

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE-IMMUNOLOGIE

PAR

HUGUES DIEUDONNÉ LOEMBA

ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE
CONTRE L'INFECTION PAR LE VIRUS DU SYNDROME
REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN

SEPTEMBRE 1995

À ma femme Yvette Loemba
À ma fille Sarah Loemba
À mes parents
pour leur amour
pour leur soutien

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XVI
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES..	XVIII
SOMMAIRE.....	XX
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1.SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN.....	7
1.1. Définition clinique et pathologique.....	7
1.2. Données épidémiologiques.....	11
1.3. Situation au Québec.....	14
1.4. Étiologie.....	16
2.VIRUS DU SRRP.....	18
2.1. Caractéristiques morphologiques.....	18
2.2. Caractéristiques biologiques.....	18
2.3. Caractéristiques physico-chimiques.....	21
2.4. Organisation du génome.....	23
2.5. Structure polypeptidique.....	24

2.6. Variations antigéniques et génomiques.....	27
2.7. Stratégie de la réplication.....	29
2.8. Taxonomie.....	32
2.8.1. Critères de classification.....	32
2.8.2. Caractéristiques des virus du genre Artérovirus.....	32
3. PATHOGÉNÈSE.....	35
4. IMMUNITÉ.....	38
5. DIAGNOSTIC.....	41
5.1. Généralités.....	41
5.2. Problématique associée au diagnostic virologique.....	46
5.3. Problématique associée au diagnostic sérologique.....	48
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	50
1. MATÉRIEL.....	51
1.1. Virus.....	51
1.2. Cultures cellulaires.....	52
1.2.1. Macrophages alvéolaires.....	52
1.2.1.1. Prélèvement des macrophages alvéolaires....	52
1.2.1.2. Culture des macrophages alvéolaires.....	54

1.2.2. La lignée cellulaire MARC-145.....	54
1.3. Antisérums.....	55
1.3.1. Production d'un antisérum hyperimmun de porc.	55
1.3.2. Production d'un sérum hyperimmun de lapin....	56
1.3.3. Anticorps monoclonaux.....	56
1.3.4. Échantillons sériques des infections expérimentales.....	57
2. PROPAGATION DES ISOLATS.....	57
2.1. Clonage par la technique des plages.....	58
2.2. Mise en évidence de l'effet cytopathique et titrage.	59
2.2.1. L'effet cytopathique sur cellules MARC-145... 59	
2.2.2. Titrage du virus.....	60
2.3. Identification sérologique.....	61
2.3.1. Préparation de plateaux pour l'immuno- fluorescence indirecte.....	61
2.3.2. Épreuve d'immunofluorescence indirecte.....	61
3. PURIFICATION DU VIRUS.....	63
3.1. Concentration.....	63
3.2. Ultracentrifugation isopycnique sur gradients de densité.....	64
3.3. Microscopie électronique à coloration négative.	64

3.4. Immunomarquage à l'or colloïdal	65
4. PROTÉINES RECOMBINANTES DU VIRUS DU SRRP.....	67
5. MÉTHODOLOGIE.....	69
5.1. INFECTIONS EXPÉRIMENTALES.....	69
5.1.1. Exposition naturelle au virus du SRRP cohorte sentinelle.....	69
5.1.2. Inoculations expérimentales.....	70
5.1.2.1. Soins aux animaux.....	70
5.1.2.2. Infection à dose unique intranasale...	71
5.1.2.3. Surinfection.....	71
5.1.2.4. Hyperimmunisation.....	71
5.1.2.5. Infection concomitante avec le virus influenza porcin.....	72
5.2. TESTS SÉROLOGIQUES.....	72
5.2.1. Immunofluorescence indirecte.....	73
5.2.2. Neutralisation de l'effet cytopathique.....	73
5.2.3. Immunobuvardage.....	75
5.2.3.1. Séparation des protéines virales par SDS-PAGE.....	75
5.2.3.2. Coloration au bleu de Coomassie.....	76
5.2.3.3. Transfert électrophorétique.....	77

5.2.3.4. Révélation immunologique.....	77
5.2.4. Réaction d'immunoprécipitation.....	78
5.2.4.1. Marquage isotopique des protéines virales.....	78
5.2.4.2. L'épreuve d'immunoprécipitation.....	79
5.3. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE.....	81
5.3.1. Isolement du virus.....	81
5.3.2. Confirmation sérologique.....	82
5.3.3. Réaction RT-PCR.....	82
5.3.3.1. Extraction de l'ARN viral.....	82
5.3.3.2. Détection du virus par amplification enzymatique.....	83
5.3.3.2.1. Réaction de transcription inverse.....	84
5.3.3.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne.....	85
5.3.3.2.3. Analyse des produits d'amplifi- cation enzymatique.....	86
5.3.4. Transfert de type Southern.....	86
5.3.5. Hybridation moléculaire.....	88
5.3.5.1. Réaction de préhybridation.....	88

5.3.5.2. Réaction d'hybridation.....	88
5.3.5.3. Détection immunologique.....	89
RÉSULTATS.....	91
1. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE.....	92
1.1. Effet cytopathique sur macrophages alvéolaires.....	92
1.2. Effet cytopathique sur cellules MARC-145.....	92
1.3. Identification sérologique du virus.....	97
1.4. Détermination du titre viral.....	100
1.5. Production de plages.....	100
2. ÉTUDE DES MÉTHODES DE CONCENTRATION ET DE PURIFICATION DU VIRUS.....	103
2.1. Détermination de la densité de flottaison du virus du SRRP en gradients de saccharose et de chlorure de césium.....	103
2.2. Concentration et purification du virus.....	103
3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE DU VIRUS DU SRRP.	105
4. ÉTUDE DE L'ULTRASTRUCTURE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.	108
4.1. Coloration négative des particules virales.....	108
4.2. Immunomarquage à la protéine A couplée à l'or colloïdal.....	108
5. REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DU SRRP.....	113

5.1. Examen clinique.....	113
5.2. Lésions macroscopiques et histologiques observées chez les porcs exposés au virus.....	114
6. CINÉTIQUE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE.....	120
6.1. Suivi d'une cohorte sentinelle.....	120
6.1.1. Chronologie d'apparition des anticorps IgM et IgG.	120
6.1.2. Cinétique des titres en anticorps neutralisants...	121
6.1.3. Identification de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard du virus purifié.....	124
6.1.4. Identification de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard des protéines recombinantes.....	124
6.2. Reproduction expérimentale du SRRP avec dose unique intranasale.....	129
6.2.1. Cinétique d'apparition des anticorps IgM et IgG...	130
6.2.2. Cinétique des titres en anticorps neutralisants...	133
6.2.3. Étude de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard du virus purifié.....	133
6.2.4. Étude de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard des protéines recombinantes...	138
6.3. L'hyperimmunisation des porcelets.....	138

6.3.1. Réponse immunitaire humorale des porcs hyperimmunisés.....	140
6.3.2. Détermination des titres en anticorps neutralisants.....	140
6.3.3. Identification de la spécificité polypeptidique des sérums hyperimmuns.....	143
6.3.4. Identification de la réactivité des anticorps à l'égard des protéines recombinantes.....	146
6.4. Suivi d'une co-infection par le virus du SRRP et le virus influenza porcin.....	146
6.4.1. Chronologie d'apparition des anticorps IgG.....	150
6.4.2. Évaluation des titres en anticorps neutralisants anti-SRRP.....	150
6.5. Suivi de la cinétique de la réponse immuni- taire humorale par radio-immunoprécipitation.....	151
7. SUIVI DE LA VIRÉMIE.....	154
7.1. Isolement du virus et identification sérologique....	154
7.1.1. Évaluation de la virémie au cours de l'expérience cohorte sentinelle.....	157
7.1.2. Évaluation de la virémie au cours d'une	

infection expérimentale après dose unique	
intranasale.....	158
7.1.3. Évaluation de la virémie au cours d'une surin-	
fection	158
7.2. Détection du génome viral par la technique	
d'amplification enzymatique.....	159
7.2.1. Sensibilité et spécificité de la technique RT-PCR	
pour la détection du génome viral à partir des	
sérums.....	159
7.2.2. Amplification par RT-PCR.....	162
7.2.3. Révélation de la présence du génome viral par	
hybridation moléculaire	162
DISCUSSION.....	166
1. CARACTÉRISTIQUES DU VIRUS.....	167
2. ÉTUDE DE LA PERSISTANCE DU VIRUS AU COURS DU SRRP.....	171
3. ÉVALUATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE CONTRE	
LE VIRUS DU SRRP.....	174
CONCLUSION.....	191
REMERCIEMENTS.....	195
BIBLIOGRAPHIE.....	198
ANNEXES	222

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Chronologie d'apparition des anticorps IgM et IgG dirigés contre le virus du SRRP et détectés par IFI.....	122
TABLEAU II	Cinétique des titres d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus du SRRP chez les porcs de la cohorte sentinelle.....	123
TABLEAU III	Cinétique d'apparition des anticorps IgM et IgG détectés par IFI chez les porcs infectés avec une dose unique intranasale du virus du SRRP	131
TABLEAU IV	Cinétique des titres en anticorps neutralisants dirigés contre le virus du SRRP chez les porcs infectés avec une dose virale intranasale unique	132
TABLEAU V	Réactivité des sérums de l'infection à dose virale intranasale unique contre les protéines recombinantes MBP-ORF7, MBP-ORF5 et MBP-ORF4 telle que déterminée par l'épreuve d'immunobuvardage.....	139
TABLEAU VI	Titres en anticorps IgG détectés par IFI chez les porcs hyperimmunisés.....	141
TABLEAU VII	Titres en anticorps neutralisants anti-SRRP détectés chez les porcs hyperimmunisés.....	142

TABLEAU VIII	Cinétique des titres d'anticorps IgG anti-SRRP détectés par IFI au cours d'une infection mixte SRRP-Influenza.....	152
TABLEAU IX	Cinétique d'apparition des anticorps neutralisants contre le virus du SRRP au cours d'une infection mixte SRRP-Influenza.....	153

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1	: Représentation schématique du virus responsable du SRRP.....	20
FIGURE 2	: Effet cytopathique du virus du SRRP sur cultures de macrophages alvéolaires	94
FIGURE 3	: Effet cytopathique du virus du SRRP sur cultures de cellules MARC-145	96
FIGURE 4	: Identification sérologique du virus du SRRP....	99
FIGURE 5	: Plages induites par le virus du SRRP sur cultures de cellules MARC-145	102
FIGURE 6	: Profil d'immunobuvardage des protéines structurales du virus du SRRP	107
FIGURE 7	: Micrographie électronique du virus du SRRP.....	110
FIGURE 8	: Immunomarquage spécifique à la protéine A-or colloïdal	112
FIGURE 9	: Lésions macroscopiques observées chez les porcs infectés avec une dose virale IN unique	117
FIGURE 10	: Lésions histopathologiques pulmonaires des porcs de l'infection cohorte sentinelle.....	119
FIGURE 11	: Réactivité des sérums de l'infection cohorte sentinelle contre les protéines du virus purif.	126

- FIGURE 12 : Réactivité des sérums de l'infection cohorte sentinelle contre les protéines recombinantes MBP-ORF7 (A), MBP-ORF5 (B), MBP-ORF4 (C), et GST-ORF6 (E) 128
- FIGURE 13 : Cinétique de la réponse immune humorale et de la virémie chez les porcelets infectés avec une dose virale unique 135
- FIGURE 14 : Réactivité des sérums de l'infection à dose virale unique contre les protéines du virus purifié... 137
- FIGURE 15 : Spécificité polypeptidique des sérums de porcs hyperimmunisés contre la souche IAF-Klop du virus du SRRP 145
- FIGURE 16 : Spécificité polypeptidique des sérums de porcs hyperimmunisés contre chacune des protéines recombinantes MBP-ORF7 (A), MBP-ORF5 (B), et MBP-ORF4 (C) 148
..... 149
- FIGURE 17 : Spécificité polypeptidique des sérums des porcs infectés par le virus du SRRP telle que déterminée par radioimmunoprécipitation 156
- FIGURE 18 : Sensibilité de la technique RT-PCR pour la détection du génome du virus du SRRP à partir du sérum 161
- FIGURE 19 : Détection du génome du virus du SRRP dans le sérum des animaux infectés à l'aide des techniques de RT-PCR et d'hybridation moléculaire..... 165

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARN	Acide ribonucléique
BSA	Albumine sérique bovine
BVD	Virus de la diarrhée bovine
DEPC ₅₀	Dose induisant un effet cytopathique dans plus de 50% des cultures
DMEM	Milieu Minimal Essentiel de Dulbecco
EAV	Virus de l'artérite équine
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
g	Gramme
GST	Glutathion sulfotransferase
HAAT	Hyperthermie, anorexie et avortement chez les truies
Ig	Immunoglobuline
IFI	Immunofluorescence indirecte
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
im	Intramusculaire
in	Intranasal
iv	Intraveineuse
kb	Kilopaires de bases
kDa	Kilodalton
LDV	Virus de l'élévation de la déhydrogénase lactique des souris
MARC	Meat Animal Research Center
MBP	Maltose binding protéin
MEM	Milieu essentiel minimum d'Eagle
min	Minute
mM	Millimolaire
mg	Milligramme
nm	Nanomètre
ORF	Cadre de lecture
pb	Paires de bases

PBS	Saline phosphatée, sans calcium ni magnésium
PCR	Amplification par réaction en chaîne de l'ADN polymérase
PEARS	Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome
PI	Post-infection
PM	Poids moléculaire
PPN	Pneumonie proliférative et nécrosante
PRRS	Porcine reproductive and respiratory syndrome
Purif	Purifié
PTA	Acide phosphotunstique
RIPA	épreuve d'immunoprécipitation
rpm	Révolution par minutes
RT	Transcriptase inverse
SDRP	Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de SDS
sec	Seconde
SFB	Sérum de foetus bovin
SHFV	Virus de la fièvre hémorragique des singes
SIV	Virus de l'influenza porcin
SIRS	Syndrome d'infertilité et respiratoire porcin
SN	Séroneutralisation
SRRP	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
TAE	Tampon tris-acétate
TBS	Tampon tris-NaCl
TBS-T	Tampon TBS additionné de tween-20
TGEV	Virus de la gastroentérite transmissible
U	Unité
VAE	Virus de l'artérite équine

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Loemba H., S. Mounir, H. Mardassi et S. Dea. 1994. " Viral polypeptide specificities of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs ". *The seventy-fifth conference of research workers in animal diseases*, november 14-15, Chicago.

Archambault D., A. Vézina, A. Dumais, S. Dea, H. Loemba et M. Fournier. 1994. " Suivis immunologiques cellulaires et humoraux chez des porcs infectés avec le virus du SRRP ". *Neuvième conférence annuelle en pathologie animale*, 4-5 mai, Sherbrooke, Québec.

Vézina S.A.S., H. Loemba, M. Fournier, S. Dea et D. Archambault. 1995 " Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus ". Soumis (mars 1995) et accepté pour publication à *Canadian Journal of Veterinary Researches*.

Loemba H., S. Mounir, H. Mardassi et S. Dea. 1995." Étude de la réponse immune humorale chez les porcs infectés par le virus du SRRP ". *Xième Conférence annuelle en pathologie animale*, 3 et 4 mai, Sherbrooke, Québec.

Loemba H., S. Mounir, H. Mardassi et S. Dea. 1995." Characterisation of the humoral immune response to PRRS virus infection ". *CSM Meeting - Queen' University, Kingston, Ontario*, June 11-15,

Loemba H., S. Mounir, H. Mardassi, D. Archambault et S. Dea.
1995." Viral protein specificities of the humoral immune
response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus
infection ". Soumis (juillet 1995) et accepté (novembre 1995)
pour publication à *Archives of virology*.

SOMMAIRE

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcine (SRRP) est une nouvelle maladie porcine qui est caractérisée par des troubles de la reproduction accompagnés par des problèmes respiratoires. Ces signes respiratoires sont observés chez les porcelets à la mamelle, les porcelets sevrés et les porcs à l'engraissement et ils sont attribuables à une pneumonie interstitielle ou une pneumonie proliférative et nécrosante. Cette maladie est d'abord apparue en Amérique du nord vers la fin des années 80 et s'est répandue très rapidement dans plusieurs pays européens vers le début des années 90. L'agent causal fut pour la première fois identifié en 1991 en Hollande et désigné virus de Lelystad. Peu de temps après, des chercheurs en Europe et en Amérique du nord, et en particulier au Québec, ont isolé des virus possédant les caractéristiques morphologiques du virus néerlandais et sérologiquement associés à ce dernier. Ces virus furent isolés sur cultures primaires de macrophages alvéolaires de porcs à partir des spécimens cliniques provenant de fermes affectées par la maladie aux États-Unis, au Canada et au Québec.

Le virus du SRRP fait partie du genre des *Artérovirus*, classé provisoirement dans la famille *Togaviridae*, en regard de ses caractéristiques morphologiques. Sur le plan de son organisation génomique et de sa stratégie de réplication, le virus du SRRP est très proche des virus de la famille *Coronaviridae*. Il existe différents variants antigéniques du

virus du SRRP et certains isolats se distinguent par leur pathogénicité particulière.

Les objectifs de ce projet de recherche étaient d'étudier la réponse immunitaire humorale des porcs atteints du SRRP, d'établir la chronologie d'apparition des anticorps, d'identifier les polypeptides viraux impliqués dans l'induction de la réponse immunitaire humorale, ainsi que d'évaluer différentes techniques pouvant être utilisées pour le suivi sérologique de cette infection virale.

La souche cytopathique de référence du Québec IAF-Klop fut utilisée dans cette étude et propagée sur cellules MARC-145, une lignée hautement permissive au virus du SRRP, dérivée de cellules de reins de singes. L'identification sérologique de la souche IAF-Klop a été confirmée par immunofluorescence indirecte, utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine N de la nucléocapside de la souche de référence américaine ATCC-VR2332. Le virus a été cloné par la technique des plages; des antisérums homologues ont été obtenus suite à l'immunisation de porcs et de lapins avec les préparations de virus purifié par ultracentrifugation isopycnique sur gradients de densité de chlorure de césium ou de saccharose.

Différentes infections expérimentales ont été réalisées chez des porcelets de cinq semaines d'âges et exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF), ce qui a permis d'obtenir des

échantillons cliniques prélevés hebdomadairement pour l'évaluation de la réponse immunitaire humorale et le suivi de la virémie. Cinq types d'infections expérimentales ont été réalisées:

1- Une étude cohorte-sentinelles où les porcelets SPF ont été introduits dans un élevage ayant des évidences cliniques et sérologiques du SRRP.

2- L'infection expérimentale de porcelets SPF avec une dose unique intranasale de 10^5 DECP₅₀ de la souche IAF-exp91 propagée sur cultures de macrophages alvéolaires.

3- Une expérience de surinfection où des porcelets SPF ont reçu une dose intranasale initiale de 10^5 DECP₅₀ du virus du SRRP, suivie d'une dose de rappel au 35ième jour de la maladie.

4- Une expérience d'hyperimmunisation où des porcelets SPF ont été infectés par voie intranasale, puis ont reçu des doses de rappel à toutes les deux semaines.

5- Une infection virale mixte où les porcelets ont reçu initialement une dose intranasale de la souche IAF-Klop du virus du SRRP, suivie d'une dose intranasale de la souche A/SW/IAF-5393/QC91(H1N1) du virus de l'influenza porcine au septième jour post-infection.

Les animaux infectés de même que les porcelets témoins, ont été gardés pour une période d'observation de sept à

quatorze semaines. Suite aux diverses infections expérimentales, les porcs ont développé des signes cliniques du SRRP, à savoir une hyperthermie ou une subfébrilité intermittente, une asthénie et une anorexie, une dyspnée, une conjonctivite ainsi qu'une cyanose des extrémités. Lors de la nécropsie, les principales lésions macroscopiques observées chez les porcs infectés étaient localisées au niveau des poumons. Il y avait généralement une congestion diffuse et une hépatisation du tissu pulmonaire, associées à des adénopathies médiastinales et paratrachéales satellites. Histologiquement, cette atteinte pulmonaire était liée à une pneumonie interstitielle.

Des tests d'immunofluorescence indirecte (IFI), de séroneutralisation (SN) et d'immunobuvardage (WB) ont été effectués pour suivre la cinétique des titres des différents anticorps et pour établir la spécificité polypeptidique de la réponse immunitaire humorale. Indépendamment du type d'infection réalisée, peu de différences au niveau de la cinétique de la réponse immunitaire en anticorps chez les porcelets a été notée. En général, les IgM étaient détectés dès la fin de la première semaine de l'infection. Puis leurs titres atteignaient un niveau maximal vers le 14^{ième} jour après exposition au virus du SRRP, pour ensuite décroître sous des valeurs non significatives au 35^{ième} ou 42^{ième} jour. Les IgG, pour leur part, étaient détectés au cours de la deuxième

semaine de l'infection et leurs titres augmentaient rapidement pour atteindre une valeur-plateau vers le 28^{ième} jour ou le 35^{ième} jour; toutefois des titres élevés étaient maintenus pour plus de 3 mois après le début de l'infection. Des titres significatifs en anticorps neutralisants (>1:16) n'ont pas été observés avant la 4^{ième} ou 5^{ième} semaine de l'infection. Le virus fut isolé sur cultures cellulaires à partir des sérums des porcs infectés dès le 3^{ième} jour d'infection jusqu'à la fin de la période d'observation. Ces résultats confirment ainsi la persistance du virus du SRRP, en dépit des titres relativement élevés en anticorps circulants.

Les séquences correspondant aux cadres de lecture ORFs 4, 5, 6 et 7 ont été amplifiées à l'aide de la technique de réaction de la Taq polymérase, puis clonées dans les vecteurs d'expression procaryotes pMALTM-2 et pGEX-4T. Les gènes ont par la suite été exprimés dans les cellules bactériennes *E.coli* transformées par les plasmides recombinants. La réactivité des sérums d'animaux infectés envers les produits codés par ces cadres de lecture, a été suivie par immunobuvardage. Les animaux infectés ont développé des anticorps contre les quatre protéines virales obtenues après expression des gènes amplifiés et clonés. Une réponse immunitaire humorale spécifique à chaque protéine du virus du SRRP a été mise en évidence; les anticorps dirigés contre la protéine d'enveloppe (E) codée par l'ORF5 et ceux contre le produit de l'ORF4 étaient détectables vers le

7ième jour après infection, tandis que les anticorps spécifiques à la protéine N de la nucléocapside (produit de l'ORF7) n'étaient décelables qu'à partir du 14ième jour d'infection. Finalement les anticorps produits contre la protéine de la matrice M (produit de l'ORF6) n'ont pu être mis en évidence qu'au début de la troisième semaine.

Les résultats obtenus ont démontré qu'il existait une chronologie particulière d'apparition des différents types d'anticorps produits chez les animaux infectés et une réponse immunitaire humorale spécifique dirigée contre chacune des protéines du virus du SRRP. Toutefois, aucune corrélation n'a été observée entre les titres des anticorps détectés par immunofluorescence, les titres en anticorps neutralisants, la spécificité polypeptidique de la réponse humorale et la virémie révélée au cours de l'infection.

Enfin, les tests sérologiques utilisés au cours de ce recherche, ont permis de révéler l'efficacité de certaines épreuves telle que l'immunofluorescence indirecte et l'immunobuvardage pour le suivi sérologique de l'infection par le virus du SRRP. La Technique de la RT-PCR a permis de confirmer le statut virémique des porcs infectés ayant été déterminé par les tests d'isolement viral à partir du sérum; toutefois, il est nécessaire d'approfondir l'étude des paramètres pouvant améliorer la sensibilité de cette technique pour la détection du génome viral à partir des échantillons cliniques.

INTRODUCTION

Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) est une nouvelle maladie porcine qui est apparue en Amérique du nord en automne 1987 (Keffaber ,1989) et un peu plus tard en Europe en hiver 1990-1991 (Wensvoort et al.,1991a; Paton et al., 1991a, 1991b; Albina et al., 1992a; Baron et al., 1992). Ce syndrome s'est rapidement répandu à travers le monde, en particulier tout récemment en Asie centrale et orientale, causant de grandes pertes économiques à l'industrie de l'élevage des porcs (Dial et al.,1990; Polson et al., 1990).

Initialement, les virus de l'encéphalomyocardite et le parvovirus porcin ont été associés à cette maladie à cause de l'importance des problèmes de la reproduction (Joo et al., 1988; Kim et al., 1989; Dea et al., 1990, 1991a, 1991b; Bilodeau et al., 1991). En 1989 et 1990, les atteintes respiratoires étaient devenues cliniquement prédominantes et on y associait souvent des lésions de pneumonie proliférative et nécrosante attribuables dans certains cas à l'infection par un nouveau variant du virus influenza porcin ou par une combinaison de différents agents (Dea et al., 1991a et 1992c; Morin et al., 1990; Girard et al., 1992). Par la suite, il fut possible d'observer que ces atteintes respiratoires apparaissaient chez les porcelets de tout âge, presque simultanément ou parfois de manière consécutive, avec des troubles reproducteurs multiformes tels que des avortements, des mises-bas prématurées, des morts-nés. Ce tableau clinique

portait à croire qu'il y avait deux formes différentes d'une même entité nosologique qui pouvaient avoir une évolution clinique variable selon le type de production porcine préconisée et selon la salubrité des élevages (Martineau et al., 1991).

D'après les signes cliniques observés dans différents pays, plusieurs dénominations ont été données à ce syndrome: "la maladie mystérieuse des porcs" (Loula, 1991), "la maladie des oreilles bleues" (Paton et al., 1991a et 1991b; Wensvoort et al., 1991a), le syndrome HAAT-pneumonie interstitielle (Clermont et Bilodeau, 1990; Dea et al., 1991a) ou syndrome d'hyperthermie, anorexie et avortement de la truie (Martineau et al., 1991), le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (Albina et al., 1992a). Les participants au premier symposium international sur la maladie, tenu en 1992 à St-Paul au Minnesota, se sont mis d'accord sur l'utilisation de l'appellation de "Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin" ou SRRP (Collins J., First international symposium on SIRS-PRRS, 1992).

La confusion qui sévissait autour de l'étiologie du SRRP fut résolue au cours de l'été 1991, quand Wensvoort (Wensvoort et al., 1991b) et son équipe de chercheurs isolèrent, pour la première fois, l'agent causal de la maladie à partir de cas cliniques du SRRP, dans la ville de Lelystad en Hollande: ils dénommèrent cet agent viral "virus de Lelystad". Peu après,

d'autres chercheurs en Europe et en Amérique du Nord ont isolé des virus partageant les mêmes caractéristiques morphologiques. Au Québec, au printemps 1992, un virus cytopathogène, morphologiquement et sérologiquement apparenté au virus de Lelystad, fut isolé à l'Institut Armand-Frappier sur cultures de macrophages alvéolaires de porc à partir des tissus pulmonaires d'animaux infectés (Dea et al., 1992a et 1992b).

Au cours des deux dernières années, l'utilisation d'un test d'immunofluorescence indirecte (IFI) pour le dépistage des anticorps a montré que plus de 70% des fermes porcines du Québec sont touchées par le SRRP. Ce syndrome représente à l'heure actuelle un nouveau risque sanitaire et économique pour l'industrie de l'élevage des porcs, deuxième en importance au pays. Les méthodes de diagnostic ainsi que les moyens de contrôle thérapeutique et prophylactique restent à être développés. En ce qui concerne le diagnostic sérologique, plusieurs aspects doivent être considérés afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité des tests. Une étude méthodique de la chronologie d'apparition des anticorps neutralisants et du rôle facilitateur des anticorps dans l'infection des macrophages, l'identification des protéines du virus porteuses des déterminants antigéniques associés aux fonctions de virulence, et le rôle de la réponse immunitaire à médiation cellulaire sont autant d'aspects à considérer pour le développement de tests de diagnostic valides et de vaccins.

Sur le plan du diagnostic virologique, des problèmes subsistent encore, en particulier les difficultés liées à la culture du virus bien que maintenant certaines lignées cellulaires spécialisées aient été développées. Au début il n'a été possible de cultiver ce virus que sur des macrophages alvéolaires porcins, limitant ainsi les travaux d'isolement pour les fins de diagnostic de routine. D'autre part, l'utilisation de la réaction en chaîne de la *Taq* polymérase (PCR) pour la détection du génome viral a été jusqu'à présent très limitée à cause de l'existence de variations majeures ayant été démontrées au niveau des séquences de certains gènes des souches américaines et européennes (Wensvoort et al., 1992a; Nelson et al., 1993a et 1993b; Benfield et al., 1994; Mardassi et al., 1994b et 1994c; Meng et al., 1994).

En tenant compte de ce qui précède, la présente étude a été entreprise sur la base des objectifs suivants:

- 1- Étudier la réponse immunitaire humorale et la virémie chez les animaux infectés.
- 2- Établir la chronologie d'apparition des différents anticorps en fonction de leur spécificité polypeptidique et leur valeur protectrice.
- 3- Évaluer différentes techniques de diagnostic pour le suivi sérologique.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN

1.1. DÉFINITION CLINIQUE ET PATHOLOGIQUE

Le Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP) est une nouvelle entité pathologique associée à des problèmes reproducteurs affectant les truies de toutes parités, accompagnés de problèmes respiratoires attribuables à une pneumonie interstitielle ou à une pneumonie proliférative et nécrosante chez les porcelets de tous les âges. Une augmentation du taux de mortalité est observé chez les truies, de même qu'une fréquence accrue d'avortements tardifs, de momifications foetales, de mortinatalités, de mise-bas prématurées et de porcelets nés-faibles (Goyal, 1993; Christianson et Joo, 1994).

Chez les porcelets à la mamelle, dans les pouponnières et en engraissement, la maladie se manifeste par de la fièvre souvent persistante, par de la polypnée et par de la dyspnée avec une respiration abdominale laborieuse. La toux n'est pas un signe important de la maladie et plusieurs porcelets meurent tandis que les survivants développent des retards de croissance importants (Morin et al., 1990; Bilodeau et al., 1991; Dea et al., 1991a et 1991b; Martineau et al., 1992). Des porcelets de moins d'une semaine d'âge peuvent en être affectés, mais l'incidence de la maladie est surtout importante chez les porcelets âgés de 4 à 10 semaines. La maladie a une tendance à

la chronicité et les porcelets ayant survécu à la phase aiguë développent généralement un syndrome d'immunodéficience se manifestant cliniquement par des problèmes de polyarthrite, de polysérosite, de rhinite, d'encéphalite et des lésions cutanées attribuables à des infections bactériennes secondaires diverses (Goyal, 1993; Albina et al., 1994). Les verrats sont aussi affectés et la qualité de la semence est diminuée (Albina et al., 1993; Yeager et al., 1993; Swenson et al., 1994a, 1994b).

Le SRRP était connu initialement sous le nom de "la maladie mystérieuse du porc" (mystery swine disease). D'autres termes ayant été employés pour désigner cette maladie et faisant d'avantage référence à la situation clinique observée dans chaque pays sont: le syndrome d'infertilité et respiratoire porcin (SIRS) en 1987 et 1988 aux États-Unis (Keffaber, 1989; Collins et al., 1991), le syndrome de l'hyperthermie, de l'anorexie et de l'avortement chez les truies (syndrome-HAAT) en 1987 au Canada (Martineau et al., 1991), le syndrome d'avortement épidémique et respiratoire porcin (PEARS) en 1991 en Hollande (Wensvoort et al., 1991b), le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) en 1991 en France (Albina et al., 1992a) et, enfin, la maladie des oreilles bleues en 1991 en Grande-Bretagne et en Hollande (Paton et al., 1991a, 1991b; Wensvoort et al., 1991a).

Chez les porcs infectés dans des conditions naturelles, les poumons ont en général un aspect macroscopique normal, à

moins que le SRRP soit compliqué par une infection secondaire (Done et al., 1992). Les changements pathologiques au cours du SRRP ne sont pas pathognomoniques. Il n'y a pas de "pneumonie typique au SRRP". La sévérité des aspects cliniques et histopathologiques observés dépend de la prédominance des agents pathogènes des voies respiratoires qui subsistent de façon endémique dans les élevages (Blaha, 1993; Goyal, 1993; Christianson et Joo, 1994).

Dans les cas d'infections expérimentales, les lésions pulmonaires visibles macroscopiquement ont une apparence variable (Morin et al., 1990; Bilodeau et al., 1991; Collins et al., 1991); elles impliquent généralement tout le poumon. Une pneumonie interstitielle diffuse avec des zones circonscrites de pneumonie catarrhale a souvent été observée (Dea et al., 1990; Collins et al., 1991; Pol et al., 1991a; Christianson et al., 1992; Paton et al., 1992). Une hypertrophie et une vacuolisation des macrophages de la pulpe rouge de la rate sont aussi observées. Sur le plan ultrastructurel, il y a une dégénérescence des macrophages alvéolaires et des cellules épithéliales au niveau des poumons et de la muqueuse nasale avec une vacuolisation excessive du réticulum endoplasmique (Pol et al., 1991a, 1991b; Paton et al., 1992).

D'autres lésions macroscopiques peuvent être parfois observées comme la nécrose marquée de l'épithélium bronchiolaire, la présence de cellules syncytiales et,

occasionnellement, du protozoaire *Pneumocystis carinii* dans les alvéoles pulmonaires. Des infections secondaires bactériennes par *Haemophilus parasuis*, *Pastereulla multocida* et *Streptococcus suis* viennent souvent compliquer les lésions catarrhales et prolifératives déjà présentes (Magar et al., 1993, 1995; Desrosiers et al., 1994). Dans les cas sévères, les lobes pulmonaires sont fermes, de couleur grisâtre ou en aspect de mosaïque. Les ganglions thoraciques et médiastinaux sont hypertrophiés. À la coupe, les poumons ont un aspect de thymus. Ce sont des cas de pneumonie proliférative et nécrosante. Ils sont caractérisés par des lésions microscopiques exsudatives, prolifératives et nécrotiques (Morin et al., 1990; Bilodeau et al., 1991; Dea et al., 1992c; Girard et al., 1992; Magar et al., 1993). Les changements microscopiques les plus importants sont la prolifération marquée des pneumocytes de type II et la présence de débris cellulaires nécrotiques, de fibrine et de membranes hyalines dans la lumière alvéolaire (Morin et al., 1990). Il y a généralement absence de lésions chez les avortons.

En définitive le SRRP se définit:

1- par des troubles reproducteurs: taux d'avortement et de mise-bas prématurés supérieur ou égal à 8%, taux de mortinatalités et de momifications foetales supérieur ou égal à 15%, taux de mortalités naissance-sevrage supérieur ou égal à

20% (Keffaber, 1989; Morin et al., 1990; Bilodeau et al., 1991; Martineau et al., 1991; Wensvoort et al., 1991a).

2- et par des problèmes respiratoires, généralement attribuables à une pneumonie interstitielle ou une pneumonie proliférative et nécrosante.

1.2. DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Le SRRP est apparu en Amérique du Nord à l'automne 1987 (Keffaber et al., 1989; Quaipe, 1989, 1990; Dea et al., 1990), puis s'est rapidement répandu à d'autres continents, plus particulièrement en Europe où des cas ont été observés en Allemagne (Lindhaus et Lindhaus, 1991), en Hollande (Wensvoort et al., 1991a), en France (Baron et al., 1991) et en Grande-Bretagne (Paton et al., 1991a, 1991b; White, 1991). Actuellement, la composante respiratoire du SRRP est prédominante sur le syndrome reproducteur (Albina et al., 1992a; Wensvoort et al., 1992b; Goyal, 1993).

La période d'incubation est généralement courte; il s'écoule le plus souvent de 4 à 7 jours avant l'apparition des premiers symptômes (anorexie et hyperthermie) (Pol et al., 1991a), et de 14 à 28 jours avant l'apparition des troubles de la reproduction (Davies, 1991). L'apparition est brutale, la rémission partielle et rapide dans un premier temps (après 4 à 8 semaines) puis plus prolongée dans un second temps (après 11 semaines au minimum). La diffusion de la maladie a été de

nature épizootique aux États-Unis, au Canada, en Allemagne, en Hollande et en France (Goyal, 1993), alors qu'elle a été limitée à quelques foyers dans les autres pays (Albina et al., 1992a). Le porc est la seule espèce-cible connue (Goyal, 1993). En Europe, il semble que la maladie ait une incidence saisonnière car une réduction sensible du nombre de nouveaux foyers déclarés au début de l'été a été constatée (Albina et al., 1992a). Cependant en Amérique du Nord, la maladie est observée toute l'année, bien que les états du sud des États-Unis soient moins touchés que les états du nord (Collins et al., 1992; Morrison et al., 1992a, 1992b; Christianson et Joo, 1994).

Il a été estimé aux États-Unis que la forme sévère du SRRP conduisait à des pertes économiques majeures estimées, pour un élevage de 250 truies, à 92% du profit net par truie et par an, soit 268\$ US (Keffaber et al., 1989; Polson et al., 1990). En 1990, 43% d'un total de 100 fermes de l'état d'IOWA, ayant la plus grande densité de porcs en Amérique du Nord, renfermaient des animaux qui étaient sérologiquement positifs en anticorps contre le virus du SRRP (Morrison et al., 1992a et 1992b). Au Canada, les analyses sérologiques effectuées suggèrent que le virus du SRRP est très répandu dans les élevages de porcs du Québec (plus de 60% des troupeaux) et d'autres provinces (Dea et al., 1992a; Goyal, 1993; Magar et al., 1993). Les résultats de ces enquêtes ont aussi révélé une

forte fréquence d'infections sub-cliniques ou atypiques et un écart entre les résultats de séroprévalence et les données cliniques (Bilodeau et al., 1991, 1994; Albina et al., 1992a; Goyal, 1993).

La source d'infection la plus importante est le porc infecté dont au moins le sang, le sperme, l'épithélium nasal, les foetus, les morts-nés, contiennent le virus (Terpstra et al., 1991; Wensvoort et al., 1991a; Yeager et al., 1993; Swenson et al., 1994). Le mode de transmission du SRRP n'est pas encore complètement élucidé, mais l'expansion rapide observée parmi les fermes de certaines localités (Keffaber, 1989; Lindhaus et Lindhaus, 1991) et les essais de reproduction expérimentale réalisés à la suite de l'inoculation intranasale du virus à des porcelets (Collins et al., 1991; Dea et al., 1991a et 1992b; Bilodeau et al., 1991), suggèrent que la maladie se transmet par les aérosols. D'autre part, une étude épidémiologique hollandaise a permis de démontrer une transmission du virus par l'air (Komijn et Van Klink, 1991); il a été observé que des élevages complètement fermés et isolés, ne faisant aucun achat de semence et d'animaux de l'extérieur, se contaminaient. L'enregistrement des données météorologiques a permis de montrer que la diffusion géographique de la maladie suivait la direction des vents dominants. Les conditions optimales qui accompagnent la diffusion du SRRP sont: une vitesse de vent faible (< 8 m/s), une température basse, une

humidité élevée (>60%) et un ensoleillement minimal. Ces conditions permettent de conserver le pouvoir pathogène du virus et de limiter sa dispersion verticale par des mouvements de convection d'air à partir de la surface terrestre (Albina et al., 1992a).

D'autre part, il y a des preuves de la sécrétion du virus dans le sperme des verrats pour de longues périodes, ce qui laisse présager un risque de contamination de la semence fraîche ou traitée pour des fins d'insémination (Swenson et al., 1994a, 1994b; Christopher-Hennings et al., 1995). Dans une étude épidémiologique, le virus du SRRP a été isolé à partir du sperme dès le troisième jour après l'infection expérimentale de verrats par voie intranasale (Swenson et al., 1994a, 1994b). Dans une autre étude, deux truies, inséminées artificiellement avec du sperme provenant de verrats infectés, ont développé un état morbide transitoire (Yeager et al., 1993).

1.3. SITUATION AU QUÉBEC

Au début de l'épidémie au Québec en 1987, l'aspect reproducteur semblait dominer sur le plan clinique (Martineau et al., 1991). À présent, une composante du SRRP à dominance respiratoire paraît plus manifeste et elle est caractérisée sur le plan histopathologique par une pneumonie proliférative et nécrosante (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992c; Martineau et al., 1992; Magar et al., 1993) ou une pneumonie interstitielle

moins sévère (Dea et al., 1991a, 1991b). Dans le cas d'élevages en système "tout plein-tout vide", les mortalités attribuables aux problèmes respiratoires surviennent tout au long de la période d'engraissement. Les taux s'élèvent fréquemment jusqu'à 12-15%. Les performances zootechniques sont détériorées et les taux de saisie en abattoir atteignent 1 à 2%, le tout conduisant à une perte de plus de 18\$ par tête (Moore et al., 1990). La baisse importante de la productivité attribuable aux problèmes de la reproduction chez les truies de toutes parités, ainsi qu'une fréquence accrue de problèmes respiratoires observés chez les porcelets à la mammelle, les porcelets sevrés et les porcs à l'engraissement, compromettent la rentabilité de cette industrie (Keffaber, 1989; Martineau et al., 1991).

Des études sérologiques et virologiques, effectuées à l'aide d'échantillons obtenus de plusieurs fermes, ont permis d'établir l'ampleur de la situation du SRRP au Québec. Les résultats de ces enquêtes sont comparables à ceux obtenus par les équipes d'autres pays producteurs de porcs et démontrent que: 1- les animaux infectés peuvent demeurer virémiques plus de 4 mois après l'absence de signes cliniques dans les fermes et représentent un danger pour les animaux nouvellement introduits (Goyal, 1993; Albina, 1992a; Bilodeau et al., 1994; Mardassi et al., 1994a; Yoon et al., 1992); 2- les élevages infectés ne recouvrent pas leurs performances initiales avant 3 à 4 mois et les infections subcliniques ou atypiques se

propagent rapidement à des élevages indemnes (Bilodeau et al., 1991, 1994; Goyal, 1993; Albina et al., 1992a); 3- le virus peut être isolé à partir de spécimens cliniques obtenus de certaines fermes n'ayant pas connu d'épisodes cliniques pour plus de 24 à 60 mois après un premier épisode aigu de troubles de la reproduction (Goyal, 1993; Mardassi et al., 1994a).

