre que l'animal atteigne un aussi grand poids avant de prélever les échantillons sanguins et plusieurs prélèvements auraient pu être effectués sur le même animal. En ayant un plus grand nombre d'animaux, il aurait été possible de calculer la moyenne et l'écart-type pour chaque condition expérimentale et effectuer des calculs statistiques permettant de d'affirmer que les différences observées sont significatives ou non (par exemple: valeur de *p* du test de Student)

Ce qui fut aussi très préoccupant, c'est que les conditions expérimentales mises au point avec un animal, n'étaient plus les mêmes avec un autre. Les porcs utilisés sont des animaux "sauvages" qui ne sont pas consanguins, par opposition à des souris ou des rats de laboratoire, et des différences génétiques importantes peuvent donc exister entre différents porcs. Il serait donc nécessaire d'évaluer la réponse des différents porcs par une expérience

préliminaire qui permettrait de choisir les porcs réceptifs au stimulus choisi ou de pouvoir les répartir en groupes selon leur réceptivité. La disponibilité d'une lignée de porc possédant peu de différences génétiques interindividuelles serait un atout majeur. De plus, la possibilité d'avoir des animaux élevés dans des milieux contrôlés autres que des fermes d'élevage permettraient d'avoir des animaux sains n'ayant pas été contaminés par différents pathogènes.

Les conditions expérimentales pourraient aussi être revues et modifiées. Par exemple, il a été démontré par Natale et McCullough (1998) que la température d'incubation peut être différente d'une espèce à l'autre car les températures corporelles ne sont pas les mêmes. Pour quatre porcs, ils ont mesuré le TNF total, par la technique d'ELISA, produit dans le surnageant par des macrophages mis en culture en présence de LPS et incubés à 37°C et 39,2°C. Les résultats obtenus à 37°C sont respectivement de 0, 0, 51 et 41 pg/ml. Tandis que les résultats obtenus à 39,2°C sont respectivement de 106, 145, 118 et 51 pg /ml. Il est évident que la production de TNF est supérieure à 39,2°C, mais il y a quand même une différence entre les porcs (145 pg/ml pour le deuxième et 51 pg/ml pour le quatrième à 39,2°C). De plus, en comparant la quantité de TNF retrouvée à 37°c à celle retrouvée à 39,2°C pour chacun des porcs et en les comparants, on observe pour le premier 0 et 106 pg/ml, pour le second 0 et 145 pg/ml, pour le troisième 51 et 118 pg/ml et pour le quatrième, 41 et 51 pg/ml. L'augmentation obtenue pour le second et, surtout, pour le quatrième porc, par exemple, n'est pas proportionnelle. Pour les autres non plus. La culture des cellules de porcs à une température plus élevée permettrait peut-être d'obtenir des résultats supplémentaires mais ne règle pas le problème de variabilité observé entre les porcs. Dans plusieurs études qui ont succédé à l'article de Natale et McCullough, la température d'incubation choisie fut quand même encore de 37°C (Dufour *et al.*, 1999; Lopez Fuertes, 1999).

Finalement, la méthodologie utilisée lors de ces expériences comporte quelques failles. Mais plusieurs publications portant sur des recherches faites

avec le porc, comme mentionnées précédemment, montrent qu'il y a plusieurs facteurs, dont la génétique, qui influence la réponse immunitaire et qui rendent les études plus difficiles en comparaison avec celles effectuées avec de plus petits animaux comme les souris et les rats.

CONCLUSION

Le PPV cause bien des problèmes aux éleveurs de porcs lorsqu'il infecte des truies non immunisées en gestations. Il en résulte des pertes économiques importantes car le nombre de porcelets menés à terme est réduit. Il est donc important de comprendre la réaction immunitaire afin de se munir de vaccins efficaces contre le PPV.

Les objectifs de ce travail étaient de commencer à déchiffrer la réaction immunitaire contre le PPV en observant le rôle du macrophage lors de l'infection. Une des principales cytokines produites par celui-ci, le TNF, a été choisie comme marqueur de la première étape de la réaction immunitaire. Par la suite, on devait comparer la réponse obtenue entre deux souches de PPV dont les pathogénécités s'étaient avérées très différente (NADL-2 non-virulente, Kresse très virulente), mais dont la séquence ne comporte cependant que quelques différences en acides aminés.

