

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de microbiologie et biotechnologie**

**Caractérisation des facteurs impliqués dans l'attachement du Virus
du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (VSRRP) *in
vitro***

Dominic Therrien

Mémoire de maîtrise

Octobre 2003

Résumé

Depuis la fin des années 80, le Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (SRRP) constitue un problème majeur dans les élevages porcins à travers le monde. L'agent étiologique de la maladie, le virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin (VSRRP), est un membre de la famille des *Artérvirus*, sous l'ordre des *Nidovirales*. Ce virus possède un tropisme restreint pour les macrophages tissulaires porcins *in vivo*. *In vitro*, il est en mesure d'infecter seulement des cultures primaires de macrophages alvéolaires, les leucocytes du sang périphérique et les cellules MARC-145. Des travaux préliminaires sur l'entrée du VSRRP chez la cellule hôte suggèrent la présence d'un récepteur cellulaire spécifique à la surface des cellules permissives (Kreutz, 1998; Nauwynck et al., 1999). Mais jusqu'à maintenant, aucun récepteur cellulaire n'a encore été identifié dans la famille des *Artérvirus*. Cependant, une molécule de 210 kDa, exprimée à la surface des macrophages alvéolaires porcins (MAP) a été suggérée comme un potentiel récepteur cellulaire pour le VSRRP (Duan et al., 1998). L'objectif des présents travaux est d'approfondir les connaissances sur les éléments impliqués dans le tropisme du VSRRP.

Initialement, un test permettant d'observer l'attachement du VSRRP par cytométrie de flux a été mis au point. Ce test s'est avéré sensible et spécifique. À l'aide de cette méthode, il a été démontré que l'ensemble des cellules MARC-145 et des MAP est en mesure d'attacher le virus. Des traitements des cellules MARC-145 avec des protéases, effectués avant le test d'attachement, démontrent qu'un facteur protéique spécifique est impliqué dans l'attachement du virus sur ces cellules susceptibles. Le traitement du virus avec du chloroforme et ou du trichloro-trifluoroéthane, dans le but d'altérer l'enveloppe du VSRRP, bloque totalement l'attachement du virus. Ceci suggère qu'une ou des protéines de l'enveloppe du virus, et non la nucléocapside, interagissent avec la cellule susceptible pour permettre l'attachement. De plus, l'attachement du VSRRP n'est pas restreint aux cellules permissives à l'infection *in vitro*. Les expériences d'attachement effectuées sur des cellules reconnues pour être réfractaires à l'infection du VSRRP *in vitro*, démontrent qu'elles peuvent aussi attacher le virus. Ces résultats, combinés avec

ceux de Kreutz, 1998, suggèrent qu'il existe plus d'un facteur impliqué dans l'attachement et la pénétration du VSRRP à la surface des cellules permissives.

L'infection des leucocytes du sang périphérique au cours de l'infection du VSRRP *in vivo*, plus précisément les monocytes, est toujours débattue. Dans les présents travaux, à l'aide du test d'attachement, il est démontré que seules les cellules CD14+ et CD11b+, caractéristiques phénotypiques des monocytes, peuvent attacher le VSRRP, et donc être infectées *in vitro*. Ces résultats suggèrent que l'élimination d'une large quantité de cellules de type monocyte/macrophage lors de l'infection *in vivo*, affecte la capacité de l'animal à combattre d'autres infections, principalement celles de type bactériennes. Ce phénomène expliquerait la fréquence accrue et l'amplification des dommages causés par ce type d'infection chez les animaux infectés par le VSRRP.

Des anticorps monoclonaux ont été obtenus à partir de souris immunisées avec des lysats de cellules MARC-145, de MAP, ou avec du VSRRP purifié sur coussin de sucrose 30 %. Deux anticorps, 18-A7 et 18-F6, ont été en mesure de bloquer l'infection du VSRRP et partiellement son attachement. Ces anticorps sont tous deux dirigés contre une protéine de masse moléculaire approximative de 60 à 66 kDa. Ces travaux suggèrent donc qu'une protéine de 60 à 66 kDa à la surface des MARC-145 soit un récepteur cellulaire potentiel pour l'infection du VSRRP de ces cellules *in vitro*. L'absence de cette protéine à la surface des MAP soulève l'hypothèse que l'entrée du VSRRP dans les cellules MARC-145 passe par un mécanisme différent de celui des MAP. Le clonage et l'expression de ce récepteur, ainsi que celui de 210 kDa identifié par un autre groupe de chercheurs, dans des lignées non-susceptibles et susceptibles au VSRRP, nous permettra de mieux comprendre la restriction du tropisme de ce virus.