1.4. ÉTIOLOGIE

Au début des épidémies du SRRP survenues en Amérique du Nord et en Europe, plusieurs agents pathogènes ont été incriminés d'être à l'origine de cette nouvelle maladie porcine. Parmi les virus mentionnés, il y avait le virus de l'influenza porcin, notamment à cause du syndrome grippal accompagnant plusieurs cas de SRRP (Bilodeau et al., 1991; Goyal et al, 1993), mais surtout à cause d'un nouveau type de pneumonie apparue au Québec au cours de la même période, la pneumonie proliférative et nécrosante, qui avait été attribuée à un nouveau variant antigénique du virus de l'influenza porcin (SIV) (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992c). Les résultats d'analyses cliniques, histopathologiques et virologiques suggèraient que ces deux nouvelles entités pathologiques coexistaient dans plusieurs élevages du Québec (Bilodeau et al., 1991; Martineau et al., 1992). D'autres infections virales connexes avaient été identifiées (le parvovirus porcin, le virus de l'encéphalomyocardite, le virus de la pseudorage, le virus BVD ou virus de la diarrhée virale bovine, le IBR ou

virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine, le TGEV ou virus de la gastroentérite transmissible) et rapportés dans plusieurs cas en Amérique du Nord et Europe, sans pouvoir toutefois définir leur véritable rôle dans la maladie (Joo, 1988; Keffaber, 1989; Dea et al., 1990; Kim et al., 1991; Paton et al., 1991a, 1991b; Wensvoort et al., 1991a; Albina et al., 1992a).

Un nouveau virus porcin, désigné initialement "virus de Lelystad", a été isolé sur cultures primaires de macrophages alvéolaires en 1991 à Lelystad en Hollande et reconnu comme l'agent étiologique primaire du SRRP (Wensvoort et al., 1991b). Les infections expérimentales de truies gestantes et de porcelets, inoculés par la voie intranasale, ont permis de confirmer le rôle primaire de cet agent (Terpstra et al., 1991; Pol et al., 1991a), ainsi que celui d'isolats américains (Benfield et al., 1992c; Christianson et al., 1992a; Collins et al., 1992) et québécois (Dea et al., 1992a, 1992b; Voicu et al., 1992; Magar et al., 1993). Suite à l'inoculation intranasale à des truies au dernier tiers de la gestation, le virus a pu être réisolé chez des porcelets morts-nés ou nés-faibles (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Dea et al., 1992a), et des lésions de pneumonie interstitielle ont pu être démontrées chez les porcelets moins d'une semaine après leur naissance (Pol et al., 1991a; Terpstra et al., 1991; Collins et al., 1992; Dea et al., 1992b).

2. VIRUS DU SRRP

2.1. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES

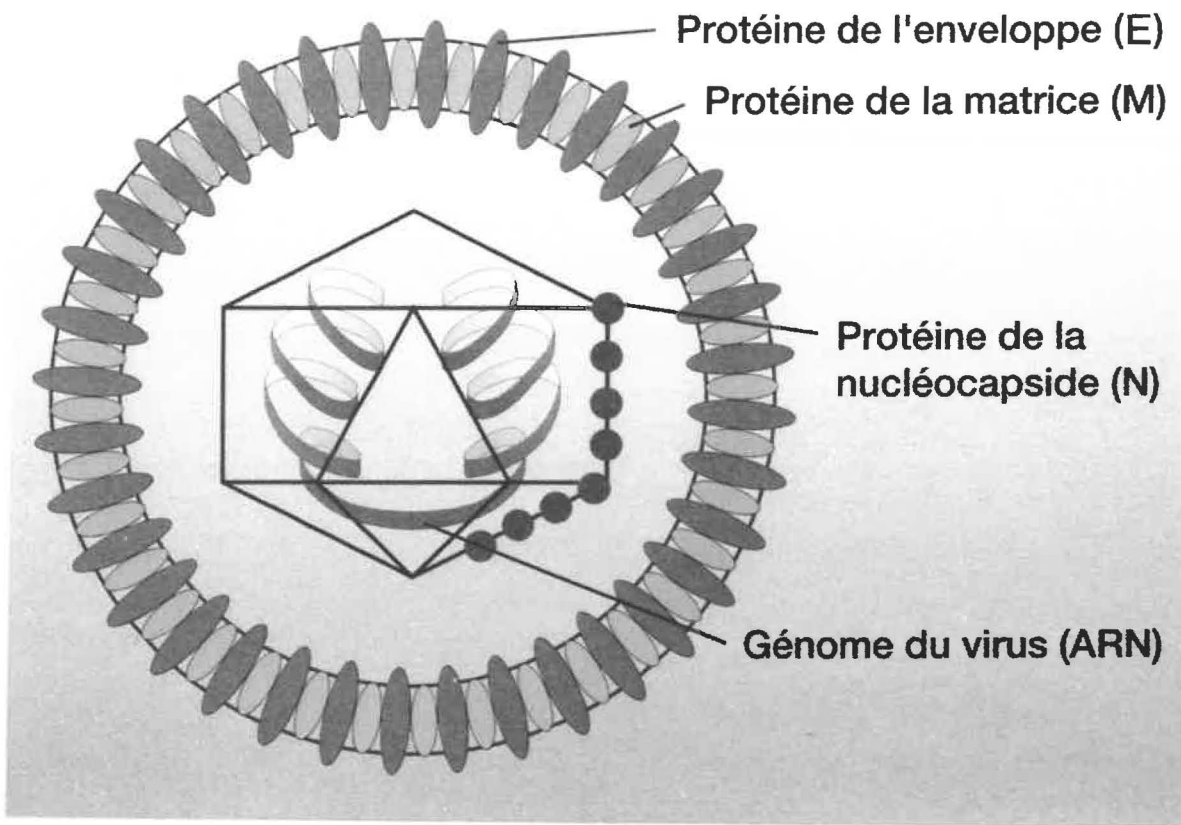
Le virus du SRRP, en microscopie électronique, se présente sous forme de particules enveloppées et pléomorphes, plutôt sphériques, d'environ 62 nm de diamètre; le virion possède une nucléocapside icosaédrique de 25-30 nm (Benfield et al., 1992b, 1992c; Dea et al., 1992a, 1992b; Wensvoort et al., 1991b) renfermant le génome. Des petites projections de surface peuvent aussi être observées (Benfield et al., 1992c).

2.2. CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES

Le virus du SRRP est très fastidieux, sa réplication étant restreinte aux cultures primaires de macrophages alvéolaires de porcs (PAM) (Wensvoort et al., 1991b; Dea et al., 1992b; Yoon et al., 1992). Toutefois certains isolats du virus ont été adaptés à deux lignées cellulaires continues, les lignées CCL-2621 et MARC-145, toutes deux dérivées de la lignée cellulaire MA 104 provenant de cellules épithéliales de rein de singe (Benfield et al., 1992c; Kim et al., 1993). Généralement sur ces deux lignées hautement permissives, le virus induit un effet cytopathique apparaissant au bout de 2 à 3 jours après l'infection. Aucune activité hémagglutinante du virus du SRRP n'a été observée en présence d'érythrocytes humains, porcins, aviaires, ovins, de rats, de souris et de lapins (Wensvoort et

**FIGURE 1. Représentation schématique du virus responsable du
SRRP**

Le virus du SRRP est un virus sphérique, enveloppé, de 50 à 70 nm de diamètre, possédant une nucléocapside de forme icosahédrique. Le génome consiste en une molécule d'ARN de polarité positive, monocaténaire, non-segmentée. Trois protéines structurales majeures ont été identifiées: la glycoprotéine d'enveloppe (E), la protéine de la matrice (M) et la protéine de la nucléocapside (N).



al., 1991b; Yoon et al., 1992; Benfield et al., 1992c; Dea et al., 1992b, Goyal, 1993).

L'espèce porcine est la seule cible connue du virus du SRRP. Aucune réactivité croisée du virus du SRRP n'a été observée avec les sérums dirigés contre une série de 39 virus à ARN enveloppés qui infectent principalement les vertébrés, incluant les virus considérés comme les plus proches du virus du SRRP, en l'occurrence le virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique (LDV) des souris et le virus de l'artérite équine (VAE) (Wensvoort et al., 1991b; Benfield et al., 1992a, 1992c; Ohlinger et al., 1992b; Zimmerman et al., 1992).

2.3. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

La densité de flottaison des particules virales purifiées par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium est estimée à 1,18-1,20 g/ml, et à 1,14 g/ml sur gradient de saccharose (Ohlinger et al., 1991a; Wensvoort et al., 1991; Benfield et al., 1992c). Les titres infectieux du virus sont plus élevés lorsqu'il est purifié par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de saccharose (Benfield et al., 1992c).

Le virus est inactivé après pré-traitement avec du chloroforme ou de l'éther, ce qui confirme la présence d'une enveloppe contenant des lipides (Ohlinger et al., 1991a; Yoon

et al., 1992; Plana Duran et al., 1992a, 1992b). Le virus du SRRP est très sensible aux élévations de la température: son titre infectieux est réduit d'un facteur de 100 à 10000 s'il est incubé pendant 15-20 minutes à 56°C, ou de 10 à 24 heures à 37°C, ou pendant 6 jours à 20°C. Le titre infectieux n'est réduit que d'un log10 après conservation d'un mois à 4°C. Il est stable pendant plus de 4 mois lorsque le virus est conservé à -70°C et pendant plus de 10 semaines quand il est gardé à -20°C (Benfield et al., 1992c; Yoon et al., 1992; Terpstra et al., 1992; Bloemraad et al., 1994). Lorsque le virus est conservé pendant 1 mois à 4°C, le titre infectieux peut être réduit de dix fois (Bloemraad et al., 1994).

Le virus du SRRP est sensible aux variations du pH du milieu. Le titre infectieux est réduit pour plus de 90% à des valeurs de pH inférieures à 5 ou supérieures à 7 (Benfield et al., 1992c). À la température de 4°C, la demi-vie du virus varie avec le changement du pH: la stabilité maximale du virus avec une demi-vie de 50 heures a été obtenue à pH 6,25 et la stabilité minimale avec une demi-vie de 33,3 heures à pH 8,5 et 18 heures à pH 5,0 (Bloemraad et al., 1994). La demi-vie (6,25 heures) la plus longue, pour l'incubation du virus à la température de 37°C, a été observée lorsque la valeur du pH était égale à 6,0. L'augmentation ou la diminution des valeurs du pH à 37°C réduisent rapidement la demie-vie du virus (Benfield et al., 1992c; Bloemraad et al., 1994).

2.4. ORGANISATION DU GÉNOME

Le génome du virus du SRRP est constitué d'une molécule d'ARN simple brin linéaire, non-segmentée, coiffée en 5' et polyadénylée en 3' (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a). C'est une molécule de 15,1 kb ayant une organisation similaire à celle du virus de l'artérite équine (Den Boon et al., 1991; Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a). Huit cadres de lecture ouverts ont été identifiés et les 2/3 du génome, constitués par l'ORF1a et l'ORF1b, codent pour une ARN polymérase ARN dépendante et d'autres protéases associées à la réplication du virus (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a). Le reste du génome, constitué des ORF2 à 7, code pour au moins 3 protéines structurales majeures, mais aussi pour des protéines non-structurales (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, 1995; Mardassi et al., 1995). Deux séquences particulières situées dans la zone intermédiaire entre l'ORF1a et l'ORF1b ont été identifiées: une séquence heptanucléotidique (UUUAAAC) située en aval juste après le codon stop (UAG) de l'ORF1a et une séquence formant une structure secondaire qui serait associée à un signal de fin de transcription (pseudoknot structure); ces deux séquences sont similaires à celles qui ont été observées chez le virus de l'artérite équine, les torovirus et les coronavirus (Brierly et al., 1989; Meulenberg et al., 1993a). La comparaison des séquences d'acides aminés correspondant aux différents cadres

de lecture identifiés pour le génome du virus du SRRP avec celles du LDV des souris et celles du VAE, a démontré que le virus du SRRP est beaucoup plus proche du virus murin que de celui du cheval (Meulenberg et al., 1993a). Les profils d'hydrophobicité déduits des séquences des acides aminés indiquent que les cadres de lecture ORFs 2 à 6 codent probablement pour des protéines associées à la membrane. L'ORF7 code pour la protéine de la nucléocapside (Meulenberg et al., 1993a, 1995; Conzelmann et al., 1993; Mardassi et al., 1995).

Une région non-codante, située à l'extrémité 3' du génome, a été retrouvée en aval du codon stop de l'ORF7 (Conzelmann et al., 1993; Mardassi et al., 1995). La comparaison des séquences de cette région du virus du SRRP d'une part avec les séquences correspondantes du LDV et celles du VAE d'autre part, a montré qu'en excluant la queue polyadénylée, la région 3' non codante du virus du SRRP est la plus longue de tous les artérovirus identifiés à ce jour (Conzelmann et al., 1993; Meng et al., 1994). La longueur de cette région 3' non-codante du virus de Lelystad a été évaluée à 114 nucléotides, celle du LDV à 80 nucléotides, et celle du VAE à 59 nucléotides (Conzelmann et al., 1993).

2.5. STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE

Trois protéines structurales majeures, ayant des poids moléculaires estimés à 15, 19 et 24-26 kDa, ont été identifiées

par des analyses d'immunobuvardage et d'immunoprécipitation. La protéine de 15 kDa correspond à la protéine de la nucléocapside, celle de 18-19 kDa correspond à la protéine de la matrice et celle de 24-26 kDa à la glycoprotéine de l'enveloppe (Nelson et al., 1994; Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, 1995; Mardassi et al., 1994a, 1995). Les protéines N de la nucléocapside, M de la matrice et E de l'enveloppe sont codées respectivement par les cadres de lecture ORF7, ORF6 et ORF5 (Meulenberg et al., 1995; Mardassi et al., 1995).

La protéine N n'est pas glycosylée. Sa séquence d'acides aminés est extrêmement basique et montre 41% d'homologie avec celle de la protéine N du LDV (Chen et al., 1993; Godeny et al., 1990) et 20% avec celle du VAE (Den Boon et al., 1991; Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995).

La protéine (M) de 18-19 kDa est une protéine d'enveloppe non glycosylée possédant un profil d'hydrophobicité identique à celui des protéines M des coronavirus de l'hépatite murine (MHV) (Bournsnell, 1994), et de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) (Rottier et al., 1986), la protéine E du virus de Berne (Den Boon et al., 1991), la protéine M du VAE (De Vries et al., 1992), et le produit du gène ORF6 du LDV (Chen et al., 1993; Godeny et al., 1993). Ces protéines sont caractérisées par la présence de trois segments hydrophobes à l'extrémité N-terminale (Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995).

La glycoprotéine d'enveloppe E possède au moins deux sites de N-glycosylation (Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995). Cette glycoprotéine d'enveloppe E incorporée dans les particules virales est sensible à l'enzyme PNGaseF, mais elle est en partie résistante à l'endopeptidase H; cela indique que pendant la maturation du virus, la protéine E est transportée à travers l'appareil de Golgi où elle acquiert un résidu d'olisaccharides simples et complexes à partir des résidus de dolichol N-phosphate (Meulenberg et al., 1995). La protéine E correspond à la protéine G1 d'enveloppe codée par l'ORF5 du VAE (De Vries et al., 1992; Meulenberg et al., 1995). Bien que les processus de maturation des chaînes d'oligosaccharides N-terminales de ces protéines E et G1 semblent différents, ces deux protéines contiennent chacune une grande région interne hydrophobe, qui pourrait jouer un rôle principal dans l'ancrage de ces protéines dans la membrane (De Vries et al., 1992; Meulenberg et al., 1995).

À l'heure actuelle, la nature exacte des produits des gènes ORFs 2 à 4 n'est pas encore connue. Le profil d'hydrophobicité du produit de l'ORF2 du virus du SRRP est similaire à ceux du VAE et du LDV (De Vries et al., 1992; Meulenberg et al., 1995).

2.6. VARIATIONS ANTIGÉNIQUES ET GÉNOMIQUES

Sur le plan clinique, bien que les syndromes associés à l'infection par le virus du SRRP en Amérique du Nord et en Europe soient similaires (Goyal, 1993), des variations génomiques ont été rapportées entre les isolats américains et européens (Wensvoort et al., 1992a; Dea et al., 1992a; Nelson et al., 1993a; Mardassi et al., 1994b, 1995). Les observations sur ces différences génomiques ont été fortement consolidées par les résultats des enquêtes sérologiques (Morrison et al., 1992a, 1992b; Collins et al., 1992). La comparaison des séquences de la portion 3' terminale du génome de la souche québécoise de référence IAF-exp91 du virus du SRRP avec la séquence correspondante du virus de Lelystad indique que les cadres de lectures ORFs 5, 3 et 7 sont les plus variables avec seulement 52%, 54%, et 59% d'homologie en acides aminés, respectivement (Mardassi et al., 1995). Par contre, les ORFs 4 et 6 de ces deux isolats ont une homologie de séquences en acides aminés de 68% et de 81%, respectivement. Des variations dans la longueur de chaque cadre de lecture ont aussi été notées entre la souche IAF-exp91 et le virus de Lelystad; les ORFs 7, 5, 4, et 3 de la souche IAF-exp91 sont plus courts que ceux du virus de Lelystad, sauf que l'ORF6 de cette souche québécoise a un résidu d'acide aminé supplémentaire par rapport à l'ORF6 du virus de Lelystad (Mardassi et al., 1994b, 1995).

Les différentes souches du virus du SRRP partagent plusieurs propriétés (Dea et al., 1992b), mais montrent quelques différences antigéniques. Bien que les isolats Nord-américains et européens soient apparentés, ils se distinguent par des variations affectant les déterminants antigéniques de leurs différentes protéines structurales, notamment la protéine de la nucléocapside (Mardassi et al., 1994b; Meng et al., 1994). On considère que les différents isolats européens sont très proches les uns des autres, très peu de variabilité ayant été démontrée lors des analyses de leur séquences génomiques (Suarez et al., 1994; Conzelman et al., 1993; Meulenberg, 1993a). D'autre part, des variations plus marquées semblent affecter les isolats Nord-américains, ces derniers pouvant se distinguer selon leur réactivité en immunofluorescence indirecte vis-à-vis des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de la nucléocapside (Nelson et al., 1993a et 1993b; Magar et al., 1995). Récemment, Joo et Yoon (1994) ont démontré qu'on pouvait distinguer au moins trois différents sérotypes parmi les souches isolées de fermes de différentes régions des États-Unis par des analyses de séroneutralisation. Les résultats d'enquêtes sérologiques ont de plus montré que des isolats plus rapprochés de la souche prototype européenne auraient infecté près de 4% des élevages américains (Collins et al., 1992; Morrison et al., 1992a, 1992b)..

L'existence de souches du virus du SRRP apathogéniques et de souches de faible pathogénicité a aussi été suggérée (Ohlinger et al., 1992; Van Alstine et al., 1993a; Halbur et al., 1994b). L'observation de formes aiguës et chroniques du SRRP, ainsi que l'existence de différents degrés d'affection du dispositif muco-ciliaire de l'épithélium trachéo-bronchique, et la présence de différents types de pneumonies chez les animaux malades, sont des évidences de la présence de variants possédant différents niveaux de virulence (Goyal, 1993). En outre, certains isolats du virus du SRRP ne peuvent être propagés que dans l'un ou l'autre des deux systèmes cellulaires disponibles (les cultures primaires de PAM ou les lignées continues de rein de singe CL2621 et MARC-145), tandis que d'autres isolats s'adaptent facilement aux deux systèmes cellulaires (Bautista et al., 1993). Il a été aussi suggéré que le virus du SRRP est probablement similaire aux autres virus à ARN, capables de changer rapidement en présence des anticorps, ce qui leur permet de survivre dans le milieu environnant pendant une longue période (Carlton et al., 1993).

2.7. STRATÉGIE DE LA RÉPLICATION

La répllication du virus du SRRP est restreinte au niveau du cytoplasme des cellules infectées (Dea et al., 1992b; Plagemann et al., 1992b). Cette répllication du virus passe par la synthèse d'au moins 6 ARNms sous génomiques polyadénylés possédant une extrémité 3' commune et ayant une même séquence

de tête (leader) en 5' (Meulenberg et al., 1993b; Conzelmann et al., 1993; Meng et al., 1994). Les antigènes viraux sont détectés dans le cytoplasme des cellules infectées dès les premières 6 heures d'infection. Ensuite, les nucléocapsides bourgeonnent à travers les membranes du réticulum endoplasmique lisse (Pol et al., 1991a, 1991b, 1992). La maturation du virus a lieu au niveau des vésicules du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi; il n'y a pas de bourgeonnement à la surface des cellules infectées (Mardassi et al., 1994a; Plagemann et al., 1992b; Wensvoort et al., 1992b; Dea et al., 1992b, 1995). Les particules virales enveloppées sont libérées à partir des cellules infectées par exocytose moins de 9 heures après le début de l'infection. Le cycle de réplication du virus du SRRP est d'une durée de 9 à 12 heures, tandis que celui du LDV des souris et celui du VAE sont d'une durée de 12 et 18 heures, respectivement. (Plagemann et al., 1992b; Pol et al., 1992; Wensvoort et al., 1992b; Mardassi et al., 1994a; Dea et al., 1995).

Les cultures primaires de PAM ont été initialement le seul support cellulaire permettant la réplication du virus du SRRP (Wensvoort et al., 1991a; Yoon et al., 1992). Les cultures primaires dérivées d'autres organes ou tissus porcins se sont avérées non-permissives au virus (Wensvoort et al., 1992b). Récemment, deux lignées continues de cellules désignées MA-145 et CCL2621, ont été développées à partir de clones des cellules

MA104 dérivées du cortex rénal de singe cercopithèque (Collins et al., 1992; Kim et al., 1993). Dans les cultures de cellules permissives, la réplication du virus se manifeste par l'apparition d'un effet cytopathique distinct. Les premiers signes dégénératifs dans les cultures de PAM sont observés au microscope photonique moins de 24 heures après le début de l'infection virale; la lyse cellulaire est observée au bout de 48 à 72 heures selon les isolats (Dea et al., 1992b; Pol et al., 1991b, 1992; Mardassi et al., 1994a). Des changements au niveau de l'ultrastructure des cellules infectées peuvent être observées en microscopie électronique moins de 3 heures après le début de l'infection (Pol et al., 1991a, 1991b, 1992). Il y a une perte des projections de surface des cellules (phylopodie et pseudopodie) entraînant un collapsus total de la cellule infectée (Paton et al., 1991). La prolifération et la dégénérescence mitochondriales, observées dès 6 heures après l'infection, sont caractérisées par l'apparition de nombreuses petites vésicules ayant une double membrane. Les mitochondries perdent aussi leurs granules (Dea et al., 1992b; Pol et al., 1991b, 1992). La perte du réticulum endoplasmique rugueux et l'augmentation de la vacuolisation du réticulum endoplasmique lisse, indique que l'homéostasie cellulaire est perturbée (Pol et al., 1992).

2.8. TAXONOMIE

2.8.1. Critères de classification

Le virus du SRRP s'apparente aux virus du genre *Artérvirus* auquel appartiennent le VAE, le LDV et le virus de la fièvre hémorragique des singes (SHFV). Ce nouveau virus porcin partage plusieurs propriétés biologiques, morphologiques et biochimiques des virus de ce groupe (Benfield et al., 1992c; Wensvoort et al., 1992b; Plagemann et al., 1992b), et les analyses des séquences nucléotidiques ont montré qu'il en était de même pour l'organisation génomique et la stratégie de réplication (Cavanagh et al., 1994). Comme chez les autres *artérvirus*, des variations antigéniques et génomiques ont été observées entre les différentes souches du virus du SRRP, notamment entre les souches nord-américaines et les souches européennes (Wensvoort et al., 1992a; Nelson et al., 1993a, 1993b; Bautista et al., 1994; Mardassi et al., 1994b, 1995).

2.8.2. Caractéristiques des virus du genre *Artérvirus*

Le genre des *Artérvirus* est formé par le VAE, le LDV, le SHFV et le virus du SRRP. Ce sont des virus enveloppés, pléomorphes, mais de forme plutôt sphérique et d'un diamètre variant entre 40 nm et 60 nm. Ils possèdent une nucléocapside icosahédrique de 25 à 35 nm renfermant une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive (Westaway et al., 1985;

Plagemann, 1992b). Par leurs propriétés morphologiques, les *artérovirus* sont proches des virus de la famille *Togaviridae*, dans laquelle ils ont été classés provisoirement; toutefois, leur organisation génomique et leur mode de répllication s'apparentent plutôt à ceux des virus de la famille *Coronaviridae*. Il a été récemment proposé qu'un changement soit fait au niveau de la classification des *Artérovirus*, compte tenu de leurs différences morphologiques avec les *Coronavirus* et compte tenu des différences majeures dans la structure de leur génome et leur stratégie de répllication par rapport aux autres virus de la famille *Togaviridae* (Cavanagh et al., 1994). La longueur du génome des *Artérovirus* varie entre 13 et 15 Kb. Les deux tiers du génome, située dans la partie 5', comprend deux grands cadres de lecture, ORF 1a et ORF 1b. La traduction du produit de l'ORF1b s'accompagne d'un mécanisme ribosomal de changement de charpente (frame-shifting) (Den Boon et al., 1991). Il existe deux domaines dans le cadre de lecture 1a: un domaine appartenant à la superfamille des protéases apparentées à la chymotrypsine, et un domaine appartenant à la superfamille d'enzymes apparentées à la papaine (Lee et al., 1991; Snijder et al., 1991). Les domaines de la polymérase et de l'hélicase identifiées dans l'ORF 1b des *Artérovirus* sont similaires aux domaines respectifs des *Coronavirus* et des *Torovirus*, avec lesquels ils partagent une grande homologie de séquences en acides aminés par opposition aux domaines d'autres virus à ARN de polarité positive (Cavanagh et al., 1993; Godeny et al.,

1993). Chez les artérovirus, les gènes codant pour les glycoprotéines de surface sont organisés dans le génome comme chez les *Coronavirus* et les *Torovirus*. En général, la protéine M des *Artérovirus* contient trois domaines traversant la membrane lipidique (Cavanagh et al., 1993). Les deux protéines de surface des *Artérovirus* (G_L et G_S) n'ont pas une structure superenroulée et saillante hors de la membrane comme chez les *Coronavirus* et les *Torovirus* (Cavanagh et al., 1993).

Au cours du cycle de réplication des *Artérovirus*, il y a synthèse d'un réseau de 6 à 8 ARN messagers sous-génomiques polyadénylés en leurs extrémités 3' (Den Boon et al., 1991; De Vries et al., 1990; Kuo et al., 1992). Au niveau de leurs extrémités 5', les ARNs messagers possèdent en commun une séquence de tête (leader), dérivée de l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Ils ont aussi en commun l'extrémité 3' (Plagemann et al., 1992b; De Vries et al., 1990; Kuo et al., 1993). Le plus petit de ces ARNs messagers code pour la protéine de la nucléocapside de 12 à 14 kDa (Plagemann et al., 1992b; Den Boon et al., 1991). Deux autres protéines structurales sont synthétisées, soit la protéine de la matrice de 16 à 19 kDa, et une glycoprotéine d'enveloppe de 24 à 50 kDa selon son niveau de glycosylation (Plagemann et al., 1992b; Francki et al., 1992).

Les *artérovirus* partagent plusieurs propriétés biologiques. La première cellule-cible est le macrophage; la

réplication est cytoplasmique, rapide et cytolytique (Plagemann et al., 1992b). Ils mûrissent dans les vésicules du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi; ces virus ne bourgeonnent pas à la surface des cellules infectées (Dea et al., 1992b; Plagemann et al., 1992b; Wensvoort et al., 1992b; Mardassi et al., 1994a). Les *artérovirus* sont le plus souvent responsables d'infections subcliniques ou asymptomatiques caractérisées par une virémie persistante, de longue durée, en présence de hauts titres d'anticorps circulants, en majorité non-neutralisants (Plagemann et al., 1992a). Les variations génomiques et antigéniques sont fréquentes parmi les souches des *Artérovirus* provenant de différents pays (Plagemann et al., 1992a; Murphy et al., 1992).

3. PATHOGÉNÈSE

La pathogénèse du SRRP a été étudiée à travers les infections expérimentales réalisées chez des porcelets exempts d'agents pathogènes spécifiques (Martineau et al., 1992; Hoefling, 1990; Bilodeau et al., 1994; Christianson et al., 1992a, 1992b, 1993; Collins et al., 1992; Pol et al., 1992; Wensvoort et al., 1991) et chez des truies infectées vers la fin de leur gestation (de 77 à 95 jours de gestation) (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992a). Suite à une infection oronasale, le virus du SRRP se multiplie dans les cellules épithéliales des cavités nasales et alvéoles pulmonaires (Albina et al., 1992a). Le virus inoculé infecte par

prédilection les cellules de la lignée monocyte-macrophage, notamment les macrophages alvéolaires. Il produit alors les lésions caractéristiques de pneumonie interstitielle (Terpstra et al., 1991; Christianson et al., 1992; Dea et al, 1992b; Bilodeau et al, 1994). L'agent infectieux est isolé sur cultures de PAM à partir du plasma, du sérum et des leucocytes prélevés sur des animaux d'élevages infectés. Il a été démontré que le virus du SRRP se réplique aussi dans les monocytes périphériques (Voicu et al, 1994). En effet, dans une culture primaire de monocytes adhérents, il induit un effet cytopathique similaire à celui qui est observé dans les cultures de PAM (Voicu et al, 1994). Le virus du SRRP diffuse par voie hématogène dans tous les organes soit sous forme libre après virémie, soit sous forme liée aux leucocytes circulants. Il se propage dans plusieurs organes (thymus, rate, moëlle osseuse, ganglions lymphatiques, poumons, cerveau). Le virus peut traverser le placenta par un mécanisme encore non élucidé (Terpstra et al, 1991; Christianson et al., 1992a, 1992b) et infecter le fœtus dès le 14ième jour après exposition (Christianson et al., 1992a), ce qui peut entraîner des mortinatalités, des avortements, des mise-bas prématurées ou de la faiblesse néonatale. Le virus a été isolé à partir d'homogénats d'organes fœtaux (Collins et al., 1991; Wensvoort et al., 1991a, 1991b), à partir du sang et du liquide d'ascite des fœtus (Wensvoort et al., 1991a; Dea et al., 1992b). Toutefois, des lésions microscopiques n'ont été que très

rarement mises en évidence dans les tissus foetaux (Collins et al., 1991). La multiplication du virus à des niveaux très élevés peut, dans certains cas, causer des dommages à des organes vitaux, ce qui peut entraîner une maladie foetale en l'absence de lésions microscopiques (Benfield et al., 1992b). La présence d'antigènes viraux a aussi été mise en évidence à la surface des cellules de la zone marginale entourant les manchons périartériolaires de la rate (Wensvoort et al., 1991b; Albina et al., 1992a, 1992b). Le virus peut être isolé à partir du sang des porcs infectés, à partir du sperme des verrats, dans les sécrétions nasales et dans les tissus d'organes affectés, notamment les poumons (Christianson et al., 1993; Van Alstine et al., 1993a; Bilodeau et al., 1994; Hill et al., 1994; Mengeling et al., 1994, 1995).

Les porcelets et les truies infectés par voie intranasale subissent d'abord une période prodromale au cours de laquelle ils deviennent anorexiques et asthéniques; ils développent parfois une hyperthermie transitoire (39-40°C) qui dure 1 à 2 jours (Christianson et al., 1992b). Les signes cliniques apparaissent généralement au bout de 4-7 jours après l'exposition et persistent de 1 à 7 jours. Les animaux peuvent parfois développer un érythème cutané au niveau des oreilles, dépendamment de l'isolat qui a été utilisé pour l'infection. Le virus du SRRP entraîne souvent des infections subcliniques ou asymptomatiques caractérisées par une virémie persistante

(Goyal et al., 1993; Bilodeau et al., 1994; Albina et al., 1995.).

4. IMMUNITÉ

Le virus du SRRP semble altérer la réponse immunitaire chez les porcs infectés. Les animaux convalescents développent généralement un syndrome d'immunodéficience favorisant plusieurs infections virales ou bactériennes secondaires (Goyal, 1993; Albina et al., 1992a). La plupart des infections secondaires observées sont respiratoires, car les premiers éléments de défense cellulaire au niveau des voies aériennes, les PAM, sont la cible de l'infection par le virus du SRRP. Les études préliminaires de l'effet du virus sur la réponse immunitaire à long terme ne permettent pas pour l'instant de conclure sur son potentiel immunosuppresseur (Molitor et al., 1992). Les expériences effectuées *in vivo* et *in vitro* indiquent que le virus est lytique pour les macrophages alvéolaires (réduction du nombre de PAM chez les animaux infectés) et qu'il interfère avec leurs fonctions normales (diminution de la synthèse de superoxydes, diminution de l'activité phagocytaire) (Molitor et al., 1992). Toutefois, le virus ne semble pas interférer avec les réponses immunitaires cellulaire (augmentation du nombre de lymphocytes et neutrophiles) et humorale systémiques (Nelson et al., 1994; Mengeling et al., 1995). Au contraire, il y aurait augmentation de la réponse immunitaire systémique plutôt qu'une suppression telle

qu'observée au niveau du système respiratoire (Vezina et al., 1995, in press).

D'autre part, la présence d'anticorps dirigés contre le virus semble favoriser l'infection des PAM par ce même virus à travers un phénomène appelé ADE (Antibody Dependant Enhancement) ou pouvoir facilitateur des anticorps, comme l'indique les résultats de certains travaux préliminaires (Choi et al., 1992). Le titre infectieux du virus dans les cultures de PAM peut augmenter de 10 à 100 fois suite à une incubation en présence de sérum hyperimmun produit contre le virus (Choi et al., 1992). D'autre part, il semble que ce pouvoir facilitateur des anticorps envers le virus du SRRP puisse se produire *in vivo* (Yoon et al., 1994b). Ceci a été démontré dans une expérience où le titre viral moyen était significativement ($P < 0,05$) plus élevé pendant les cinq premiers jours après l'infection chez les porcelets ayant reçu simultanément des doses non-neutralisantes d'IgG spécifiques contre le virus par rapport aux titres viraux moyens chez les porcs témoins ayant reçu des doses d'IgG neutralisantes (Yoon et al., 1994b). D'autres études ont montré que la réplication du virus du SRRP était accélérée chez des foetus ayant reçu par voie parentérale, au milieu de la période de gestation, du virus ainsi que de l'antisérum homologue, par comparaison aux foetus n'ayant reçu que du virus (Christianson et al., 1992b). En fait, il est très probable que le phénomène ADE puisse avoir

lieu au cours du SRRP, car il a été observé au cours des infections provoquées par certains *artérovirus*, comme le LDV chez les souris (Plagemann et al., 1992a, 1992b). Au cours de ce phénomène, les anticorps couplés au virus se fixent aux récepteurs Fc des immunoglobulines situés à la surface des macrophages favorisant ainsi leur infection (Choi et al., 1992).

Les résultats obtenus d'autres études suggèrent qu'il n'existerait pas de protection croisée chez les animaux infectés par différentes souches du virus du SRRP (Nicolas, 1993). Ceci pourrait créer un véritable problème dans le développement d'un vaccin. Le mécanisme précis de la réponse immune n'est pas encore clairement connu. Les anticorps détectés sérologiquement ne sont apparemment pas protecteurs; certainement qu'ils ne neutralisent pas le virus présent dans les macrophages, d'où la virémie prolongée observée chez les animaux séropositifs (Ohlinger et al., 1992b; Paton et al., 1992; Bilodeau et al., 1994). Les anticorps (neutralisants et ceux détectés par immunofluorescence indirecte) semblent effectivement augmenter la réplication virale (Choi et al., 1992). Les anticorps détectés par l'épreuve d'immunoperoxydase indirecte se développent dès la fin de la première semaine de l'infection; leurs titres augmentent au cours des deux semaines suivantes et peuvent persister, dans certains cas, pendant plus d'un an après l'absence de signes cliniques (Anon., 1993).

Cliniquement, la plupart des porcs semblent être immunisés contre une réinfection après un épisode de SRRP. Cependant, un certain nombre de porcs dans les élevages échappent habituellement à la maladie, mais peuvent succomber à l'infection à une date ultérieure (Plana Duran et al., 1992a, 1992b). Il a été démontré dans une expérience préliminaire sur la réinfection de truies en gestation, que les animaux ne développent pas de réaction après la réinfection, mais les truies réinfectées après plus de 5 mois après la première infection peuvent de nouveau développer la maladie (Plana Duran et al., 1992a, 1992b). La possibilité des porcs convalescents de rester porteurs du virus n'a pas encore été clairement démontrée. Il semble qu'on ne puisse pas isoler le virus à partir des tissus de porcelets infectés depuis plus de trois mois. Pourtant, le virus du SRRP peut persister dans un élevage infecté pendant une période de plus de 6 mois après la cessation de signes évidents de la maladie (Bilodeau et al., 1994).

5. DIAGNOSTIC

5.1. GÉNÉRALITÉS

Depuis l'isolement de l'agent causal en 1991, le diagnostic du SRRP a connu une amélioration sensible. Auparavant, le diagnostic était essentiellement basé sur les données cliniques ou histopathologiques, et il était réalisé

par élimination progressive des autres causes connues entraînant des problèmes reproducteurs et respiratoires chez les porcs (Dea et al., 1990; Van Alstine, 1991; Benfield et al., 1992a). Le diagnostic était rendu difficile en raison de la grande variabilité des signes cliniques (Albina et al., 1992a, 1992b). Chaque pays avait établi ses propres critères de diagnostic. Aux États-Unis par exemple, une liste de 9 critères fut proposée pour poser le diagnostic de la maladie mystérieuse (SRRP) (Zimmerman, 1991). En Hollande, le diagnostic reposait initialement sur l'observation, pour une période maximale de 14 jours, de 2 des 3 critères reconnus en ce temps là (Cromwijk, 1991).

L'isolement du virus du SRRP a suscité le développement de tests sérologiques permettant d'effectuer un diagnostic plus rapide et plus fiable. Parmi les tests sérologiques ayant été développés, on peut citer les tests d'immunoperoxydase et d'immunofluorescence indirectes, de séroneutralisation et d'ELISA indirect. Le test d'immunoperoxydase utilisant des macrophages alvéolaires comme source d'antigènes est celui qui avait été développé initialement (Wensvoort et al., 1992b; Ohlinger et al., 1992b). Le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) est présentement reconnu comme l'épreuve sérologique officielle pour les besoins d'import-export (Dea et Martineau, 1994; Hill, 1994; Mengeling et al., 1994). Au début, l'épreuve d'IFI s'effectuait sur macrophages alvéolaires de porc (Yoon et

al., 1992). L'utilisation plus récente des cellules MARC-145 dans l'épreuve d'IFI a permis d'éliminer plusieurs cas de faux-positifs attribuables à la réactivité non spécifique de certains sérums contre les PAM, en plus d'éliminer les problèmes rencontrés dans la préparation des cultures cellulaires primaires (Dea et Martineau, 1994).

L'adaptation de plusieurs isolats du virus du SRRP sur des lignées cellulaires continues, en l'occurrence les lignées CCL 2621 et MARC-145 (Collins et al., 1992; Kim et al., 1993), a entraîné des progrès dans la détection de l'antigène viral, en facilitant la culture du virus et son isolement à partir des échantillons cliniques (Magar et al., 1993; Halbur et al., 1994a; Larochelle et al., 1994). Toutefois, il existe des souches du virus du SRRP qui ne peuvent se répliquer qu'exclusivement sur cultures primaires de PAM, tandis que d'autres isolats peuvent se répliquer de façon similaire sur lignées continues et sur PAM (Bautista et al., 1992; Kim et al., 1993). Ces différences dans l'adaptation des isolats sur les systèmes cellulaires utilisés sont probablement dues aux variations antigéniques et génomiques qui existent entre les différentes souches du SRRP (Mardassi et al., 1994a, 1994c, 1995; Nelson et al., 1993b; Meng et al., 1994; Bautista et al., 1994).

D'autre part, les méthodes de détection du génome viral par amplification enzymatique tendent à se développer, mais

elles ne sont pas encore utilisées en diagnostic de routine (Mardassi et al., 1994b, 1994c; Suarez et al., 1994; Van Woensel et al., 1994). Plusieurs échantillons cliniques peuvent être analysés simultanément, puisque les paramètres de la technique ont été adaptés pour divers tissus récoltés chez des porcs infectés (poumons, tissus foetaux, etc...), le sérum et le sperme (Mardassi et al., 1994c; Suarez et al., 1994; Van Woensel et al., 1994; Swenson et al., 1994a, 1994b). En plus de permettre la détection du génome viral dans les tissus infectés, il est possible à l'aide d'amorces spécifiques correspondant au gène ORF7 et à la région 3'non-codante de discriminer les souches européennes des souches nord-américaines du virus du SRRP (Mardassi et al., 1994c). C'est ainsi que des analyses effectuées à l'aide de la réaction de la transcriptase inverse suivie de la réaction de la polymérase en chaîne, ont permis de confirmer les différences génomiques qui existent entre différentes souches canadiennes et européennes au niveau de plusieurs cadres de lectures (Mardassi et al., 1994b, 1994c; 1995).

Sur le plan histopathologique, il y a généralement absence de lésions significatives chez les porcelets morts-nés ou momifiés; toutefois, la présence de lésions de pneumonie interstitielle ou de pneumonie proliférative et nécrosante chez les porcs présentant la forme respiratoire de la maladie, est suggestive d'une infection par le virus du SRRP (Bilodeau et

al., 1991; 1994; Dea et al., 1992b; Desrosiers et al., 1994; Larochelle et al., 1994). Des anticorps monoclonaux, dirigés contre la protéine de la nucléocapside et couplés à la fluorescéine, peuvent être utilisés pour la détection des souches américaines, canadiennes et européennes (Benfield et al., 1992b; Nelson et al., 1993a, 1993b). Néanmoins, les essais de mise en évidence des antigènes viraux par immunofluorescence sur coupes de tissus congelés n'ont pas donné jusqu'à présent des résultats satisfaisants (Hill, 1994; Dea et Martineau, 1994; Mengeling et al., 1994). D'autres techniques immunohistochimiques, tel que l'immunoperoxydase indirecte (Pol et al., 1991a; Halbur et al., 1994a) et l'immunomarquage à la protéine A couplée à l'or colloïdal suivi d'une amplification à l'argent (IGSS) (Magar et al., 1993) ont été rapportées plus sensibles. Dans le cas de la technique d'immunopéroxydase, la sensibilité peut être significativement augmentée suite à un couplage des immunoglobulines anti-virus à la biotine et l'utilisation d'un conjugué streptavidine-peroxydase (Halbur et al., 1994a). Quant à l'IGSS, cette technique s'est avérée efficace pour la détection des antigènes du virus SRRP dans des sections de tissus pulmonaires fixés au formol et enrobés à la paraffine, de même que dans des sections congelées de tissus pulmonaires ayant été conservés depuis plus de cinq ans (Magar et al., 1993; Larochelle et al., 1994).