Nous avons démontré ici que les souches de PPV peuvent avoir un effet sur la production de TNF, mais seulement chez certains individus. En effet, la réponse obtenue pour chacun était très variable d'un individu à l'autre. En plus, à cause de la quantité limitée de matériel pour un même échantillon, nous n'avons pas pu contrôler totalement tous les paramètres techniques du PCR, d'où des résultats parfois surprenants même au niveau des groupes témoins. Très probablement à cause de ces deux raisons, il n'a pas été possible de comparer la réponse entre les deux souches de PPV: NADL-2 et Kresse.

Comme les réactifs nécessaires à l'étude de la réaction immunitaire du porc, comme les trousses ELISA, commencent de plus en plus maintenant, à faire leur apparition sur le marché, ces précieux outils seront très utiles dans le futur. En effet, plusieurs anticorps, non seulement pour les cytokines, mais aussi pour des marqueurs, de surface sont maintenant disponibles, ce qui devrait

supprimer certains inconvénients causés par le manque de fiabilité des techniques utilisées jusqu'ici.

Par contre, un problème persiste: la variation de réponse entre les individus. La disponibilité de lignées cellulaires porcines serait certainement un atout. Les cytokines produites par les lymphocytes Th1 et Th2 pourraient aussi nous permettre d'observer une réponse immunitaire lors d'une infection au PPV et de déterminer si cette réponse diffère selon la souche utilisée. Des amorces utiles pour des étude futures ont été développées lors de cette maîtrise et les séquences sont présentées à l'annexe II.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier sincèrement mon directeur de recherche, le docteur Daniel Oth, qui m'a accordé sa confiance en m'acceptant dans son laboratoire. Merci pour votre support, votre enthousiasme et vos judicieux conseils. Vous m'avez aidé plus que vous ne pouvez l'imaginer !

Merci aussi à mon codirecteur, le docteur Peter Tijssen. Votre support m'a été précieux. La passion que vous avez pour vos recherches fait briller une flamme dans vos yeux qui m'a émerveillée et poussée à toujours en savoir plus.

Je tiens aussi à remercier le docteur Martin Lessard pour ses conseils, son attention, nos nombreuses discussions et son amitié. Je remercie aussi Yvon Lamontagne pour son aide, sa patience et ses nombreux conseils.

Un merci particulier à tous ceux qui ont rendu possible ce travail dont: le Dr Serge Dea et son équipe, pour les échantillons de sang; le tout nouveau docteur Benoît Hébert, mon fournisseur de virus, et pour tous ses conseils.

Un merci aussi à Pierre Tremblay, Aïcha Daher et Marie-Andrée Régis. Votre soutien, votre aide et votre amitié ont ensoleillé mes journées, surtout quand tout semblait gris. Et un gros merci à tous mes amis sans qui la vie à l'Institut aurait été moins drôle.

Enfin, je désire remercier mes parents, Denise et Jean-Paul, pour leur support inconditionnel tout au long de mes études et Pierre, mon époux, pour son soutien et son encouragement de tous les jours.

MERCI !

BIBLIOGRAPHIE

Aderka, D., Engelmann, H., Maor, Y., Brakebush, C., Wallach, D. (1992). Stabilisation of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* **175:**323-329

Adorini, L. (1999). Interleukine-12, a key cytokine in Th-1mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* **55:**1610-1625

Aggarwal, B.B., Kohr, W.J., Hass, P.E., Moffat, B., Spencer S.A., Henzel, W.J., Bringman, T.S., Nedwin, G.E., Goeddel, D.V., Harkins, R.N. (1985). Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterisation. *J Biol Chem* **260:**2345-2354

Aggarwal, B.B., Natarajan, K. (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* **7:**93-124

Bemelmans M.H., Abramowicz, D., Gouma, D.J., Goldman, M., Buurman, W.A. (1994). In vivo cell activation by anti-CD3 monoclonal antibody induces soluble TNF receptor release in mice. Effects of pentoxifylline, methylprednisolone, anti-TNF, and anti-IFN-gamma antibodies. *J Immunol* **153:**499-506

Bemelmans, M.H.A., van Tits, L.J.H., Buurman, W.A. (1996). Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* **16:**1-11

Bergeron, J., Hébert, B., Tijssen, P. (1996). Genome organisation of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* **70**:2508-2515