Table des matières

Résumé	2
Table des matières	4
Liste des Tableaux	6
Liste des Figures	7
Liste des abréviations	8
Première Partie : Revue de littérature	9
1.1 Historique	10
1.2 Symptômes et lésions	12
1.2.1 Signes cliniques du SRRP	12
1.2.2 Lésions	13
1.3 Isolement du VSRRP	14
1.4 Caractéristiques morphologiques et physico-chimiques du VSRRP	15
1.5 Taxonomie	15
1.5.1 Les autres membres de la famille des <i>Arteriviridae</i> .	18
1.6 Hôtes	18
1.7 Caractéristiques moléculaires du VSRRP	19
1.7.1 Génome	19
1.7.2 Protéines non-structurales	19
1.7.3 Les protéines structurales	22
1.8 Réponse Immunitaire contre le VSRRP	25
1.8.1 Réponse humorale	26
1.8.2 Réponse cellulaire	27
1.9 Relations virus-hôtes	28
1.9.1 Tropisme <i>in vivo</i> du VSRRP	28
1.9.2 Tropisme <i>in vitro</i> du VSRRP	29
1.9.3 Différences entre MAP et les cellules MARC-145	30
1.9.4 Récepteurs généralités	30
1.9.5 Attachement et récepteur pour le VSRRP	31
1.9.6 Pénétration du VSRRP et entrée de son génome dans la cellule	33
Deuxième Partie : Résultats	35
Chapitre 1	
Mise en évidence de l'attachement du VSRRP sur différentes lignées cellulaires.	36
Introduction	37
Article I	38
Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells.	38
Contribution des auteurs	39
Résumé	39
Chapitre 2	
Production d'anticorps monoclonaux contre les protéines de surface des cellules MARC-145	59
Introduction	60
Article II	61
Monoclonal antibody directed against a membranous protein of MARC-145 cells blocks infection by PRRSV.	61

Contribution des auteurs	62
Résumé	62
Article III	69
Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant <i>E. coli</i> -expressed nucleocapsid protein as antigen.	69
Contribution des Auteurs	70
Résumé	71
Troisième Partie : Discussion	86
3.1 Présence d'un facteur d'attachement spécifique pour le VSRRP à la surface des cellules permissives.	88
3.2 VSRRP peut infecter seulement les cellules CD14 et CD11b/CD18 positives dans le sang périphérique porcin.	90
3.3 Effet de l'infection du VSRRP sur la réponse immune.	91
3.4 Nature du facteur d'attachement.	92
3.5 L'attachement du VSRRP n'est pas restreint aux lignées cellulaires permissives.	93
3.6 Génération d'une banque d'anticorps monoclonaux	94
3.7 Facteurs impliqués dans la restriction du tropisme du VSRRP.	96
Références	99
Remerciements	120

Liste des Tableaux

Tableau 1. Effects of proteolytic enzymes and inhibitors on PRRSV attachment to MARC-145 cells	49
Tableau 2. Binding of PRRSV on permissive and non-permissive cells	50
Tableau 3. Cellular surface markers identified on CD14+ and CD14- porcine PBLs...52	
Tableau 4. Cross-reactivity of anti-N protein MAbs to reference Canadian, US and European strains of PRRSV as determined by indirect immunofluorescence	78
Tableau 5. Comparison of sensitivity and specificity of the three serological tests used for the validation of the K8-ELISA (<i>n</i> =95)	81
Tableau 6. Results of 542 field sera from 56 Canadian pig herds examined by HerdChek® ELISA (IDEXX), IF and K8-ELISA	81