5.2. PROBLÉMATIQUE ASSOCIÉE AU DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

La mise au point et le développement de tests adéquats pour le diagnostic virologique ont été jusqu'à présent retardés par les difficultés rencontrées pour la propagation *in vitro* du virus. Plusieurs difficultés sont associées à l'utilisation des PAM comme support cellulaire permettant la multiplication du virus (Wensvoort et al., 1991; Christianson et al., 1993; Goyal, 1993; Yoon et al., 1992; Bautista et al., 1993). La préparation des macrophages est un travail ardu et onéreux qui exige plusieurs contrôles rigoureux afin de maintenir une bonne spécificité (dépistage des faux-positifs). Il ne doit pas y avoir d'infection intercourante par des virus endogènes (cytomégalovirus, parvovirus, virus de l'influenza) et par des mycoplasmes, très répandus chez l'espèce porcine. De plus, des passages aveugles sont nécessaires afin de permettre l'adaptation du virus aux cellules provenant de différents porcs (variation dans la sensibilité intrinsèque), d'où les cinétiques d'infection sont à reprendre pour les différents lots de cellules (Wensvoort et al., 1991; Benfield et al., 1992c; Dea et al., 1992b; Dea et Martineau, 1994). L'état sanitaire des animaux donneurs est aussi un facteur critique (problèmes de contamination par des moisissures et des bactéries opportunistes). La possibilité d'isolement du virus sur cultures de monocytes est une alternative qui demeure encore à être confirmée (Voicu et al., 1994). Jusqu'à présent,

seules les lignées cellulaires continues CCL-2621 et MARC-145 ont été rapportées être permissives pour la culture du virus (Benfield et al., 1992c; Kim et al., 1993). Sur ces deux lignées cellulaires, le virus du SRRP induit un effet cytopathique non spécifique, d'où la nécessité de confirmer sérologiquement la présence d'antigènes du virus à l'aide d'anticorps spécifiques (Benfield et al., 1992c; Kim et al., 1993). Toutefois, ces deux lignées cellulaires s'avèrent souvent peu efficaces pour l'isolement du virus à partir du sérum, des homogénats de poumons ou des tissus lymphoïdes d'animaux malades (Bautista et al., 1993; Christianson et al., 1993; Kim et al., 1993).

Parmi d'autres problèmes à résoudre pour le diagnostic virologique, il faut citer l'existence de variations antigéniques et génomiques entre différentes souches du virus du SRRP (Mardassi et al., 1994b; 1995), puis les évidences cliniques et pathologiques de l'existence de souches de virulence variable (Goyal, 1993; Albina et al., 1992a, 1993). Des variations antigéniques et génomiques peuvent aussi survenir suite à la persistance du virus dans un élevage ou suite à la pression sélective des anticorps (Bilodeau et al., 1994; Dea et Martineau, 1994). Ces variations entraînent des difficultés techniques dans l'utilisation des méthodes d'amplification enzymatique pour la détection du génome du virus du SRRP en pratique courante, d'où la nécessité de

confirmer par des tests d'hybridation moléculaire avec des sondes spécifiques aux gènes-cibles adaptées (Mardassi et al., 1994c; Suarez et al., 1994; Woensel et al., 1994).

5.3. PROBLÉMATIQUE ASSOCIÉE AU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

Différentes techniques ont été décrites pour le dépistage des anticorps contre le virus du SRRP. Toutefois, il subsiste encore des difficultés associées à leur réalisation, tel que celles qui sont associées à l'utilisation des PAM pour la multiplication du virus (Dea et Martineau, 1994). Pour certains sérums, la présence d'une réactivité non-spécifique envers les cellules MAP peut entraîner des réactions faussement positives; ce problème a été rencontré dans l'application des tests d'immunopéroxydase, d'ELISA et d'IFI utilisés tant en Europe qu'aux États-Unis (Wensvoort et al., 1991; Albina et al., 1992b; Yoon et al., 1992; Bautista et al., 1993). Les anticorps sont détectés précocement par les techniques d'IFI et d'ELISA, et ces anticorps persistent plusieurs mois (Albina et al., 1992b, 1993; Yoon et al., 1992). Les anticorps révélés par les épreuves d'IFI et d'ELISA apparaissent de une à deux semaines après l'infection et persistent dans la plupart des cas de six mois à un an (Yoon et al., 1992; Albina et al., 1993; Christianson et al., 1993; Goyal, 1993; Nelson et al., 1994). Par contre, il ne semble pas exister de corrélation entre les titres en anticorps (obtenus par les techniques sérologiques utilisées actuellement) et la valeur protectrice de ces

derniers; en outre, les anticorps neutralisants ne sont détectés que tardivement et à des titres relativement faibles au cours de l'infection (Nelson et al., 1994; Mengeling et al., 1995).

Les études effectuées jusqu'à présent indiquent que la réponse immunitaire vis-à-vis du virus du SRRP n'engendre pas toujours son élimination totale, et que les anticorps spécifiques semblent faciliter l'infection des macrophages en venant s'attacher aux récepteurs Fc des immunoglobulines situées à leur surface (Christianson et al., 1992b; Goyal, 1993; Yoon et al., 1994). Par ailleurs, la forte mortalité foetale observée suite à un épisode classique de SRRP pose le problème de la valeur des anticorps maternels pour la protection naturelle des foetus (Christianson et al., 1992b; Van Alstine et al., 1993a; Hill et al., 1994).

Parmi les autres problèmes à résoudre pour les besoins du diagnostic sérologique, il faut considérer les variations antigéniques et génomiques pouvant survenir suite à la persistance du virus dans un élevage où s'exerce une forte pression sélective des anticorps (Mardassi et al., 1994b) ; il faut aussi déterminer la valeur protectrice des anticorps et leurs spécificités polypeptidiques (Dea et Martineau, 1994). En outre, il est aussi nécessaire d'augmenter la spécificité et la sensibilité des tests sérologiques utilisés présentement, afin d'améliorer la qualité et la fiabilité du diagnostic.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. MATÉRIEL

1.1. VIRUS

Deux souches québécoises de référence du virus du SRRP, soient les souches IAF-exp91 et IAF-Klop (Dea et al., 1992b; Mardassi et al., 1994a), ont été utilisées dans cette étude. Ces deux isolats québécois du virus du SRRP ont été obtenus d'une part, après inoculation intranasale à des truies gestantes, de broyats filtrés de poumons ne contenant aucune évidence de virus pathogènes connus et provenant d'animaux malades de fermes du Québec touchées par le SRRP, et d'autre part, après inoculation intranasale à des porcelets SPF (exempts de la maladie) de tissus pulmonaires de porcelets mort-nés à des porcelets SPF. Les animaux ainsi inoculés ont démontré des signes cliniques caractéristiques du SRRP et ont développé une séroconversion vis-à-vis des deux souches québécoises. Ces deux souches québécoises ont été initialement isolées sur cultures primaires de macrophages alvéolaires (Dea et al., 1992b; Mardassi et al., 1994a). Contrairement à la souche IAF-exp91, la souche IAF-Klop a pu être adaptée avec succès sur la lignée cellulaire continue MARC-145 (voir point 1.2.2.).

1.2. CULTURES CELLULAIRES

1.2.1. Macrophages alvéolaires

1.2.1.1. Prélèvement des macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires de porcs (PAM) étaient récoltés suite à des lavages broncho-alvéolaires faits à l'aide de PBS et réalisés après euthanasie de porcelets SPF de cinq à huit semaines d'âge (Wenswoort et al., 1992a). Pour ce faire, des porcelets SPF étaient obtenus de fermes du Québec et testés préalablement pour la présence d'anticorps envers les virus de la gastroentérite transmissible, le virus de l'encéphalo-myocardite, le parvovirus porcin, les mycoplasmes, l'*Actinobacillus pleuropneumonia* et *Streptococcus suis* (Dea et al., 1992).

Après confirmation de leur statut séronégatif, les porcelets étaient soumis à un jeûne de 12 heures avant l'intervention chirurgicale; on devait par la suite s'assurer que leur température rectale était inférieure à 40⁰ C. Le protocole d'anesthésie était divisé en trois étapes:

1- La pré-anesthésie: une dose de 6mg/kg d'Azapérone (Stresnil™, CDMV, St-Hyacinthe, Québec) à raison de 40mg/ml était administrée par la voie intramusculaire 20 minutes avant l'anesthésie.

2- L'anesthésie: une dose de 2mg/kg de Xylazine (Rompun™) à raison de 20mg/ml et une dose de 5mg/kg de Kétamine (Rogarsetic™, CDMV, St-Hyacinthe, Québec) à raison de 100mg/ml étaient administrées par la voie intraveineuse. Selon l'état de l'animal, jusqu'à 2 ou 3 ml de pentobarbital (Somnitol™, CDMV, St-Hyacinthe, Québec) pouvait aussi être administrée pour s'assurer d'une anesthésie profonde.

3- L'euthanasie était réalisée suite à l'administration de pentobarbital (Euthanyl™ forte, CDMV, St-Hyacinthe, Québec) par la voie intra-cardiaque.

Au cours de l'intervention chirurgicale, les poumons étaient prélevés, puis manipulés strictement sous la hotte laminaire. Les macrophages alvéolaires étaient collectés en suspension suite à une série de trois à cinq lavages broncho-alvéolaires à l'aide d'une solution de PBS stérile contenant 200 unités/ml de pénicilline (Gibco Lab), 200 µg/ml de streptomycine (Gibco Lab) et 50 mg/ml d'amphotéricine B (Gibco Lab). Les macrophages étaient recueillis après trois centrifugations de la suspension à la vitesse 100 x g (centrifugeuse DPR 6000; IEC Needham Hts, MA, E.U.), pendant 10 minutes à la température de la pièce. Le culot était resuspendu dans du PBS contenant de la pénicilline, de la streptomycine et de l'amphotéricine B; la suspension finale était ajustée à une concentration de 10⁶ cellules/ml.

1.2.1.2. Culture des macrophages alvéolaires (MAP)

Les MAP étaient mis en culture à une densité initiale de 10^6 cellules/ml dans un mélange (1:1) des milieux HANKS 199 (base de sels de Hank's, Grand Island Biological Co., Gibco, N.Y., E.U.) et Essentiel Minimal de Eagle (EMEM) (base de sels de Earle, GIBCO Lab, Grand Island, NY, E.U.). Le milieu de culture était supplémenté de 2 mM de glutamine (GIBCO Lab), 100 unités/ml (U/ml) de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 8% de sérum foetal bovin (SFB, GIBCO Lab). Le sérum était préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et irradié sous rayonnement Gamma afin d'éviter l'interférence potentielle par des virus bovins endogènes. Les cellules étaient mises en culture dans des plateaux de 24 puits de 16 mm de diamètre (Baxter Corporation, Pointe-Claire, Québec) à raison de 1,5 ml par puits. Les plateaux étaient incubées à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ pour une période maximum de 7 jours.

1.2.2. La lignée cellulaire MARC-145

La lignée cellulaire MARC-145 est une lignée continue hautement permissive au virus du SRRP et dérivée de cellules épithéliales de reins de singes (Kim et al., 1993) nous ayant été gracieusement fournie par le Dr J. Kwang (Meat Animal Research Center, Nebraska, E.U). Les cellules MARC-145 étaient mises en culture à une concentration initiale de 2×10^5

cellules/ml dans le mélange de Hank 199 et EMEM. Le milieu nutritif était supplémenté de 2mM de glutamine, de 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 8% de sérum foetal bovin préalablement traité comme au point 1.2.1.2. Les cultures étaient incubées à 37°C jusqu'à l'obtention d'un feuillet confluent sous une atmosphère comprenant 5% de CO₂. Les passages cellulaires étaient généralement réalisés hebdomadairement. Lors des passages, la solution de trypsine à 0,05% dans du PBS dépourvu de calcium et de magnésium (PBS à pH 7,2), était utilisée pour disperser les cellules.

1.3. ANTISÉRUMS

1.3.1. Production d'un sérum hyperimmun de porc

Un antisérum polyvalent de référence a été produit expérimentalement chez des porcs contre la souche IAF-Klop du virus du SRRP, purifiée tel que mentionné au point 2.4. Des porcelets SPF de cinq semaines d'âge ont reçu par voie intranasale une dose de 10⁵ TCID₅₀ de la souche IAF-Klop. Quatre doses de rappel ont été données à des intervalles de deux semaines et des échantillons sériques ont été prélevés hebdomadairement. Les animaux ont été euthanasiés après 15 semaines (105 jours). Par la technique d'immunofluorescence indirecte, des titres en anticorps de 2560 à 5120 ont été déterminés contre la souche virale homologue. Par ailleurs,

les titres en anticorps neutralisants variaient entre 32 et 64.

1.3.2. Production d'un sérum hyperimmun de lapin

Les fractions des gradients de densité de CsCl contenant les particules virales ont aussi été utilisées pour produire un antisérum chez des lapins contre la souche IAF-Klop du virus du SRRP. Les lapins ont reçu à chaque inoculation de 250 à 500 µg de protéines virales. Lors de la première inoculation, une suspension contenant une quantité égale du virus et d'adjuvant complet de Freund fut donnée à la fois par la voie intrapéritonéale (1ml) et par la voie intradermique (10 sites à raison de 50 µl/site). Aux jours 14 et 21, des doses de rappel consistant en un mélange égal de virus et d'adjuvant incomplet de Freund ont été administrées par les voies intrapéritonéale et intramusculaire, selon la procédure décrite dans la littérature (Dea et al., 1992b). Des échantillons sériques ont été prélevés par ponction cardiaque avant immunisation et à toutes les deux semaines. Les lapins ont été euthanasiés au jour 64.

1.3.3. Anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux désignés SDOW17, EP147 et VO17 et dirigés contre la protéine N de la nucléocapside de la souche de référence américaine ATCC-VR2332 du virus du SRRP, ont été utilisés pour l'identification sérologique des souches

Québécoises de référence IAF-Klop et IAF-exp91. Ces anticorps monoclonaux nous ont été gracieusement fournis par les Drs D.A. Benfield et E. Nelson (South Dakota State University, E.U.).

1.3.4. Échantillons sériques des infections expérimentales

Au cours des différentes infections expérimentales réalisées tel que décrit au point 3.1., des échantillons sériques ont été prélevés hebdomadairement tant chez les porcelets infectés que chez ceux des groupes témoins. Le sang était obtenu par ponction de la veine cave craniale. Ces sérums ont été utilisés pour le suivi de la réponse immune humorale contre le virus du SRRP.

2. PROPAGATION DES ISOLATS

2.1. CLONAGE PAR LA TECHNIQUE DES PLAGES

La souche IAF-Klop du virus du SRRP a été sous clonée par la technique des plages sur feuillets cellulaires MARC-145 préparés dans des plateaux de 6 puits de 35 mm de diamètre (Corning, New York, E.U.). Pour permettre une meilleure adhérence des cellules, un volume d'environ 1ml de SFB (Gibco Lab) était d'abord déposé dans chaque puits et les plateaux étaient gardés à 4° C pour une nuit. Le lendemain, le sérum était vidangé et les cellules étaientensemencées, à raison de 5ml par puits d'une suspension contenant 2×10^5 cellules/ml

de milieu de culture. Les plateaux étaient ensuite incubés à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ jusqu'à l'obtention d'un feuillet confluent. Le milieu de culture était par la suite vidangé et on procédait au rinçage du feuillet cellulaire à trois reprises avec du PBS, pH 7,2.

Les feuillets cellulaires étaient inoculés à raison de 0,5 ml/puits de la suspension virale diluée de 10 à 100 fois dans le milieu Hanks 199 et EMEM contenant 0,1% d'albumine sérique bovine (Sigma). Les plateaux étaient alors incubés sous une légère agitation pour 90 minutes à la température ambiante afin de permettre l'adsorption du virus. L'inoculum viral était par la suite vidangé et les feuillets cellulaires étaient recouverts de 5ml/puits du milieu de culture EMEM supplémenté de 25 µg/ml de DEAE-Dextran (Pharmacia; Uppsala, Suède), 25mg/ml de gentamycine (Gibco Lab), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 1% d'Agar Noble (Difco). Après gélification, les plateaux étaient incubés en position inversée dans l'étuve à 37° C sous une atmosphère humide et contenant 5% de CO₂. Après 48 heures d'incubation, on ajoutait à chaque puit 3ml du milieu gélifié supplémenté de 0,06% de rouge neutre. Les plateaux étaient réincubés à 37°C pour une période de 24 à 72 heures dépendamment de l'apparition de plages visibles à l'oeil nu. Les feuillets cellulaires étaient ensuite fixés par l'addition de formaldéhyde à 5% pour 15 minutes à la température de la

pièce, puis rincés brièvement à l'eau bidistillée. Le milieu gélifié était enlevé à l'aide d'un scalpel en prenant soin de ne pas endommager le feuillet cellulaire. Finalement, les feuillets étaient colorés à l'aide d'une solution de crystal violet à 1% (bleu de Gentian) préparée avec de l'eau bidistillée. Après 5 minutes, les feuillets étaient rincés à l'eau pour éliminer l'excès de colorant et séchés à l'air.

2.2. MISE EN ÉVIDENCE DE L'EFFET CYTOPATHIQUE ET TITRAGE

2.2.1. L'effet cytopathique sur cellules MARC-145

La souche virale IAF-Klop a été utilisée pour infecter des feuillets confluents de cellules MARC-145 préparés dans des plateaux de 96 puits comme décrit au point 1.2.2. Le surnageant était vidangé et les cellules étaient lavées à deux reprises avec du PBS. L'excédent de milieu de lavage était enlevé à l'aide d'une pipette, puis les feuillets étaient infectés avec la dilution appropriée de la suspension virale. Après une période d'absorption de 2 heures à la température ambiante, on ajoutait le milieu nutritif (EMEM et Hanks 199) sans sérum dans chaque puits et les plateaux étaient incubés dans l'étuve à 37° C en présence de 5% de CO₂. Les feuillets étaient examinés quotidiennement pour une période maximale de 5 jours pour suivre l'évolution de l'effet cytopathique du virus.

2.2.2. Titrage du virus

Pour la détermination des titres infectieux, des dilutions décimales des surnageants de cultures infectées étaient préalablement réalisées dans le milieu de culture (Hanks 199 et EMEM) exempt de sérum foetal bovin et supplémenté de 2mM de glutamine, 50 µg/ml de gentamycine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Des aliquots de 100 µl de chaque dilution étaient déposés dans 4 à 8 puits de plateaux de microtitrage à 96 puits. Ensuite, une suspension cellulaire préalablement ajustée à 2×10^5 cellules/ml était ajoutée à raison de 100 µl /puits. Les plateaux étaient subséquemment incubés dans l'étuve à 37° C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ pour une durée de 4 à 5 jours afin de permettre l'apparition de l'effet cytopathique. Certains puits étaient réservés pour des feuillets cellulaires non infectés afin de servir de contrôles négatifs.

Le titre de la suspension virale était estimé selon la réciproque de la plus haute dilution de la suspension virale induisant un effet cytopathique dans au moins 50% des feuillets cellulaires inoculés (DCEP₅₀ / ml). La méthode de Reed et Muench (1938) fut utilisée pour la détermination du titre infectieux.

2.3. IDENTIFICATION SÉROLOGIQUE

2.3.1. Préparation des plateaux pour l'immunofluorescence indirecte

Avant de réaliser les épreuves d'IFI, les cellules (MARC-145 pour la souche IAF-Klop ou les macrophages alvéolaires pour la souche IAF-exp91) étaient mises en culture à une concentration initiale de 2×10^5 cellules/ml dans des plateaux à 96 puits, à raison de 150 μ l de la suspension cellulaire par puits. On rajoutait simultanément 50 μ l du virus dilué dans du milieu nutritif sans sérum foetal de bovin. Les plateaux étaient incubés dans une étuve à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant environ 30 à 40 heures.

Dès que l'effet cytopathique était observable, les surnageants étaient vidangés à l'aide d'une micropipette à 12 canaux. Un volume de 50 μ l d'une solution à 80% d'acétone froid (-20°C) dans du PBS était ajouté aux cupules. Après une période de fixation de 30 minutes à 4° C, la solution d'acétone était décantée et les plateaux étaient séchés pour un minimum de 5 minutes sous la hotte.

2.3.2. Épreuve d'immunofluorescence indirecte

Les cellules fixées à l'acétone étaient au préalable réhydratées avec 150 μ l de PBS pendant quelques minutes à la

température de la pièce. L'excès de PBS était par la suite décanté.

Pour l'identification sérologique des isolats, un volume de 50 µl d'anticorps monoclonaux anti-SRRP (dilués 1:200 dans du PBS) était ajouté dans une cupule de cellules témoins et dans une cupule de cellules infectées. Un sérum négatif en anticorps contre le virus du SRRP était aussi utilisé. Les plateaux étaient incubés 30 minutes à 37°C, puis 6 lavages au PBS étaient effectués. Par la suite, on rajoutait 50 µl de la dilution 1:60 dans du PBS de gammaglobulines de chèvre anti-IgG de souris couplées à l'isothiocyanate de fluorescéine (ICN, Pharmaceutical Canada Ltd, Montréal, Québec). La dilution du conjugué était préalablement centrifugée pendant 10 minutes à 10,000 x g afin d'éliminer les agrégats. Les plateaux étaient de nouveau incubés pendant 30 minutes à 37°C en atmosphère humide. Après quatre lavages au PBS et deux lavages à l'eau bidistillée pour éliminer les sels, une goutte de glycérol dilué 3:1 dans du PBS était ajoutée dans chaque puits pour faciliter la lecture au microscope à rayonnement ultra-violet (Laborlux K, Leitz, Allemagne).

Pour le dépistage des anticorps dans les sérums des animaux, des dilutions décimales des sérums étaient d'abord réalisées dans du tampon PBS, puis 50 µl de chacune des dilutions étaient rajoutés aux cupules contenant les feuillets cellulaires infectés et préalablement fixés à l'acétone. Le

dépistage des anticorps était effectué tel que décrit ci-dessus, utilisant une dilution 1:40 dans du PBS à pH 7,0 d'une préparation de gammaglobulines de lapin anti-IgG de porc conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (Boehringer Mannheim, Laval, Qc, Canada).

Une lecture positive se traduisait par la présence de cellules fluorescentes (cytoplasmes) souvent distribuées en foyers dans les cupules de cellules infectées, mais non dans les cupules de cellules MARC-145 témoins.

3. PURIFICATION DU VIRUS

3.1. CONCENTRATION

Les surnageants des cultures cellulaires infectées par le virus du SRRP étaient soumis à trois cycles de congélation et décongélation, puis clarifiés à deux reprises par centrifugation à 8,000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Les surnageants étaient ensuite récupérés et les particules virales extracellulaires étaient concentrées par ultracentrifugation différentielle contre un coussin de 30% de saccharose pendant 3 heures à 100,000 x g à 4°C (centrifugeuse L5-65, rotor T35, Beckman, San Diego, Ca, E.U.). Les virions se retrouvaient dans le culot, alors que les débris cellulaires étaient pour la plupart retenus par le coussin de saccharose.

3.2. ULTRACENTRIFUGATION ISOPYCNIQUE SUR GRADIENT DE DENSITÉ

La pureté de la préparation virale était augmentée en réalisant une ultracentrifugation isopycnique sur gradient de densité de chlorure de césium (1,20-1,30 g/ml) à 100,000 x g pendant 16 heures à 4° C (centrifugeuse L5-65, rotor SW27). À l'aide d'une pipette, on prélevait les bandes virales puis on les diluait dans quelques gouttes du tampon TNE (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM), à pH égal à 7,4, afin d'en abaisser la teneur en chlorure de césium.

La récupération des virions ainsi purifiés était réalisée par une ultracentrifugation supplémentaire à 100,000 x g pendant 3 heures à 4° C. Le culot obtenu était alors resuspendu dans le tampon TNE et la suspension virale concentrée était aliquotée dans des tubes Eppendorf à raison de 200 à 300 µl, puis congelée à -70° C.

3.3. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À COLORATION NÉGATIVE

Pour l'examen au microscope électronique, des gouttes de la suspension virale purifiée étaient déposées sur un morceau de parafilm. Des grilles de cuivre de 300 mesh, recouvertes d'une double membrane de formvar et de carbone étaient déposées pour deux minutes sur ces gouttes de la suspension virale. Dans certain cas, les virions extracellulaires

présents dans 200 ml de surnageant de cultures cellulaires infectées étaient au préalable concentrés par ultracentrifugation à 120,000 X g (30 psi) pendant 10 minutes directement sur une grille de nickel nue à l'aide d'un appareil airfuge (Beckman, Palo Alto, Californie, USA). Par la suite, dans les deux cas, le surplus de liquide était absorbé à l'aide d'un papier filtre de type Whatman#1 (Fischer Scientific, CO LTD). Après rinçage à l'eau, la coloration négative des préparations était réalisée en déposant les grilles pour 30 secondes sur une goutte d'acide phosphotungstique (PTA) à 3% ajustée au pH de 7,0. L'excès de PTA était aspiré à l'aide d'un papier buvard, et les grilles étaient séchées à l'air. Les grilles étaient par la suite examinées au microscope électronique EM300 de Philips (Edinburgh, Suède) sous une tension de 80 kV.

3.4. IMMUNOMARQUAGE À LA PROTÉINE A-OR COLLOÏDAL

Pour réaliser l'épreuve d'immunomarquage à l'or colloïdal, des grilles de nickel nues étaient d'abord déposées pour deux à cinq minutes sur une goutte de suspension virale, comme décrit précédemment au point 2.4. Le surplus de liquide était par la suite délicatement absorbé à l'aide d'un papier filtre. Chaque grille était ensuite déposée brièvement sur la solution de blocage consistant en une solution de 1% d'ovalbumine. Par la suite, la grille était déposée sur une goutte de la dilution appropriée de l'antisérum anti-SRRP

pendant au moins 30 minutes à la température de la pièce. Les grilles étaient ensuite rincées par passages successifs sur 5 gouttes de tampon TBS (Tris 5mM, 150 mM NaCl, à pH 8,0). Après une incubation subséquente de 5 minutes en présence de la préparation d'ovalbumine, les grilles étaient réincubées à la température de la pièce sur une goutte d'une suspension de protéine A couplée à l'or colloïdal (diamètre de 5 nm) (Biocell Research, Cedarlane, Ontario, Canada) et diluée à 1/60 dans le cas où des sérums porcins avaient été utilisés dans la première incubation; si les grilles avaient été incubées avec un anticorps monoclonal ou un sérum anti-lapin, alors les grilles étaient incubées respectivement avec une préparation d'immunoglobulines anti-IgG de souris ou de lapin couplées à l'or colloïdal (Biocell Research, Cedarlane, Ontario, Canada) diluée 1/60. Par la suite, les grilles étaient rincées par passages successifs sur des gouttes de tampon TBS pendant 5 minutes, puis sur deux à trois gouttes d'eau bidistillée, avant d'être déposées pour 2 minutes sur une goutte d'acide phosphotungstique (PTA 3%, pH 7,0). Après 30 secondes de contact, l'excès de PTA était absorbé à l'aide d'un papier filtre. Finalement, les grilles étaient séchées à l'air, puis examinées au microscope électronique à transmission sous une tension de 80 kV.

4. PROTÉINES RECOMBINANTES DU VIRUS DU SRRP

Les protéines recombinantes MBP-ORF7, MBP-ORF5 et MBP-ORF4 du virus du SRRP nous ont été gracieusement fournies par le Dr S. Mounir (Centre de Recherche en Virologie, IAF) et la protéine GST-ORF6 par le Dr H. Mardassi (Centre de Recherche en Virologie, IAF).

L'ARN génomique de la souche IAF-exp 91 du virus du SRRP a été extrait à partir de la préparation de virus purifié, selon la méthode décrite par Chomczynsky et Sacchi (1987) utilisant une solution d'isothiocyanate de guanidine 4M et d'acide phénolique. Les séquences correspondant aux cadres de lecture ORFs 4, 5, 6 et 7 ont été amplifiées par RT-PCR, en utilisant huit amorces oligonucléotidiques spécifiques aux séquences de la souche IAF-exp 91 de référence québécoise du virus du SRRP (EMBL/Gene Bank, numéro d'accès L40898). Deux sites de restriction *EcoRI* (amorces sens) et *BamHI* (amorces antisens) ont été ajoutés au niveau des extrémités 5' des amorces pour favoriser le clonage directionnel des gènes amplifiés. Les séquences et les positions des oligonucléotides ayant servi pour l'amplification des ORFs 4 à 7, respectivement, sont les suivantes:

SRRP4S: 5'GAATTCGAATTCATGGCTGCGTCCCTTCTT3' (663-680) et
EcoRI

SRRP4R: 5'GGATCCGGATCCTCAAATTGCCAACAGAATGG3' (1196-1179);
BamHI

SRRP5S: 5'GAATTCGAATTCATGTTGGGGAAATGCTTGACC3' (1210-1230) et

SRRP5R: 5'GGATCCGGATCCGGCAAAAGTCATCTAGGG3' (1807-1824);

SRRP6S: 5'GAATTCGAATTCAGTTTCAGCGGAACAATGG3' (1782-1800) et

SRRP6R: 5'GGATCCGGATCCCAGCTGATTGACTGGCTGGC3' (2357-2376);

SRRP7S: 5'GAATTCGAATTCCTAAATATGCCAAATAACAAC3' (2307-2327) et

SRRP7R: 5'GAATTCGAATTCTAGGTGACTTAGAGGCACA3' (2754-2772).

Les produits d'amplification de la réaction RT-PCR ont été clonés dans les vecteurs pMAL-c2™ ou pGEX-4T, en aval du promoteur "tac" selon la procédure standard (Sambrook et al, 1989). Les vecteurs recombinants ont été utilisés pour transformer les cellules bactériennes *Escherichia coli* (lignée BL21 ou TB1) compétentes (Pharmacia). L'expression des protéines a été induite en ajoutant subséquemment 1 mM d'IPTG (Boehringer Mannheim, Laval, QC) dans le milieu de culture. Les lysats bactériens ont été clarifiés et les protéines recombinantes exprimées ont été préalablement purifiées par chromatographie d'affinité à travers une colonne de résine d'amylose (New England Biolabs) ou de glutathion sépharose 4B (Pharmacia), ensuite analysées par SDS-PAGE puis identifiées sérologiquement en immunobuvardage, utilisant un sérum

hyperimmun porcin anti-SRRP. Les poids moléculaires des différentes protéines de fusion obtenues, la "maltose binding protein" (MBP)-ORF4, la MBP-ORF5, la MBP-ORF7 et la "glutathion-sulfotransférase" (GST)-ORF6, ont été respectivement 62 kDa, 65 kDa, 56 kDa, et 45 kDa.

5.MÉTHODOLOGIE

5.1. INFECTIONS EXPÉRIMENTALES

5.1.1. Exposition naturelle au virus du SRRP: Cohorte sentinelle.

L'infection cohorte sentinelle a consisté en l'introduction de cinq porcelets exempts de la maladie (SPF) de cinq semaines d'âge dans un élevage porcin du Québec ayant des évidences sérologiques et cliniques de l'infection par le virus du SRRP. Les porcelets ainsi exposés au SRRP ont subi une contamination dans des conditions naturelles et ont développé des signes cliniques du SRRP.

Les animaux furent observés quotidiennement pour l'apparition de fièvre, d'asthénie, d'anorexie, de conjonctivite, de cyanose des extrémités, de dyspnée, et cette période d'observation s'est prolongée jusqu'à 42 jours après le début de l'exposition. Des échantillons sériques ont été prélevés régulièrement à toutes les semaines pour les fins d'analyses sérologiques et virologiques.

Parallèlement aux porcelets exposés au SRRP, deux porcelets SPF de cinq semaines d'âge avaient été introduits dans un élevage cliniquement et sérologiquement exempt du SRRP et ont servi de groupe témoin. Ces porcelets témoins n'ont pas développé de symptômes de la maladie.

5.1.2. INOCULATIONS EXPERIMENTALES

5.1.2.1. Soins aux animaux

Des porcelets SPF de cinq semaines d'âge ont été utilisés lors des essais de reproduction expérimentale du SRRP. Un examen clinique fut effectué lors de leur arrivée dans les locaux de l'animalerie de l'Institut Armand-Frappier. Les animaux furent logés dans des cages en acier inoxydable et gardés dans des pièces préalablement désinfectées. Aucun autre animal ne pouvait être gardé dans cette pièce et, afin de protéger ces porcelets et les autres animaux de l'animalerie, l'accès fut limité au personnel directement lié au projet.

Une moulée de début ou de post-sevrage d'origine commerciale, l'eau de boisson ainsi que la litière étaient fournies en quantité suffisante pour la durée de chaque expérience. Le surplus était systématiquement détruit à la fin de chaque expérience. La litière était changée tous les deux jours et la litière souillée était incinérée dans les plus brefs délais, afin d'éviter toute possibilité de

contamination. La température de la pièce était maintenue entre 22 et 25°C et l'humidité à environ 50%.

5.1.2.2. Infection avec une dose unique intranasale

Cette infection a consisté en l'instillation nasale à trois porcelets SPF de cinq semaines d'âge d'une dose unique de 10^5 TCID₅₀/ml de la souche IAF-exp91. Au cours de la période d'observation qui a duré 9 semaines, des échantillons sériques ont été prélevés à toutes les semaines.

Parallèlement aux porcelets infectés, trois porcelets SPF inoculés avec du milieu de culture normal, ont été suivis comme animaux témoins et sont demeurés cliniquement sains pour toute la durée de la période d'observation.

5.1.2.3. Surinfection

Cette expérience a consisté en l'administration, à deux porcelets SPF de cinq semaines d'âge, d'une dose initiale de 10^5 TCID₅₀ de la souche IAF-exp91 par voie intranasale, suivie d'une dose de rappel au jour 35 de l'infection. Un porcelet témoin avait été suivi en parallèle.

5.1.2.4. Hyperimmunisation.

Après un septième passage du virus IAF-Klop sur cultures primaires de macrophages alvéolaires, un volume de 2 ml de la suspension virale (titre $10^{4,0}$ /ml) a été administré à deux

porcelets SPF de cinq semaines d'âge par voie intranasale à toutes les deux semaines. Aux jours 28 et 42, les porcelets ont reçu respectivement l'adjuvant complet puis l'adjuvant incomplet de Freund par voie intramusculaire, en plus de la dose intranasale virale. Des prises de sang ont été effectuées à toutes les semaines et la période d'observation a duré 9 semaines. Parallèlement aux porcelets infectés, un porcelet SPF de cinq semaines d'âge avait été suivi à titre de témoin négatif.

5.1.2.5. Infection mixte avec le virus influenza porcin

Quatre porcelets SPF de quatre semaines d'âge ont été infectés par voie intranasale avec une dose de 10^5 DECP₅₀/ml de la souche IAF-Klop du virus du SRRP propagé sur la lignée MARC-145. Au septième jour, ces porcelets ont été co-infectés par voie intranasale avec 3 ml de la souche influenza porcin A/SW/IAF.5393/QC91(H1N1) propagée dans des oeufs embryonnés de poule SPAFAS et dont le titre avait été préalablement ajusté à 512 unités HA/ml de liquide allantoïque. Des échantillons sériques ont été prélevés hebdomadairement et la période d'observation a duré sept semaines. Parallèlement, quatre porcelets SPF de quatre semaines d'âge, ayant été inoculés avec du liquide allantoïque d'oeuf normal, ont servi de groupe témoin.

5.2. TESTS SÉROLOGIQUES

5.2.1. Immunofluorescence indirecte

Des cultures de cellules MARC-145, infectées par la souche IAF-Klop dans des plateaux de 96 puits puis fixées à l'acétone, étaient préalablement préparées tel qu'indiqué au point 2.3.1. L'épreuve d'IFI, pour le dépistage des anticorps contre le virus du SRRP, était réalisée tel qu'indiqué au point 2.3.2.

Plusieurs dilutions en base 2 (dilution de départ 1:8) des sérums obtenus au cours des diverses infections expérimentales ont été préparées dans du PBS. Pour la détection d'anticorps de type IgM, une préparation d'immunoglobulines de lapin anti-IgM porcin couplées à l'isothiocyanate de fluorescéine (Kirkegaard & Perry Lab Inc, Gaithersburg, Maryland, E.U.) était utilisée. Pour la recherche des anticorps de type IgG, une préparation d'immunoglobulines de lapin anti-IgG porcin couplées à la fluorescéine (Sigma Immunochemicals, St-Louis, Mo, E.U.) était utilisée. Le titre en anticorps contre le virus du SRRP était estimé selon la réciproque de la plus haute dilution sérique permettant la détection de foyers fluorescents dans les cultures de cellules MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop du virus du SRRP.

5.2.2. Neutralisation de l'effet cytopathique

Le dosage en anticorps neutralisants des différents sérums récoltés au cours des infections expérimentales a été

réalisé selon une procédure standard (Bilodeau et al., 1994). Les sérums à analyser étaient préalablement dilués dans du milieu nutritif sans sérum et déposés en duplicata dans un plateau de 96 puits à raison de 100 μ l par puits. Un volume de 50 μ l de la préparation virale (souche IAF-Klop), préajustée à une dose de 200 DECP₅₀/0,1 ml, était ajouté à chaque échantillon sérique. Les mélanges de dilutions sériques et de virus étaient ensuite incubés pendant une heure à 37° C. Une quantité de 100 μ l/par puits d'une suspension de cellules MARC-145 ajustée à 150000 cellules/ml dans du milieu nutritif supplémenté de 10% de sérum foetal bovin, était ajoutée à chacun des puits. Par la suite, les plateaux étaient incubés à l'étuve à 37° C, dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Après quatre à six jours d'incubation, la neutralisation était évaluée par l'absence d'effet cytopathique dans les cultures cellulaires. Le titre neutralisant des sérums à tester était exprimé selon la réciproque de la plus haute dilution sérique inhibant l'effet cytopathique induit dans les feuilletts de cellules MARC-145 par une dose constante de 100 DECP₅₀ du virus IAF-Klop. L'exactitude de la dose virale était vérifiée en parallèle par un titrage à rebours.

5.2.3. Immunobuvardage

5.2.3.1. Séparation des protéines virales par SDS-PAGE

L'épreuve d'immunobuvardage a été réalisée selon la procédure décrite par Mardassi et al. (1994). Les protéines virales extraites à partir des préparations virales concentrées étaient au préalable séparées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de 1% de SDS (SDS-PAGE), selon la méthode à pH discontinu décrite par Laemmli (1970). Les gels de séparation avaient une concentration de 12% d'acrylamide et étaient coulés entre deux plaques de verre, à une épaisseur de 0,75 mm et d'une hauteur d'environ 6 cm (appareil Mini-protean II, Bio-Rad Labs, Mississauga, Ont). Des gels de regroupement de 0,5 cm de hauteur et contenant 3,5% d'acrylamide ont été utilisés.

Les échantillons à analyser étaient dénaturés dans un tampon Tris 62,5 mM, à pH 6,8, contenant 10% de glycérol, 2% de SDS, 5% de β -mercaptoéthanol et 0,0025% de bleu de bromophénol. Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons étaient chauffés de 3 à 5 minutes à 100°C. L'électrophorèse était conduite à 60 volts pendant 30 minutes puis à 100 volts durant une heure.

5.2.3.2. Coloration au bleu de Coomassie

Après l'électrophorèse, les gels de polyacrylamide étaient immergés pour une heure dans une solution contenant 10% d'acide acétique glacial, 50% de méthanol et 0,05% de bleu de Coomassie R-250 (Sigma, St-Louis, MO, E.U.). Par la suite, les gels étaient décolorés dans une solution de 30% de méthanol et de 7% d'acide acétique. La taille des protéines sur le gel a été estimée par comparaison de leur distance de migration avec celle de protéines standards de poids moléculaire connu (Rainbow™ Marker, Amersham; SDS-PAGE Standards, Bio-Rad Labs).

5.2.3.3. Transfert électrophorétique

Les protéines du gel étaient par la suite transférées électrophorétiquement sur membrane de nitrocellulose ayant une porosité de 45 µm (NC™, Schleicher & Schuell, Keene, NH, E.U.). Le tampon de transfert consistait en une solution de 25 mM de Tris HCl, 192 mM de glycine, ajustée à pH égal 8,3 , et additionnée de 20% de méthanol. L'appareil de transfert Trans Blot Cell (Bio-rad Labs) a été utilisé et l'électrophorèse a été effectuée sous une tension constante de 60 volts pendant 2 heures à 4° C. Les membranes de nitrocellulose étaient déposées dans le tampon de blocage consistant en une solution de Blotto (lait en poudre écrémé) dilué à 5% dans du TBS (Tris 5 mM, 150 mM NaCl, à pH 8,0), pour une période de deux heures

sous une légère agitation. Après blocage des sites non-spécifiques, les membranes étaient délicatement rincées au TBS et utilisées immédiatement ou conservées à 4° C dans un emballage hermétique.

5.2.3.4. Révélation immunologique.

Les membranes de nitrocellulose portant les protéines virales transférées, étaient découpées en petites lanières de 0,5 cm de largeur. Chaque lanière était identifiée puis incubée pendant une heure à la température de la pièce sous une légère agitation, en présence d'un des sérums récoltés au cours des infections expérimentales et dilué 1/50 dans le tampon de blocage (Blotto à 5%). Les lanières étaient par la suite lavées à trois reprises pendant dix minutes dans du TBS contenant 0,05% de Tween 20 (ICN Biochemicals Inc, Montréal, Québec). Pour la détection de la réaction immunologique, les lanières étaient réincubées en présence d'une préparation d'IgG de lapin anti-IgG porcin couplées à la phosphatase alcaline, et diluée 1/1000 dans le tampon de blocage. Après une heure d'incubation à température de la pièce sous une légère agitation, les immunoempreintes étaient lavées à trois reprises pendant dix minutes dans la solution TBS-T, suivis de deux lavages de dix minutes dans du TBS sans Tween 20. La révélation des complexes immuns était réalisée après une incubation de 10 à 30 minutes des lanières en présence du substrat de la phosphatase alcaline, consistant en un mélange

d'une solution de 10 ml de diméthylformamide contenant 600mg de nitrobleu tetrazolium et d'une autre solution de 10 ml de diméthylformamide contenant 300 mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BioRad Labs). Le mélange de la solution de substrat était préparé dans le tampon TBS.