Berns, K.I. (1996). *Parvoviridae*: The virus and their replication. *Fundamental virology*, Third edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al.*, Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia 1017-1041

Beutler, B., Cerami, A. (1988). Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* **57:**505-18

Beutler, B., Cerami, A. (1989). The biology of cachectin/TNF – a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* **7:**625-55

Biron, C.A. (1998). Role of early cytokines, including alpha and beta interferon (IFN-α/β), in innate and adaptive immune responses to viral infection. *Semin Immunol* **10:**383-390

Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural Killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17:**189-220

Choi, C.S., Molitor, T.W., Joo, H.S., Gunther, R. (1987). Pathogenecity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Vet Microbiol* **15:**19-29

Chomczynski, P., Sacchi N. (1987). Single-step method for RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162:**156-159

Chung, Y.-H., Jun, H.S., Kang, Y., Hirasawa, K., Lee, B.R., Rooijen, N.V., Yoon, J.W. (1997). Role of macrophages and macrophage-derivated cytokines in the pathogenesis of Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in diabetes-resistant BioBreeding rats. *J Immunol* **159:**466-471

Cotmore, S.F., Tattersall, P. (1987). The autonomously replicating parvovirus of vertebrates. *Advances in virus research* **33**:91-174

Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Ann Rev Immunol* **12:**259-293

Croen, K.D. (1993). Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J Clin Invest* **91:**2446-2452

Cutlip, R.C., Mengeling, W.L. (1975). Pathogenesis of *in utero* infection: experimental infection of 8- and 10-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **36:**1751-1754

Dinarello, C.A. (1999). Interleukin-18. *Methods* **19:**121-132

Dufour, V., Arnauld, C., Lantz, O., Peguillet, I., Movilliers, K., Emmanuel, A., Jestin, A. (1999). Quantification fo porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection. *J Immunol Methods* **229:**49-60

Dunne, H.W., Gobble, J.C., Hokanson, J.R., Kradel, D.C. and Bubash, G.R. (1965). Porcine reproductive failure associated with a newlly defined "SMEDI" group of picornavirus. *Am J Vet Res* **26:**1284-1290

Edwards, K.M., Davis, J.E., Browne, K.A., Sutton, V.R., Trapani, J.A. (1999). Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction. *Immunol Cell Biol* **77:**76-89

Evans, T.J., Cohen, J. (1996). Mediators: Nitric oxide and other toxic oxygen species. *Current topics in microbiology and immunolgy: pathology of septic shock.* **216:**189-207

Freudenberg, M.A. Galanos, C. (1990). Bacterial lipopolyssharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int Rev Immunol* **6**:207-221

Gordon, J.R., Galli, S.J. (1990), Mast cells as a source of both performed and immunologically inducible TNF-α/cachectin. *Nature* **346**:274-276

Gualandi, G.L., Ferrari, M., Boldini, M., Cardeti, G., Losio, M.N., Muratori, G. (1992). The response of pregnant gilts previously given an inactivated preparation of porcine parvovirus (PPV) to challenge infection with a fully virulent PPV. *Microbiologica* **15**:391-396

Harding, M.J., Molitor, T.W. (1988). Porcine parvovirus: replication in and inhibition of selected cellular functions of swine alveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Arch Virol* **101**:105-117

Herbein, G. (1997). Cytokines, viruses and macrophages: an interactive network. An immune dysregulation involving the members of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily could be critical in AIDS pathogenesis. *Pathol Biol (Paris)* **45**:115-125

Hicks, T.A., McGlone, J.J., Whisnant, C.S., Kattesh, H.G., Norman, R.L. (1998). Behavioural, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. *J Anim Sci* **72**:474-483

Kanno, H., Wolfinbarger, J.B., Bloom, M.E. (1993). Aleutian mink disease parvovirus infection of mink peritoneal macrophages and human macrophage cell lines. *J Virol* **67**:2075-2082

Karp, S.E., Hwu, P., Farber, A., Restifo, N.P., Kriegler, M., Mule J.J., Rosenberg, S.A. (1992). In vivo activity of tumor necrosis factor (TNF) mutants. Secretory but not membrane-bound TNF mediates the regression or retrovirally transduced murine tumor. *J Immunol* **149**:2076-81