Liste des Figures

Figure 1. Schématisation du VSRRP de type Nord-américain	17
Figure 2. Schématisation de la réplication du VSRRP	21
Figure 3. Binding of PRRSV on permissive cell lines as followed by flow cytometry	46
Figure 4. Treatments of PRRSV with chloroform and 1,1,2-Trichlorotrifluoroethane interfere with its attachement to MARC-145 cells	47
Figure 5. Effect of pretreatment of MARC-145 cells with chymotrypsin on the binding of PRRSV	48
Figure 6. Separation of porcine peripheral blood leucocytes by their size (FS), their granularity (SS LOG) and surface expression of the CD-14 marker by flow cytometry	51
Figure 7. Binding of PRRSV on PBLs as followed by flow cytometry	52
Figure 8. Binding of MAb 18-F6 and inhibition of PRRSV attachment	66
Figure 9. Reactivity of Mab 18-F6 against a cellular protein of 60 to 66 kDa	66
Figure 10. SDS-PAGE analysis of expression and purification of GST-N recombinant fusion protein and reactivity with hyperimmune anti-PRRSV pig serum	77
Figure 11. Immunoprecipitation of PRRSV (IAF-Klop strain) showing the N specificity of the MAbs IAF-K8 and IAF-2B4	78
Figure 12. Comparison between values obtained by three different tests used for the detection of antibodies to PRRSV (IAF-Klop strain) in sera (95) from experimentally infected pigs	80

Liste des abréviations

AcMo :	Anticorps Monoclonal
ADE:	Antibody-Dependant Enhancement
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
DTH :	Hypersensibilité de type retardée
EAV:	Equine Arteritis Virus (Virus de l'artérite équine)
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
ICTV:	International Committee for Taxonomy of Viruses
IFI:	ImmunoFluorescence Indirecte
IFN:	Interféron
kDa:	Kilodalton
LDV:	Lactic Dehydrogenase elevating Virus (Virus de l'élévation de la lactate déshydrogénase)
LV:	Lelystad Virus
MAP:	Macrophages Alvéolaires Porcins
NK :	De l'anglais «Natural killer cells»
NSP:	Non Structural Protein (Protéine non-structurale)
ORF:	Open Reading Frame (Cadre de lecture ouvert)
PRRSV:	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
PVA:	Protéine Virale d'Attachement
SDS-PAGE:	Électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide
SHFV:	Simian Hemorrhagic Fever Virus
SRRP:	Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin
TLR :	Toll-Like Receptor (Recepteur de type Toll)
VSRRP:	Virus du Syndrome Reproducteur et Respiratoire Porcin

Première Partie : Revue de littérature

1.1 Historique

Les premiers cas de SRRP ont été observés en 1987 aux États-Unis (Keffaber, 1989) et au Canada (Bilodeau et al., 1991). Cependant, une étude rétrospective sur des sérums de porc a démontré la présence d'anticorps contre le VSRRP dans un certain nombre d'échantillons au cours de l'année 1979 (Carman et al., 1995). Au départ, cette maladie fut associée à d'autres pathogènes qui provoquent des symptômes similaires chez les animaux infectés, ce qui peut expliquer en partie la présence sérologique de VSRRP chez les porcs à des dates antérieures à 1987. En effet, des virus, comme le virus de l'encéphalomyocardite et le virus de l'influenza A, de par le type de symptômes qu'ils engendrent chez les porcs, ont été suspectés d'être les responsables de ce syndrome (Keffaber, 1989; Dea et al., 1992). Le rôle de ces agents a été par la suite écarté, car l'apparition du syndrome n'était pas toujours corroborée par la séro-conversion à ces virus (Goyal, 1993). Après l'année 1987, la prédominance du syndrome fut très élevée dans les troupeaux nord-américains et a engendré des pertes économiques considérables pour les éleveurs (Meredith, 1994). Le SRRP est ensuite apparu en Allemagne en juin 1990 et au cours de l'hiver qui suivit, s'étendant dans la plupart des régions de production porcine du pays (Lindhaus et Lindhaus, 1991). Au début de l'année 1991, la maladie s'est étendue rapidement vers les Pays-Bas (Cromwijk, 1991), la Belgique (Albina, 1997) et l'Espagne (Plana Duran et al., 1992). En raison de l'ampleur du problème, des mesures ont été appliquées par la communauté européenne pour stopper l'expansion du syndrome (Albina, 1997). Ces mesures furent abandonnées par la suite, étant donné leur inefficacité à freiner la progression de la maladie. Les élevages de l'Angleterre (Paton et al., 1992), la France (Baron et al., 1992) et le Danemark (Bøtner et al., 1994) furent par la suite affectés par le SRRP. Vers la fin de l'année 1991, à Lelystad au Pays-Bas, l'agent étiologique de la maladie a été découvert. Le virus de Lelystad, en référence à la ville où il fut découvert, a été isolé à partir de cultures primaires de macrophages alvéolaires porcins (MAP) (Wensvoort et al., 1991). Le virus fut également isolé par la suite au Canada, aux États-Unis et dans d'autres pays d'Europe (Dea et al., 1992a; Collins et al., 1992; Paton et al., 1992; Plana Duran et al., 1992). En raison de son génome d'ARN et son aspect morphologique, le virus a été d'abord classé dans la famille des *Togaviridae*.