5.2.4. Réaction d'immunoprécipitation

5.2.4.1. Marquage isotopique des protéines virales

Des cultures de cellules MARC-145, préparées dans des flacons de 150 cm² de surface (3-4 flacons), ont été infectées avec 3 ml d'une dilution appropriée de la suspension virale. La souche IAF-Klop a été utilisée à cette fin. Après une période d'absorption d'une heure et demie à la température de la pièce sous une légère agitation, 12 ml de milieu nutritif, supplémenté de 2% de sérum de cheval étaient rajoutés aux flacons. Subséquemment à une période d'incubation de trois heures des flacons à 37°C, le milieu était vidangé et les feuillets cellulaires rincés deux fois avec du milieu nutritif. Par la suite, les feuillets cellulaires étaient réincubés pendant 3 heures en présence de milieu dépourvu de méthionine et tamponné avec de l'Hepes à 1%. Après cette période de déprivation, le milieu de culture était remplacé par du milieu contenant 50 µCi/ml de L-méthionine [³⁵S] (activité spécifique 1,120 Ci/mMole; Amersham Learle Co., Oakville, Ontario) pour un total de 750 µCi par flacon. Les

cultures cellulaires étaient finalement réincubées à 37°C; elles étaient observées régulièrement pendant environ 48 heures jusqu'au moment où l'effet cytopathique affectait près de 50% du feuillet cellulaire. Les flacons étaient ensuite congelés et décongelés à trois reprises et le surnageant cellulaire était clarifié par deux centrifugations successives à 5000 rpm (3,000 x g) pendant 20 minutes. Les surnageants étaient récupérés et concentrés par ultracentrifugation différentielle contre un coussin de 30% de saccharose pendant 3 heures à 100,000 x g à 4°C. (centrifugeuse L5-65, rotor T35, Beckman, San Diego, E.U.). Les culots étaient dispersés dans le minimum (100-200 µl) de tampon TNE (0,02 M de Tris, 0,15 M de NaCl, 0,002 M d'EDTA à pH 8,0) pendant toute une nuit à 4°C. La suspension virale était finalement aliquotée dans des tubes Eppendorf. Un comptage de la radioactivité du matériel viral marqué dilué 1/10 dans du liquide de scintillation (cocktail Pop-Popop, ICN Biomedicals, Costa Mesa, Ca, E.U.) était effectué avant l'épreuve d'immuno-précipitation, à l'aide du compteur à scintillation (2200CA Tri-Carb, Packard Instrument International, Zurich, Suisse). Les échantillons de virus marqué étaient gardés à -70°C.

5.2.4.2. L'épreuve d'immunoprécipitation.

L'immunoprécipitation des protéines virales a été réalisée selon le procédé décrit par Mardassi et al. (1994a). Les protéines virales semi-purifiées et marquées à la

méthionine [³⁵S] étaient resuspendues dans du tampon RIPA contenant 20mM de Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM de NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% de NP-40, 0,1% de SDS, 0,1% de deoxycholate de sodium , 1 µg d'aprotinine/ml et 1mM de PMSF (Phénylméthyl sulfonyl fluoride). Un volume de 15 µl de sérum à analyser était ajouté dans un tube eppendorf contenant 50 µl de la préparation de protéines virales radiomarquées (environ 1,000,000 cpm). Après une incubation d'une nuit à 4°C, 60 µl de la préparation de protéine G (Omnisorb cells, Calbiochem, San Diego, Ca, E.U.) étaient ajoutés au premier mélange, et les tubes étaient réincubés pendant 2 heures à 4° C. Par la suite, les échantillons étaient centrifugés à 14000 rpm pendant 1 minute, puis lavés à trois reprises dans du tampon de lavage qui consistait en une solution de 20 mM de Tris-HCl, à pH 7,6, 150 mM de NaCl, 5 mM d'acide tétraacétique éthylènediamine (EDTA) et 0,1% de NP-40. Deux autres lavages étaient faits dans le deuxième tampon de lavage composé de 20 mM de Tris-HCl, à pH 7,6 , et de 0,1% de NP-40. Pour chaque lavage il fallait d'abord centrifuger les complexes immuns à 13000 rpm pendant une minute, ensuite le culot était resuspendu dans du tampon de lavage puis laissé sous agitation pendant 20 minutes avant d'être recentrifugé de nouveau.

Après les lavages, le culot obtenu était resuspendu dans le tampon de dénaturation de Laemmli (1970) et chauffé à 100° C pendant 5 minutes. Les immunoprécipitats clarifiés étaient

par la suite analysés par électrophorèse sur gels de 12% de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode décrite au point 4.2.3.1.

La révélation de la réaction d'immunoprécipitation était faite par fluorographie des gels après l'électrophorèse. Les gels étaient imprégnés pendant quelques heures dans une solution de fixation contenant 30% de méthanol et 10% d'acide acétique, puis pour 30 minutes dans une solution d'amplification fluorographique (Amplify™, Amersham Canada Ltd, Oakville, Ontario). Les gels étaient ensuite séchés sous vide sur un support de papier filtre épais et les profils polypeptidiques étaient révélés après exposition à -70°C pendant 2 à 14 jours de films de type Rx-OMAT (Kodak, Eastman).

5.3. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

5.3.1. Isolement du virus

Des feuillets cellulaires (MARC-145) confluents étaient préparés dans des plateaux de 24 puits. Après avoir vidangé le surnageant, 100 µl de sérum à tester était ajouté par puits (deux puits par sérum). Après une période d'absorption d'une heure à la température de la pièce sous une légère agitation, 1 ml de milieu sans sérum, supplémenté de gentamycine était ajouté dans chaque puits. Les plateaux étaient par la suite incubés à l'étuve à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂. Les

cultures cellulaires étaient observées régulièrement jusqu'à l'apparition de l'effet cytopathique.

5.3.2. Confirmation sérologique

Après au plus 5 jours d'incubation des cultures cellulaires infectées, les surnageants étaient vidangés et les feuillets étaient fixés pendant 30 minutes à 4° C, à l'aide d'une solution de 80% d'acétone froid. L'acétone était ensuite décanté et les plateaux séchés pendant 5 minutes sous la hotte. La présence du virus du SRRP dans les cultures cellulaires inoculées à l'aide des sérums cliniques fut confirmée par IFI, selon la procédure décrite au point 2.5. Un sérum de porc hyperimmun produit contre la souche IAF-Klop fut utilisée pour la confirmation sérologique. Un isolement positif du virus à partir des sérums se traduisait par la mise en évidence de foyers de fluorescence dans les cultures cellulaires infectées par opposition aux feuillets cellulaires non infectés ne présentant pas une fluorescence cytoplasmique claire et évidente.

5.3.3. Réaction RT-PCR

5.3.3.1. Extraction de l'ARN viral.

L'ARN génomique a été extrait à partir des sérums récoltés au cours des infections expérimentales. Au total 100 µl de sérum étaient prélevés et la méthode de Chomczynski et

Sacchi (1987) a été employée pour l'extraction de l'ARN viral. L'échantillon était dénaturé brièvement dans une solution contenant 4 M de thiocyanate de guanidine, 25 mM de citrate de sodium à pH 7, 0,5% de sarcosyl et 0,1 M de β -mercaptoéthanol. L'ARN total était extrait par la suite dans un mélange de phénol:chloroforme (1:1) en présence de 0,2 M d'acétate de sodium à pH 4, puis précipité par l'addition d'isopropanol à 50% et une incubation d'une heure à -20°C . L'ARN était récupéré suite à une centrifugation à 13,000 rpm pendant 20 minutes; le culot d'ARN était lavé à deux reprises à l'éthanol à 75% , par la suite séché sous vide durant 15 minutes et finalement resuspendu dans 10 μl d'eau bidistillée traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) et contenant 40 unités (U) de RNAGuard™ (Pharmacia, Dorval, Qc). Cette suspension d'ARN était gardée à -70°C si la réaction d'amplification enzymatique n'était pas entreprise immédiatement après l'extraction. Toutes les solutions pour la préparation de l'ARN ont été préalablement traitées avec du DEPC pour inactiver les ribonucléases.

5.3.3.2. Détection du virus par amplification enzymatique.

La réaction de polymérisation a été entreprise pour la détection de l'ARN génomique du virus du SRRP, extraite à partir des échantillons sériques. Cette détection a été réalisée par amplification du gène ORF7 codant la protéine N

de la nucléocapside du virus du SRRP, tel que décrit par Mardassi et al. (1994c). Les amorces oligonucléotidiques ont été déduites des séquences de la souche IAF-exp91 du virus du SRRP. Les séquences de ces oligonucléotides auxquels avaient été ajoutés deux sites de restriction *EcoRI* au niveau de l'extrémité 5' et leurs positions sont les suivantes:

SRRP7S: 5'GAATTCGAATTCCTAAATATGCCAAATAACAAC 3' (2307-2327) et

SRRP7R: 5'GAATTCGAATTCTAGGTGACTTAGAGGCACA 3' (2754-2773).

5.3.3.2.1. Réaction de transcription inverse.

Dans des tubes de microfuge de 600 μ l exempts d'ARNase (Fisher Scientific) et posés sur de la glace, le mélange réactionnel suivant était ajouté pour un volume final de 20 μ l : 9 μ l d'eau bidistillée traitée au DEPC, 1 μ l de chacune des deux amorces (sens 25 picomole/ μ l, antisens 25 picomole/ μ l) et 1 μ l d'ARN viral extrait. Les tubes eppendorfs étaient incubés pendant 10 minutes à 70°C pour dénaturer l'ARN puis déposés immédiatement sur la glace pour 3 minutes. Ensuite, dans chaque tube un volume de 7 μ l du mélange suivant était ajouté: 2 μ l (10 mM) de désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, TTP, Pharmacia), 1 μ l (50mM) de tampon $MgCl_2$ (Gibco BRL Canada, Burlington), 1 μ l de RNAGuard™ (Pharmacia) et 2 μ l de tampon pour la transcriptase inverse (Gibco BRL). Les tubes étaient de nouveau incubés à 37°C pendant 3 minutes pour permettre l'appariement des amorces. Par la suite, l'enzyme

transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine (MuLv, Gibco BRL) était ajoutée à raison de 1 μ l (200 U) par tube. Les tubes étaient immédiatement incubés pendant 1 heure à 42°C pour que la réaction de transcription inverse s'effectue. Par la suite, les tubes étaient soit utilisés immédiatement pour la réaction de polymérisation en chaîne, soit gardés à -20°C.

5.3.3.2.2. Réaction de polymérisation en chaîne.

Les tubes de microfuge contenant les produits de la transcription inverse étaient incubés à 94°C pendant 5 minutes afin de stopper l'activité de l'enzyme. Ensuite, les tubes étaient déposés immédiatement sur la glace pendant 15 minutes. La réaction de polymérisation en chaîne était effectuée dans un volume final de 100 μ l constitué de 1 μ M de chacune des amorces, 200 μ M de chacun des désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, TTP) (Pharmacia), 20 μ l du produit de la transcription inverse et 2,5 U de la *Taq* polymérase (Gibco BRL) diluée dans du tampon de l'enzyme. Afin de prévenir l'évaporation, de l'huile minérale était ajoutée au dessus du mélange réactionnel à raison de 70 μ l par tube Eppendorf. Les échantillons étaient par la suite soumis aux divers cycles de température en utilisant l'appareil thermocycleur "DNA Thermal Cycler" de Cetus (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, E.U.). Chacun des cycles comprenait une phase de dénaturation à 94°C d'une durée de 60 secondes, une phase d'hybridation de 60 secondes à 42°C

pour les cinq premiers cycles puis à 55°C pour les cycles suivants et une phase d'élongation à 72°C de 90 secondes. Toutes les réactions d'amplification se terminaient par un cycle de 10 minutes à 72°C. Les échantillons amplifiés étaient refroidis à 4°C avant d'être analysés.

5.3.3.2.3. Analyse des produits d'amplification enzymatique.

Une quantité égale au dixième du mélange obtenu suite à la réaction de la polymérisation en chaîne ayant suivi celle de la transcription inverse était analysée par électrophorèse en gel d'agarose dont la concentration variait entre 0,8% et 1,2% selon la grandeur prévue des fragments amplifiés. Pour ce faire, l'agarose était dissout dans une solution de Tris-acétate (TAE: Tris-acétate à 40 mM, EDTA à 2 mM à pH 8,0). Les appareils d'électrophorèse GNA-100 (Pharmacia) et Wide Mini-Sub (Bio-Rad) étaient utilisés. La séparation des fragments avait lieu sous une tension de 1 à 2 volts par cm² de gel pendant 30 minutes. La taille des fragments obtenus était estimée en comparant leur distance de migration avec celle des fragments d'ADN de taille connue après leur coloration au bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml.

5.3.4. Transfert de type Southern.

La coloration du gel contenant les fragments du génome viral amplifié était faite dans une solution de 0,5 mg/ml de

bromure d'éthidium pendant 15 minutes. Après la prise d'une photo, le gel était déposé dans une solution de dénaturation (NaOH 0,5M , NaCl 1,5M) pendant 15 minutes à deux reprises à température de la pièce, puis dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 1M , NaCl 1,5M) deux fois 15 minutes à la température de la pièce. Ensuite un montage spécial était fait pour réaliser le transfert Southern par capillarité pendant une période de 12 à 24 heures, selon la technique décrite par Maniatis et al., 1982. Une membrane de nylon de porosité 0,22 m chargée positivement (Nytran: Schleicher et Schuell, Keene, NH, E.U.) et équilibrée dans du tampon 10 X SSC (1 X SSC contient du NaCl 0,15M , du citrate de sodium 0,015M à pH 7,0) était utilisée. Après le transfert, la membrane de nylon était retirée du montage pour être trempée dans le tampon 5 X SSC pendant 5 minutes puis séchée brièvement à l'air afin de permettre une bonne immobilisation de l'acide nucléique sur la membrane. La fixation de l'ADN sur la membrane était faite par exposition au rayonnement ultra-violet pendant exactement 5 minutes. L'efficacité du transfert était confirmée par l'absence de bandes lors de l'examen du gel sous un rayonnement ultra-violet.

5.3.5. Hybridation moléculaire

5.3.5.1. Réaction de préhybridation

La membrane de nylon ayant servi pour le transfert Southern était placée dans un sac de plastique hermétiquement fermé et contenant la solution de préhybridation. Cette solution était constituée d'une solution 5 X SSC, de 0,5% de caséine modifiée (Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada) de 0,1% de N-lauroylsarcosine (Sarcosyl), de 0,02% de SDS et de 50% de formamide (Fisher Scientific). La membrane était incubée pour une nuit dans un bain-marie à 42°C pour la réaction de préhybridation.

5.3.5.2. Réaction d'hybridation

Tout en évitant que la membrane de nylon ne sèche, la solution de préhybridation était vidangée et remplacée immédiatement par la solution d'hybridation (mêmes constituants que la solution de préhybridation) contenant 10 picomoles de la sonde moléculaire, préparée préalablement à partir de l'ORF7 de la souche IAF-Klop du virus du SRRP et marquée à la digoxigénine. La membrane était incubée de nouveau pour une nuit dans un sac de plastique scellé mis dans un bain-marie à 42°C. La sonde moléculaire marquée pouvait être réutilisée à quelques reprises en la retirant du sac et en l'entreposant à -20°C.

5.3.5.3. Détection immunologique

Après avoir retiré la solution d'hybridation, la membrane était rincée d'abord à la température ambiante en mettant dans le sac de plastique pour cinq minutes à deux reprises du tampon 2 X SSC contenant 0,1% de SDS, puis dans un bain-marie à 68°C pour 15 minutes à deux reprises avec du tampon 0,1 X SSC contenant 0,1% de SDS. Un lavage de 5 minutes à température de la pièce était ensuite effectuée dans une solution de lavage composée de 100 mM d'acide maléique, de 150 mM de NaCl et ayant un pH 7,5 ajusté avec du NaOH. La membrane était incubée à la température ambiante pour 30 minutes dans un réactif standard de blocage (Blocking stock solution, Boehringer Mannheim) dilué 1% dans la solution de lavage décrite précédemment. Cette solution, contenant 1% du réactif standard de blocage et additionnée de 75 U/ml de conjugué anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim), était utilisée par la suite pour une autre incubation de la membrane pendant 30 minutes à température ambiante. Par la suite, deux lavages étaient faits pendant 15 minutes à deux reprises avec la solution de lavage, avant d'équilibrer la membrane pour cinq minutes dans un tampon à pH 9,5 et composé de 100 mM de Tris-HCl, de 100 mM de NaCl et de 50 mM de MgCl₂. La révélation de la réaction immunologique était réalisée en utilisant comme substrat le produit Lumigen PPD, qui est le 4-metho-4-(3-phosphatephenyl) spiro(1,2-

dioxetane-3,2'-adamantane) (Boehringer Mannheim), dilué 10 mg/ml dans le tampon utilisé précédemment pour équilibrer la membrane. Le développement et la détection de la réaction étaient faits dans l'obscurité en exposant la membrane à un film de type Rx-OMAT (Kodak, Eastman) pour une période variant de 2 à 12 heures.

RÉSULTATS

1. ÉTUDE DE LA CROISSANCE VIRALE

Cette étude avait pour but de déterminer les conditions optimales de croissance et le moment propice de récolte des souches IAF-exp91 et IAF-Klop du virus du SRRP propagées sur cultures primaires de macrophages alvéolaires d'une part, et de la souche IAF-Klop adaptée sur la lignée cellulaire continue MARC-145 d'autre part.

1.1. Effet cytopathique sur macrophages alvéolaires

Les souches IAF-exp91 et IAF-Klop propagées sur cultures primaires de macrophages alvéolaires induisaient au bout de 24 à 48 heures un effet cytopathique distinct. Cet effet cytopathique était au début caractérisé par une granulation cytoplasmique et péricellulaire, donnant aux cellules un aspect d'oursins de mer. Par la suite, il y avait la formation d'amas de cellules conglomérées et entassées par groupes de petits foyers circonscrits, suivi d'une lyse progressive des cellules. La destruction complète du feuillet cellulaire était obtenue en moins de 96 heures. La figure 2 illustre l'effet cytopathique induit lors du 7ième passage de la souche IAF-exp91 du virus du SRRP sur macrophages alvéolaires.

1.2. Effet cytopathique sur cellules MARC-145

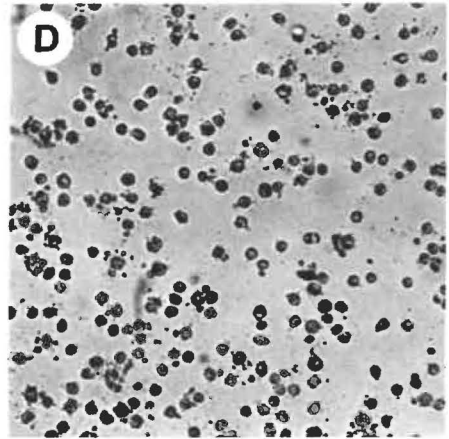
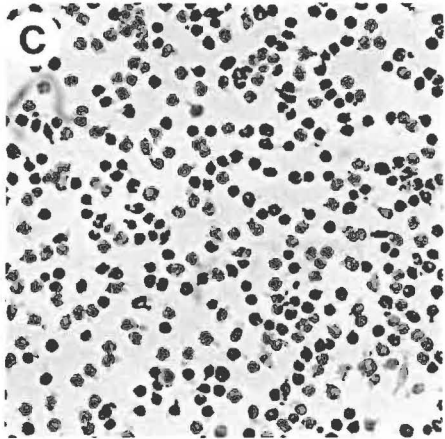
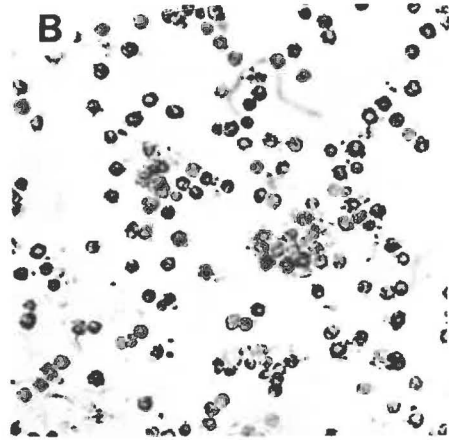
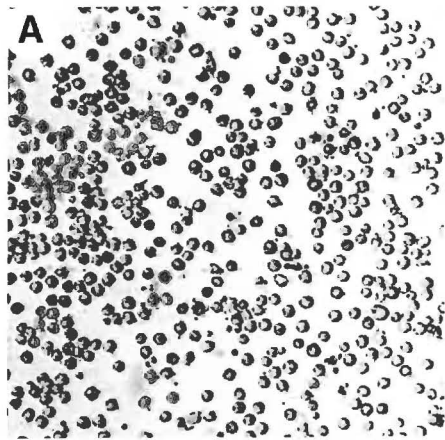
La lignée cellulaire continue MARC-145 s'est avérée permissive à la souche IAF-Klop du virus du SRRP. Au cours des

FIGURE 2. Effet cytopathique du virus du SRRP sur cultures de macrophages alvéolaires

Effet cytopathique observé au septième passage sur macrophages alvéolaires de porc de la souche IAF-exp91 du virus du SRRP.

A et C: Feuilletés témoins.

B et C: Feuilletés infectés 48 à 96 heures après incubation à 37°C.

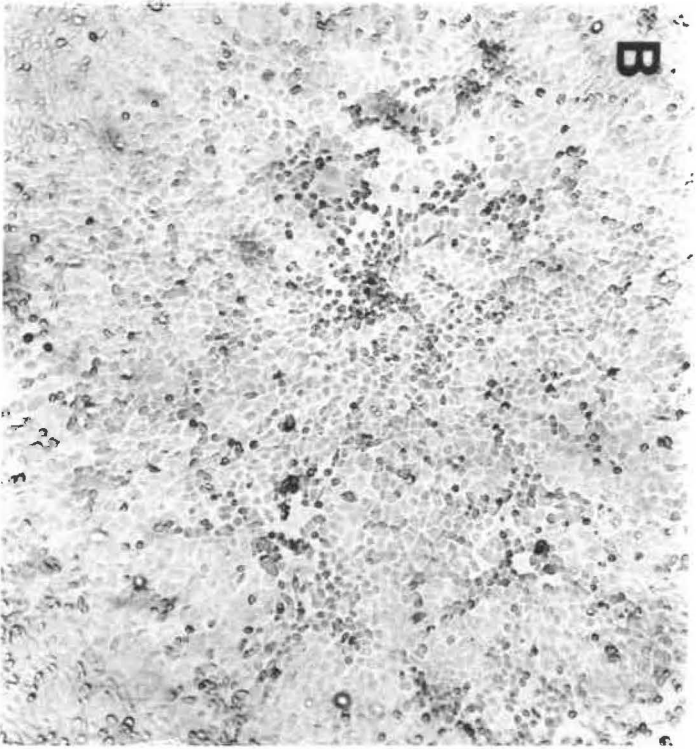
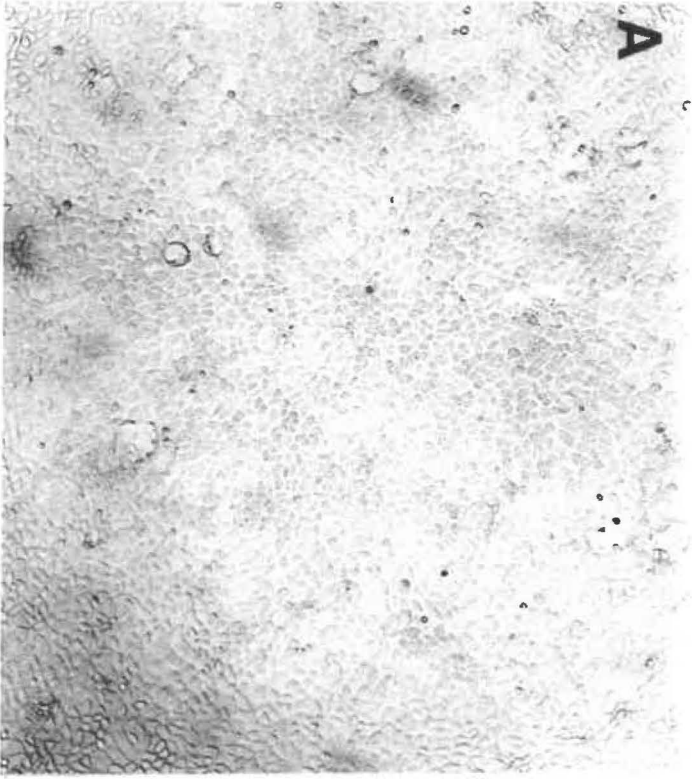


**FIGURE 3. Effet cytopathique du virus du SRRP sur cultures
de cellules MARC-145**

Effet cytopathique observé sur les cellules MARC-145
au cinquième passage de la souche IAF-Klop du virus du SRRP.

- A- Feuillet infecté: feuillet de cellules MARC-145, 48
heures après incubation à 37°C.

- B- Feuillet témoin.



cinq premiers passages, un effet cytopathique était visible de 48 heures à 72 heures après le début de l'infection. Au début, les cellules infectées apparaissaient gonflées, ensuite elles s'aggloméraient. L'infection progressait normalement en foyers, le feuillet demeurant presque intact jusqu'au 4^{ième} et 5^{ième} jours d'infection. Par la suite, les cellules infectées arrondies se détachaient du feuillet et se retrouvaient libres dans le milieu de culture.

Le souche virale IAF-Klop était aussi lytique sur cellules MARC-145 que sur macrophages alvéolaires, mais son effet cytopathique sur cultures de cellules MARC-145 se développait beaucoup plus lentement. Le nombre de cellules affectées augmentaient progressivement avec le temps, entraînant une dégénérescence complète du feuillet cellulaire en 4 à 6 jours. L'effet cytopathique du virus du SRRP induit sur cultures de cellules MARC-145 est illustré à la figure 3.

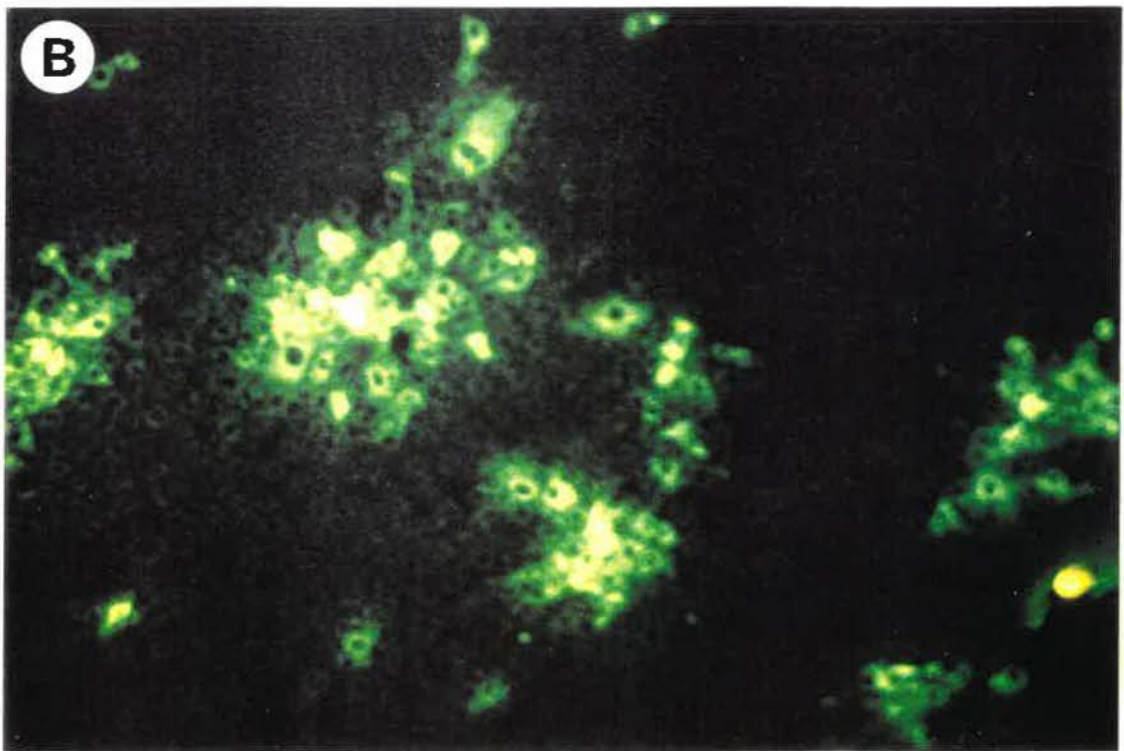
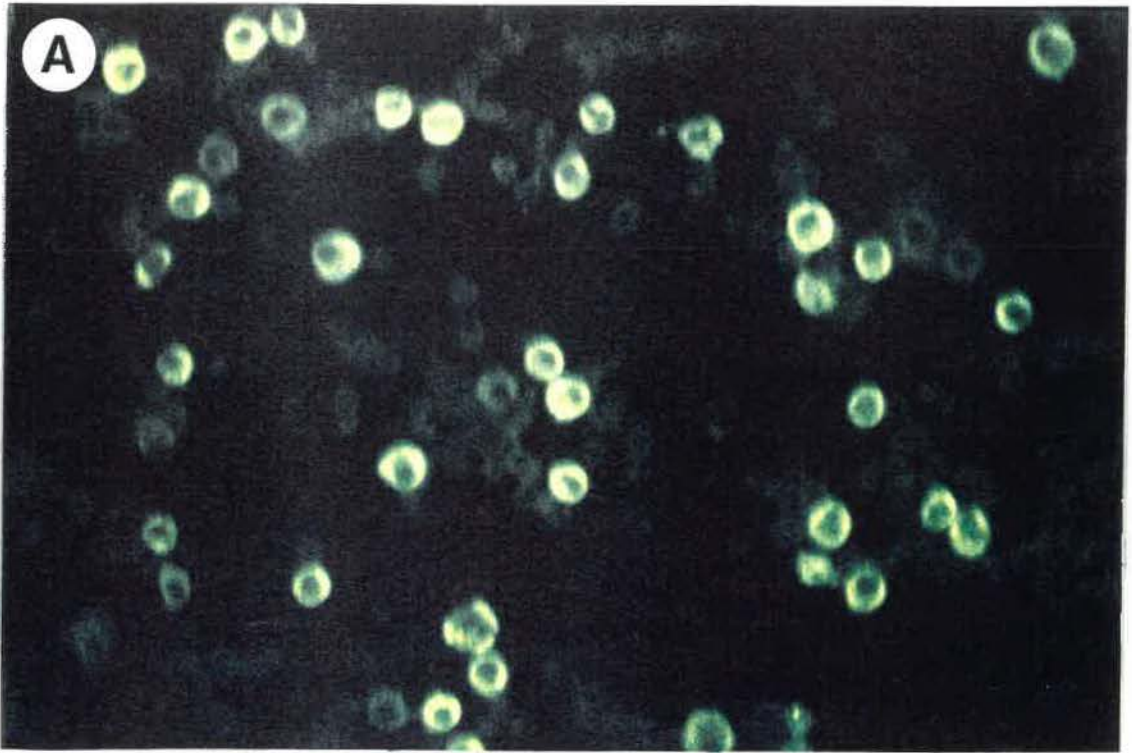
1.3. Identification sérologique du virus

L'effet cytopathique induit aussi bien sur cultures de macrophages alvéolaires que sur cellules MARC-145 étant non spécifique, il était nécessaire de réaliser une identification sérologique afin de confirmer l'infection par le virus du SRRP. On utilisait à cette fin une épreuve d'IFI. L'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre la protéine N de la nucléocapside, permettait de mettre en évidence la présence

FIGURE 4. Identification sérologique du virus du SRRP

Profil de fluorescence de cellules infectées avec la souche IAF-Klop du virus du SRRP (macrophages alvéolaires ou MARC-145). Dans certains cas, pour la révélation des antigènes viraux, on utilisait le sérum de porc positif de référence ayant antérieurement réagi positivement avec le virus de Lelystad, et préalablement dilué à 1:20. Dans d'autres cas, l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) était réalisée avec des anticorps monoclonaux (SDOW17, EP147 et VO17) dirigés contre la protéine de la nucléocapside de la souche américaine de référence ATCC-VR2332. L'épreuve d'IFI était généralement effectuée sur des feuillets cellulaires ayant été fixés à l'acétone 40 heures après le début de l'infection.

- A- Fluorescence cytoplasmique observée dans les macrophages alvéolaires de porc infectés par la souche IAF-exp.91 (12ième passage).
- B- Foyers de fluorescence observés sur feuillet de cellules MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop (7ième passage).



d'antigènes du virus au niveau des cellules infectées. Les analyses sérologiques ont permis de démontrer que la réplication du virus était restreinte au cytoplasme des cellules infectées (Figure 4).

1.4. Détermination du titre viral

Étant donné la cytopathogénicité du virus du SRRP sur cultures cellulaires, il nous a été possible de déterminer les titres infectieux du virus. L'utilisation de dilutions successives du virus, inoculées à des cellules cultivées dans des puits d'une plaque stérile, a rendu possible la détermination du pourcentage de cultures cellulaires présentant un effet cytopathique visible. Le titre viral était calculé par la méthode de Reed et Muench (1938) et était exprimé en unités de DECP₅₀ qui correspondaient à une dose virale capable d'induire un effet cytopathique visible dans 50% des cultures infectées. Les titres viraux obtenus variaient entre 10^{3,5} et 10^{4,7} DECP₅₀ /0,1ml.

1.5. Production de plages

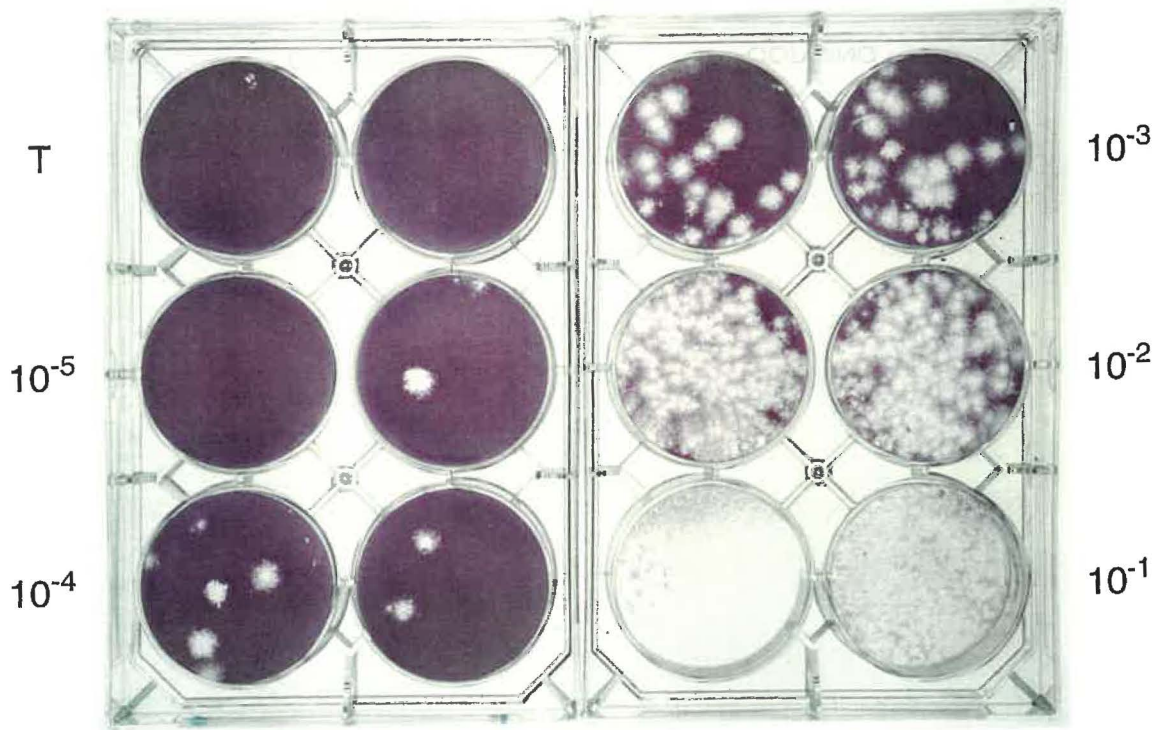
L'infection de feuilletts cellulaires maintenus sous un milieu de culture contenant de l'agar noble a permis la production de plages correspondant à un foyer de lyse induit par une particule virale infectieuse. Conséquemment, il a été possible d'évaluer avec précision le nombre de particules infectieuses présentes dans les suspensions virales. Le clonage

FIGURE 5. Plages induites par le virus du SRRP sur cultures de cellules MARC-145

Des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-5}) des suspensions virales étaient préalablement effectuées dans du milieu de culture sans sérum. Des cultures confluentes de cellules MARC-145 étaient par la suite infectées et incubées pendant 48 heures en présence de milieu de culture contenant 1% d'agar noble. Les plages étaient révélées de 24 à 72 heures après addition de milieu gélifié supplémenté de rouge neutre.

La figure représente le type de plages ayant été obtenues suite à l'infection par la souche IAF-Klop du virus du SRRP au 7ième passage sur les cellules MARC-145.

T- Feuilletts cellulaires témoins.



par la technique de plages permettait en plus d'obtenir des suspensions virales plus homogènes, démontrant beaucoup moins de variations au niveau de la cytopathogénicité et de la virulence. Par la suite, peu de variations étaient observées au niveau des titres infectieux. La figure 5 illustre le type de plages obtenues. Le diamètre des plages variait généralement de 5 à 6 mm après 4 à 5 jours d'infection.

2. ÉTUDES DES MÉTHODES DE CONCENTRATION ET DE PURIFICATION DU VIRUS

2.1. Détermination de la densité de flottation du virus du SRRP en gradients de saccharose et de chlorure de césium

La densité de flottation du virus du SRRP a été déterminée après centrifugation isopycnique d'une nuit sur gradient de chlorure de césium ou gradient de saccharose. Dans les deux cas, deux bandes opaques étaient généralement obtenues à la suite de cette étape d'ultracentrifugation. Les analyses en microscopie électronique ont permis de déterminer que les particules virales se retrouvaient dans les bandes correspondant à des densités de flottation de 1,18 à 1,20 g/ml dans le saccharose et de 1,14 g/ml dans le chlorure de césium.

2.2. Concentration et purification du virus

Les suspensions virales obtenues, après clarification des surnageants de cellules infectées, ont été concentrées et

purifiées dans le but de se débarrasser de la plupart des organites cellulaires, ainsi que du matériel non viral en suspension. La proportion relative des différentes protéines du virus du SRRP, ayant été séparées par électrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de SDS et révélées par coloration au bleu de Coomassie, variait légèrement selon le type de préparation virale utilisée (simplement clarifiée, concentrée ou purifiée). Par contre, la proportion de ces différentes protéines virales, pour une même méthode de préparation, ne variait pas beaucoup selon les différents passages cellulaires. En général, la concentration des particules virales présentes dans les surnageants par ultracentrifugation sur coussin de 30% de saccharose était suffisante pour les tests d'immunobuvardage. La présence de matériel cellulaire n'influençait pas de façon significative les résultats des différents essais d'immunobuvardage. Le virus purifié par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de chlorure de césium a surtout été utilisé pour les expériences de reproduction expérimentale du SRRP et d'hyperimmunisation de porcelets et de lapins, car la contamination avec du matériel cellulaire devait être minimale dans ces cas-ci, pour éviter la production d'une réponse immune anti-cellulaire interférente.

3. ÉTUDE DE LA STRUCTURE POLYPEPTIDIQUE DU VIRUS DU SRRP

Le but de cette étude était d'établir et d'analyser le contenu protéique du virus. L'identification exacte des différentes protéines virales était indispensable pour l'interprétation et l'analyse des résultats des tests sérologiques prévus dans le cadre du suivi sérologique.

Après SDS-PAGE et transfert électrophorétique sur membranes de nitrocellulose des suspensions virales concentrées ou purifiées, les analyses d'immunobuvardage réalisées à l'aide de sérums hyperimmuns anti-SRRP ont permis de mettre en évidence la présence de trois protéines virales majeures. La première bande, très intense, correspondait à une protéine de 15 kDa; la deuxième bande, tout aussi intense mais surtout très large, correspondait à une protéine de 19 kDa; et la troisième bande, beaucoup moins marquée que les deux premières, correspondait à une protéine de 24-26 kDa. La figure 6 montre la présence de ces trois protéines virales, ayant été identifiées par un sérum de lapin hyperimmun homologue. Aucune de ces protéines n'a été reconnue par les sérums de lapin et de porc pré-immuns. Les autres bandes visibles sont probablement des protéines d'origine cellulaire.

**FIGURE 6. Profil d'immunobuvardage des protéines structurales
du virus du SRRP.**

Les virions, présents dans les surnageants de cultures cellulaires MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop du virus du SRRP, ont été concentrés par ultracentrifugation contre un coussin de 30% de saccharose. Les culots de virus ont été solubilisés dans le tampon de Laemmli et leur contenu protéique analysé par électrophorèse sur gel de 12% de polyacrylamide en présence de SDS. Suite à leur transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines ont été révélées en utilisant le sérum de lapin hyperimmun dirigé contre la souche IAF-exp91 et une préparation d'immunoglobulines anti-IgG de lapin conjuguées à la phosphatase alcaline.

- 1- Profil électrophorétique des protéines structurales du virus du SRRP (souche IAF-Klop).
- 2- Témoin sérum négatif.