Knight, S.C., Stagg, A.J. (1993). Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol* **5**:374-382

Konig, R., Huang, L.Y., Germain, R.N. (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**:796-798

Koopmann, J.O., Hammerling, G.J., Momburg, F. (1997). Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **9**:80-88

Kresse, J.I., Taylor, W.D., Stewart, W.W., Fernisse, K.A. (1985). Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Vet Microbiol* **10:**525-531

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., Lu S.D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53:**45-53

Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L.T., Vilcek, J., Sehgal, P.B. (1986). Induction of β_2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell* **45:**659-666

Kwon, B., Youn, B.S., Kwon, B.S. (1999). Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **11:** 340-345

Lager, K.M., Mengeling, W.L. Liu, W. (1992). Comparison of the virulence of two isolates of porcine parvovirus in 72-day-old porcine fetuses. *J Vet Diagn Invest* **4**:245-248

Loetscher, H., Schlaeger, E.J., Lahm, H.-W., Pan, Y.C., Lesslauer, W., Brockhaus, M. (1990). Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors form HL60 cells. *J Biol Chem* **265:**20131

Lopez Fuertes, L., Domenech, N., Alvarez, B., Ezquerra, A., Dominguez, J., Castro, J.M., Alonso, F. (1999). Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res* **64:**33-42

Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., Kenis, G., Bosman, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S., Smith, R.S. (1998). The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* **10:**313-318

Malissen, B., Schmitt-Verhulst, A.M. (1993). Transmembrane signaling through the T-cell-recptor-CD3 complex. *Curr Opin Immunol* **5:**324-333

Mannick, J.B. (1995). The antiviral role of nitric oxide. *Res Immunol* **146:**693-697

McGlone, J.J., Salak, J.L., Lumpkin, E.A., Nicholson, R.I., Gibson, M., Norman, R.L. (1993). Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *J Anim Sci* **71:**888-896

Mengeling, W.L., Cutlip, R.C., Wilson, R.A., Parks, J.B., Marshall, R.F. (1975). Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc* **166:** 993-995

Mengeling, W.L., Cutlip, R.C. (1975). Pathogenesis of *in utero* infection: experimental infection of 5-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **36:**1173-1177

Mestan, J., Digel, W., Mittnacht, S., Hillen, H., Blohm, D., Moller, A., Jacobsen, H., Kirchner, H. (1986). Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vitro. *Nature* **323:**816-818

Mestan, J., Brockhaus, M., Kirchner, H., Jacobsen, H. (1988). Antiviral activity of tumor necrosis factor. Synergism with interferons and induction of (2'-5')A_n-Synthetase. *J Gen Virol* **69:**3113-3120

Miller , D.M., Sedmak, D.D. (1999). Viral effects on antigen processing. *Curr Opin Immunol* **11:**94-99

Molitor, T.W., Joo, H.S. (1990). Clinical and pathological features of porcine-parvovirus-related disease and its diagnosis. *Handbook of Parvovirus, volume II*, CRC Press inc. 135-150

Natale, V.A., McCullough, K.C. (1998). Macrophage culture: influence of species-species incubation temperature. *J Immunol Methods* **214:**165-174

Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6:**3051-3064

Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286:** 2156-2159

Old, L.J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF) *Science* **230:**630-32

Otto, C.M., Drobatz, K.J., Soter, C. (1997). Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med* **11:**65-70

Oraveerakul, K., Choi, C.-.S., Molitor, T.W. (1992). Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J Virol* **66**: 715-722

Ovareerakul, K., Choi, C.S., Molitor, T.W. (1993). Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. *Arch Virol* **130:**377-389

Pampush M.S., Bennaars, A.M., Harsch, S., Murtaugh, M.P. (1998). Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. *Vet Immunol Immunopathol* **61:**279-289

Paul, P.S., Mengeling, W.L. (1980). Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *Am J Vet Res* **41:**2007-2011

Pauli, U., Bertoni, G., Duerr, M., Peterhans, E. (1994). Neutralization rates of TNF-alpha from eight different species with a monoclonal antibody against human TNF. *J Immunol Methods* **171:**263-265

Pauli, U. (1995). Porcine TNF: A review. *Vet Immunol Immunopathol* **47:**187-201

Ramshaw, I.A., Ramsay, A.J., Karupiah, G., Rolph, M.S., Mahalingam, S., Ruby, J.C. (1997). Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev* **159:**119-135

Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M. (1998). Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukine-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? *J Infect Dis* **177:**1076-1079

Reiss, C.S., Komatsu, T. (1998). Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol* **72:**4547-4551

Rhode, S.L., Paradiso, P.R. (1983). Parvovirus genome: Nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid arrest translations. *J Virol* **45:**173

Rhode, S.L. (1985). Trans-activation parvovirus p38 promoter by the 76K non-capsid protein. *J Virol* **55:**886

Rietschel, E.T., Kirikae, T., Shade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U., Di Padova, F (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB* **8:**217-225

Ruddle, N.H. (1992). Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lympotoxin (TNF-beta). *Curr Opin Immunol* **4:**327-332

Ruggerio, V., Antonelli, G., Conciartori, G., Massimo, G., Van Damme, J., Dianzani, F. (1989). The *in vitro* antiviral activity of tumor necrosis factor (TNF) in WISH cells mediated by IFN-β induction. *Antiviral Res* **11:**77-88

Schlehofer J.R., Rentrop M.,Männel D.N., (1992). Parvovirus are inefficient in inducing interferon-β, tumor necrosis factor-α, or interleukin-6 in mammalian cells, *Med Microbiol Immunol* **181**: 153-164

Sedlik, C. (1996). Les sous-populations de lymphocytes Th1 et Th2: caractérisation, rôle physiologique et régulation. *Bull Inst Pasteur* **94:** 173-200

Shames, B.D., Selzman, C.H., Pulido, E.J., Mang, W., Meldrum D.R., McIntyre, R.C. Jr, Harken, A.H., Banerjee, A. (1999). LPS-induced NF-kappaB activation and TNF-alpha release in human monocytes are protein tyrosine kinase dependent and protein kinase C independent. *J Surg Res* **83:**69-74

Shull, B.C., Chen, K.C., Lederman, M., Stout, E.R., Bates, R.C. (1988). Genomic clones of bovine parvovirus: Construction and effets of deletions and terminal sequence inversions on infectivity. *J Virol* **62:**417

Singh, A., Ni, J., Aggarwal, B.B. (1998). Death domain receptors and their role in cell demise. *J Interferon Cytokine Res* **18:** 439-450

Smith, R.A., Kirstein, M., Fiers, W., Baglioni, C. (1986). Species specificity of human and murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **261:**14871-14874

Solheim, J.C. (1999). Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunol Rev* **172:**11-19

Solinas, S., Pauli, U., Kuhnert, P., Peterhans, E., Fries, R. (1992). Assignment of the porcine tumour necrosis factor alpha and beta genes to the chromosome region 7p11-q11 by in situ hybridisation. *Anim Genet* **23:**267-271

Sprang, S.R., Eck, M.J. (1992). The 3-D structure of TNF. *Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine* Raven Press Ltd, New York, 11-32

Tartaglia, L.A., Goeddel, D.V. (1992). Two TNF receptors. *Immunol Today* **13:**151

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kDa TNF receptor signals cell death (Review). *Cell* **74:**845

Tavernier, J., van Ostade, X., Hauquier, G., Prange, T., Lasters, I., de Maeyer, M., Lewit-Bentley, A., Fourne, R. (1989). Conserved residues fo tumor

necrosis factor and lymphotoxin constitute de framework fo the trimeric structure. *FEBS Lett.* **257**:315-318

Tsuda, H., Maeda, Y., Nakagama, K., Nakagama, M., Nishimura, H., Ishihara, A., Miyayama, H. (1994). Parvovirus B19-associated haemophagocytic syndrome with prominent neutrophilia. *British J Haemat* **86**:413-414

Unanue, E.R. (1993). Macrophages, antigen presenting cells, and the phenomenon of antigen handling and presentation. *Fundamental immunology*. Edited by Paul W.E., New York: Raven Press, 111-143

Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* **10**:411-52

Vilček, J., Sen, G.C. (1996). Interferons and other cytokines. *Fundamental virology*, Third edition, edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley *et al.*, Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia 341-365

Vodovotz, Y., Kwon, N.S., Pospischil, M., Manning, J., Paik, J., Nathan, C. (1994) Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **152**:4110-4118

von Poblotzki, A., Gerdes, C., Reischl, U., Wolf, H., Modrow, S. (1996). Lymphoprolipherative responses after infection with human parvovirus B19. *J Virol* **70**:7327-7330

Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Boldin, M.P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**:331-367

Wang, J.M., Walter, S., Mantovani, A. (1990). Re-evaluation of the chemotactic activity of tumour necrosis factor for monocytes. *Immunology* **71**:364-367

Warren, M.K., Ralph, P. (1986). Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *J Immunol* **137**:2281-2285

Watanabe, M., Shimamoto, Y., Yamaguchi, M., Inada, S., Miyakaki, S., Sato, H. (1994). Viral-associated haemophagocytosis and elevated serum TNF-α with parvovirus-B-19-related pancytopenia in patients with hereditary spherocytosis. *Clin Lab Haemat* **16**:179-182

Whittal, J.T., Parkhouse, R.M. (1997). Changes in swine macrophage phenotype after infection with African swine fever virus: cytokine production and

responsiveness to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Immunology* **91:**444-449

Whitton, L.J., Oldstone, M.B.A. (1997). Immune response to virus. Chapter 10. *Fundamental Virology*. Third edition. edited by B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Holey, *et al.* Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia. 311-340

Wilson, I.A., Garcia, K.C. (1997). T-cell receptor structure and TCR complexes. *Curr Opin Struct Biol* **7:**839-848

Wong, G.H.W., Goeddel, D.V. (1986). Tumor necrosis factors α and β inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* **323:**819-822

Wong, G.H.W., Kamb, A., Goeddel, D.V. (1992). Antiviral properties of TNF. *Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine*. Edited by Bruce Beutler. Raven Press, Ltd, New York. 371-381

Wride, M.A., Sanders, E.J. (1995). Potential roles for tumour necrosis factor-α during embryonic development. *Anat Embryol Berl* **191:**1

Wubbolts, R., Neefjes, J. (1999). Intracellular transport and peptide loading of MHC class II molecules: regulation by chaperon and motors. *Immunol Rev* **172:**189-208

York, I.A., Goldgerg, A.L., Rock, K.L. (1999). Proteolysis and class I major histocompatibility antigen presentation. *Immunol Rev* **172:**49-66

Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1974). Restriction of *in vitro* T-cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic of smiallogenic system. *Nature* **248:**701-702

ANNEXE

Annexe I

Inactivation aux Ultraviolets (U.V.) du PPV

Pour les deux souches de PPV, soit NADL-2 et Kresse, des préparations de virus ont été inactivées pour des périodes de 30 et 60 minutes. Cinq millilitres de chacune des suspensions virales ajustées à 1 x 10^8 particules par ml sont déposés dans quatre petits pétris en verre. Les couvercles des pétris sont retirés et les quatre pétris sont soumis à une exposition de 100µW/cm^2 (Short wave U.V. meter, position A, Model J225, San Gabriel, Calif. Serial #37247; germicidal lamp G.E. Modèle G64T6, 64 watts) pour une période de trente minutes avec une agitation toutes les dix minutes. Un pétri pour chacune des souches, NADL-2 et Kresse, est retiré. Les deux autres pétris sont soumis à la même intensité pour une période supplémentaire de 30 minutes avec une agitation toutes les 5 minutes, totalisant 60 minutes. Les suspensions sont ensuite conservées à 4°C.

Annexe II

Séquences des amorces mises au point au laboratoire, avec ma participation active, pendant la période de mes recherches

Gène	Sens	Séquence 5' – 3'		Standard interne "MIMIC" (pb)	Gène (pb)	GenBank No.
IL-1β	+	TCA GGC AGA TGG TGT CTG TC	20 nt	333	407	M86725
	-	GGT CTA TAT CCT CCA GCT GC	20 nt			
IL-4	+	GAC ACA AGT GCG ACA TCA CCT	21 nt		175	
	-	TGT GGT GTC TGT AGA TGT GCC	21 nt			
IL-6	+	AAC GCC TGG AAG AAG ATG CC	20 nt	485	532	M80258
	-	CTC AGG CTG AAC TGC AGG AA	20 nt			
IL-10	+	TAC CTG GGT TGC CAA GCC TT	20 nt	476	523	L20001
	-	TTC ACA GAG AGC CTC GGT AAA T	22 nt			