Mais il fut par la suite reclassé dans la famille des *Arteriviridae*, considérant les similarités partagées avec les autres membres de ce groupe (Cavanagh, 1997; De Vries et al., 1997). Les données génomiques et antigéniques recueillies sur les différents isolats du SRRP ont permis de séparer les souches en deux groupes: soit les souches européennes et américaines. Bien que l'émergence de ces deux groupes soit apparue environ dans la même période, aucune donnée n'est connue sur leur ancêtre d'origine et à quand remonte leur séparation.

La composante reproductrice du syndrome, principaux symptômes observés lors de l'émergence du SRRP en Amérique du Nord, est devenue moins importante et a laissé sa place aux symptômes respiratoires qui constituent aujourd'hui le principal facteur des pertes économiques au Québec (Dea et Martineau, 1994). Cependant, en Europe, les problèmes liés à la reproduction sont toujours aussi présents (Albina, 1997). Deux vaccins ont été produits et utilisés à grande échelle, soit le CyblueTM, produit à partir d'une souche virale européenne inactivée, et le RespPRRSTM ou Ingelvac PRRSTM, constitué d'un vaccin vivant (souche américaine atténuée après de multiples passages sur culture cellulaire). Mais ces deux vaccins ne s'avèrent pas être la solution au problème du VSRRP. En effet, la protection induite par ces vaccins n'a pas été démontrée clairement. De plus, ils ne permettent pas de différencier les animaux infectés de ceux qui ont reçus le vaccin et leur introduction peut engendrer un effet néfaste sur les troupeaux. Au Danemark, l'introduction du vaccin Ingelvac PRRSTM a été catastrophique dans la majorité des troupeaux où il a été utilisé. Un nombre élevé d'avortements et de porcelets chétifs à la naissance a été observé 2 mois après les premières vaccinations (Bøtner et al., 1997b ; Nielsen et al., 2001). Aujourd'hui, le SRRP constitue toujours un problème d'actualité dans cette industrie en constante progression en raison de sa présence endémique dans la majorité des pays producteurs de porc sauf l'Australie et la Nouvelle-Zélande.

1.2 Symptômes et lésions

1.2.1 Signes cliniques du SRRP

Comme son nom l'indique, le SRRP comporte deux types de symptômes, soit la forme reproductrice et la forme respiratoire. Ils peuvent apparaître simultanément dans un même troupeau ou séparés de quelques semaines, ne comprendre qu'un seul type, ou être absents. Dans ce dernier cas, le passage asymptomatique de la maladie ne peut-être détecté que par des tests pour diagnostiquer la présence de virus (Morrison et al., 1992). L'infection peut provoquer une phase aigüe des symptômes, mais elle peut induire également une forme chronique qui peut être observée au cours d'une longue période de temps au niveau d'un même troupeau (Albina, 1997). Les signes dans les deux formes sont très variés et dépendent de plusieurs facteurs, en particulier la virulence de la souche du VSRRP, mais également de l'âge des porcs, du type d'élevage, du statut géographique, de la présence d'infections secondaires et des conditions sanitaires de l'élevage (Albina, 1997).