STD

1

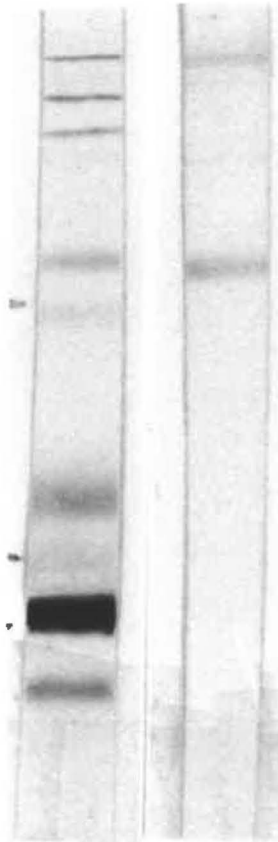
2

46 -

30 -

21 -

14 -



4. ÉTUDE DE L'ULTRASTRUCTURE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

L'examen en microscopie électronique des particules virales présentes dans les suspensions de virus purifié, a permis de caractériser la morphologie et les dimensions des particules virales; il a permis aussi de visualiser dans certains cas les sous-unités du virus telle que la nucléocapside.

4.1. Coloration négative des particules virales

Les particules du virus du SRRP colorées à l'acide phosphotungstique à 3% apparaissaient plutôt de forme sphérique, mais très souvent pléomorphes, avec un diamètre variant de 42 à 60 nm (Fig.7a). Dans certains cas, il était aussi possible de mettre en évidence à l'intérieur de certaines particules la présence d'une nucléocapside icosaédrique ayant un diamètre d'environ 30 nm (Fig.7b).

4.2. Immunomarquage à la protéine A couplée à l'or colloïdal

La réactivité des sérums hyperimmuns vis-à-vis des particules virales purifiées a été déterminée par immunomarquage à l'aide d'une préparation de protéine A couplée à l'or colloïdal, le diamètre des particules d'or ayant au préalable été ajusté à un diamètre de 25 nm tel que démontré dans la Figure 8. Un marquage spécifique des particules virales a été obtenu après leur incubation en présence des sérums

FIGURE 7. Micrographie électronique du virus du SRRP

A- Micrographie électronique en imprégnation négative des particules virales retrouvées dans les fractions de densité 1,18-1,20 g/ml de saccharose.

B- Mise en évidence de la nucléocapside du virus (flèches).

La barre représente 100 nm.

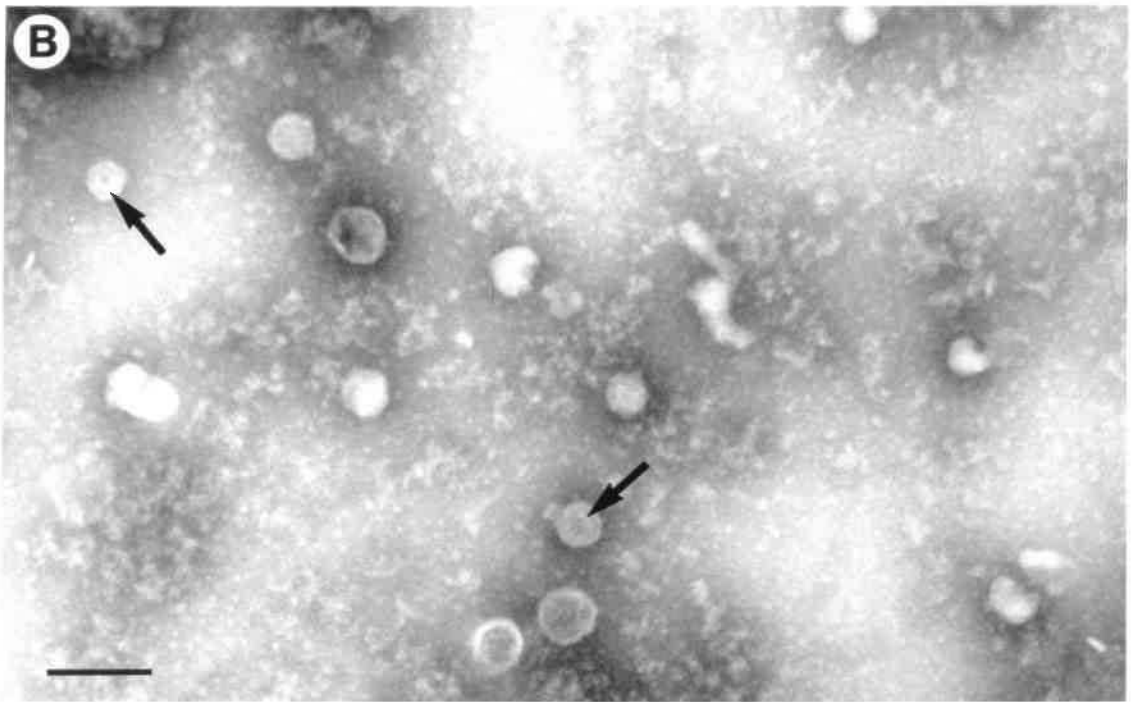
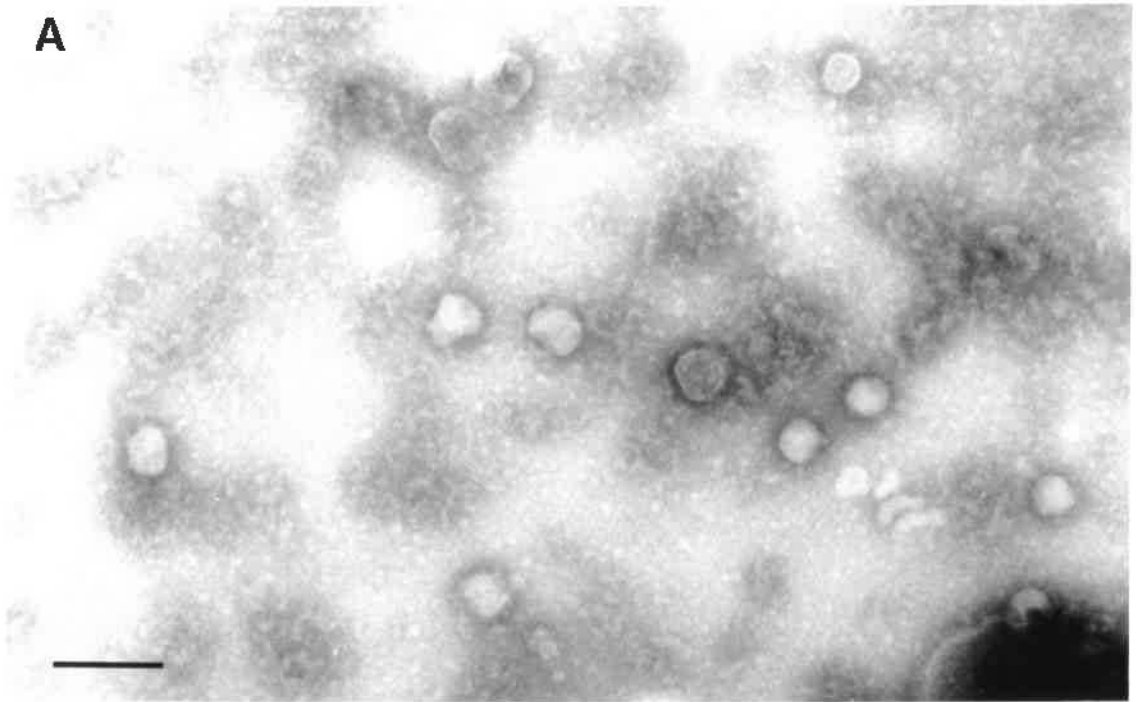
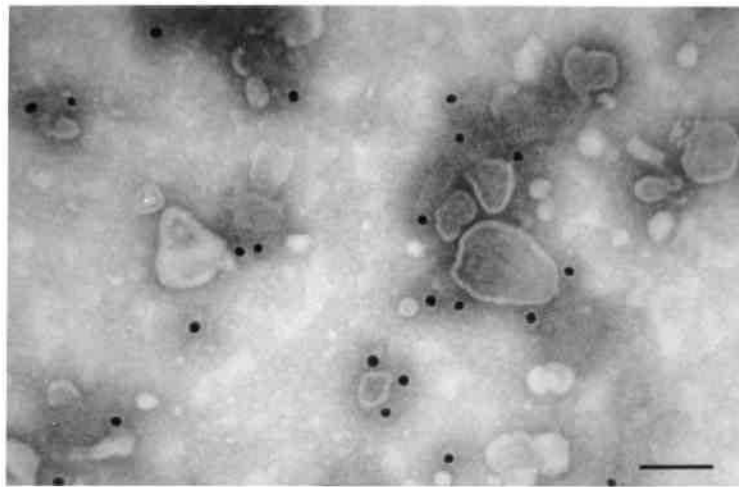
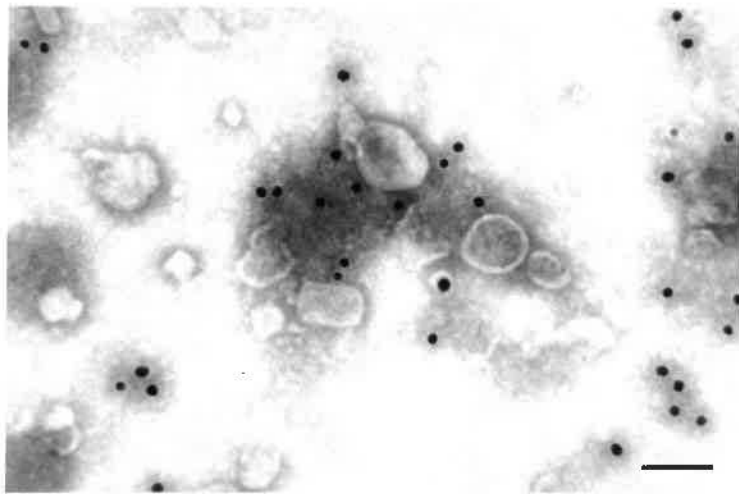
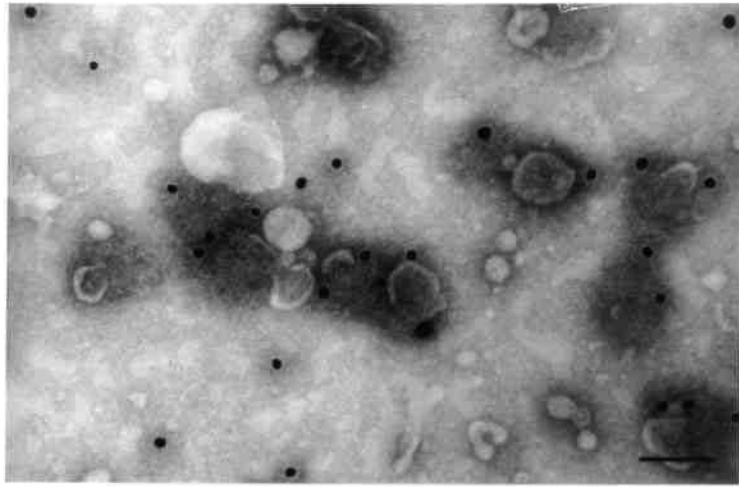


FIGURE 8. Immunomarquage spécifique à la protéine A-or colloïdal

Micrographie électronique de particules du virus du SRRP ayant été incubées en présence d'un sérum hyperimmun homologue, suivi d'une seconde incubation en présence d'une préparation de protéine A conjuguée à l'or colloïdal. Un marquage spécifique des particules virales par des particules d'or peut être observé.

La barre représente 100 nm.



hyperimmuns homologues produits chez des lapins et des porcs. Aucune réactivité de ces sérums n'a été démontrée envers d'autres virus tel le coronavirus bovin, le virus de l'encéphalomyocardite du porc et la souche H1N1 du virus de l'influenza porcin.

5. REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DU SRRP

5.1. Examen clinique

Les porcelets utilisés pour la reproduction expérimentale du SRRP étaient exempts de toute infection intercourante à leur arrivée à l'IAF. Les analyses sérologiques effectuées ont démontré qu'ils étaient sérologiquement négatifs au virus du SRRP et aux autres virus tels que le coronavirus de la GET, les virus EMC, PPV et influenza de type A (H1N1). Ces animaux étaient aussi exempts d'anticorps contre *Mycoplasma hyopneumoniae*. Aucun signe clinique particulier n'a été observé chez ces animaux pendant leur période d'adaptation de 1 à 2 semaines avant l'infection expérimentale. Au cours des infections expérimentales, les premiers symptômes observés chez les animaux étaient: une élévation temporaire de la température corporelle variant de 40 à 41°C dès 24 heures après exposition au virus, ensuite suivait une seconde période d'hyperthermie (température variant de 40 à 42 °C) apparaissant au bout de 72 heures après exposition, suivie d'une phase de normalisation de la température (de 38,1 à 38,8 °C) jusqu'à la fin de la période

d'observation. Chez tous les porcelets témoins, des températures se situant dans les limites de la normale (de 38,2 à 38,7 °C) ont été observées au cours des expériences.

À partir du 3^{ième} jour jusqu'au 14^{ième} jour après le début de l'infection, les animaux étaient léthargiques et démontraient des signes d'oedème périoculaire accompagnés d'une légère conjonctivite sans évidence de larmoiement, de l'anorexie, une cyanose des oreilles, ainsi qu'une toux avec une légère dyspnée qui se traduisait par une respiration abdominale plus ou moins laborieuse. On pouvait dans certains cas diagnostiquer une adénopathie pelvienne. Aucun des animaux infectés, même dans le cas de l'infection mixte avec la souche IAF-5393 du virus de l'influenza de type A, n'a démontré de signes de coryza et la toux n'était pas quinteuse. Ultérieurement, aucun signe clinique ne fut observé chez les animaux exposés au virus du SRRP ayant recouvert de l'infection vers la fin de la deuxième semaine. Aucun des animaux témoins n'a présenté de symptômes cliniques au cours des différentes expériences.

5.2. Lésions macroscopiques et histologiques observées chez les porcs exposés au virus

Au jour 7 ou 10 après exposition, pour chaque groupe d'animaux infectés, un porcelet fut euthanasié pour des fins de nécropsie. Les principales lésions macroscopiques étaient

confinées au niveau du système respiratoire et consistaient en une décoloration grisâtre et diffuse de la surface des poumons, associée à une hypertrophie plus ou moins importante des ganglions lymphatiques médiastinaux (Fig.9). Les lobes ventraux des poumons étaient hyperémiés. De petits foyers hémorragiques pouvaient aussi être observés à la surface du myocarde (Fig.9).

Aucune lésion histologique significative ne fut observée chez les porcelets témoins généralement euthanasiés au dixième jour après le début de chaque reproduction expérimentale. Au niveau microscopique, les lésions pulmonaires consistaient en une pneumonie, caractérisée par une infiltration interstitielle et périvasculaire de cellules de la lignée monocyte-macrophage (Fig.10). Cette infiltration interstitielle entraînait un épaissement marqué des septa alvéolaires. Dans certains cas, il était possible d'observer la présence de cellules mononucléées et de débris nécrotiques dans la lumière des alvéoles. Des lésions de myocardite lympho-monocytaire pouvaient aussi être observées au niveau des ventricules (Fig.10). Une hyperplasie des follicules lymphoïdes a aussi été notée au niveau de certains ganglions lymphatiques, en particulier dans les ganglions médiastinaux mais aussi au niveau de la rate.

**FIGURE 9. Lésions macroscopiques observées chez les porcs
infectés avec une dose virale intranasale unique**

Hépatisation du tissu pulmonaire avec cyanose et hyperémie à la surface des poumons, associée à une polyadénopathie médiastinale (flèche). Des micro-foyers hémorragiques sont aussi visibles à certains endroits à la surface du myocarde.

Photo prise par le Dr Robert Bilodeau, D.M.V., Société des éleveurs de porcs du Québec.

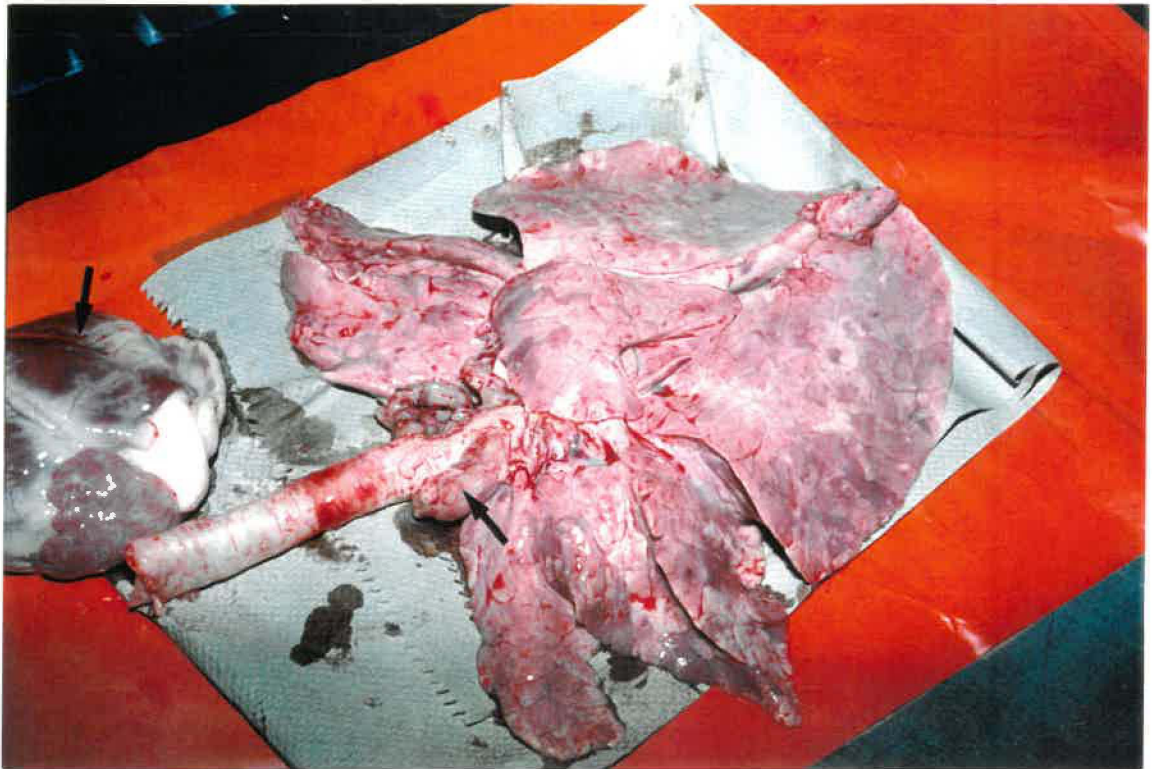


FIGURE 10. Lésions histopathologiques pulmonaires des porcs de l'infection cohorte sentinelle

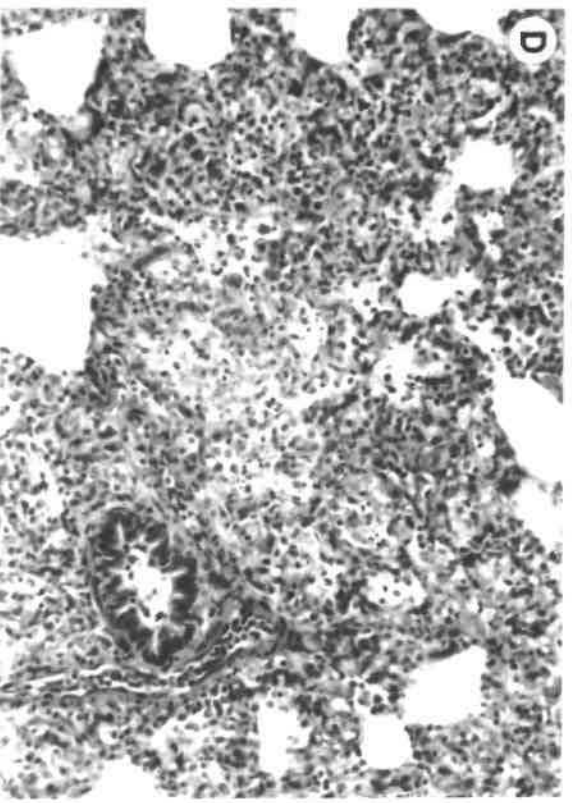
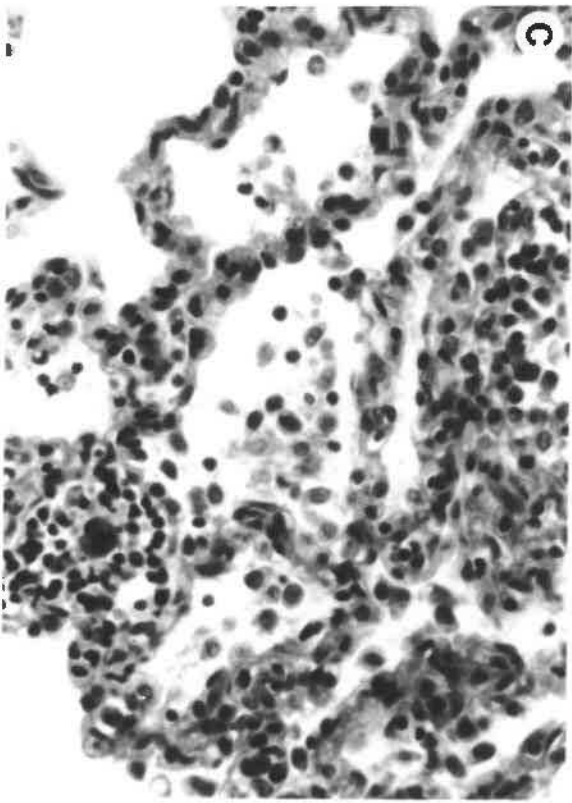
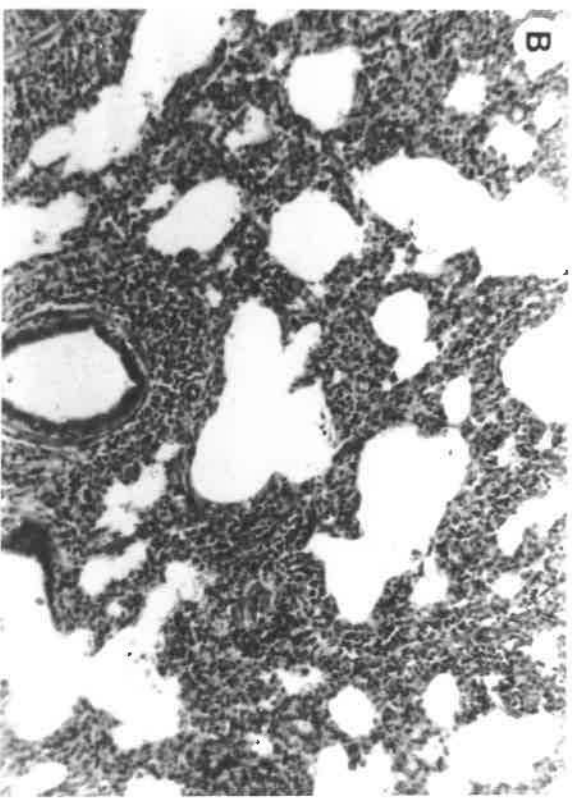
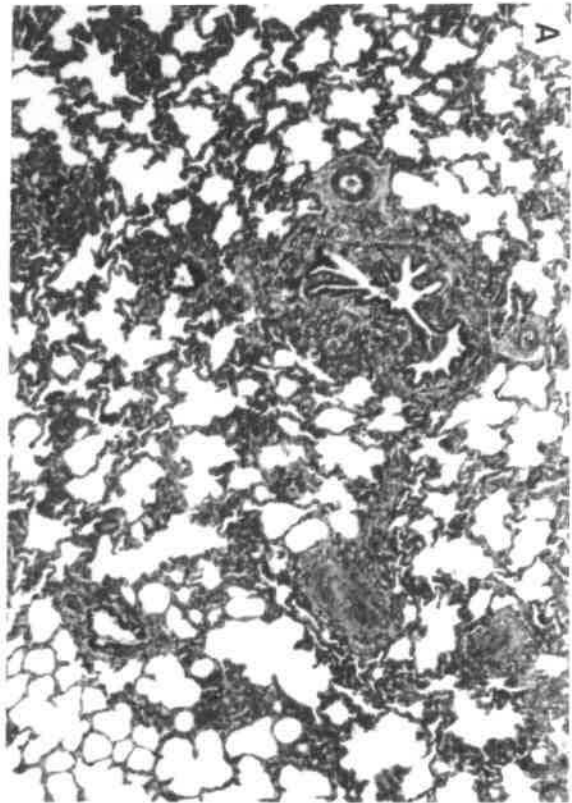
Lésions histopathologiques observées chez les porcs de la cohorte sentinelle 42 jours après leur introduction dans un élevage séropositif au virus du SRRP.

A et B- Aspects généraux de pneumonie interstitielle avec épaissement marqué des septa alvéolaires suite à leur infiltration massive par des cellules de la lignée lymphomonocytaire. On peut aussi observer une infiltration périvasculaire et péribronchique par des cellules lymphocytaires.

C- Présence de macrophages libres dans la lumière des alvéoles. Toutefois, il y a absence de cellules pycnotiques et aucune évidence d'hyperplasie des pneumocytes de type II

D- Exudat protéinique avec accumulation de cellules mononucléaires et nécrotiques ainsi que de débris cellulaires dans la lumière des alvéoles.

NB: Photos tirées de Bilodeau et al., 1994.



6. CINÉTIQUE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE

6.1. Suivi d'une cohorte sentinelle

Le but de cette étude était d'établir la facilité de transmission du virus du SRRP chez les animaux exempts de la maladie introduits dans un élevage ayant expérimenté un épisode de problèmes reproducteurs attribuables à une infection par le virus du SRRP, mais où il y avait absence de signes cliniques depuis plus de 3 mois. Ceci permettait d'obtenir quelques informations sur la persistance du virus en plus de nous permettre d'établir la chronologie d'apparition des anticorps spécifiques au virus du SRRP au cours d'une infection contractée dans des conditions naturelles.

6.1.1. Chronologie d'apparition des anticorps IgM et IgG

Les résultats des tests d'IFI effectués dans le cadre de l'infection cohorte-sentinelle ont été rapportés dans le tableau 1. Les anticorps IgM ont été détectés chez les porcs sentinelles dès la fin de la première semaine après leur introduction dans l'élevage séropositif. Leurs titres ont augmenté rapidement pour atteindre un niveau maximal vers le 14^{ième} jour post-infection (PI) (titres IFI de 1024 à 2048). Ensuite, les titres d'IgM ont baissé vers le jour 35 ou 42 PI pour atteindre rapidement des titres non détectables vers la fin de la 5^{ième} semaine PI (Tableau 1).

Les anticorps IgG spécifiques, pour leur part, ont aussi été détectés vers la fin de la première semaine d'exposition (titres de 16 à 32 au jour 6 PI) (Tableau 1). Ensuite, leurs titres ont augmenté pour atteindre un plateau vers le jour 21 ou 28 PI (titres de 1024 à 2048). Après le jour 28 PI, les valeurs des titres en IgG de tous les animaux sentinelles sont demeurés stables et élevés jusqu'à la fin de la période d'observation de 42 jours (Tableau 1). Les porcelets témoins pour leur part sont demeurés séronégatifs pour toute la période d'observation (Tableau 1).

6.1.2. Cinétique d'apparition des anticorps neutralisants

Le tableau 2 montre la cinétique des titres en anticorps neutralisants détectés au cours de l'infection cohorte-sentinelles. Les anticorps neutralisants spécifiques n'ont pu être observés que dans les échantillons sériques collectés chez deux des cinq porcelets exposés à l'élevage infecté. Des titres significatifs en anticorps neutralisants (>16) n'ont pas été observés avant 4 à 5 semaines après exposition; les titres les plus élevés avaient des valeurs variant de 32 à 64. Les anticorps neutralisants ont persisté jusqu'à la fin de la période d'observation de 42 jours. Par ailleurs, les porcelets témoins sont demeurés séronégatifs tout au long de l'expérience.

TABLEAU 1. Chronologie d'apparition des anticorps IgM et IgG dirigés contre le virus du SRRP et détectés par IFI

Groupe d'animaux	No du porc	jours après infection							
		0	3	7	14	21	28	35	42
groupe témoin	2	<16 (<16) a	<16 (<16) b	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)
groupe témoin	3	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)
groupe infecté	22	<16 (<16)	<16 (<16)	32 (<64)	512 (2048)	2048 (2048)	1024 (1024)	512 (64)	1024 (<16)
groupe infecté	33	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<64)	128 (2048)	2048 (1024)	512 (256)	1024 (64)	512 (<16)

Les titres en anticorps ont été estimés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique donnant une fluorescence cytoplasmique spécifique.

a- Titres en anticorps IgG.

b- Les chiffres entre parenthèses indiquent les titres en anticorps IgM.

TABLEAU 2 Cinétique des titres d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus du SRRP chez les porcs de la cohorte sentinelle

Groupe d'animaux	No du porc	jours après infection						
		0	7	14	21	28	35	42
Groupe témoin	2	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	3	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Groupe infecté	4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	5	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	11	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	22	<8	<8	<8	<8	16-32	16-32	>32
	33	<8	<8	<8	<8	>32	64-128	64-128

Les titres en anticorps neutralisants ont été estimés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique neutralisant l'effet cytopathique induit dans les cultures de cellules MARC-145 par une dose virale constante de 100 DECP₅₀.

6.1.3. Identification de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard du virus purifié

Le but de cette étude était de déterminer la réactivité spécifique des sérums des porcs, infectés de façon naturelle, à l'égard des protéines du virus du SRRP purifié. Après séparation des protéines virales par SDS-PAGE dans des conditions réductrices suivie de leur transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose, les différentes protéines virales majeures ont été détectés en immunobuvardage à l'aide d'anticorps. La séroconversion des animaux infectés n'était généralement détectée que vers la fin de la deuxième semaine d'infection (Fig.11). Les anticorps dirigés contre la protéine de la nucléocapside (15 kDa) et ceux dirigés contre la protéine de la matrice (19 kDa) du virus étaient généralement détectables vers la fin de la deuxième et de la troisième semaine, respectivement. Dans la plupart des cas, les anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe (24,5 kDa) n'étaient pas détectables avant le 42ième jour après exposition (Fig.11). Les autres bandes visibles au niveau des lanières 4 et 5, en plus des trois protéines virales, sont probablement des protéines cellulaires.

6.1.4. Étude de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard des protéines recombinantes

**FIGURE 11. Réactivité des sérums de l'infection cohorte
sentinelle contre les protéines du virus purifié**

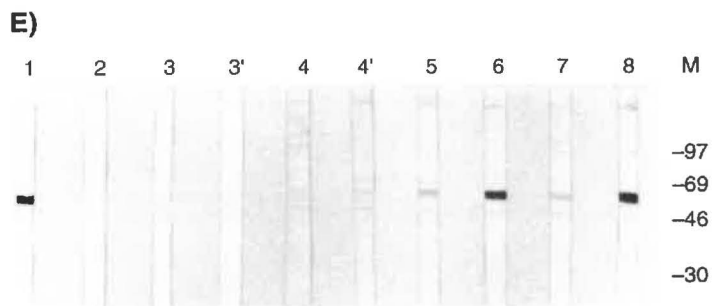
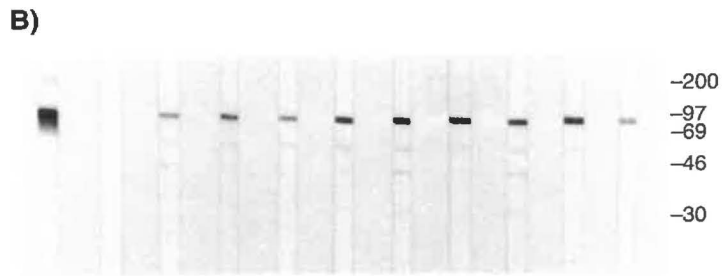
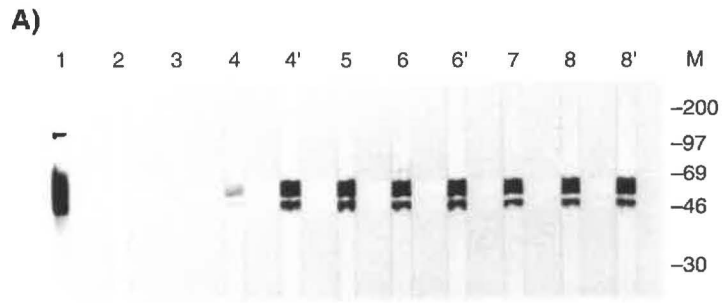
Les protéines du virus purifié, séparées par SDS-PAGE et transférées par électrophorèse sur membranes de nitrocellulose, ont été détectées par la technique d'immunobuvardage utilisant une dilution de 1:50 des sérums des porcelets de l'infection cohorte sentinelle. Les complexes immuns ont été révélés à l'aide d'une préparation d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG porcin conjuguées à la phosphatase alcaline.

- 1- Réactivité d'un sérum prélevé au jour 0 (porc SPF)
- 2- Réactivité d'un sérum prélevé chez un porc 7 jours après contact avec des animaux séropositifs
- 3- Réactivité d'un sérum prélevé chez un porc 14 jours après contact avec des animaux séropositifs
- 4- Réactivité d'un sérum prélevé chez un porc 28 jours après contact avec des animaux séropositifs
- 5- Réactivité d'un sérum prélevé chez un porc 35 jours après contact avec des animaux séropositifs

FIGURE 12. Réactivité des sérums de l'infection cohorte sentinelle contre les protéines recombinantes MBP-ORF7(A), MBP-ORF5(B), MBP-ORF4(C), et GST-ORF6(E)

Après extraction du RNA génomique du virus du SRRP, les régions correspondant aux cadres de lecture (ORFs) 4, 5, 6, et 7 ont été amplifiées séparément par RT-PCR. Les produits de la réaction RT-PCR ont été purifiés et clonés dans les vecteurs d'expression pMAL-C2 (ORFs 4, 6 et 7) et pGEX-4T (ORF5) tel que décrit dans la section matériel et méthodes. Les protéines recombinantes ont été obtenues après induction de l'expression chez les bactéries *Escherichia coli* transformées. Les protéines recombinantes (protéines de fusion), MBP-ORF7, MBP-ORF5, MBP-ORF4 et GST-ORF6, analysées par SDS-PAGE, ont été détectées par immunobuvardage en utilisant les sérums des porcs No22 et No33 de l'infection cohorte-sentinelle dilués à 1:25. Les complexes immuns ont été révélés à l'aide d'une préparation d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG anti-porcine couplées à la phosphatase alcaline.

Les sérums de porc ont été collectés au jour 0 (lanière 2), jour 7 (lanières 3 et 3', respectivement pour les porcs 22 et 33), jour 14 (lanières 4 et 4'), jour 21 (lanières 5 et 5'), jour 28 (lanières 6 et 6'), jour 35 (lanière 7) et jour 42 (lanières 8 et 8') après exposition au virus du SRRP. La lanière 3' (porc 33) n'existe que pour la GST-ORF6 (E) au jour 7 PI. Aucune réactivité des sérums porcins avec la protéine MBP (D) ainsi qu'avec la protéine GST, n'a été observée. Le sérum de lapin hyperimmun, produit contre la protéine MBP, a réagit positivement contre les protéines recombinantes des ORFs 4 à 7 (lanières No1). La position des marqueurs de poids moléculaires (M) est indiquée à droite.



Cette étude avait été entreprise afin de confirmer les résultats sur la spécificité polypeptidique de la réponse immunitaire humorale tel qu'établie par immunobuvardage avec les préparations virales purifiées. Les résultats sur la réactivité des sérums récoltés au cours de l'infection cohorte-sentinelle indiquent que la réponse humorale spécifique contre chacune des protéines structurales du virus du SRRP apparait de façon chronologique (Fig.12). Ainsi, les anticorps dirigés contre la protéine d'enveloppe E codée par l'ORF5 et ceux dirigés contre le produit de l'ORF4 ont été détectés vers le 7ième jour après l'infection, tandis que les anticorps spécifiques à la protéine N de la nucléocapside (produit de l'ORF7) n'ont été observés qu'au 14ième jour. Finalement, les anticorps produits contre la protéine de la matrice M (produit de l'ORF6) n'ont été mis en évidence que vers le début de la troisième semaine (Fig.12). Aucune réactivité des sérums testés n'a été observée envers les protéines MBP et GST.

6.2. REPRODUCTION EXPÉRIMENTALE DU SRRP AVEC DOSE UNIQUE INTRA-NASALE

Une investigation de la réponse immunitaire humorale des porcelets inclus dans cette reproduction expérimentale a été réalisée pour déterminer la cinétique d'apparition des anticorps IgM, IgG, et des anticorps neutralisants, ainsi que pour identifier la spécificité polypeptidique de cette réponse dans le cadre d'une infection classique avec une dose virale

unique inoculée par voie intranasale. On voulait ainsi mimer une situation clinique où il n'y aurait pas de surinfection des porcelets par la même souche virale ou par une souche antigéniquement différente au cours de leur passage des locaux de la maternité aux locaux de la pouponnière et d'engraissement. Cette expérience avait donc pour but d'établir la persistance d'une infection primaire par le virus du SRRP.

6.2.1. Cinétique d'apparition des anticorps IgM et IgG

Les résultats sur la cinétique d'apparition des anticorps IgM et IgG chez les animaux ayant été inoculés par la voie intranasale par une seule dose de 10^5 DECP₅₀ de la souche IAF-exp91 sont rapportés dans le tableau 3. Par IFI, les anticorps IgM ont été détectés à partir de la première semaine de l'infection (titres de 64 à 256). Leurs titres atteignaient un niveau maximal vers le 14^{ième} jour après exposition au virus (titres de 1024 à 2048), pour décroître ensuite jusqu'au 35^{ième} ou 42^{ième} jour post-infection (Tableau 3 et Fig.13). Les IgG, pour leur part, ont aussi été détectés dès la fin de la première semaine de l'infection (titres 1:64 au jour 7 PI) et leurs titres ont augmenté rapidement pour atteindre un plateau vers le 21^{ième} ou le 28^{ième} jour PI (titre 2048). Les titres élevés en IgG sont demeurés inchangés jusqu'à la fin de la période d'observation. Tous les animaux du groupe témoin sont demeurés séronégatifs pour toute la durée de la période d'observation.

TABLEAU 3 Cinétique d'apparition des anticorps IgM et IgG détectés par IFI chez les porcs infectés avec une dose unique intranasale du virus du SRRP

Groupe d'animaux	No du porc	Jours après infection								
		0	3	6	14	21	28	35	42	63
groupe témoin	8978	<16 ^a (<16) ^b	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)
	8980	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)
	8982	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)	<16 (<16)
groupe infecté	8979	<16 (<16)	<16 (<16)	<64 (<256)	<256 (<1024)	<256 (<256)	<2048 (<256)	<2048 (<64)	<2048 (<64)	<2048 (<16)
	8983	<16 (<16)	<16 (<16)	<64 (<256)	<64 (<2048)	<2048 (<256)	<2048 (<256)	<2048 (<64)	<2048 (<64)	<2048 (<16)
	8984	<16 (<16)	<16 (<16)	<64 (<64)	<64 (<1024)	<2048 (<256)	<2048 (<256)	<2048 (<64)	<2048 (<64)	<2048 (<16)

Les titres en anticorps étaient estimés par la réciproque de la plus haute dilution sérique donnant une fluorescence cytoplasmique spécifique.

a- Titres des IgG détectés par IFI.

b- Les chiffres entre parenthèses indiquent les titres des IgM détectés par IFI.

TABEAU 4 **Cinétique des titres en anticorps neutralisants dirigés contre le virus du SRRP chez les porcs infectés avec une dose virale intranasale unique**

Groupe d'animaux	No du porc	Jours après infection										
		0	3	6	14	21	28	35	42	49	63	
Groupe témoin	8978	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
	8980	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
	8982	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
Groupe infecté	8979	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	16-32	8-16	8-16	8-16
	8983	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	>32	16-32	8-16	8-16
	8984	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8-16	16-32	8-16	8-16

Les titres en anticorps neutralisants ont été estimés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique neutralisant l'effet cytopathique induit dans les cultures de cellules MARC-145 par une dose virale constante de 100 DECP₅₀

6.2.2. Cinétique des titres en anticorps neutralisants

Chez les animaux n'ayant reçu qu'une seule dose du virus du SRRP par la voie intranasale, des titres significatifs en anticorps neutralisants n'ont pu être observés qu'après la 4^{ième} ou 5^{ième} semaine de l'infection (titres 32 - 64) Les résultats sur la cinétique d'apparition des anticorps neutralisants chez ces animaux sont reportés dans le tableau 4. Un profil typique de la réponse immune humorale chez un animal représentatif est illustré par la figure 13.