La forme reproductrice se retrouve surtout chez les truies de toutes parités, mais elle peut également provoquer des problèmes au niveau des verrats (Albina, 1997). L'hyperthermie et une perte de l'appétit sont observées en premier lieu chez les truies affectées (Albina et al., 1994; Baron et al., 1992; Dea et al., 1992; Keffaber, 1989; Martineau et al., 1991; Terpstra et al., 1991). La cyanose des oreilles de courte durée (30 minutes à quelques jours), phénomène à l'origine de l'appellation « blue ears disease », peut parfois être observée chez les truies autant dans les élevages que lors d'infection expérimentale, et ce principalement chez les isolats Européens (Baron et al., 1992; Hopper et al., 1992; Terpstra et al., 1991). L'infection de truie au cours de leur gestation peut induire différents problèmes comme des avortements tardifs, des mises bas prématurées, des porcelets mort-nés, des porcelets momifiés et des porcelets chétifs à la naissance (Albina, 1997; Christianson et al., 1992; Hopper et al., 1992; Lager et al.,

1994). L'infection de la portée via le passage du virus par la barrière transplacentaire varie en fonction de la période de la gestation où l'infection se manifeste. Lorsque l'infection se produit au début de la grossesse (dans les sept premiers jours), la progéniture ne sera pas infectée. Cependant, si l'infection débute après les 90 premiers jours de la gestation, jusqu'à 100 % de la portée peut être infectée (Lager et al., 1996a; Lager et al., 1996b; Prieto et al., 1996). L'infection des truies peut entraîner d'autres séquelles, comme une baisse de la production lactée ainsi qu'une baisse de fertilité. Chez les verrats, l'infection peut provoquer la diminution du volume des éjaculats et de la mobilité des gamètes (Yeager et al., 1993; Prieto et al., 1994).

La forme respiratoire se retrouve chez tous les types d'élevage et à tous les âges. Elle se traduit par un syndrome de type influenza avec montée de fièvre, dyspnée, toux, éternuement et perte de l'appétit (Albina, 1997). Ces signes sont particulièrement évidents chez les souches nord-américaines. Le taux de mortalité suite aux symptômes respiratoires causé par le SRRP est très élevé chez les porcelets non-sevrés (Baron et al., 1992; Hopper et al., 1992; Martineau et al., 1991). Toutefois, les porcelets en sevrage ou en engraissement peuvent aussi mourir de ces problèmes respiratoires, mais à une plus faible fréquence. Cependant de nombreuses pertes économiques sont encourues chez ces derniers, notamment en raison des pertes de gain de poids quotidien et en frais vétérinaires (Albina, 1997; Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1996). Les troubles respiratoires observés au cours du SRRP sont également causés par des infections secondaires comme celles causées par *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis* ou *Haemophilus parasuis*. Cette combinaison SRRP et pathogènes secondaires semble amplifier les troubles respiratoires chez l'animal, bien que ce phénomène n'ait pas vraiment été observé lors d'expérience de co-infection *in vivo* (Goyal, 1993).

1.2.2 Lésions

Comme pour les signes cliniques, les lésions engendrées par le SRRP sont très variées, dépendent de la virulence souche et ne sont pas toujours présentes. La présence d'infections secondaires a également une influence sur l'importance des lésions (Rossow, 1998). Chez les truies en gestation affectées par le SRRP, on observe la présence de

séparations des couches épithéliales au niveau du placenta, signe de nécrose cellulaire. Le placenta prend une couleur grise et peut-être infiltré de cellules mononuclées. Malgré la présence de ces lésions aux tissus d'origine maternelle, c'est au niveau du fœtus que l'on retrouve les tissus infectés (Albina, 1997). L'endomètre et l'utérus ne sont normalement pas infectés par le VSRRP (Vynckier et Pensaert, 1993). Les avortements et/ou la mort prématurée des fœtus ne sont pas dus à l'attaque du système reproducteur de la truie, mais à l'infection du fœtus par le virus (Albina, 1997). Chez les fœtus morts, en fonction du moment de la mort au cours de la gestation, on peut observer de légères lésions externes jusqu'à la momification (Christianson et al., 1992; Dea et al., 1992; Mengeling et al., 1994).

Le principal organe où l'on retrouve des lésions induites par le VSRRP est le poumon. Cependant, des affectations à d'autres organes ou tissus comme le cœur, la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales, les testicules, les vaisseaux sanguins et le système nerveux central, ont été décrites et reproduites expérimentalement (Collins et al., 1992; Rossow et al., 1994; Sur et al., 1997; Thanawongnuwech et al., 1997). Les lésions macroscopiques observées sur les poumons se caractérisent par des foyers de quelques centimètres, de teinte grisâtre ou brunâtre, et généralement situées dans les lobes antérieurs (Albina, 1997; Dea et al., 1992; Rossow, 1998). Sur le plan histologique, on retrouve au niveau de ces foyers des lésions de type «pneumonie interstitielle», souvent accompagnées d'infiltration de cellules lympo-mononuclées dans les septas alvéolaires. À des degrés plus sévères, on peut observer l'infiltration de neutrophiles, l'hyperplasie des pneumocytes de type II, et une accumulation de débris cellulaires et d'exudats séroprotéiques dans la lumière alvéolaire (Albina, 1997; Collins et al., 1992; Dea et al., 1992; Rossow et al., 1994). L'apoptose, la mort cellulaire programmée, a été rapportée au niveau des macrophages du poumon, de même qu'au niveau des cellules germinales testiculaires (Suarez et al., 1996; Sur et al., 1997; Sur et al., 1998).

1.3 Isolement du VSRRP

Dans les premières années de l'émergence du SRRP, plusieurs chercheurs ont tenté en vain de découvrir l'agent causal de cette maladie. Comme nous le verrons plus loin, en

raison de son tropisme cellulaire restreint, il était impossible d'observer la réplication du VSRRP sur l'ensemble des lignées cellulaires utilisées dans l'isolement de pathogènes infectieux. C'est en 1991, à Lelystad au Pays-Bas, que le virus fut isolé pour la première fois. Des homogénats de poumons de porc affectés par le SRRP inoculés sur des cultures primaires de macrophages alvéolaires de porc, provenant de lavages broncho-alvéolaires, ont permis l'isolement du virus (Wensvoort et al., 1991). Des infections expérimentales *in vivo*, avec cet isolat, ont permis de reproduire les signes cliniques de la maladie et remplir les 4 postulats de Koch, test classique essentiel dans l'association d'un agent pathogène à une maladie (Terpstra et al., 1991).

1.4 Caractéristiques morphologiques et physico-chimiques du VSRRP

Le VSRRP est un virus enveloppé de forme sphérique d'environ 45 à 70 nm de diamètre (Benfield et al., 1992; Dea et al., 1992). Son enveloppe origine du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Dea et al., 1992; Poll et Wagenaar, 1992). Le corps du virus est formé par une capsidie icosahédrique d'environ 25 à 35 nm de diamètre. Le VSRRP possède une densité de flottation de 1,13-1,15 sur un gradient de sucrose et de 1,18-1,19 sur un gradient de chlorure de césium (Benfield et al., 1992; Mardassi et al., 1994a). A pH moindre que 5 ou plus élevé que 7, le VSRRP perd plus de 90 % de son infectivité. La demi-vie du virus est de 3 heures à 37°C, et elle est inversement proportionnelle à la température à laquelle il est exposé. Il peut être conservé 4 mois à -70°C sans perdre son titre infectieux. Cependant, le virus est inactivé très rapidement à des températures supérieures à 37°C (Bloemraad et al., 1994).

1.5 Taxonomie

C'est en 1992, lors du congrès de l'American Association of Swine Practitioners, que le terme VSRRP, ou en anglais PRRSV, est adopté par l'ensemble de la communauté internationale pour désigner l'agent étiologique de cette maladie. Initialement, en raison de ses caractéristiques morphologiques, le VSRRP a été identifié dans la famille des *Togaviridae* (Benfield et al., 1992). Suite à la caractérisation de son génome, le VSRRP fut identifié comme un membre de la famille des *Arteriviridae* (Conzelmann et al., 1993 ;

Meulenberg et al., 1993). En 1996, le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV), a décidé de créer un nouvel ordre viral, soit les Nidovirales. Cet ordre comprend les familles *Arterividae* et *Coronaviridae*, qui diffèrent principalement par leur taille et la forme de leur capsid, mais possèdent toutes deux la même organisation génomique