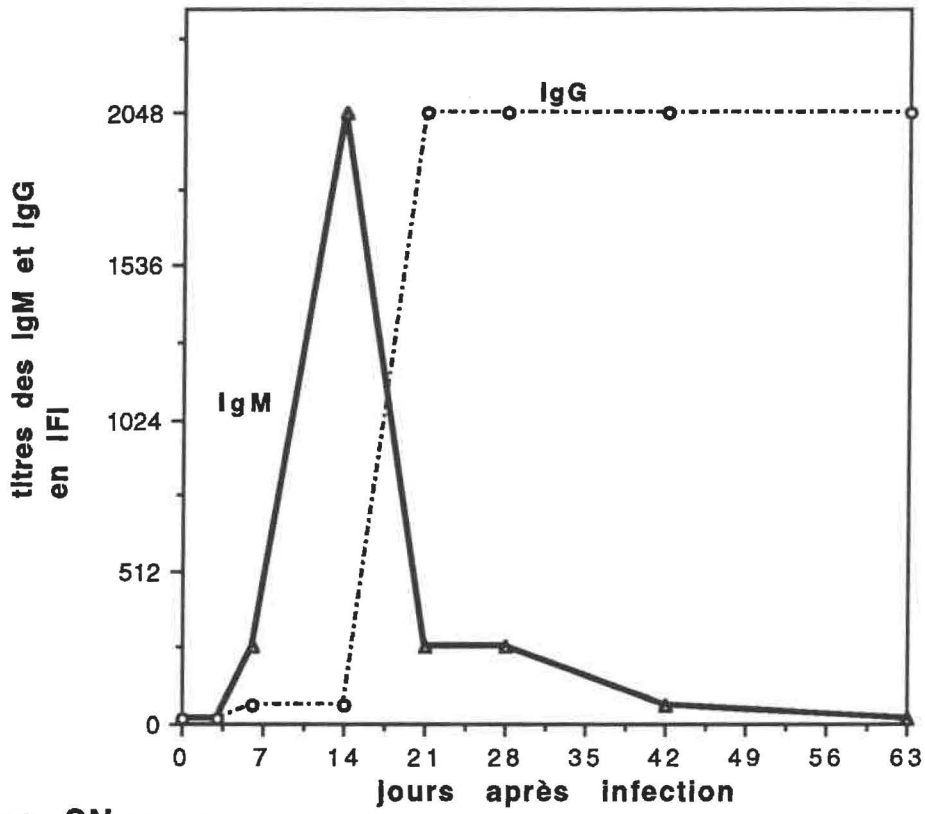
6.2.3. Étude de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard du virus purifié

Des épreuves d'immunobuvardage ont été réalisées afin d'établir la chronologie d'apparition et la spécificité polypeptidique des anticorps produits chez les animaux n'ayant reçu qu'une seule dose du SRRP. Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 14. Les animaux infectés ont développé des anticorps qui ne pouvaient être observés par immunobuvardage que vers la cinquième semaine après leur exposition au virus. Les anticorps dirigés contre la protéine de la nucléocapside (15 kDa) et les anticorps spécifiques à la protéine de la matrice de (19 kDa) ont été observés à partir du jour 35 après infection. Toutefois, la réponse immunitaire humorale dirigée spécifiquement contre la glycoprotéine

FIGURE 13. Cinétique de la réponse immune humorale et de la virémie chez les porcelets infectés avec une dose virale unique

Réponse typique en anticorps chez un porcelet SPF (No 8283) infecté par voie intranasale avec une dose unique de 1×10^5 DECP₅₀ de la souche IAF-exp91 du virus du SRRP. Les titres en anticorps IgM et IgG ont été déterminés par immunofluorescence indirecte (IFI). L'identification sérologique du virus isolé sur cellules MARC-145 à partir du sérum a été réalisée par IFI, en utilisant l'anticorps monoclonal SDOW17 dirigé contre la protéine de la nucléocapside de la souche de référence américaine ATCC-2332.

**CINÉTIQUE DE LA RÉPONSE IMMUNE HUMORALE
ET DE LA VIRÉMIE CHEZ UN PORC INFECTÉ PAR
LE VIRUS DU SRRP**

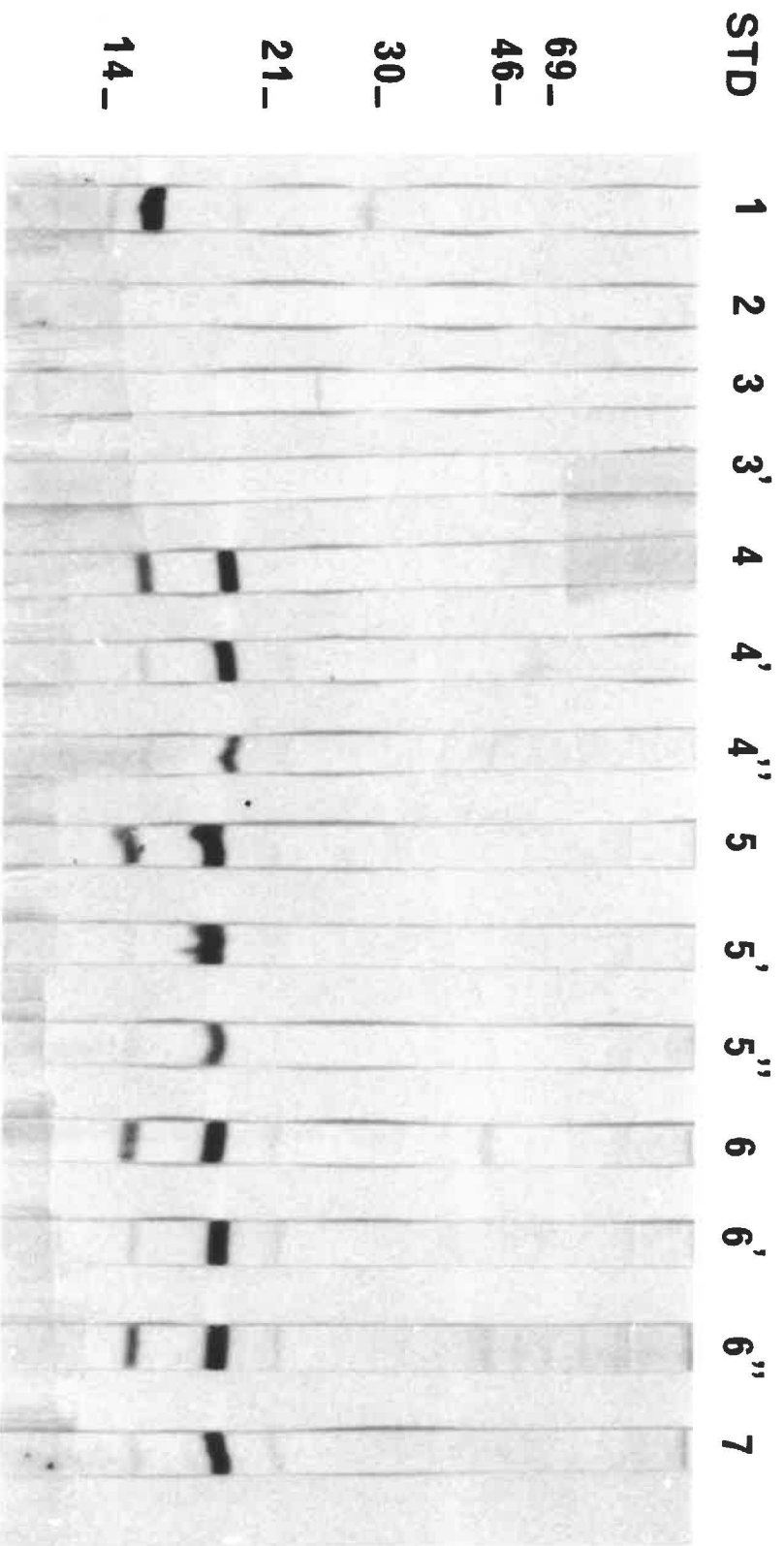


Titres SN →	< 8	< 8	< 8	16	32	32	32	32	32	32
Virémie →	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+

FIGURE 14. Réactivité des sérums de l'infection à dose virale unique contre les protéines du virus purifié

Les protéines du virus purifié, séparées par SDS-PAGE et transférées par électrophorèse sur membranes de nitrocellulose, ont été détectées par la technique d'immunobuvardage en utilisant les sérums (dilués à 1:50) des porcs Nos 79, 83 et 84 ayant été infectés expérimentalement par voie intranasale. La réactivité des échantillons sériques envers les protéines du virus purifié a été révélée suite à une seconde incubation en présence d'une préparation d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG porcin couplées à la phosphatase alcaline.

Les sérums des porcs infectés ont été prélevés au jour 14 PI (lanières 3 et 3' respectivement pour les porcs 79 et 83), au jour 35 PI (lanières 4, 4' et 4'' respectivement pour les porcs 79, 83 et 84), au jour 42 PI (lanières 5, 5' et 5''), au jour 49 PI (lanières 6, 6' et 6'') et au jour 63 PI (lanière 7 pour le porc 79). Aucune réactivité n'a été observée avec le sérum de porc SPF prélevé avant l'infection expérimentale (lanière No2). Le sérum de lapin hyperimmun anti-SRRP (lanière No1) reconnaissait faiblement les différentes protéines du virus. La position des marqueurs de poids moléculaires (Std) est indiquée à droite.



d'enveloppe (26 kDa) n'était généralement détectable que vers le jour 49 PI .

6.2.4. Étude de la spécificité polypeptidique des anticorps à l'égard des protéines recombinantes

Les résultats d'analyse par immunobuvardage de la cinétique de la réponse immunitaire humorale, dirigée spécifiquement contre chacune des protéines recombinantes obtenues par expression chez *E.coli* des différentes gènes du virus, ont été reportés dans le tableau 5. Les anticorps développés contre le produit de l'ORF5 et ceux dirigés contre la protéine codée par l'ORF4, ont pu être détectés dès la fin de la première semaine après exposition. Par ailleurs, les anticorps développés contre la protéine de la nucléocapside N codée par l'ORF7 n'ont été observés que vers la fin de la deuxième semaine après infection. Aucune réactivité des sérums testés n'a été observée avec les protéines MBP et la GST.

6.3. L'HYPERIMMUNISATION DES PORCELETS

Ces expériences ont été effectuées dans le but d'établir la réactivité du système immunitaire chez les animaux infectés de façon répétitive avec le virus du SRRP. Les expériences ont été conduites d'une part avec du surnageant de culture de cellules MARC-145 infectées avec la souche IAF-Klop du virus du SRRP dont le titre infectieux fut évalué à 1×10^5 DECP₅₀/ml,

TABLEAU 5 Réactivité des sérums de l'infection à dose virale intranasale unique contre les protéines recombinantes MBP-ORF7, MBP-ORF5 et MBP-ORF4 telle que déterminée par l'épreuve d'immunobuvardage

Réactivité établie contre les protéines recombinantes				
Origine des sérums	MBP-ORF7	MBP-ORF5	MBP-ORF4	MBP
porc SPF	-	-	-	-
Porc 79	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	-
Porc 83	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	-
Porc 84	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	j6, j14, j21 j28, j35, j42 j49, j63	-

j - Jour après infection pour lequel il y a eu détection dans le sérum d'anticorps dirigés contre les différentes protéines recombinantes

Porcs Nos 79, 83 et 84 - Porcelets ayant été infectés expérimentalement avec une dose virale intranasale unique de 1×10^5 DECP₅₀.

Sérum SPF - Sérum pré-immun.

et d'autre part, avec le virus purifié sur gradients de densité de saccharose.

6.3.1. Réponse immunitaire humorale des porcs hyperimmunisés

Les valeurs des titres en anticorps IgG contre la souche IAF-Klop, telles que déterminées par IFI, sont reportées dans le tableau 6. Suite à l'inoculation de 3 doses de virus (1×10^5 DECP₅₀) à intervalle de 2 semaines, il a été possible de détecter des titres en IgG spécifiques relativement élevés (2560) au jour 42 PI. Ces titres en IgG ont augmenté par la suite pour atteindre des valeurs maximales de 5120 à 10240 vers le jour 63 PI (Tableau 6). Ces titres sont demeurés inchangés jusqu'au jour 88 PI. Des résultats similaires ont été obtenus chez les porcs hyperimmunisés avec le virus purifié (100 mg de protéines virales par dose), les anticorps IgG ayant été détectés à des titres variant de 640 à 2560 dès le jour 30 PI puis demeurés stables à des valeurs maximales de 1280 à 2560 jusqu'au jour 88 PI. Les porcelets témoins sont demeurés séronégatifs jusqu'à la fin de la période d'observation.

6.3.2. Détermination des titres en anticorps neutralisants

Les résultats obtenus suite aux expériences d'hyperimmunisation ont démontré que les titres en anticorps neutralisants demeuraient faibles, que les animaux aient été inoculés avec du virus pur ou du surnageant de culture de cellules MARC-145 infectées (Tableau 7). Le porcelet témoin n'a

TABLEAU 6 Titres en anticorps IgG détectés par IFI chez les porcs hyperimmunisés

Sérums	Numéro du porc	Jours après infection			
		J30 PI	J42 PI	J63 PI	J88PI
Sérums pré-immuns	-----	nd	<20	<20	<20
Sérums hyperimmunés (A)	92000	nd	2560	5120	5120
	92007	nd	2560	10240	10240
Sérums hyperimmunés (B)	457	2560	nd	640	2560
	470	2560	nd	640	2560
	471	2560	nd	640	2560
	472	640	nd	2560	2560

Le titre en anticorps était estimé par la réciproque de la plus haute dilution sérique donnant une fluorescence cytoplasmique spécifique.

Sérums (A): Porcs hyperimmunisés avec du surnageant de culture des cellules MARC-145 infectées.

Sérums (B): Porcs hyperimmunisés avec du virus purifié.

nd: non déterminé.

TABLEAU 7 Titres en anticorps neutralisants anti-SRRP détectés chez les porcs hyperimmunisés

Sérums	Numéro du porc	Jours après infection			
		J30 PI	J42 PI	J63 PI	J88PI
Sérums pré-immuns	-----	<8	<8	<8	nd
Sérums hyperimmuns (A)	92000	<8	<8	<8	nd
	92007	<8	<8	<16	nd
Sérums hyperimmuns (B)	457	<8	<8	<32	<32
	470	<8	<8	<8	<8
	471	<8	<8	<8	<8
	472	<16	<16	<16	<16

Les titres en anticorps neutralisants étaient estimés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique neutralisant l'effet cytopathique induit dans les cultures de cellules MARC-145 par une dose virale constante de 100 DECP₅₀

Sérums (A): Porcs hyperimmunisés avec du surnageant de culture des cellules MARC-145 infectées.

Sérums (B): Porcs hyperimmunisés avec du virus purifié.

nd: non déterminé.

pas produit d'anticorps neutralisants détectables jusqu'à la fin de la période d'observation (Tableau 7). Deux des quatre animaux ayant été inoculés avec du virus purifié, ont développé des anticorps neutralisants détectés à des titres de 32 au jour 63 PI, tandis que les deux autres porcelets sont demeurés séronégatifs jusqu'au jour 88 PI.

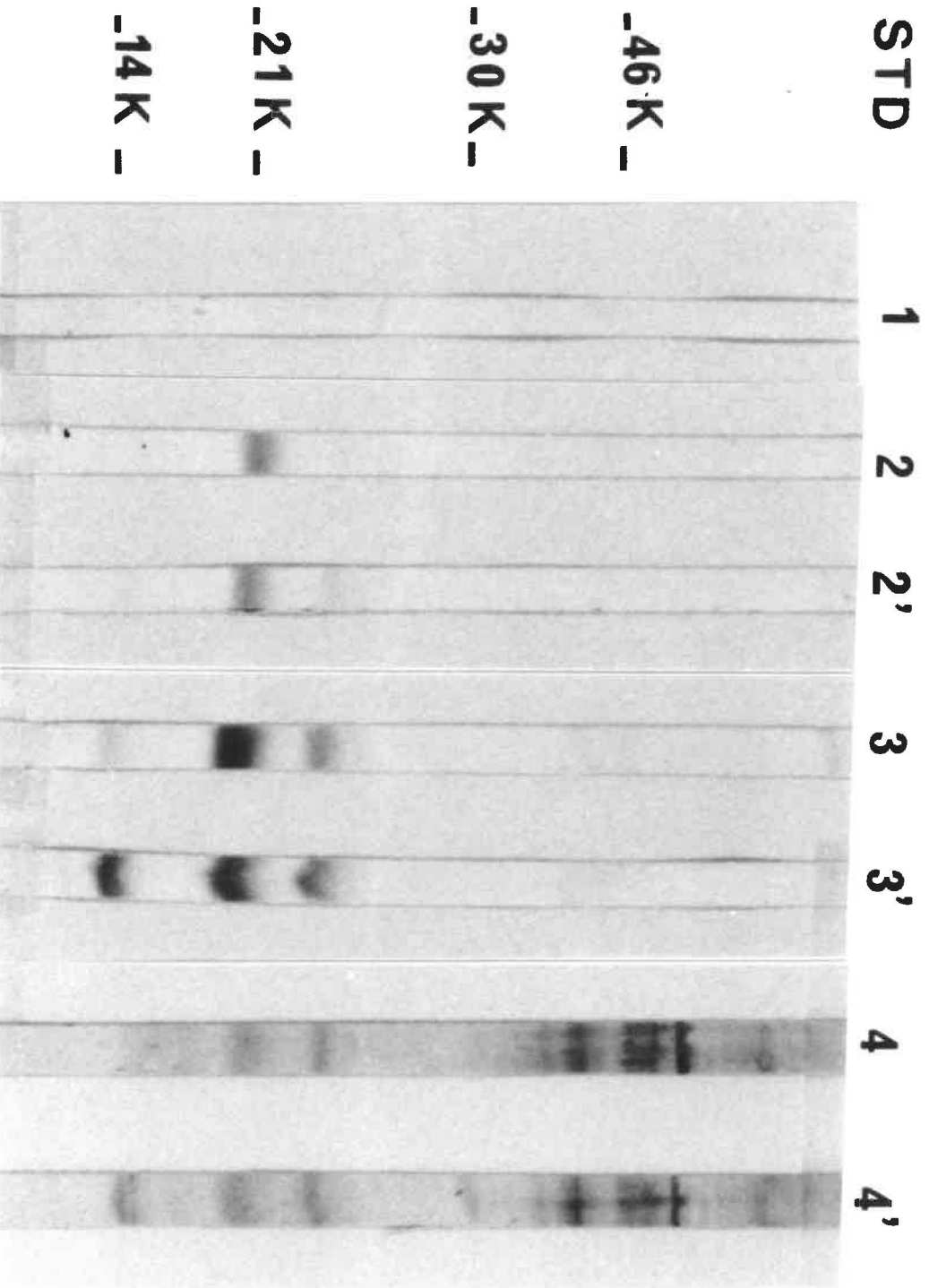
6.3.3. Identification de la spécificité polypeptidique des sérums hyperimmuns

Les résultats des analyses d'immunobuvardage ayant permis de déterminer la spécificité polypeptidique de la réponse immunitaire humorale des porcs hyperimmunisés contre la souche IAF-Klop sont illustrés dans la figure 15. Les résultats obtenus montrent que les anticorps dirigés contre les trois protéines structurales du virus n'ont pas pu être détectés au cours des 4 premières semaines chez les animaux inoculés avec le virus purifié sur gradients de densité de saccharose. Chez ces animaux, les anticorps produits contre la protéine de la matrice M ont été observés à partir du jour 30 PI, tandis que ceux dirigés contre la protéine de la nucléocapside N d'une part et ceux dirigés contre la protéine d'enveloppe E d'autre part n'ont été détectés qu'à partir du jour 62 post-exposition. Chez les animaux ayant été inoculés avec du surnageant de culture de cellules MARC-145 infectées avec la souche IAF-Klop, les résultats ont été similaires. Aucune réactivité n'a été observée avec le sérum de porc pré-immun.

**FIGURE 15. Spécificité polypeptidique des sérums de porcs
hyperimmunisés contre la souche IAF-Klop du virus du
SRRP**

Les protéines du virus purifié, séparées au préalable par SDS-PAGE et transférées électrophorétiquement sur membranes de nitrocellulose, ont été détectées par immunobuvardage avec les sérums de deux porcelets ayant reçu au moins 4 doses du virus (1×10^5 DECP₅₀) par voie intranasale à intervalle de 2 semaines. Les complexes immuns ont été révélés suite à une incubation en présence d'une préparation d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG porcin couplées à la phosphatase alcaline.

- 1 - Absence de réactivité vis-à-vis des protéines du virus du SRRP d'un sérum prélevé chez l'un des deux porcs avant leur immunisation.
- 2 et 2' - Réactivité vis-à-vis des protéines N et M du virus du SRRP des sérums prélevés au jour 30 PI.
- 3 et 3' - Réactivité vis-à-vis des protéines N, M et E du virus du SRRP des sérums prélevés au jour 62 PI.



6.3.4. Identification de la réactivité des anticorps à l'égard des protéines recombinantes

La réponse en anticorps développée par les porcelets hyperimmunisés a également été étudiée par immunobuvardage en utilisant les protéines recombinantes du virus exprimées chez *E. coli*. Les résultats obtenus (Fig.16) montrent que les anticorps développés contre la protéine N de la nucléocapside codée par l'ORF7, la protéine M codée par l'ORF6, la protéine E. codée par l'ORF5 et le produit de l'ORF4, ont tous été détectés à partir du jour 30 après exposition chez les animaux inoculés avec le virus pur. Ces anticorps ont persisté jusqu'à la fin de la période d'observation de 88 jours. Aucune réactivité n'a été observée avec les protéines MBP et GST.

6.4. SUIVI D'UNE EXPÉRIENCE DE CO-INFECTIION PAR LE VIRUS DU SRRP ET LE VIRUS INFLUENZA PORCIN

L'objectif principal de cette expérience était de reproduire une infection mixte SRRP-Influenza, une situation ayant été souvent diagnostiquée chez les animaux d'élevages ayant expérimenté des épisodes du SRRP. Cette expérience devait permettre d'établir si la présence d'infections opportunistes intercourantes, en l'occurrence l'infection par le virus de l'Influenza, pouvait altérer ou tout au moins affecter la réponse immunitaire humorale des animaux contre le virus du SRRP.

FIGURE 16. Spécificité polypeptidique des sérums des porcs hyperimmunisés contre chacune des protéines recombinantes MBP-ORF4 (A), MBP-ORF7 (B), et MBP-ORF5 (C)

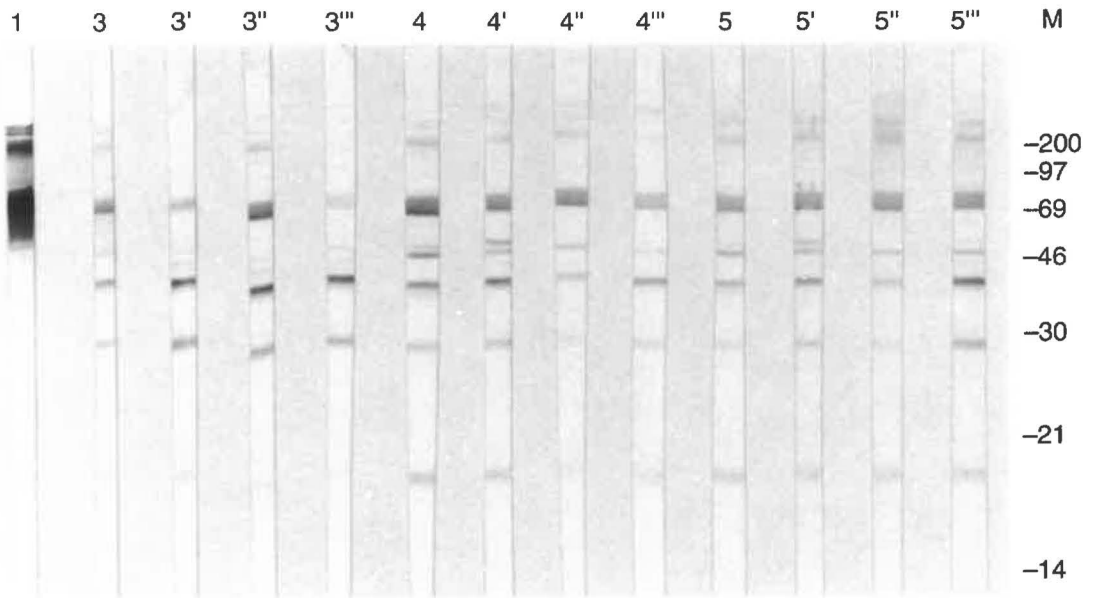
Après extraction du RNA génomique et amplification par RT-PCR des séquences correspondant aux cadres de lecture ORFs 4, 5, 6, et 7, les produits de la réaction RT-PCR purifiés, ont été clonés et exprimés dans les cellules bactériennes *E.coli*, ayant été transfectées par les vecteurs recombinants pMAL-C2 comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les protéines recombinantes MBP-ORF7, MBP-ORF5, MBP-ORF4 analysées par SDS-PAGE ont été détectées en immunobuvardage en utilisant les sérums des porcs Nos 457, 470, 471, et 472 hyperimmunisés. Les complexes immuns ont été révélés à l'aide d'une préparation d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG porcin couplées à la phosphatase alcaline.

Le sérum de lapin hyperimmun anti-MBP (lanière 1) a réagi positivement contre toutes les protéines de fusion, tandis qu'aucune réactivité n'a été notée pour le sérum de porc SPF récolté avant l'immunisation (lanière No2).

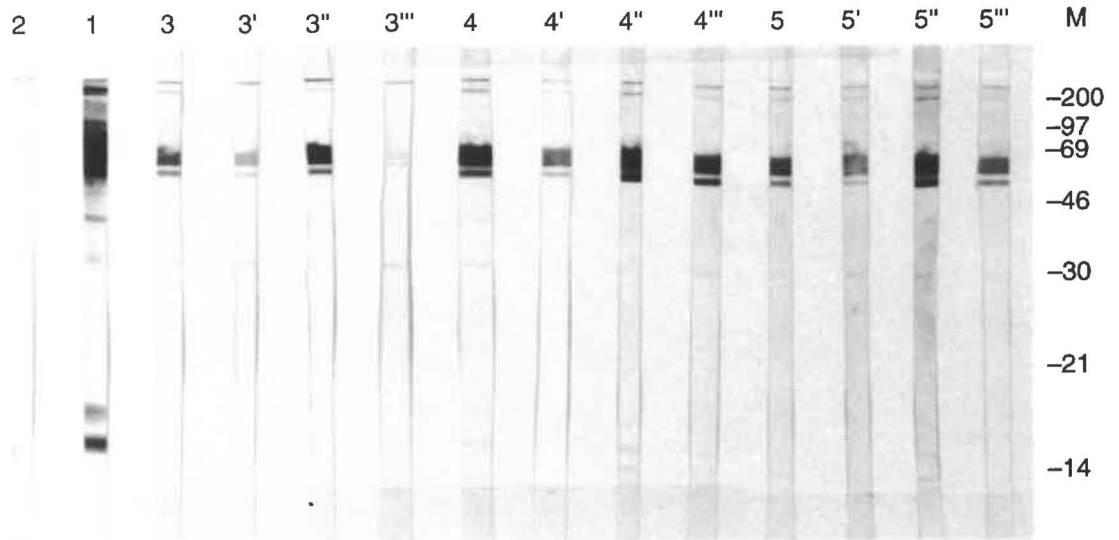
Les sérums de porcs hyperimmunisés ont été collectés au jour 30 PI (lanières 3, 3', 3'' et 3''' correspondant respectivement aux porcs 457, 470, 471, et 472), au jour 62 PI (lanières 4, 4', 4'' et 4''') et au jour 88 PI (lanières 5, 5', 5'' et 5'''). Aucune réactivité de ces sérums de porcs hyperimmunisés n'a été observée envers la MBP (D).

La position des marqueurs de poids moléculaires (M) est indiquée à droite.

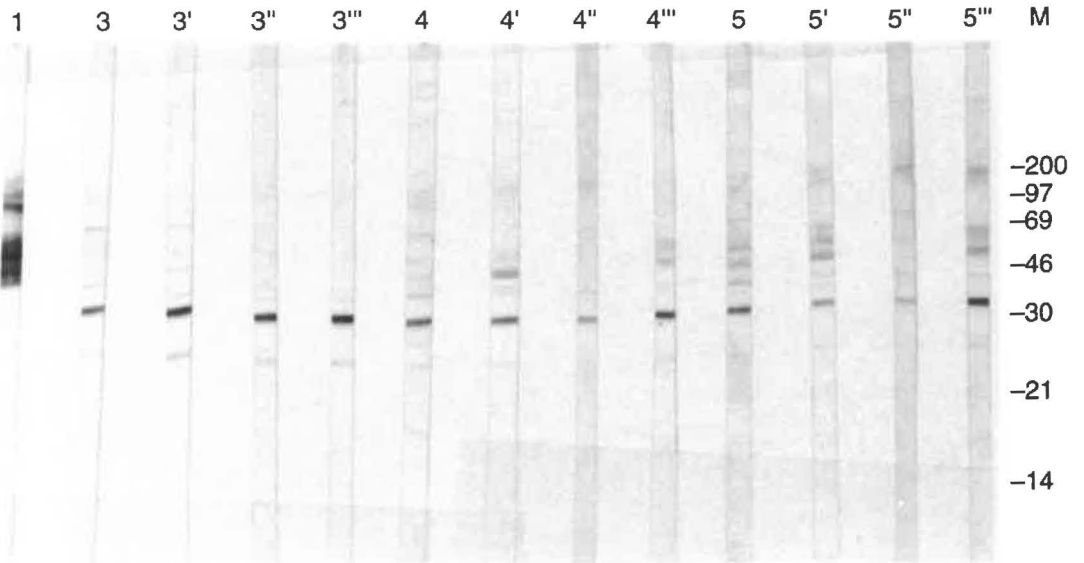
A)



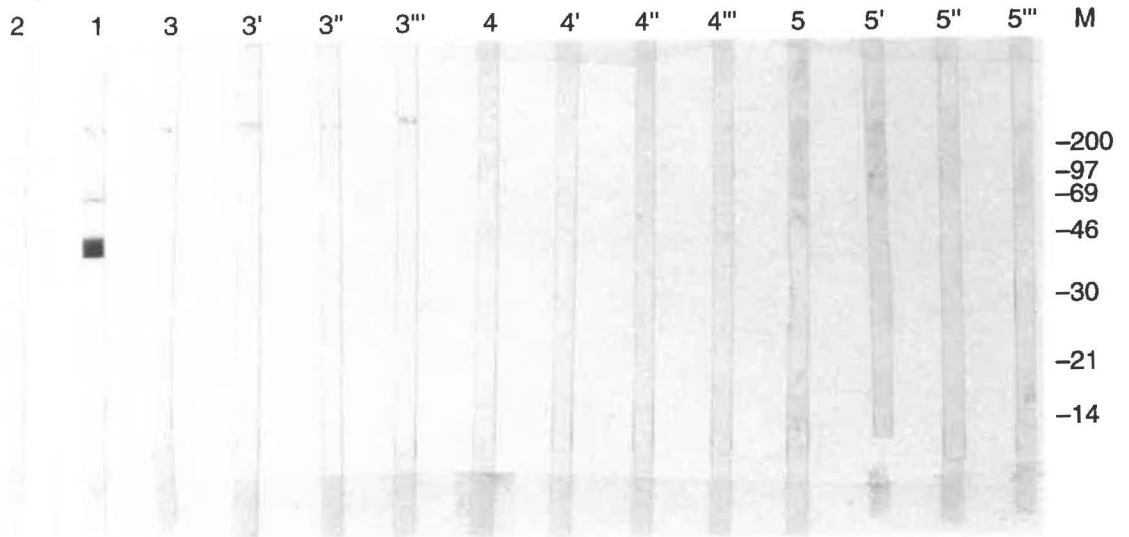
B)



C)



D)



6.4.1. Chronologie d'apparition des anticorps IgG

La cinétique de la réponse en anticorps IgG contre le virus du SRRP telle qu'établie par l'épreuve d'IFI des porcelets co-infectés expérimentalement par la souche IAF-Klop du virus du SRRP et la souche A/SW/IAF-5393/QC91(H1N1) du virus de l'influenza, est illustrée au tableau 8. Tous les porcelets infectés ont développé des anticorps contre le virus du SRRP. Les IgG spécifiques étaient détectables dès la fin de la deuxième semaine PI; les titres variaient de 20 à 320. Par la suite, les titres en IgG ont augmenté rapidement pour atteindre un plateau entre la troisième et la quatrième semaine de l'infection (titres de 160 à 640). Ces titres élevés ont persisté jusqu'à la fin de la période d'observation de 35 jours. Aucun porcelet du groupe témoin n'a développé d'anticorps IgG contre le virus du SRRP.

6.4.2. Évaluation des titres en anticorps neutralisants

Les titres en anticorps neutralisants contre le virus du SRRP ont été mis en évidence dans les sérums des porcelets co-infectés expérimentalement par la souche IAF-Klop du virus du SRRP et la souche A/SW/IAF-5393/QC91(H1N1) du virus Influenza. Les résultats des tests de séroneutralisation, tels qu'illustrés au Tableau 9, montrent que des titres relativement faibles en anticorps neutralisants n'ont commencé à être détectés chez les animaux infectés (titres de 8 à 16) que vers

la fin de la deuxième et au cours de la troisième semaine après exposition. Des titres sériques de 32 n'ont été observés qu'à partir du jour 21 ou parfois du jour 28 PI; ces titres ont persisté jusqu'à la fin de la période d'observation de 35 jours. Aucun des porcelets témoins n'a développé d'anticorps neutralisants contre le virus du SRRP.

6.5. SUIVI DE LA CINÉTIQUE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE PAR RADIO-IMMUNOPRÉCIPITATION

L'utilisation de la technique de RIPA a été jugée nécessaire afin de compléter les résultats relatifs à la spécificité polypeptidique des anticorps obtenus par immunobuvardage dans le cadre du suivi sérologique. Cette technique a permis d'établir la réactivité des sérums d'animaux infectés vis-à-vis des protéines virales non-dénaturées, préservant ainsi la conformation tridimensionnelle des déterminants antigéniques.

Les différents profils d'immunoprécipitation obtenus avec les sérums des porcs testés sont illustrés dans la figure 17. Dans le cas du porc 8984 de l'infection expérimentale avec dose intranasale unique, aucune réactivité envers les protéines virales n'a pu être démontrée avec le sérum prélevé au jour 6 PI. Pour le même porc, les protéines de la matrice (19 kDa) et de la nucléocapside (15 kDa) du virus étaient fortement reconnues par les sérums prélevés au jour 14; cette réactivité

TABLEAU 8 **Cinétique des titres d'anticorps IgG anti-SRRP détectés par IFI au cours d'une infection mixte SRRP-Influenza**

groupe d'animaux	No du porc	jours après infection						
		0	7	10	14	21	28	35
	6587	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Groupe	6000	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
témoin	6598	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	6580	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	6583	<10	<10	<10	20	640	160	80
Groupe	6585	<10	<10	<10	<10	160	160	640
infecté	6597	<10	<10	<10	320	80	640	640
	6582	<10	<10	<10	10	160	40	640

Les titres en anticorps IgG étaient estimés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique donnant une fluorescence cytoplasmique spécifique.

TABEAU 9 Cinétique d'apparition des anticorps neutralisants contre le virus du SRRP au cours d'une infection mixte SRRP-Influenza

Groupe d'animaux	No du Porc	jours après infection						
		0	7	10	14	21	28	35
	6587	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
Groupe témoin	6000	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	6598	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	6580	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	6583	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
	6585	<8	<8	<8	<8	8-16	<8	<8
Groupe infecté	6597	<8	<8	<8	<8	<8	16-32	<8
	6582	<8	<8	<8	<8	16-32	8-16	16-32

Les titres en anticorps neutralisants ont été estimés selon la réciproque de la plus haute dilution sérique neutralisant l'effet cytopathique induit dans les cultures de cellules MARC-145 par une dose constante de 100 DECP₅₀ du virus du SRRP.

envers ces deux protéines a persisté jusqu'à la fin de la période d'observation (jour 42 PI). Les protéines de la matrice M et de la nucléocapside N étaient également reconnues par les sérums prélevés aux jours 14 et 28 PI chez le porc No33 de l'expérience sentinelle. Pour ce même porcelet, il n'a été possible de mettre en évidence une réactivité contre la glycoprotéine d'enveloppe E qu'à partir du jour 28 PI. Paradoxalement, le sérum du porc 92007 hyperimmunisé contre le virus du SRRP a montré une réactivité intense contre les trois protéines structurales du virus. Aucune réactivité spécifique n'a été démontrée vis-à-vis des protéines des cellules MARC-145 non-infectées par le virus du SRRP.

7. SUIVI DE LA VIRÉMIE

Le suivi virologique de l'infection par le virus du SRRP figurait parmi les objectifs principaux de ce travail de recherche. Ce suivi a été entrepris en parallèle avec le suivi sérologique pour pouvoir établir une relation, voire même une corrélation, entre la réponse spécifique en anticorps des porcelets infectés et les différents niveaux de fluctuation de la virémie pouvant être observés au cours de l'infection par le virus du SRRP.

7.1. ISOLEMENT DU VIRUS ET IDENTIFICATION SÉROLOGIQUE

L'adaptation du virus du SRRP sur la lignée cellulaire continue MARC-145 a rendu relativement facile son isolement.

FIGURE 17. Spécificité polypeptidique des sérums de porcs infectés par le virus du SRRP telle que déterminée par radioimmunoprécipitation

Les particules virales extracellulaires, présentes dans les surnageants de culture des cellules MARC-145 infectées par la souche IAF-Klop du virus du SRRP en présence de méthionine ^{35}S , ont été concentrées par ultracentrifugation à travers un coussin de 30% de saccharose. Des aliquots (100 μl) de la suspension virale concentrée ont été incubés en présence des sérums du porc No33 de l'étude cohorte sentinelle, du porc No84 de la reproduction expérimentale avec dose virale intranasale unique et du sérum du porc hyperimmunisé No92007. Les complexes immuns ont été adsorbés sur la protéine G et après solubilisation, ils ont été analysés par SDS-PAGE et révélés par fluorographie.

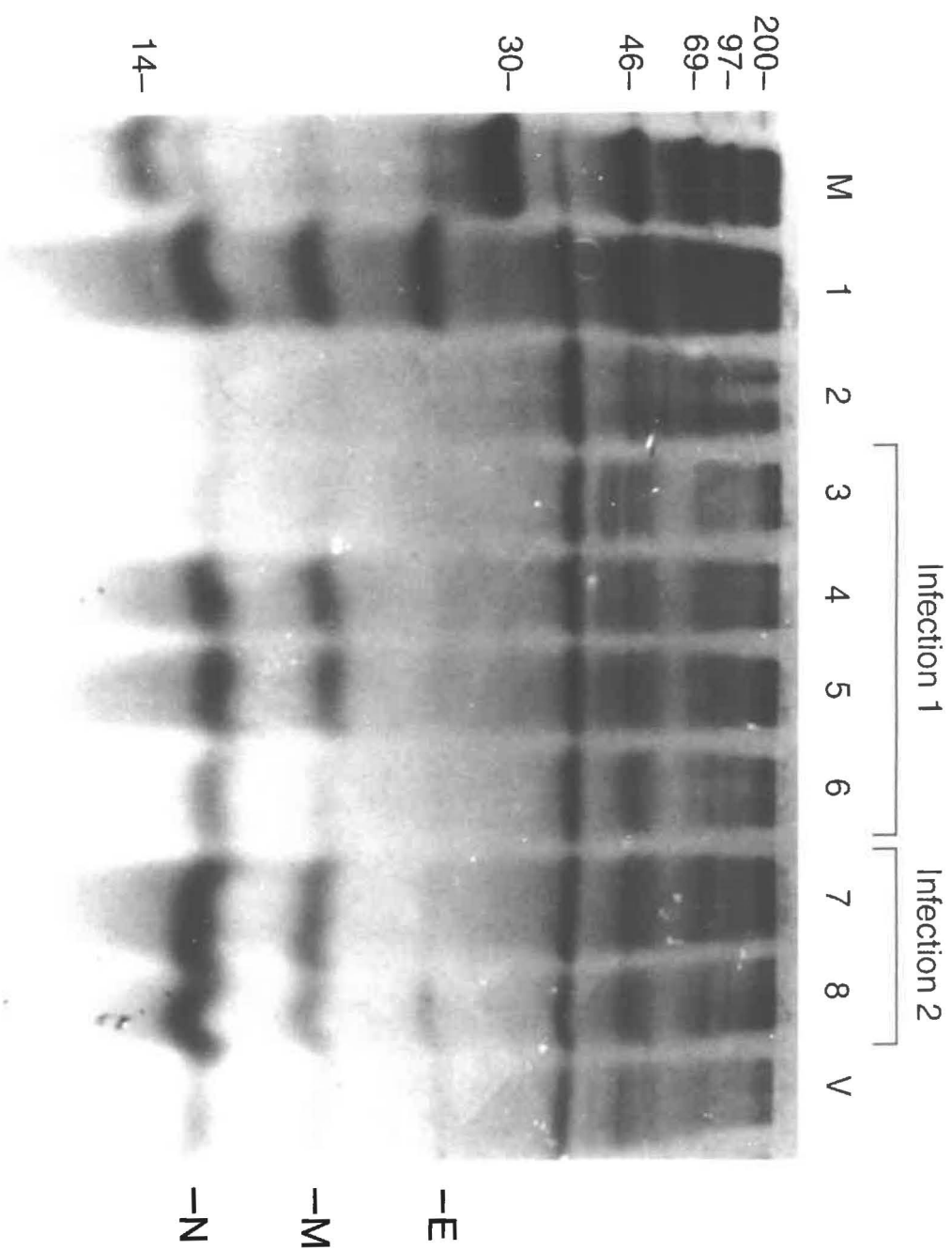
Les chiffres à gauche indiquent la position des marqueurs de poids moléculaires (M) radiomarqués au ^{14}C .

1- Profil d'immunoprécipitation obtenu pour le sérum de porc hyperimmun anti-SRRP (porc No92007).

2- Lysat de cellules non-infectées.

3, 4, et 5- Profils d'immunoprécipitation obtenus pour les sérums du porc No84 prélevés aux jours 6, 14, et 21 PI, respectivement.

14' et 28'- Profils d'immunoprécipitation obtenus pour les sérums du porc No33 prélevés aux jours 14 et 28 PI, respectivement.



Cet isolement était basé sur l'apparition d'un effet cytopathique, induit par le virus dans les cultures de cellules MARC-145, et visible au microscope optique à partir de 72 heures après l'infection. L'identification finale du virus dans les différents échantillons sériques a pu être confirmée sérologiquement par IFI, utilisant l'anticorps monoclonal SDOW17 dirigé contre un déterminant majeur de la nucléocapside du virus.

7.1.1. Évaluation de la virémie au cours de l'expérience cohorte sentinelle

Au cours de l'infection cohorte sentinelle, le virus du SRRP a pu être isolé dès le 7ième jour après exposition, à partir des échantillons sériques récoltés chez les porcelets sentinelles mis en contact avec les animaux infectés. L'isolement du virus à partir des sérums des animaux infectés étaient ensuite possible jusqu'à la fin de la période d'observation de 35 jours. Un seul des cinq porcelets exposés à la maladie est demeuré avirémique du début jusqu'à la fin de l'expérience, de même que tous les porcelets témoins.

7.1.2. Évaluation de la virémie au cours de l'infection expérimentale avec dose unique intranasale

Tous les porcelets infectés au cours de l'infection expérimentale avec dose virale intranasale unique ont développé une virémie détectable dès la deuxième semaine après exposition. Le virus a été isolé vers la fin de la première semaine après exposition jusqu'à la fin de la période d'observation de 63 jours (Fig.13). Aux jours 35 et 49 de l'infection, le virus n'a pas pu être isolé que chez deux des trois porcelets infectés, bien que tous les porcelets aient été virémiques aux jours 42 et 63 de l'infection. Deux pics de virémie ont donc été déterminés chez les animaux infectés. Le virus n'a pas pu être isolé à partir des échantillons sériques récoltés chez tous les porcelets témoins.