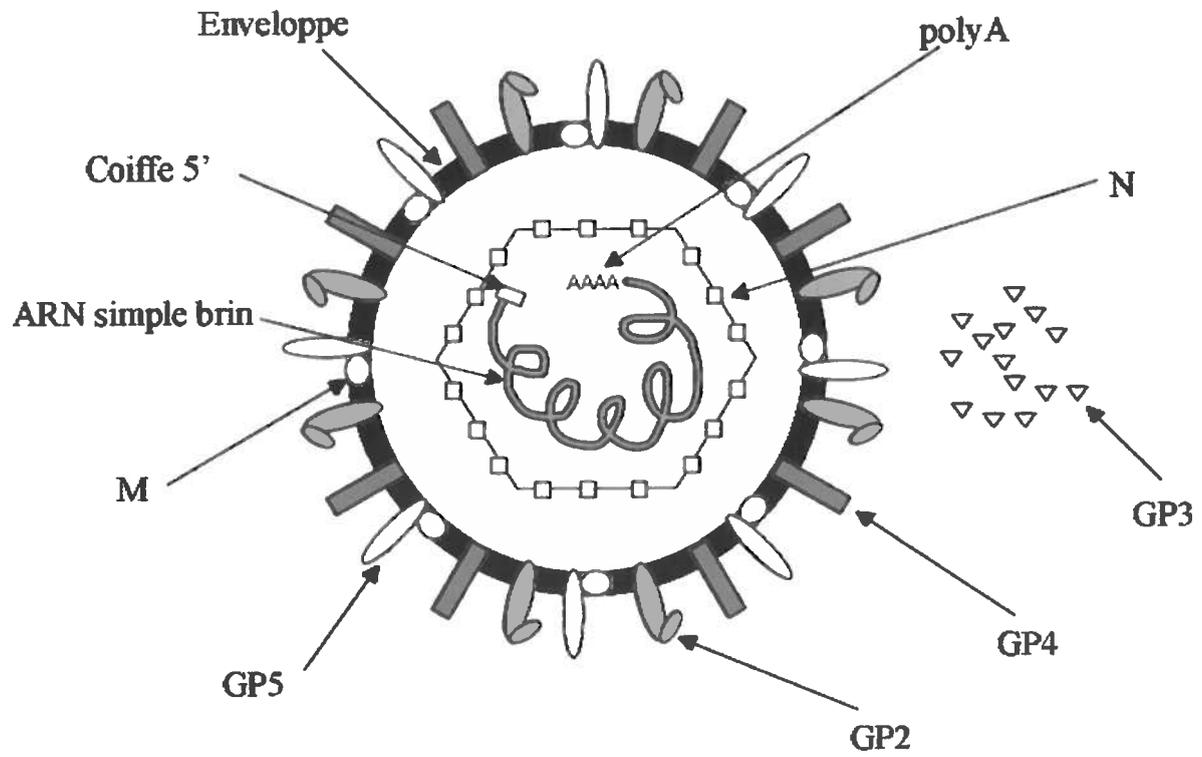


Figure 1 . Schématisation du VSRRP de type Nord-américain
Adapté de Dea et al., 2000

(DeVries et al., 1997; Cavanagh, 1997). La famille des Arteriviridae comprend le genre *Arterivirus*, qui en plus du VSRRP, possède trois autres membres; le virus d'élevage de la lactate déshydrogénase murine (LDV), le virus de l'artérite équine (EAV) et le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV). En plus de leur organisation génomique et morphologique, les virus de cette famille peuvent persister pendant de longues périodes chez l'animal infecté et ils possèdent tous un tropisme restreint aux macrophages tissulaires *in vivo* (Plagemann, 1996; Snijder et Meulenberg, 1998).

1.5.1 Les autres membres de la famille des *Arteriviridae*.

Le LDV infecte seulement une sous population de macrophages chez la souris qui jouent un rôle important dans la dégradation de la lactate déshydrogénase musculaire, de l'isocitrate déshydrogénase et d'autres enzymes retrouvées dans le sang périphérique (Plagemann et Moenning, 1992). Il induit infection persistante qui peut être fatale principalement chez les souches qui ont tropisme pour le système nerveux (Plagemann, 1996). Le LDV induit également une diminution de la réponse immune (Plagemann, 1996). L'EAV est capable d'infecter l'ensemble des macrophages tissulaires équins. Il a été isolé pour la première fois sur des poumons de foetus avortés près de Bucyrus, en Ohio (Doll et al., 1957). La plupart des animaux infectés sont asymptomatiques ou ont des problèmes respiratoires de type influenza. Cependant, chez les juments en gestation, l'infection mène à des avortements (Plagemann et Moenning, 1992). Ce virus peut persister pour une longue période chez l'animal. Peu de travaux ont été réalisés sur le SHFV. Il infecte les macrophages simiens et induit une infection asymptomatique et persistante chez certains types de singes (singes Africain et Patas), alors qu'il provoque une infection aiguë, rapide et fatale chez les macaques (Plagemann, 1996).