7.1.3. Évaluation de la virémie au cours de l'expérience de surinfection

Le virus du SRRP a pu être isolé dès le jour 7 PI à partir des sérums de 4 des 7 porcelets infectés au cours de l'expérience de surinfection avec la souche IAF-Klop du virus du SRRP. Ces porcelets sont demeurés virémiques jusqu'au jour 28 PI. À partir du jour 35 PI jusqu'à la fin de la période d'observation de 56 jours, le virus a été isolé avec intermittence chez seulement 2 des 7 porcelets infectés. Ensuite la virémie de ces deux porcelets était instable aux

jours 35, 42, 49 et 56 PI car le virus était en général isolé en moyenne 1 semaine sur deux. Aucune détection virale n'a pu être possible chez tous les porcelets du groupe témoin.

7.2. DÉTECTION DU GÉNOME VIRAL PAR LA TECHNIQUE D'AMPLIFICATION ENZYMATIQUE

Quelques échantillons sériques provenant des diverses infections expérimentales, déjà utilisés pour l'isolement viral et dont les résultats d'analyses virologiques étaient connus, ont été utilisés pour évaluer l'efficacité de la technique d'amplification pour la détection du génome viral.

7.2.1. Sensibilité et spécificité de la technique RT-PCR pour la détection du génome viral à partir du sérum

Afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité de la technique RT-PCR, des dilutions croissantes d'une suspension virale ont été réalisées dans du sérum de porc SPF. Ces spécimens ont été par la suite traités pour l'extraction du génome. Pour la réaction RT-PCR, les paires d'amorces 1008 sens et 1009 anti-sens, dites universelles étant donné leur capacité à permettre l'amplification de l'ORF7 des souches nord-américaines et européennes du virus du SRRP, ont été utilisées. Les résultats obtenus montrent que des copies du génome viral ont pu être détectées à partir du sérum contenant un peu moins de 1000 DECP₅₀ du virus du SRRP (Fig.18). L'intensité du signal d'amplification obtenu était d'autant plus fort que la dilution

FIGURE 18. Sensibilité de la technique RT-PCR pour la détection du génome du virus du SRRP à partir du sérum

Des dilutions décimales croissantes de la souche IAF-Klop préparées dans du sérum de porc SPF ont été réalisées, puis utilisées pour l'extraction de l'ARN génomique. Les réactions de transcription inverse et de polymérisation en chaîne ont été réalisées en utilisant une paire d'amorces oligonucléotidiques spécifiques à la séquence codant pour la protéine de la nucléocapside (Mardassi et al, 1994). Les produits amplifiés ont été analysés après migration sur gel d'agarose et colorés au bromure d'éthidium.

M- Marqueurs de poids moléculaires en nombres de paires de bases.

1- Puits correspondant au produit d'amplification à partir d'un sérum de porc SPF.

2- Puits correspondant au produit d'amplification à partir d'une suspension du virus IAF-Klop purifié, diluée 1/25 dans du sérum de porc SPF.

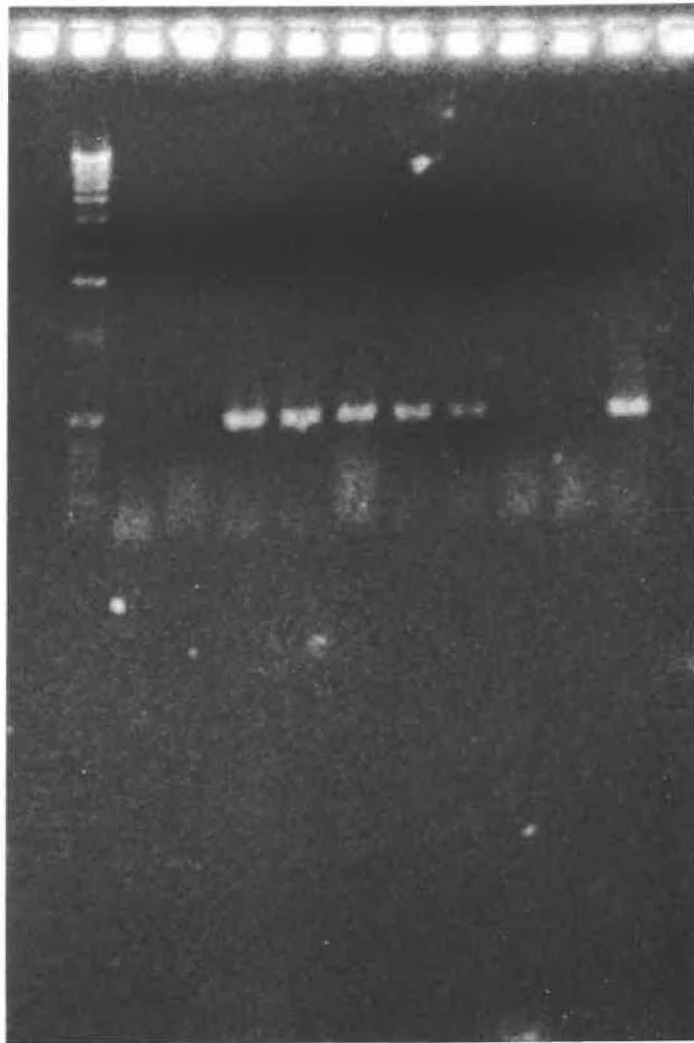
3, 4, 5, 6 et 7- Fragments génomiques amplifiés à partir de sérums infectés par différentes dilutions de la souche IAF-Klop du virus du SRRP, correspondant à des doses de 10000 DECP₅₀ (4), 1000 DECP₅₀ (5) et 100 DECP₅₀ (6), 10 DECP₅₀ (7) et 1 DECP₅₀ (8).

8 et 9- puits sans échantillons.

10- Fragment amplifié à partir de l'ARN génomique de la souche IAF-Klop.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1,636—
1,018—
0,506—



du virus était plus faible. Aucun fragment génomique n'a été amplifié à partir de sérum négatif.

7.2.2. Amplification par RT-PCR

Tel que démontré dans la figure 19a, des fragments génomiques bien visibles après migration sur gel d'agarose et dont les longueurs correspondaient à la longueur attendue (506 pb), ont été amplifiées enzymatiquement à partir des préparations d'ARN extraites de virus purifié. Toutefois, des signaux beaucoup moins intenses, mais quand même visibles, ont été révélés à partir des sérums du porc 8983 de l'expérience d'infection à dose virale (1×10^5 DECP₅₀) unique récoltés aux jours 14 à 42 PI. Aucune bande n'a été démontrée dans le puits correspondant au sérum de porc SPF (Fig.19a).

7.2.3. Révélation de la présence du génome viral par hybridation moléculaire

Le niveau de détection du génome du virus du SRRP, après amplification enzymatique à partir d'échantillons sériques, était très sensiblement augmenté à l'issue de l'épreuve d'hybridation moléculaire (Fig.19b). Dans le cas des sérums auxquels avaient été ajoutées des dilutions connues de virus, la sensibilité de la détection était augmentée de près d'un facteur de 10. La détection des copies du génome viral, à partir des sérums des animaux infectés dans le cadre de l'expérience de reproduction expérimentale de la maladie avec

une dose virale intranasale unique, était aussi accentuée (Fig.19b). En effet, en dehors des fragments précédemment visibles sur gel d'agarose (Fig.19a), la virémie avait pu être confirmée par PCR à partir des sérums prélevés de J14 à J42 PI avec un seuil de détection évalué à environ 5 DECP₅₀ de virus par 100 ml. Dans le cas des sérums récoltés aux jours 28 et 35 PI, il n'avait pas été possible de révéler par RT-PCR la présence du génome viral dans les sérums des animaux infectés. Aucun fragment d'amplification à partir du sérum porcin pré-immun n'a pu être détecté.

FIGURE 19. Détection du génome du virus du SRRP dans le sérum des animaux infectés à l'aide des techniques de RT-PCR et d'hybridation moléculaire

A- Amplification du génome par la technique RT-PCR.

L'extraction de l'ARN génomique a été réalisée selon la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (1987) à partir des sérums de porcs infectés expérimentalement. Les réactions de transcription inverse et de polymérisation en chaîne ont été réalisées telle que décrit dans la méthodologie en utilisant les amorces spécifiques 1009PR et 1009PS permettant l'amplification du gène (ORF7) codant la protéine N de la nucléocapside du virus du SRRP. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et colorés au bromure d'éthidium

. B- Confirmation de la spécificité des fragments amplifiés par hybridation moléculaire. Après coloration au bromure d'éthidium, le gel d'agarose contenant les fragments du génome viral amplifié, a été déposé dans la solution de dénaturation puis dans celle de neutralisation. L'ADN transféré par capillarité sur une membrane de nylon a été fixé par brève exposition de la membrane au rayonnement ultraviolet. La membrane a par la suite été déposée successivement dans les solutions de préhybridation et d'hybridation. La révélation de la réaction d'hybridation a été faite par chémiluminescence.

1- ARN génomique de la souche IAF-Klop du virus du SRRP.

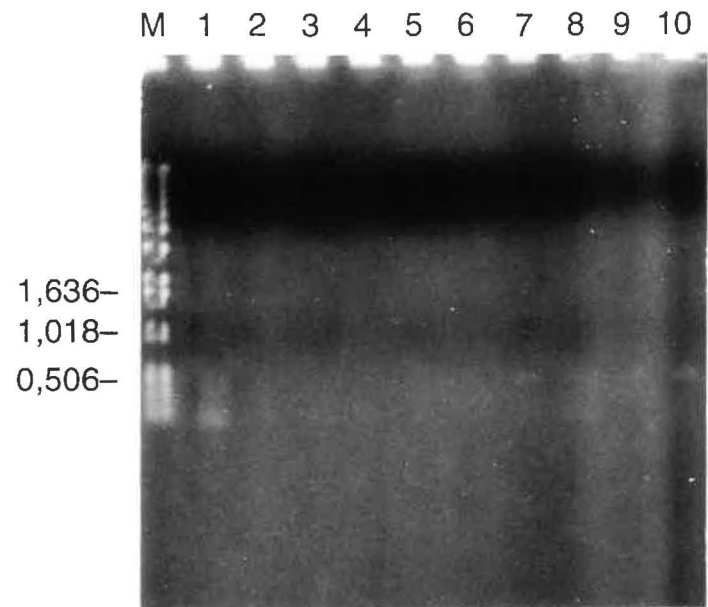
2- Sérum de porc SPF

3 à 7- Sérums du porc No83 récoltés respectivement aux jours 14, 21, 28, 35 et 42 PI.

8 à 10- sérums contenant respectivement 10^2 (8), 10^3 (9) et 10^4 (10) DECP₅₀ de la souche IAF-Klop dans du sérum.

Les chiffres à gauche indiquent la position des marqueurs de poids moléculaires (M) en kb.

A)



B)



DISCUSSION

1. CARACTÉRISTIQUES DU VIRUS DU SRRP

Dans la présente étude, la caractérisation du virus du SRRP et sa production en quantité suffisante pour la réalisation des différents essais de reproduction expérimentale était une étape préliminaire pour la suite des travaux.

Deux souches québécoises de référence du virus du SRRP (IAF-exp91 et IAF-Klop), propagées initialement sur cultures primaires de macrophages alvéolaires, ont été utilisées dans les différentes reproductions expérimentales. Toutefois, la souche IAF-Klop a été préférée comme source d'antigène dans les différents tests sérologiques étant donné son adaptation avec succès sur la lignée cellulaire MARC-145, développée à partir de clones des cellules MA104 dérivées du cortex rénal de singe cercopithèque (Collins et al., 1992; Kim et al., 1993). Au contraire, malgré plusieurs essais, il nous a été impossible d'adapter la souche IAF-exp91 sur cette lignée cellulaire. Ceci confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs comme quoi plusieurs souches isolées de cas cliniques ne peuvent être propagées sur cette lignée cellulaire continue, leur tropisme étant restreint aux macrophages alvéolaires (Bautista et al., 1993). C'est le cas notamment pour plusieurs souches européennes du virus (Albina et al., 1992a; Wensvoort et al., 1992b; Goyal, 1993). Contrairement aux macrophages alvéolaires dont la récolte est délicate et dont l'utilisation à grande échelle est très onéreuse, la lignée cellulaire MARC-145 a

donné la possibilité de produire de grands stocks du virus, nécessaires à la réalisation des infections expérimentales et des épreuves sérologiques. En outre, la lignée MARC-145 a offert l'avantage d'éliminer de nombreux cas de faux-positifs qui pourraient être attribuables à la réactivité non spécifique de certains sérums envers les macrophages alvéolaires prélevés chez d'autres animaux.

Les expériences de propagation de la souche IAF-Klop du virus du SRRP effectuées sur les cultures de cellules MARC-145 se sont avérées satisfaisantes dans la plupart du temps, la croissance du virus ayant été à certains moments instable. Néanmoins, tel que rapporté par d'autres auteurs, la vitesse de croissance du virus dépendait de plusieurs facteurs parmi lesquels, le nombre de passages cellulaires effectués avant l'infection, le titre initial de la suspension virale utilisée, le pH du milieu de culture, la présence de CO₂ dans l'atmosphère, la température et la durée d'incubation (Bautista et al., 1993; Kim et al., 1993; Van Alstine et al., 1993b; Bloemraad et al., 1994). Sur cultures primaires de macrophages alvéolaires, l'effet cytopathique induit par l'une ou l'autre des deux souches virales était observé au bout de 2 à 4 jours, en accord avec les observations antérieures (Benfield et al., 1992c; Dea et al., 1992b; Wensvoort et al., 1992b; Van alstine et al., 1993b). L'effet cytopathique induit sur cellules MARC-145 par la souche IAF-Klop apparaissait un peu plus tardivement

que sur macrophages alvéolaires, ce qui concorde aussi avec les observations d'autres auteurs (Kim et al., 1993; Yoon et al., 1993). Bien que la souche IAF-Klop se soit avérée hautement cytopathogène, elle ne produisait que des titres très faibles variant entre $10^{3,5}$ DECP₅₀/0,1ml et $10^{4,7}$ DECP₅₀/0,1ml, une situation ayant été observée pour plusieurs isolats adaptés sur cellules MARC-145 (Kim et al., 1993; Yoon et al., 1993).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux, dirigés contre la protéine de la nucléocapside N de la souche de référence américaine ATCC-2332, a permis de confirmer l'identité sérologique des deux isolats québécois par la technique d'immunofluorescence indirecte. Des foyers de cellules démontrant une fluorescence cytoplasmique ont été observées dans les cultures cellulaires infectées. L'examen en microscopie électronique de coupes minces, a permis de mettre en évidence la présence de particules virales enveloppées ayant tendance à s'accumuler dans la lumière des vésicules cytoplasmiques cellulaires. Les particules virales extracellulaires présentaient les caractéristiques des virus de la famille *Togaviridae*, tel que rapporté pour les souches du virus isolées en Europe et aux États Unis (Wensvoort et al., 1991b; Benfield et al., 1992c; Christianson et al., 1992b; Collins et al., 1992; Dea et al., 1992b). Les particules étaient plutôt sphériques, enveloppées et possédaient une nucléocapside centrale icosahédrique. L'utilisation de la

technique d'immunomarquage à la protéine A - or colloïdal avec des sérums hyperimmuns homologues, a permis de confirmer la spécificité de ces sérums, aucune réactivité n'ayant été démontrée avec d'autres virus comme le coronavirus bovin, le virus de l'encéphalomyocardite du porc, la souche H1N1 du virus de l'influenza porcine. Les valeurs de densité de flottaison déterminées après centrifugation isopycniqne sur gradients de densité de saccharose et de chlorure de césium étaient tout à fait en relation avec celles qui ont été rapportées (Ohlinger et al., 1991; Wensvoort et al., 1991b; Benfield et al., 1992c). Par ailleurs, l'étude de la structure polypeptidique du virus a permis de mettre en évidence les trois protéines structurales majeures décrites pour le virus du SRRP, à savoir la glycoprotéine E d'enveloppe de 24-26 kDa, la protéine M de la matrice de 19 kDa et la protéine N de la nucléocapside de 15 kDa (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, 1995; Nelson et al., 1993b, 1994; Mardassi et al., 1994a, 1995). En définitive, les résultats obtenus au cours des travaux préliminaires sur la croissance et la propagation des deux isolats québécois en cultures cellulaires, sur la réactivité des sérums hyperimmuns spécifiques envers ces isolats et sur leurs caractéristiques biochimiques, sont en accord avec les résultats des travaux de chercheurs américains et européens (Ohlinger et al., 1991; Wensvoort et al., 1991b; Benfield et al., 1992c; Christianson et al., 1992; Collins et al., 1992; Dea et al., 1992b).

2. ÉTUDE DE LA PERSISTENCE DE L'INFECTION PAR LE VIRUS DU SRRP

Il était indispensable de réaliser une étude de la virémie chez les porcelets infectés expérimentalement afin de pouvoir analyser les résultats obtenus au cours des suivis sérologiques de l'infection. À la lumière des résultats des tests virologiques réalisés, il apparaît que les animaux infectés peuvent développer une virémie très peu de temps après le début de l'infection. En effet, il a été possible d'isoler le virus à partir du sérum dès la fin de la première semaine PI chez les porcelets de la cohorte sentinelle, sauf chez un seul porcelet qui est resté avirémique. Par ailleurs, chez les porcelets infectés avec une dose virale intranasale unique, le virus n'a pu être détecté qu'à partir de la fin de la deuxième semaine d'infection (jour 14 PI). Cette virémie a par la suite persisté chez la plupart des porcelets infectés jusqu'à la fin de la période d'observation qui a duré plus de 3 mois dans le cas d'une des infections expérimentales. Ces observations sont en accord avec celles d'autres auteurs qui ont montré que le virus du SRRP pouvait persister pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois, chez les porcs infectés, nonobstant des titres relativement élevés en anticorps circulants (Albina et al., 1993; Bautista et al., 1993; Yoon et al., 1993; Mengeling et al., 1995). Certaines études ont aussi fait état de l'isolement du virus à partir des sérums de porcelets sevrés issus de fermes n'ayant pas connu d'épisodes cliniques depuis plus de 24

à 60 mois, démontrant ainsi la ténacité du virus du SRRP à persister dans les élevages malgré une réponse immunitaire humorale significative chez la plupart des sujets testés (Christianson et al., 1992b; Goyal, 1993; Zeman et al., 1993; Bilodeau et al., 1994).

D'autre part, certains des porcelets de l'expérience de surinfection ont développé une virémie très instable, l'isolement viral n'ayant été possible chez les différents porcelets que de façon irrégulière. Chez quelques uns de ces porcelets, il n'a pas été possible de détecter le virus. Il semble que pour la majorité des porcelets surinfectés la virémie n'ait été que très brève, d'où il est probable que leur réponse immunitaire face au virus du SRRP était plus efficace dans l'élimination du virus de la circulation que dans le cas des deux autres infections expérimentales (étude cohorte et infection à dose unique). Dans ce cas, il faut considérer que le porcelet, demeuré avirémique en dépit de l'exposition au virus au cours de l'infection cohorte sentinelle, n'a tout simplement pas été contaminé. Il a été rapporté que la virémie est le plus souvent transitoire chez les porcs adultes et d'une durée d'environ deux semaines (Christianson et al., 1992b, 1993). De plus, les truies sont le plus souvent avirémiques lors de l'apparition des problèmes reproducteurs, surtout si l'infection est survenue au début du dernier tiers de la gestation (Goyal, 1993; Van Alstine et al., 1993a). Des

évidences cliniques et expérimentales indiquent aussi que les porcelets en croissance et les truies deviennent résistants à une réinfection avec le virus du SRRP (Beilage & Beilage, 1992; Benfield et al., 1992a, 1992b; Christianson et al., 1992a). La source de cette immunité, cependant, reste inconnue.

L'isolement en cultures cellulaires du virus à partir du sérum a donné des résultats fiables sur le statut virémique des porcelets infectés. L'état virémique des porcs de l'infection à dose virale intranasale unique, révélé par les résultats des tests d'isolement du virus en cultures cellulaires, a été confirmé par les analyses effectuées avec la technique RT-PCR. Il a été rapporté que le virus du SRRP pouvait être isolé à partir des tissus pulmonaires, du plasma, du sérum et des cellules sanguines pendant plusieurs semaines (Ohlinger et al., 1992b; Paton et al., 1992; Nelson et al., 1994; Mengeling et al., 1995). Le sérum est même considéré par certains auteurs comme étant le meilleur échantillon clinique devant être soumis pour l'isolement du virus du SRRP (Benfield et al., 1992b, 1994; Van Alstine et al., 1993a; Hill, 1994). Par ailleurs, l'amplification du génome viral par RT-PCR, associée à la révélation des fragments amplifiés par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde moléculaire spécifique, s'est avérée une méthode très spécifique. Des signaux d'hybridation relativement forts ont été obtenus avec les sérums porcins collectés aux jours 14, 21 et 42 PI de l'infection expérimentale avec dose

virale intranasale unique, confirmant ainsi la virémie persistante révélée par les tests d'isolement viral. De plus, la technique RT-PCR, couplée à l'hybridation moléculaire, s'est avérée une méthode très sensible pour la détection du génome viral à partir du sérum. Le seuil de détection de la technique a été évaluée à environ 5 DECP₅₀ de virus par 100ml de sérum. Ces résultats confirment les résultats récemment observés par Christopher-Hennings et al. (1995).

La faible intensité des fragments d'ADN obtenus sur gel d'agarose après amplification par RT-PCR est probablement due à une dégradation enzymatique partielle de l'acide nucléique virale au cours de son extraction à partir du sérum. D'autre part, une bonne portion de l'acide ribonucléique d'origine cellulaire peut avoir été extraite en même temps que l'ARN viral. Effectivement, il a été démontré précédemment qu'une quantité excessive d'ARN cellulaire peut inhiber l'amplification enzymatique des gènes viraux en interférant principalement au cours de l'étape de la transcription inverse.

3. ÉVALUATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE HUMORALE CONTRE LE VIRUS DU SRRP

La présente étude avait pour principal objectif d'évaluer la réponse immunitaire humorale vis-à-vis du virus du SRRP. Une meilleure connaissance de la réponse immunitaire était nécessaire pour permettre de mieux cibler les antigènes du

virus induisant une réponse protectrice. La pathogénicité des souches virales utilisées dans cette étude ayant pu être préservée au cours des différents passages sur cultures cellulaires, il a été possible de reproduire expérimentalement la maladie chez des porcelets. Ces expériences ont permis d'obtenir plusieurs échantillons sériques nécessaires au suivi du statut sérologique des animaux. D'après les résultats obtenus lors de ces différents essais de reproduction expérimentale, les souches propagées en cultures cellulaires étaient toujours virulentes puisque tous les porcelets exposés au virus ont présenté des signes cliniques pouvant être associés au SRRP (Bilodeau et al., 1991, 1994; Paton et al., 1991a; Collins et al., 1992; Dea et al., 1992a, 1992b; Wensvoort et al., 1992b; Rossow et al., 1994). Lors de la nécropsie des porcelets infectés, les principales lésions macroscopiques observées étaient confinées au niveau des poumons; ces derniers présentaient un aspect d'hépatisation de certains lobes, surtout au niveau des parties ventrales médianes et caudales, accompagné d'une hypertrophie des ganglions médiastinaux et d'une légère cardiomégalie avec de petits foyers hémorragiques très circonscrits sur la surface du myocarde. Aucune lésion macroscopique ne fut retrouvée dans d'autres organes. Ces observations rejoignent en grande partie celles déjà rapportées par certains auteurs (Pol et al., 1991a, 1991b; Collins et al., 1992; Dea et al., 1992b; Bilodeau et al., 1994; Rossow et al., 1994). Sur le plan microscopique, les

lésions observées étaient caractéristiques de la pneumonie interstitielle avec une infiltration massive lympho-monocytaire des septa alvéolaires et des espaces périvasculaires, telle que décrite dans le cas des poumons de porcs infectés de façon naturelle (Pol et al., 1991a; Collins et al., 1992; Magar et al., 1993; Bilodeau et al., 1994; Halbur et al., 1994b; Rossow et al., 1994). Par contre, la formation de cellules géantes multinucléées dans les poumons, décrite par certains auteurs (Halbur et al., 1994b; Magar et al., 1993), de même que les lésions caractéristiques de la pneumonie proliférative et nécrosante notée par d'autres (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992c; Desrosiers et al., 1994; Laroche et al., 1994), n'ont pas été observées chez les porcelets nécropsiés. D'autre part, des lésions de myocardite associées à une cardiomégalie et une polyadénopathie ont déjà été rapportées dans certaines études (Collins et al., 1992; Halbur et al., 1994b; Rossow et al., 1994). Il semble qu'il y ait quelques variations dans la sévérité et les types de lésions histopathologiques, ce qui pourrait probablement être une indication d'une variation du degré de virulence parmi les diverses souches du virus du SRRP. Cette observation a aussi été faite par d'autres auteurs (Albina et al., 1993; Bautista et al., 1993; Halbur et al., 1994b; Mardassi et al., 1994).

La réponse immunitaire humorale des porcs infectés par le virus du SRRP a été l'objet de plusieurs investigations et les

informations obtenues sont jusqu'à présent fragmentaires. Il a été rapporté que les anticorps dirigés contre le virus du SRRP, détectés par des méthodes immunohistochimiques telles que l'immunofluorescence indirecte (IFI) et l'immunopéroxydase, apparaissent généralement dès la fin de la première semaine d'infection (Ohlinger et al., 1991a; Wensvoort et al., 1991b; Frey et al., 1992; Yoon et al., 1992; Mengeling et al., 1995). Plus récemment, il a été rapporté que les anticorps IgG ne sont détectables qu' à partir de 14 à 21 jours PI par IFI et que les titres élevés en IgG peuvent persister jusqu'au 170ième jour PI (Nelson et al., 1994); dans cette même étude, les titres en anticorps IgG avaient augmenté rapidement pour atteindre un plateau vers le 31ième jour PI. Chez des animaux infectés avec une autre souche du virus, Yoon et al. (1992) avaient démontré que les anticorps IgG pouvaient être détectés en IFI à partir du 7ième et du 9ième jour PI, les titres maximums étaient déterminés entre le 11ième et le 21ième jour PI.

Dans la présente étude, les anticorps IgG au cours de l'infection cohorte ont été dans la plupart des cas détectés dès le 7ième jour après exposition (titres de 16 à 32), tandis qu'au cours de l'infection expérimentale avec dose virale intranasale unique, les IgG ont été révélés dès le 6ième jour PI (titre 64). Par la suite, les titres en anticorps IgG augmentaient très rapidement pour atteindre un seuil maximal dès le 21ième jour PI (titres de 512 à 2048). Dans l'étude

"cohorte-sentinelle", les IgG n'ont été détectés par IFI qu'au 14^{ième} jour PI chez deux des cinq porcelets exposés (titre 128); pour l'un de ces deux porcelets, le pic des titres en IgG n'a été obtenu qu'au 28^{ième} jour PI (titre de 1024). La cinétique des anticorps IgG observée chez ces deux porcelets est pratiquement en retard d'une semaine par rapport à celle des autres porcs exposés en même temps à la maladie. En ce qui concerne l'infection mixte SRRP-influenza, les IgG ont été révélés à partir du jour 14 PI (titres de 20 à 320) et les valeurs maximales ont aussi été obtenues à partir du jour 21 PI (titres de 160 à 640). Ces observations sur la chronologie d'apparition des anticorps IgG sont dans l'ensemble en accord avec celles qui ont été faites par d'autres auteurs (Yoon et al., 1992; Nelson et al., 1994; Mengeling et al., 1995). En fait, les IgG sont généralement détectables dans la période débutant à partir de la deuxième semaine d'infection jusqu'au commencement de la 3^{ième} semaine PI, puis leurs titres atteignent un plateau entre la fin de la troisième ou de la quatrième semaine PI. Ces titres élevés en IgG (titres >1024) persistent jusqu'à de 4 à 5 mois chez les porcs infectés expérimentalement (Nelson et al., 1994); ensuite les titres en IgG décroissent progressivement pour atteindre un niveau non détectable (titres <20) jusqu'à plus de 300 jours après l'infection (Nelson et al., 1994; Mengeling et al., 1995). Cependant, quelques animaux adultes peuvent redevenir séronégatifs moins de quatre à six mois après leur exposition

initiale (Goyal, 1993; Albina et al., 1994; Hill, 1994). Il semble que la cinétique de la réponse en anticorps IgG est uniforme chez tous les porcelets infectés sauf que chez certains porcelets cette réponse se développe chronologiquement avec un léger retard. Cependant, la détection des anticorps IgG dans le sérum des porcs infectés peut être une indication que l'animal a été infecté dans un passé relativement récent (9 à 14 jours PI) ou dans un passé assez tardif (plusieurs semaines, voire plusieurs mois PI). Plus encore, il a été rapporté par d'autres auteurs, dont certaines observations ont été confirmées par la présente étude, que le virus persiste longtemps chez les porcs infectés malgré les titres élevés en anticorps IgG (Yoon et al., 1993; Mengeling et al., 1995). Par conséquent, il n'est pas possible de déterminer exactement le moment précis de l'exposition au virus ou même de savoir si le porcelet infecté est porteur du virus depuis longtemps ou pas.

La cinétique d'apparition des anticorps IgM au cours de l'infection par le virus du SRRP n'avait pas encore été jusqu'à présent documentée. Les résultats obtenus dans la présente étude, indiquent que la détection des anticorps IgM anti-SRRP peut fournir des informations beaucoup plus précises dans le cadre du diagnostic sérologique de l'infection par le virus du SRRP. En effet, les anticorps IgM ont pu être détectés au cours de l'infection cohorte sentinelle dès la fin de la première semaine. Dans le cas de l'infection avec dose virale

intranasale unique, les IgM ont pu être détectés dès le 6ième jour PI (titres de 64 à 256). Dans les deux expériences, à la fin de la première et au cours de la deuxième semaines PI, les titres en anticorps IgM étaient relativement plus élevés que ceux des anticorps IgG. Les titres en IgM ont augmenté très rapidement pour atteindre un niveau maximal dès le 14ième jour PI avant de décroître deux ou trois semaines plus tard. Il apparait alors très intéressant d'exploiter, à des fins de diagnostic clinique, la persistance relativement brève des anticorps IgM circulants chez les porcs infectés. En effet, la détection des IgM devrait être considérée comme une analyse sérologique indispensable à réaliser pour un diagnostic différentiel entre les formes aiguë et chronique de l'infection par le virus du SRRP, et entre l'infection primaire et secondaire. D'autre part, la détection d'anticorps neutralisants de type IgM chez les porcelets est indicatrice d'une infection active, ce qui n'est pas le cas lors de la détection d'anticorps de type IgG étant donné qu'il pourrait s'agir d'anticorps d'origine maternelle. Chez le porc, il n'y a pas de passage transplacentaire des anticorps maternels; toutefois, les anticorps maternels de type IgG sont acquis lors de la prise du colostrum et du lait, ce qui n'est pas le cas pour les IgM. (Tizard , 1982).

En ce qui concerne la réponse en anticorps neutralisants contre le virus du SRRP, il a été décrit que généralement ces

anticorps n'apparaissaient pas avant la résorption quasi-complète des signes cliniques de la maladie (Van Alstine et al., 1993a; Nelson et al., 1994). Il a aussi été démontré que les anticorps neutralisants étaient produits plus tardivement que les anticorps révélés par IFI, puisqu'ils n'étaient pas détectés avant 4 à 6 semaines après l'infection (Albina et al., 1992a, 1993; Christianson et al., 1992b; Yoon et al., 1992; Van Alstine et al., 1993a; Zeman et al., 1993; Nelson et al., 1994). Cependant, Yoon et al. (1994a) ont récemment démontré à l'aide d'un test de séroneutralisation modifié que les anticorps neutralisants seraient détectables à partir du 9^{ième} jours PI. Selon les résultats obtenus par ces auteurs, un premier pic d'anticorps neutralisants serait observé entre le 11^{ième} et le 21^{ième} jours PI; ensuite, ces anticorps disparaîtraient de la circulation et un deuxième pic serait par la suite observé entre le 41^{ième} et le 45^{ième} jours PI. Les modifications apportées au test de neutralisation conventionnel consistaient en une inactivation au préalable des sérums à tester afin d'éliminer le virus chez des animaux virémiques, l'addition aux milieux de dilution et de culture de 20% de sérum de porc normal comme source de complément (Yoon et al., 1994).

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que des titres significatifs (>16) en anticorps neutralisants n'ont pas été observés avant la 4^{ième} ou 5^{ième} semaine PI. Les titres les

plus élevés obtenus variaient de 32 à 64. En outre, dans les études de la "cohorte sentinelle", l'infection expérimentale à dose virale unique ainsi que pour l'hyperimmunisation, les anticorps neutralisants n'ont été détectés que chez la moitié seulement des porcelets infectés. Ces anticorps neutralisants ont persisté jusqu'à la fin de la période d'observation (63 jours dans le cas de l'étude cohorte sentinelle et 88 jours dans le cas des deux autres expériences). Tous les porcelets témoins sont demeurés séronégatifs. Nos observations sur la lenteur d'apparition des anticorps neutralisants chez les porcelets infectés expérimentalement sont en accord avec les résultats rapportés par d'autres auteurs (Christopher-Henning et al., 1992; Yoon et al., 1992; Nelson et al., 1994; Mengeling et al., 1995). Selon d'autres études réalisées chez des porcs adultes, ces derniers développeraient beaucoup plus rapidement une réponse en anticorps neutralisants (Collins et al., 1991) et leur virémie serait beaucoup plus brève par rapport aux porcelets en croissance (Hesse et al., 1992).

Dans le cas du virus de l'élévation de la déshydrogénase lactique murine (LDV) qui est sérologiquement apparenté au virus du SRRP, des hauts titres en anticorps neutralisants dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe sont nécessaires afin de prévenir l'infection, ce qui suggère qu'il faut qu'il y ait un grand nombre de molécules d'anticorps neutralisants en circulation (Plagemann et al., 1992a). Comme dans le cas du

SRRP, une virémie persistante a été démontrée chez les souris infectées par le LDV, ce qui indique l'inefficacité des anticorps neutralisants à prévenir la virémie in vivo (Keffaber, 1989; Hill, 1990; Nelson et al., 1994). Au contraire, dans le cas de l'infection par le virus de l'artérite équine (EAV), apparenté aussi au virus du SRRP, il semble que des anticorps neutralisants dirigés contre une région immunogène spécifique de la large glycoprotéine d'enveloppe (G1) seraient réellement protecteurs (Chirnside et al., 1995).

Dans les différentes infections expérimentales réalisées, les résultats obtenus lors du suivi virologique sont aussi en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs indiquant que le virus du SRRP persiste longtemps chez les porcs infectés, en dépit des titres relativement élevés en anticorps circulants (Yoon et al., 1992; Albina et al., 1993; Bautista et al., 1993; Bilodeau et al., 1994; Nelson et al., 1994; Mengeling et al., 1995). Aucune corrélation n'a été observée dans notre étude entre la cinétique des différents types d'anticorps et le niveau de fluctuation de la virémie au cours de l'infection.

La persistance du virus soulève la question sur le rôle véritable de la réponse humorale immune dans la protection contre l'infection par le virus du SRRP. Au contraire, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les anticorps spécifiques faciliteraient l'infection des macrophages en venant s'attacher

aux récepteurs Fc des immunoglobulines à leur surface (Christianson et al., 1992b, Goyal, 1993; Yoon et al., 1994b). Dans le cas du LDV, il a été montré que la réplication de ce virus peut être accrue suite au développement des anticorps (Coutelier et Van Snick, 1985; Coutelier et al., 1990; Li et al., 1990; Plagemann et al., 1992a). Une étude préliminaire indique que les anticorps peuvent accélérer la réplication du virus du SRRP sur cultures de macrophages alvéolaires (Choi et al., 1992). Des évidences cliniques semblent indiquer que ce rôle facilitateur des anticorps (ADE) existerait aussi in vivo (Christianson et al., 1992a, 1992b). En outre, la réplication du virus aurait été accélérée au milieu de la période de gestation chez des foetus à qui on aurait inoculé du virus avec du sérum contenant des anticorps anti-SRRP, par rapport aux foetus qui auraient reçu du virus seul (Christianson et al., 1992a, 1992b).

Il a été récemment rapporté que le virus de Lelystad, souche prototype européenne du virus du SRRP, possède trois protéines structurales majeures, ayant un poids moléculaire estimé à 15, 18, et 25 KDa, qui correspondent respectivement aux protéines non-glycosylées de la nucléocapside et de la matrice, et à la glycoprotéine d'enveloppe (Meulenberg et al., 1995). Trois protéines structurales ayant des poids moléculaires similaires ont aussi été décrites pour la souche québécoise IAF-exp91 du virus du SRRP (Mardassi et al., 1994a).

Dans la présente étude, une investigation de la réponse immune humorale de porcelets, infectés expérimentalement ou par voie naturelle, et dirigée spécifiquement contre chacune des trois protéines structurales majeures et contre la protéine codée par le cadre de lecture ORF4, a été réalisée. Les résultats des épreuves d'immunobuvardage effectuées avec le virus purifié ont indiqué que la réponse humorale était dirigée contre les différentes protéines structurales, mais que la chronologie d'apparition des anticorps variait pour chacune de ces protéines. En effet, les anticorps dirigés contre les protéines de la nucléocapside et de la matrice étaient généralement révélés entre les jours 14 et 30 PI, soient bien avant ceux produits contre la glycoprotéine d'enveloppe (vers les jours 35-49 PI). Ces résultats obtenus par les analyses d'immunobuvardage ont été confirmés en utilisant la technique de radio-immunoprécipitation permettant d'établir la réactivité des sérums d'animaux infectés contre les protéines virales non-dénaturées. Des résultats similaires ont été récemment obtenus par d'autres auteurs contre la souche de référence américaine ATCC-VR2332 (Nelson et al., 1994). Toutefois, les résultats obtenus dans les deux cas sont difficilement interprétables étant donné les faibles quantités de virus récupérées suite aux étapes de purification. De plus, les rapports molaires varient considérablement pour chacune des protéines, la glycoprotéine d'enveloppe ne représentant que 1% du contenu protéique du

virion dans le cas du virus de l'artérite équine (De vries et al., 1992).

Les analyses effectuées au cours de la présente étude avec les protéines recombinantes, codées par les ORFs 4 à 7 du virus du SRRP, ont permis de suivre la réponse immunitaire humorale dirigée spécifiquement envers chacune des protéines virales individuelles, indépendamment de ces rapports molaires. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que la synthèse des anticorps, dirigés contre les différentes protéines du virus du SRRP chez les porcs infectés, ne se déroule pas de manière simultanée, bien que la production d'anticorps contre la glycoprotéine ne soit pas aussi tardive qu'il ne l'a été rapporté dans les études précédentes. Au contraire, les épreuves d'immunobuvardage réalisées avec les protéines recombinantes ont démontré que les anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe (codée par l'ORF5) et le produit de l'ORF4 apparaissaient les premiers, dès le jour 7 PI. Les résultats obtenus avec le produit de l'ORF5 exprimé dans *E.coli* sont très divergents de ceux ayant été obtenus dans le cas de la glycoprotéine d'enveloppe native, extraite des préparations de virus purifié. Cette divergence peut s'expliquer par le fait qu'avec les protéines recombinantes, il était possible d'ajuster aux mêmes valeurs la concentration en protéines des différentes préparations, ce qui n'était pas le cas avec les préparations de virus purifié. En effet, les rapports molaires

des protéines de 15 kDa et de 19 kDa étant beaucoup plus élevés dans le virion que celui de la glycoprotéine de 24-26 kDa, la faible intensité des bandes obtenues par immunobuvardage n'était pas nécessairement une indication de la valeur des titres en anticorps contre les différentes protéines structurales du virus. Les résultats obtenus avec les protéines recombinantes semblent indiquer que la détection plus précoce des anticorps dirigés contre les protéines de 15 kDa et de 19 kDa, en utilisant le virus purifié, n'était certainement pas due à une immunogénicité beaucoup plus élevée de ces deux protéines par rapport à la glycoprotéine d'enveloppe. Cette dernière analyse est aussi partagée par d'autres auteurs (Nelson et al., 1994). Dans le cas du virus de l'artérite équine, il a été démontré qu'à l'exception de la petite glycoprotéine Gs, les protéines se retrouvent dans des proportions égales avec un ratio moléculaire de 3(N):2(M):3(G1) (De Vries et al., 1992). La protéine Gs, qui est exprimée à une concentration similaire à celle de la protéine M dans les cellules infectées, ne représente que de 1 à 2% du contenu protéique de la particule virale (De Vries et al., 1992). Ainsi, en ce qui concerne le virus du SRRP, l'immunogénicité de la glycoprotéine d'enveloppe est probablement comparable à celle des protéines de la nucléocapside et de la matrice.

D'autre part, la révélation d'une réponse immunitaire humorale spécifique contre le produit de l'ORF4 suggère qu'il

s'agit probablement d'une protéine synthétisée en abondance par le virus du SRRP. Néanmoins, dans le cas du virus de l'artérite équine, la protéine codée par ce cadre de lecture est de nature non-structurale (Plagemann et Moenning, 1992b). Cette protéine pourrait probablement jouer un rôle dans la réplication ou dans la transformation des autres composantes du virus du SRRP. À l'heure actuelle, la nature exacte du produit de l'ORF4 n'est pas encore connue, mais un antisérum produit contre un peptide synthétique déduit de la séquence du gène ORF4 a permis d'immunoprécipiter la protéine recombinante ORF4 exprimée *in vitro* (Meulenberg et al., 1995). Toutefois, les profils d'immunobuvardage obtenus dans la présente étude sont similaires à ceux ayant été obtenus dans le cas de sérums de porcs hyperimmuns testés contre le produit de l'ORF4 de la souche américaine MN-1b du virus du SRRP (Kwang et al., 1994).

À partir des résultats obtenus avec les protéines recombinantes ainsi qu'avec le virus purifié, il n'a pas été possible d'établir une corrélation évidente entre la cinétique des anticorps circulants détectés par les tests de séroneutralisation et d'immunofluorescence indirecte, les différents niveaux de fluctuation de la virémie et les spécificités protéiques des anticorps circulants détectés par immunobuvardage, à différents moments de l'infection par le virus du SRRP. Il n'a pas été possible aussi d'identifier laquelle des différentes protéines virales serait la plus

impliquée dans l'induction d'une réponse immunitaire humorale protectrice.

En définitive, au cours de cette étude, certaines méthodes sérologiques se sont révélées très efficaces pour le suivi sérologique de l'infection par le virus du SRRP, notamment la technique d'immunofluorescence indirecte. Cette épreuve s'est avérée très utile pour la mise en évidence d'une infection par le virus du SRRP, car elle a permis de détecter les anticorps IgM et IgG dès la première semaine d'infection. L'IFI a permis aussi de réaliser un diagnostic différentiel entre les formes aiguë et chronique du SRRP en déterminant parallèlement les titres en anticorps IgG et IgM. L'adaptation de la souche IAF-Klop du virus du SRRP sur cultures continues de cellules MARC-145 a facilité la réalisation des analyses d'IFI sur ces cellules, ce qui n'aurait pas été possible avec le test d'immunopéroxydase ne se faisant jusqu'à présent que sur cultures primaires de macrophages alvéolaires. L'apparition tardive et à des titres relativement peu élevés des anticorps neutralisants limite l'emploi de la technique de séroneutralisation en diagnostic de routine. D'autre part, le test d'immunobuvardage s'est avéré une méthode rapide et spécifique pour la détection de la réactivité des sérums à tester envers les différentes protéines du virus, l'efficacité de l'utilisation de ce test ayant été confirmée par les résultats obtenus en radio-immunoprécipitation.

Les résultats du suivi virologique des porcs infectés, obtenus par la technique de la RT-PCR, ont permis de confirmer leur statut virémique tel que déterminé par les tests d'isolement du virus à partir du sérum. Récemment, différents paramètres ont été étudiés dans le but d'augmenter la sensibilité de la technique RT-PCR pour la détection du virus dans les sérums et le sperme d'animaux infectés. Ainsi, il a été démontré que l'addition de gel de silice ou de glycogène, comme véhicule de l'ARN extrait de ces spécimens, pouvait permettre la détection du génome viral dans les spécimens ne contenant que de 1 à 10 DECP₅₀ de virus (N'Diaye et Dea, Manuscrit en préparation). Ceci concorde avec les résultats précédemment rapportés pour la détection du virus présent dans les homogénats de poumons d'animaux malades (Mardassi et al., 1994c). Il semble donc que dans le cas du sperme et du sérum, il y ait des facteurs non-identifiés venant interférer lors de l'extraction de l'ARN viral, tel que discuté par St-Laurent et al. (1994) dans le cas du virus de l'artérite équine.

CONCLUSION

La présente étude avait été menée pour étudier la réponse immunitaire humorale et la virémie chez les porcs infectés par le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin. Elle consistait aussi à établir la chronologie d'apparition des différents anticorps en fonction de leurs spécificités polypeptidiques et leur valeur protectrice. Enfin, au cours de cette étude, différentes techniques de diagnostic, pouvant être utilisées pour le suivi sérologique de l'infection par le virus du SRRP, ont été évaluées.

Au cours de cette étude, il a été démontré qu'il existait une cinétique particulière d'apparition des différents anticorps produits chez les porcs infectés. Les anticorps IgM et IgG ont été détectés dès la fin de la première semaine d'infection. Les IgM étaient toutefois détectés au départ à des titres relativement plus élevés que les IgG et leurs titres atteignaient rapidement un niveau maximal vers le 14^{ième} jour PI pour décroître ensuite jusqu'au 35^{ième} ou 42^{ième} jour PI. Les titres en IgG, pour leur part, progressaient moins rapidement; ils atteignaient un plateau vers le 28^{ième} ou 35^{ième} jour PI et persistaient à ce niveau jusqu'à la fin de la période d'observation.

Par ailleurs, des titres significatifs en anticorps neutralisants (>16) n'ont pas été notés avant la 4^{ième} ou 5^{ième} semaine de l'infection, période à partir de laquelle des titres de 32 à 64 persistent chez l'animal jusqu'à plus de trois

mois, ont été observés. La présence d'anticorps neutralisants, de même que la présence de hauts titres d'anticorps IgG détectés en immunofluorescence, ne semblent pas entraver la persistance du virus puisqu'il peut être isolé sur cultures cellulaires à partir des sérums des porcs infectés pour plus de trois mois. Ainsi, cette étude a permis de confirmer la persistance du virus du SRRP chez les animaux infectés, en dépit des titres relativement élevés en anticorps circulants.

La réponse immunitaire humorale est dirigée contre les trois protéines structurales du virus du SRRP. Toutefois, les anticorps dirigés contre la protéine d'enveloppe codée par l'ORF5 et ceux dirigés contre le produit de l'ORF4 n'ont été détectés que vers le 7^{ième} jour après le début de l'infection, tandis que les anticorps spécifiques à la protéine N de la nucléocapside (produit de l'ORF7) n'ont été observés qu'au 14^{ième} jour PI. Finalement, les anticorps produits contre la protéine de la matrice M (produit de l'ORF6) n'ont été mis en évidence que vers le début de la troisième semaine PI.

Il n'a toutefois pas été possible d'établir une corrélation entre les titres des différents anticorps détectés par immunofluorescence, les titres des anticorps neutralisants, la spécificité des anticorps circulants envers chacune des protéines du virus et les différents niveaux de fluctuation de la virémie au cours de l'infection. Il n'a pas aussi été possible de déterminer l'une ou l'autre des protéines du virus

du SRRP qui serait impliquée, davantage plus que les autres, dans l'induction d'une réponse immunitaire humorale pouvant être réellement protectrice.

Enfin, cette étude a permis de démontrer l'efficacité de l'utilisation de certains tests sérologiques, en l'occurrence le test d'immunofluorescence indirecte et le test d'immunobuvardage, non seulement pour le suivi sérologique de l'infection par le virus du SRRP, mais aussi pour le diagnostic différentiel des différentes formes cliniques de cette maladie. Il a aussi été possible de montrer, au cours de cette étude, l'importance que peut avoir la technique RT-PCR pour la confirmation du statut virémique des porcs infectés; toutefois son utilisation en pratique courante demeure liée à l'aboutissement des études concernant les paramètres pouvant augmenter la sensibilité de cette technique pour la détection du génome du virus du SRRP dans les échantillons cliniques.

REMERCIEMENTS

Je remercie de tout coeur le Dr. **Serge Dea**, directeur de recherche et professeur au Centre de Recherche en Virologie, pour m'avoir fait confiance en me suggérant d'accomplir ce travail de recherche dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant pour sa disponibilité, sa présence à mes côtés pour l'apprentissage de certaines techniques, son encadrement scientifique très bénéfique et la dextérité dont il a fait montre tout au long de la réalisation de cette étude.

j'aimerais remercier le Programme Canadien des Bourses de la Francophonie (PCBF) financé par l'Agence Canadienne pour le Développement International (ACDI) pour le soutien financier durant ces deux années d'études.

Mes remerciements vont également à l'encontre des Drs. **Samir Mounir** et **Helmi Mardassi** pour m'avoir fourni les protéines recombinantes du virus du SRRP.

Je voudrais saisir l'occasion pour remercier très sincèrement les Drs. **Ghania Milane** et **Carl Gagnon** ainsi que Mesdames **Louise Wilson** et **Nicole Sawyer** pour leur aide technique très utile et leurs conseils pratiques très appréciés.

J'adresse mes remerciements au Dr. **Robert Bilodeau** de la Société des Éleveurs de Porcs du Québec (SEPQ) pour nous avoir assisté lors des infections expérimentales, de même que le Dr. **René Sauvageau**, de la direction de la santé animale, Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), pour avoir réalisé les examens histopathologiques.

Je remercie également le Dr. **Denis Archambault** de l'Université du Québec à Montréal pour ses conseils lors de la

rédaction d'un article publié en collaboration sur une partie de ce travail.

Je saisis l'occasion pour remercier de tout coeur le Pr. **R. Assaf** du Mapaq pour son assistance moral et ses conseils pratiques très judicieux.

Je voudrais aussi remercier le Dr. **Max Arella**, directeur du centre de recherche en virologie (IAF) ainsi que tous les autres membres de ce centre pour leurs conseils, leur assistance et leur amitié.

Merci à madame **Ginette Larose**, messieurs **André Levac** et **Robert Alain** pour les travaux de montage, de photographie et de micrographie.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation effective de cette étude.

Ce travail a été réalisé grâce à une subvention obtenue du MAPAQ (Recherche et développement), la Fédération des Producteurs de Porcs du Québec, et Vetrepharm Research Inc., London, Ontario.

BIBLIOGRAPHIE

ALBINA E., F. MADEC et P. VANNIER. 1992a. Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) (PRRS-maladie mystérieuse). J. Rech. Porc. 24: 115-125.

ALBINA E., Y. LAFORDAN, T. BARON, J.P. PLANA DURAN et P. VANNIER. 1992b. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. Ann. Rech. Vet. 23: 167-176.

ALBINA E., F. MADEC, R. CARIOLET, F. PABOEUF, E. HUTET, J.F. PANSART, A. KERANFLEC'H et Y. LEFORBAN. 1993. Le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP): persistance du virus chez l'animal et dans les élevages infectés. J Rech Porcines en France 25: 363-372

ALBINA E., F. MADEC, R. CARIOLET et J. TORRISON. 1994. Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. Vet. Rec. 134: 567-573.

ANON. 1993. Veterinary Investigation Service Report for March. Veterinary Record, 132: 497-498.

BARON D., E. ALBINA, Y. LEFORBAN, F. MADEC, H. GUILMOTO, J. PLANA DURAN et P. VANNIER. 1992. Report on the first outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. Ann. Vet. Res. 23: 161-166.

BAUTISTA E.M., S.M. GOYAL, I.J. YOON et J.E COLLINS. 1993. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 163-165

BAUTISTA E.M., S. AYAD, S.M. GOYAL, M. MURTAUGH et T. MOLITOR. 1994. Antigenic diversity within porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus isolates. Proceeding of the 13th IPVS congress, Bangkok, Thailand 26-30 june.

BEILAGE E. et T. BEILAGE. 1992. Epidemiological investigations into PEARs in Germany. 12th Int. Pig Vet. Soc. 8/17-20. The Hague, p125.

BENFIELD D.A., J.E. COLLINS, A.L. JENNY et T.J. LOULA. 1992a. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J. eds. Diseases of Swine. 6th ed. Ames. IA: Iowa State University Press. 756-762.

BENFIELD D.A., L. HARRIS, E. NELSON, J. CHRISTOPHER-HENNINGS, J. COLLINS, D. CHLADEK, W.T. CHRISTIANSON, R.B. MORRISON et D. GORCYCA. 1992b. Properties of SIRS virus isolate ATCC VR 2332 In the United States and preliminary characterisation of a monoclonal antibody to this virus. American Assoc. Swine Pract. News. 4: 19-21.

BENFIELD D.A., E. NELSON, J.E. COLLINS, L. HARRIS, S.M. GOYAL, D. ROBISON, W.T. CHRISTIANSON, R.B. MORRISON, D. GORCYCA et D. CHLADEK. 1992c. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). J vet Diagn. Invest. 4: 127-133.

BENFIELD D.A., E. NELSON et J. CHRISTOPHER-HENNINGS. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viral proteins and antigenic variation. Proceeding of the 13th IPVS congress, Bangkok, Thailand 26-30 june.

BILODEAU R, S. DEA, G.P. MARTINEAU et R. SAUVAGEAU. 1991. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Québec. *Vet. Rec.* 129: 102-103

BILODEAU R, D. ARCHAMBAULT, S.A. VÉZINA, R. SAUVAGEAU, M. FOURNIER et S. DEA (1994) Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Can. J. Vet. Res.* 58: 291-298

BLAHA T.H. 1993. The consequences of PRRS in fattening pigs. *Proc. Soc. Vet. Epidemiol. and Prevent Med.* April, Exeter. 1-5.

BLOEMRAAD M., E.P. DE KLUIJVER, A. PETERSEN, G.E. BURKHARDT et G. WENSVOORT. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viremic pigs. *Vet. Microbiol.* 42: 361-371.

BOURNELL M.E.G., T.D.K. BROWN et M.M. BINNS. 1994. Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Res.* 1: 303-314.

BRIERLEY I, P. DIGGARD et S.C. INGLIS. 1989. Characterization of an efficient Coronavirus ribosomal frameshifting signal, requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* 57: 537-547.

CARMAN W.F., C. WILLIAMSON, B.A. CUNLIFFE et A.H. KIDD. 1989. Reverse transcription and subsequent DNA amplification of rubella virus RNA. *J. Virol. Methods.* 25: 21-30.

CAVANAGH D. et M.C. HORZINEK. 1993. Genus *Torovirus* assigned to the *Coronaviridae*. *Arch. Virol.* 128: 395-396.

CAVANAGH D., D.A. BRIEN, M. BRINTON, L. ENJUANES, K.V. HOLMES, M.C. HORZINEK, M.M.C. LAI, H. LAUDE, P.G.W. PLAGEMANN, S. SIDELL, W.J.M. SPAAN, F. TAGUCHI et P.J. TALBOT. 1994. Revision of the taxonomy of the *Coronavirus*, *Torovirus* and *Arterivirus* genera. *Arch. Virol.* 135: 227-237.

CHEN Z., L. KUO, R.R.R. ROWLAND, C. EVEN, K.S. FAABERG et P.G.W. PLAGEMANN. 1993. Sequences of 3' end of genome and of 5' end of open reading frame 1a of lactate dehydrogenase-elevating virus and common junction motifs between 5' leader and bodies of seven subgenomic mRNAs. *J. Gen. Virol* 177: 768-771.

CHIRNSIDE E. D., A. A. F. DE VRIES, J.A. MUMFORD et P. J.M. ROTTIER. 1995. Equine arteritis virus-neutralizing antibody in the horse is induced by a determinant on the large envelope glycoprotein GL. *J. Gen. Virol.* 76: 1989-1998.

CHRISTIANSON W.T., J.E. COLLINS, D.A. BENFIELD, L. HARRIS, D.E. GORCYCA, D.W. CHLADEK, R.B. MORRISON et H.S. JOO. 1992a. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53: 485-488.

CHRISTIANSON W.T., H.S. CHOI, J.E. COLLINS, T.W. MOLITOR, R.B. MORRISON et H.S. JOO. 1992b. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res.* 57: 262-268.

CHRISTIANSON W.T. et H.S. JOO. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review. *Swine Health and Production.* 2: 10-28.

CHRISTOPHER-HENNINGS J., E.A. NELSON, J.K. NELSON, R.J. HINES, S.L. SWENSON, H.T. HILL, J.J. ZIMMERMAN, J.B. KATZ, M.J. YAEGER, C.C.L. CHASE et D.A. BENFIELD. 1995. Detection of

porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. J. Clin. Microbiol. 33 : 1730-1734.

CHOI C., W. CHRISTIANSON, J.E. COLLINS, H.S. JOO et T. MOLITOR. 1992. Antibody-dependent enhancement of SIRS virus replication. AASP Newsl 4: 30

CHOMCZYNSKY P. et N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159

CLERMONT R. et R. BILODEAU. 1990. Syndrome HAAT-pi du porc. Bulletin Epidémiologique du Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec. 6: 1-4.

COLLINS J.E., D.A. BENFIELD, W.T. CHRISTIANSON, L. HARRIS, D.E. GORCYCA, D.W. CHLADEK et R.B. MORRISON. 1991. Swine infertility and respiratory syndrome (mystery swine disease). MN. Swine Con. for Vet. St. Paul. 9: 15-17.

COLLINS J.E., D.A. BENFIELD, W.T. CHRISTIANSON, L. HARRIS, J.C. HENNINGS, D.P. SHAW, S.M. GOYAL, S. MCCULLOUGH, R.B. MORRISON, H.S. JOO, D. GORCYCA et D. CHLADEK. 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. J Vet Diagn Invest 4: 117-126

CONZELMANN K.K., N. VISSER, P. VAN WOENEL et H.J. THIEL. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. Virology 193: 329-339

CROMWIJK W. 1991. The new pig disease-further observations in Dutch herds, EEC seminar report on the new pig disease: Porcine

reproductive and respiratory syndrome (PRRS), Brussels 29-30 avril, 20-27.

COUTELIER J.P. et J. VAN SNICK. 1985. Isotypically restricted activation of B lymphocytes by lactate dehydrogenase virus. Eur. J. Immunol. 15: 250-255.

COUTELIER J.P., P.G. WAUTERS, P. HEREMANS et H. VAN-DER-LOGT. 1990. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. J. Virol. 64: 5383-5388.

DAVIES G. 1991. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-case definition. European Comm. Seminar on the New Pig Disease. 4/29-30. Brussels, 15.

DE VRIES A.A.F., E.D. CHIRNSIDE, P.J. BREDENBEEK , L.A. GRAVESTSTEIN, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1990. All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence. Nucleic Acids Res. 18: 3241-3247.

DE VRIES A.A.F., E.D. CHIRNSIDE, M.C. HORZINEK et P.J.M. ROTTIER. 1992. Structural proteins of equine arteritis virus. J. Virol. 66: 6294-6303

DEA S., R. BILODEAU, G.P. MARTINEAU et R. SAUVAGEAU . 1990. Virus isolations from farms in Québec experiencing severe outbreaks of respiratory and reproductive problems. Proceed. Mystery Swine Disease Meeting; Livestock Conserv. Institute. Denver, Colorado. USA. October, 6: 67-72.

DEA S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1991a. Caractéristiques d'isolats des virus influenza et de l'encéphalomyocardite associés au syndrome reproducteur et

respiratoire porcin (SRRP) au Québec. Le Médecin Vétérinaire du Québec. 21: 170-175.

DEA S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1991b. Outbreaks of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus in Quebec pigs farms. J. Vet. Diagn. Invest. 3: 275-282.

DEA S., R. BILODEAU, R. ATHANASSIOUS, R. SAUVAGEAU et G.P. MARTINEAU. 1992a. PRRS syndrome in Quebec: Isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. Vet. Record. 130: 167.

DEA S., R. BILODEAU, R. ATHANASSIOUS, R. SAUVAGEAU et MARTINEAU GP. 1992b. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. Can. Vet. J. 33: 801-808

DEA S., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU, C. MONTPETIT et G.P. MARTINEAU. 1992c. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 380-392.

DEA S. et G.P. MARTINEAU. 1994. Diagnostics sérologique et virologique du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) au Québec. Le Medecin Vétérinaire du Québec 24: 176-184.

DEA S., N. SAWYER, R. ALAIN et R. ATHANASSIOUS. 1995. Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. Corona and Related Viruses, Edited by P.J. Talbot and G.A. Levy Plenum Press, New York. 13: 95-98.

DEN BOON J.A., E.J. SNUDER, E.D. CHIRNSIDE, A.A.F. DE VRIES, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1991. Equine arteritis virus is not a togavirus, but belongs to the Coronavirus superfamily. *J. Virol.* 65: 2910-2920.

DESROSIERS R., Y. ELAZHARY et R. SAUVAGEAU. 1994. Observations cliniques, épidémiologiques et étiologiques sur la pneumonie proliférative et nécrosante du porc. *Le médecin Vétérinaire du Québec* 24: 153-157.

DIAL D., R.D. HULL, C.L. OLSON, H.T. HILL et G.A. ERIKSON. 1990. Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry. *Mystery Swine Disease Com Meeting, Denver: Livestock Conserv. Institute.* 10/6. p3-6.

DONE S., I. LANZA, D. PATON, I. BROWN, R. HIGGINS et D. HANNAM. 1992. Comparative pathology of viral respiratory infections in pigs. *Amer. Assoc. Swine Pract. News.* 4: 26-27.

FRANCKI R.I.B., C.M. FAUQUET, D.L. KNUDSON et F. BROWN. 1992. Classification and nomenclature of viruses: arterivirus. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2: 220-222.

FREY M., K. EERNISSE, J. LANDGRAF, J. PEARSON et D. CHLADEK. 1992. Diagnostic testing for SIRS virus at the National Veterinary Service Laboratories (NVSL). *Amer. Assoc. Swine Pract. News.* 4: 31.

GIRARD C., M. MORIN et Y. ELAZHARY. 1992. Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus. *Vet. Rec.* 130: 206-207.

GODENY E.K., D.W. SPEICHER et M.A. BRINTON. 1990. Map location of lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) capsid protein (Vp1) gene. *Virology* 177: 768-771.

GODENY E.K., L. CHEN, S.N. KUMAR, S.L. METHVEN, E.V. KOONIN et M.A. BRINTON. 1993. Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus. *Virology* 194: 585-596.

GOYAL S.M. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome. a review. *J.Vet. Diagn. Invest.* 5: 656-664

HALBUR P., J.J. ANDREWS, E.L. HUFMANN, P.S. PAUL, X.J. MENG et Y. NIYO. 1994a. Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 254-257.

HALBUR P., P. PAUL et X. MENG. 1994b. Marked variability in pathogenicity of nine U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in 5 week old CDCP pigs. Proceedings of the 13th Int. Pig Vet. Soc. Congress, Bangkok, Thailand. 26-30 june. p14.

HESSE R., L. COUTURE, S. LAU et A. DOSTER. 1992. Pathogenicity of Nebraska isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursing piglets. 73rd Con. Res. Work Ani. Dis. 11/9-10. Chicago. p42.

HILL H.T. 1990. Overview and history of swine disease. Mystery Swine Disease Com. Meeting, Denver. Livestock Conversation Institute. 10/6. p6-8.

HILL H. 1994. An update on diagnostic methods for PRRS virus. Swine Practitioner 2: 4-6.

HOEFLING D.C. 1990. Mystery swine disease. In: Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 june.

JOO H.S., H.S. KIM et A.D. LEMAN. 1988. Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. Arch. Virol. 100: 131-134.

JOO H.S. et I.J. YOON. 1994. Virologic, serological and pathogenic differences of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus isolates. Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 june.

KEFFABER K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. American Assoc. Swine Pract. News.1: 1-10.

KIM H.S., W.T. CHRISTIANSON et H.S. JOO. 1989. Pathogenic properties of encephalomyocarditis virus isolates in swine fetuses. Arch. Virol. 109: 51-57.

KIM H.S., H.S. JOO, W.T. CHRISTIANSON et R.B. MORRISSON. 1991. Evaluation of serologic methods for the detection of antibodies to encephalomyocarditis virus in swine fetal thoracic fluids. J. Vet. Diagn. Invest. 3: 283-286.

KIM H.S., J. KWANG, I.J. YOON et H.S. JOO. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. Arch Virol 133: 477-483

KOMIJJN R.E. et E.G.M. VAN KLINK. 1991. EEC seminar report on the new pig disease: porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), Brussels, april 29-30.

KUO L., Z. CHEN, R.R.R. ROWLAND, K.S. FAABER et P.G.W. PLAGEMANN. 1992. Lactate dehydrogenase-elevating virus(LDV): subgenomic mRNAs, mRNA leader and comparaisn of 3'-terminal sequences of two LDV isolates. *Virus Res.* 23: 55-72.

KWANG J, KIM HS et JOO HS. 1994. Cloning, expression, and sequence analysis of the ORF4 gene of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus MN-1b. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 293-296

LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.

LAROCHELLE R., R. SAUVAGEAU et MAGAR. 1994. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. *Can. Vet. J.* 35: 513-515.

LEE H.J., C.K. SHIEH, A.E. GORBALENYA, E.V. KOONING, N. LAMONICA, J. TULER, A. BAGDZHADZHIAN et M.M.C. LAI. 1991. The complete sequence (22 kilobase) of murine coronavirus gene-1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. *Virology* 180: 567-582.

LI S., B. HU, J.T. HARTY, C. EVEN et P.G.W. PLAGEMANN. 1990. Polyclonal B cell activation of IgG2a and IgG2b production by infection of mice with lactate dehydrogenase-elevating virus is partly dependent on CD4+ lymphocytes. *Viral Immunol.* 3: 273-288.

LINDHAUS W. et B. LINDHAUS. 1991. Ratselhafte Schweine-Krankheit. Prakt. Tieraerztl. 5: 423-425.

LOULA T. 1991. Mystery pig disease. Agri-practice. 12: 23-24.

MAGAR R, R. LAROCHELLE, Y. ROBINSON et C. DUBUC. 1993. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. Can. J. Vet. Res. 57: 300-304.

MAGAR R., R. LAROCHELLE, S. DEA, C.A. GAGNON, E. NELSON, CHRISTOPHER-HENNIGS et D.A. BENFIELD. 1995. Antigenic comparaison of canadian and U.S. isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. Can J Vet Res , 59: 232-234.

MANIATIS T, E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 545 pages.

MARDASSI H., R. ATHANASSIOUS, S. MOUNIR et S. DEA. 1994a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. Can. J. Vet. Res. 58: 55-64

MARDASSI H., S. MOUNIR et S. DEA. 1994b. Identification of major differences in the nucleocapsid genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 75: 681-685

MARDASSI H., L. WILSON, S. MOUNIR et S. DEA. 1994c. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between canadian and european strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2197-2203

MARDASSI H., S. MOUNIR et S. DEA. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec strain IAF-exp91. *Arch. Virol.* 471: 1-14.

MARTINEAU G.P., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU et S. DEA. 1991. Le syndrome "hyperthermie-anorexie-avortement de la truie (HAAT) et pneumonie interstitielle du porc. *J. Rech. Porcine en France* 23: 179-188.

MARTINEAU G.P., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU et S. DEA. 1992. Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) au Québec: données cliniques pathologiques et virologiques. *J. Rech. Porcine en France* 24: 127-136.

MENG X.J., P.S. PAUL et P.G. HALBUR. 1994. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3' terminal genomic RNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS). *J. Gen. Virol.* 75: 1795-1801.

MENGELING W.L., K.M. LAGER et A.C. VORWALD. 1995. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 3-16

MEULENBERG J.J.M., M.M. HULST, E.J. DE MEIJER, P.L.J.M. MOONEN, A. DEN BESTEN, E.P. DE KLUYER, G. WENSWOORT et R.J.M. MOORMANN. 1993a. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. Virology 192: 62-72

MEULENBERG J.J.M., E.J. DE MEIJER et R.J.M. MOORMANN. 1993b. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. J Gen Virol 74: 1697-1701

MEULENBERG J.J.M., A.P. DEN BESTEN, E.P. DE KLUYER, R.J.M. MOORMANN, V.M.M. SCHAAPER et G. WENSWOORT. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. Virology 206: 155-163

MOLITOR T.W., G. LEITNER, C.S. CHOI, J. RISDAHL, K. ROSSOW et J.E. COLLINS. 1992. Modulation of host immune responses by SIRS virus. Amer. Assoc. of Swine Pract. Newslet. 4:27-28.

MOORE C, R. BILODEAU et B.WISEMAN. 1990. Clinical aspects and consequences of mystery swine disease in nursery and grow-finish pigs. Proceed. Mystery Swine Disease Meeting; Livestock Conserv. Institute, Denver, Colorado, USA. oct. 6. 41-49.

MORIN M., C. GIRARD, Y. ELAZHARY, R. FAJARDO, R. DROLET et A. LAGACÉ. 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. Can. Vet. J. 31: 837-839.

MORRISON R., E. BAUTISTA, S. GOYAL, J. COLLINS et J. ANNELLI. 1992a. Seroprevalence of SIRS virus in the United States in 1990. Amer. Assoc Swine Pract. Newslet. 4: 47.

MORRISON R.B., J.E. COLLINS, L. HARRIS, W.T. CHRISTIANSON, D.A. BENFIELD, D.W. CHLADEK, D.E. GORCYCA et H.S. JOO. 1992b. Serologic evidence incriminating a recently isolated virus (ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). J. Vet. Diagn. Invest. 4: 186-188.

MURPHY T.W., W.H. MCCOLLUM, P.J. TIMONEY, B.W. KLINGEBORN, B. HYLLSETH, W. GOLNIK et B. ERASMUS. 1992. Genomic variability among globally distributed isolates of equine arteritis virus. Veterinary Microbiology. 32, 101-115.

NELSON E.A., J.C. HENNINGS, T. DREW, G. WENSVOORT, J.E. COLLINS et D.A. BENFIELD. 1993a. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 410-415

NELSON E.A., J.C.HENNINGS, T. DREW, G. WENSVOORT, J.E. COLLINS et D.A. BENFIELD. 1993b. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 31: 3184-3189.

NELSON E.A., J.C. HENNINGS et D.A. BENFIELD. 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. J. Vet. Diagn. Invest. 6:410-415

NICOLAS Y. 1993. Toujours actif en France, aux USA et au Canada, le SDRP mobilise les équipes de recherche. La Semaine Vétérinaire 694: 18.

OHLINGER V.F., R. AHL, B. HAAS, T.C. METTENLEITER, H.J. RZIHA, O.C. STRAUB et F. WEILAND. 1991a. PRRS-laboratory studies at Tübingen and other German laboratories. European Comm. Seminar on PRRS. 11/4-5, Brussels, 11.

OHLINGER V.F., R. AHL, B. HAAS, T.C. METTENLEITER, H.J. RZIHA, A. SAALMULLER, O.C. STRAUB, N. VISSER, E. WEILAND et F. WEILAND. 1991b. The german experience with the swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). M.N. Swine Con. For. Vet. 9/17. St. Paul. Addendum.

OHLINGER V.F. 1992a. The porcine reproductive and respiratory syndrome and its significance for artificial insemination (AI) in pigs. Proceedings, 4th Meeting of the A.I. Vets in The EEC 1: 1-4.

OHLINGER V.F., B. HAAS, A. SAALMÜLLER, J. BEYER, J. TEUFFERT, N. VISSER et F. WEILAND. 1992b. In vivo and in vitro studies on the immunobiology of PRRS. Amer. Assoc. of Swine Pract. Newslet. 4: 24.

PATON D.J., I.H. BROWN, S. EDWARDS et G. Wensvoort. 1991a. Blue ear disease of pigs. Vet. Rec. 128: 574.

PATON D.J., I.H. BROWN, S.H. DONE, AC. SCOTT et S. EDWARDS. 1991b. Laboratory investigations of " Blue eared pig disease" in Great Britain. In: Proceedings of the Seminar on porcine reproductive and respiratory syndrome, November 1991, Brussels: European Commission, p.36

PATON D.J., T.W. DREW, I.H. BROWN, S. EDWARDS et S.H. DONE. 1992. Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. Pig Vet. J. 29: 188-192.

PLAGEMANN P.G.W., J.T. HARTY et C. EVEN. 1992a. Mode of neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus, by polyclonal and monoclonal antibodies. Arch. Virol. 123: 89-100.

PLAGEMANN P.G.W. et V. MOENNING. 1992b. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-stranded RNA viruses. Adv. Virus Res. 41: 99-192.

PLANA DURAN J., M. VAYREDA, J. VILARRASA, M. BASTONS, R. ROSELL, M. MARTINEZ, J. PUJOLS, J.L. BADIOLA, M. DOMINGO et A. SAN GABRIEL. 1992a. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) - Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. Vet. Microbiol. 33: 203-211.

PLANA DURAN J., M. VAYREDA, J. VILARRASA, M. BASTONS, L. PORQUET et URNIZA. 1992b. PEARS (mystery swine disease) - summary of the conducted by our group. Amer. Assoc. of Swine Pract. Newslet. 4: 16-18.

POL J.M.A., J.E. VAN DIJK, G. WENSVOORT et C. TERPSTRA. 1991a. Pathological ultrastructural and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery disease (synonym porcine epidemic abortion and respiratory syndrome) (PEARS). Vet. Q. 13: 137-143.

POL J.M.A., F. WAGENAAR, J. BROEKHUIJSEN-DAVIES et G. WENSVOORT. 1991b. The morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. 12th Int. Pig Vet. Soc. 8/17-20. The Hague, p127.

POL J.M.A. 1992. Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alvéolar macrophages. In: Proc. Intern. Symp on SIRS/PRRS/PEARS, Minnesota: p22.

POLSON D.D., W.E. MARSH et G.D. DIAL. 1990. Financial implications of mystery swine disease (MSD). Mystery Swine Disease Com. Meeting, Denver: Livestock Conserv. Institute. 10/6, p8-28.

REED L.J. et H. MUENCH. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

ROSSOW K.D., E.M. BAUTISTA, E.M. GOYAL, S.M. MOLITOR, T.W. MURTAUGH, M.P. MORRISON, D.A. BENFIELD et J.E. COLLINS. 1994. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. J Vet Diagn Invest 6: 3-12.

ROTTIER P.J.M., G.W. WELLING, S. WELLING-WESTER, H.G.M. NIESTERS, J.A. LENSTRA et B.A.M. VAN DER ZEUST. 1986. Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. Biochemistry. 25: 1335-1339.

QUAIFE T. 1989. Scramble is on to solve mystery disease. Swine Pract. July: 5-10.

QUAIFE T. 1990. Helping labs to solve a "mystery" disease. Swine Pract. February: 8-12.

SAINT-LAURENT G., G. MORIN et D. ARCHAMBAULT. 1994. Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and non structural viral genes by reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 32: 658-665.

SAMBROOK J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

SNIJDER E.J., J.A. DEN BOON, M.C. HORZINEK et W.J.M. SPAAN. 1991. Comparaison of the genome organization of toro-and coronaviruses: both divergence from a common ancestor and RNA recombination have played a role in Berne virus evolution. *Virology* 180: 448-452.

SNIJDER E.J., A.L.M. WASSENAAR et W.J.M. SPAAN. 1992. The 5' end of the equine arteritis virus genome encodes a papainlike cysteine protease. *J. Virol.* 66: 7040-7048.

SUAREZ P., R. ZARDOYA, C. PRIETO, A. SOLANA, E. TABARÉS, J.M. BAUTISTA et J.M. CASTRO. 1994. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.* 135: 89-99.

SWENSON S.L., H.T. HILL, J.J. ZIMMERMANN, L.E. EVANS, J.G. LANDGRAF, R.W. WILLS, T.P. SANDERSON, M.J. MCGINLEY, A.K. BREVIK, D. CISZEWSKI et M.L. FREY. 1994a. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 1943-1948.

SWENSON S.L., H.T. HILL, J. ZIMMERMANN, L.E. EVANS, J.G. LANDGRAF, R. WILLS. M. MCGINLEY, A. BREVIK, D. CISZEWSKI et M.L. Frey. 1994b. PEARS virus in experimentally infected boars. Proceedings of the 13th IPVS congress, Bangkok, Thailand 26-30 June.

TERPSTRA C., G. WENSVOORT et J.M.A. POL. 1991. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory

syndrome (Mystery Swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. Vet. Q. 13: 131-136.

TIZARD I. 1982. An introduction to veterinary immunology. 2nd edition. W.B. Saunders Compagny.

VAN ALSTINE W.G. 1991. Mystery swine disease in the United States. European Comm. Seminar on the New Pig Disease. 4/29-30. Brussels, #13.

VAN ALSTINE W.G., G.W. STEVENSON et C.L. Kanitz. 1993a. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. Swine Health and Production 1: 24-28.

VAN ALSTINE W.G., C.L. KANITZ et G.W. STEVENSON. 1993b. Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 621-622.

VAN WOENSEL P., J. VAAN DER WOUW et N. VISSER. 1994. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 47: 273-278.

VEZINA A., H.D. LOEMBA, M. FOURNIER, S. DEA et D. ARCHAMBAULT. 1995. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with PRRS virus. Can. J. Vet. Res. (in press).

VOICU L.L., A. SILIM, M. MORIN et M.A.S.Y. ELAZHARY. 1994. Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. Vet. Rec. 134. 422-423.

WENSVOORT G, C. TERPSTRA, J.M.A. POL et M. WHITE. 1991a Blue ear disease of pigs. Vet. Rec. 128: 574.

WENSVOORT G, C. TERPSTRA, J.M.A. POL, E.A. TER LAAK, M. BLOEMRAAD, E.P. DE KLUYVER, C. KRAGTEN, L. VAN BUITEN, A. DEN BESTEN, F. WAGENAR, J.M. BROEKHUIJSEN, P.L.J.M. MOONEN, T. ZETSTRA, E.A. DEBOER, H.J. TIBBEN, M.F. DE JONG, P. VAN'T VELD, G.L.R. GROENLAND, J.A. VAN GENNEP, M.T. VOETS, J.H.M. VERHEIJDEN et J. BRAAMSKAMP. 1991b. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q* 13: 121-130

WENSVOORT G, E.P. DE KLUYVER, E.A. LUIJTZE, A. DEN BESTEN, D.W. CHLADEK, W.T. CHRITIANSOON, J.E. COLLINS et L. HARRIS. 1992a. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 134-138.

WENSVOORT G., E.P. DE KLUYVER, J.M.A. POL, F. WAGENAAR, R.J.M. MOORMANN, M.M. HULST, R. BLOEMRAAD, A. DEN BESTEN, T. ZESTRA et TERPSTRA C. 1992b. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet. Microbiol.* 33: 185-193.

WESTAWAY E.G., M.A. BRINTON, S.Y. GAIDAMOVICH, M.C. HORZINEK, A. IGARASHI, L. KAARIANEN, D.K. LVOV, J.S. PORTERFIELD, P.K. RUSSEL et D.W. TRENT. 1985. Togaviridae. *Intervirology* 24: 125-139.

WHITE M. 1991. Blue ear disease of pigs. *Vet. Rec.* 128: 574.

YEAGER M., T. PRIEVE, J. COLLINS, J. CHRISTOPHER-HENNINGS, E. NELSON et D. BENFIELD. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health and Production.* 1: 7-9.

YOON I.J., H.S. JOO, W.T. CHRISTIANSON, H.S. KIM, J.E. COLLINS, R.B. MORRISON et G.D. DIAL. 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 144-147.

YOON I.J., H.S. JOO, W.T. CHRISTIANSON, R.B. MORRISON et G.D. DIAL. 1993. Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Swine Health and Production 1: 6-9

YOON I.J., H.S. SAGAR, M. GOYAL et T.W. MOLITOR. 1994a. A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. J. Vet. Diagn. Invest. 6:289-292

YOON I.J., J.J. ZIMMERMAN, S.L. SWENSON, R.W. WILLS, H.T. HILL et K.B. PLATT. 1994b. Assesment of the biological significance of antibody dependent enhancement (ADE) of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus infection in passively immunized pigs. Proc. of the 13th Int. Pig. Vet. Soc. Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 june.

ZEMAN D., R. NEIGER, M. YAEGER, E. NELSON, D.A. BENFIELD, P. LESLIE-STEEN. J. THOMSON. D. MISKIMINS. R. DALY. et M. MINEHART. 1993. Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. J. Vet. Diagn. Invest. 5: 522-528.

ZIMMERMAN J. 1991. A survey of the American Association of Swine Practitioners for the presence of mystery swine disease herds. Mystery Swine Disease Com. Meeting, Bloomington: Livestock Conserv. Institute. 4/9-11.

ZIMMERMAN J., T. SANDERSON, K.A. EERNISSE, H.T. HILL et M.L. FREY. 1992. Transmission of SIRS virus from convalescent animals to comminglet penmates under experimental conditions. In: Proc. of Inter. Symp. on SIRS/PRRS/PEARS, Minnesota: p17.

ANNEXES

PRÉPARATIONS DE SOLUTIONS ET TAMPONS POUR L'ÉLECTROPHORÈSE

a. Solution d'acrylamide 45% (37:1), 100 ml.

Cette solution était préparée en faisant dissoudre 43,78 g d'acrylamide, 1,22 g de bis-acrylamide dans de l'eau distillée. Le volume final de la solution était ensuite complétée à 100 ml. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , la solution était conservée dans une bouteille opaque à 4°C et pouvait ainsi garder sa stabilité pour plus d'un mois.

b. Solution de SDS 10% (p/v), 0,02% (p/v) NaN_3 .

Cette solution était préparée en faisant dissoudre 10 g de SDS, 0,02 g de NaN_3 dans 90 ml d'eau. Le volume final de la solution était ensuite complété à 100 ml. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , la solution était conservée dans une bouteille opaque à la température de la pièce.

c. Solution de persulfate d'ammonium $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ 10%.

Cette solution était préparée extemporanément en faisant dissoudre 0,1 g de $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ dans 1,0 ml d'eau distillée.

d. Tampon d'électrophorèse: 0,1 % SDS (p/V) , 0,192 M glycine, 0,025 M Tris, pH 8,3.

Cette solution était préparée en faisant dissoudre dans 800 ml d'eau distillée 1,0 g de SDS, 14,41 g de glycine, 3,03 g de Tris. On complétait à un volume d'1,0 l avec de l'eau distillée, le pH se stabilisant aux environs de 8'3.

e. Tampon d'électrophorèse pour échantillon: 2% SDS (p/v), 20% (v/v) de glycérol, 0,02 % NaN_3 , 0,250 mM Tris-HCL, pH 6,8.

Cette solution était préparée avec 50 ml d'eau distillée, 20 ml d'une solution de SDS 10%, 20 ml de glycérol, 0,02 g de NaN_3 et 3,03 g de Tris. Le pH était ajusté à 6,8 avec de l'eau distillée. La solution était ensuite complétée à 100 ml avec de l'eau distillée. La solution était ensuite filtrée sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm et conservée à -20°C .

f. Tampon du gel de séparation: 1,5 M Tris-HCL pH 8,8, 0,02% (p/v), NaN_3 .

Pour une solution de 500 ml, 90,85 g de Tris Base et 0,1 g de NaN_3 étaient dissous dans 450 ml d'eau distillée. Le pH était ajusté à 8,8 avec du HCL 1N et le volume final était complété à 500 ml avec de l'eau distillée. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , le tampon était conservé à 4°C .

g. Tampon du gel de concentration: 0,5 M Tris-HCL pH 6,8
0,02 % NaN_3 .

Cette solution était préparée en faisant dissoudre 30,285 g de tris-base, 0,1 g de NaN_3 dans 450 ml d'eau distillée. Le pH était ajusté à 6,8 avec du HCL 1N, le volume final étant complété à 500 ml avec de l'eau distillée. Après filtration sur membranes Millex-GV d'une porosité de 0,22 μm , le tampon était conservé à 4°C.