1.6 Hôtes

Le porc est la seule espèce connue pour répliquer le VSRRP, dont les signes cliniques ont été observés dans les élevages ou lors d'expérimentation. Dans le cas du sanglier, la présence de l'infection a été démontrée par sérologie, bien que l'observation de signes cliniques n'a pu être démontrée (Oslage et al., 1994; Albina, 1997). Jusqu'à maintenant

l'homme semble résistant à l'infection par le VSRRP (Paton, 1995). Une étude sur des oiseaux de ferme exposés à de l'eau contaminée avec du VSRRP a démontré la présence de virus dans les fèces, ce qui suggère que le virus pourrait se répliquer chez ces espèces et avoir une implication dans l'épidémiologie du SRRP (Zimmerman et al., 1997).

1.7 Caractéristiques moléculaires du VSRRP

1.7.1 Génome

Le génome du VSRRP est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive et d'une longueur de 15088 nucléotides. Il possède une coiffe à l'extrémité 5' et une queue de poly-A à l'extrémité 3' (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993). Il comporte 9 cadres ouverts de lectures, communément appelés "ORF" (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993; Snijder et al., 1999). Les deux premiers, les ORF1a et 1b, forment environ 75% du génome et codent pour l'ensemble des protéines impliquées dans la réplication (Dea et al., 2000). Les autres ORFs 2 à 7 codent pour des protéines structurales, hormis le produit de l'ORF3 pour les isolats nord américains, qui code pour une protéine qui ne fait pas partie du virion et dont la fonction demeure inconnue (Mardassi et al., 1995; Mardassi et al., 1998, Meulenberg et al., 1995). L'analyse des séquences nucléotidiques de différents isolats ont permis d'identifier deux génogroupes, soit les isolats de type nord-américains et de type européens, qui proviennent probablement d'un ancêtre commun (Meng et al., 1995; Murtaugh et al., 1995; Nelsen et al., 1999).

1.7.2 Protéines non-structurales

1.7.2.1 Produit de l'ORF1a et 1b

Peu de travaux ont été réalisés jusqu'à maintenant concernant les gènes non-structuraux du VSRRP. L'ensemble des connaissances à ce sujet originent d'études réalisées chez l'EAV. Les protéines impliquées dans la réplication du génome et dans la fabrication d'ARNm pour la production des protéines structurales du virus se retrouvent encodées

par l'ORF1a et 1b. Ces gènes sont directement transcrits par les complexes ribosomiques des cellules hôtes. Dans le cas de l'ORF 1b, un changement de cadre ribosomal est requis pour permettre la poursuite de la transcription (Den Boon et al., 1991). L'expression de ces gènes résulte en deux polyprotéines de masses moléculaires variable chez les artérovirus, soit de 187 à 260 kDa pour le produit de l'ORF1a, et de 345 à 421 kDa pour le produit de l'ORF 1ab (Snijder et Meulenberg, 1998). Ces polyprotéines sont ensuite clivées à 10 endroits par protéolyse, ce qui permet la création douze protéines appelées NSP1-12 (Snijder et Meulenberg, 1998). Les protéines responsables de ce clivage sont NSP-1 et NSP-2, qui contiennent des sites d'auto-protéolyse, et NSP-4 (Snijder et Meulenberg, 1998). Les autres protéines résultant de ce clivage forment le complexe de la réplicase. Ce complexe produit une molécule d'ARN de polarité négative complémentaire à la totalité du génome viral. Ce segment d'ARN intermédiaire servira par la suite de matrice à la fabrication de nouveau génome viral et d'ARNm sous-génomiques ayant tous la même séquence de tête à l'extrémité 5' qui serviront à l'expression des gènes structuraux. Bien que les nouveaux ARNm créés soient polycistroniques, à l'exception de celui contenant l'ORF7, il y aura la traduction d'une seule protéine, celle encodée par le gène en aval de la séquence de tête (voir figure 2).

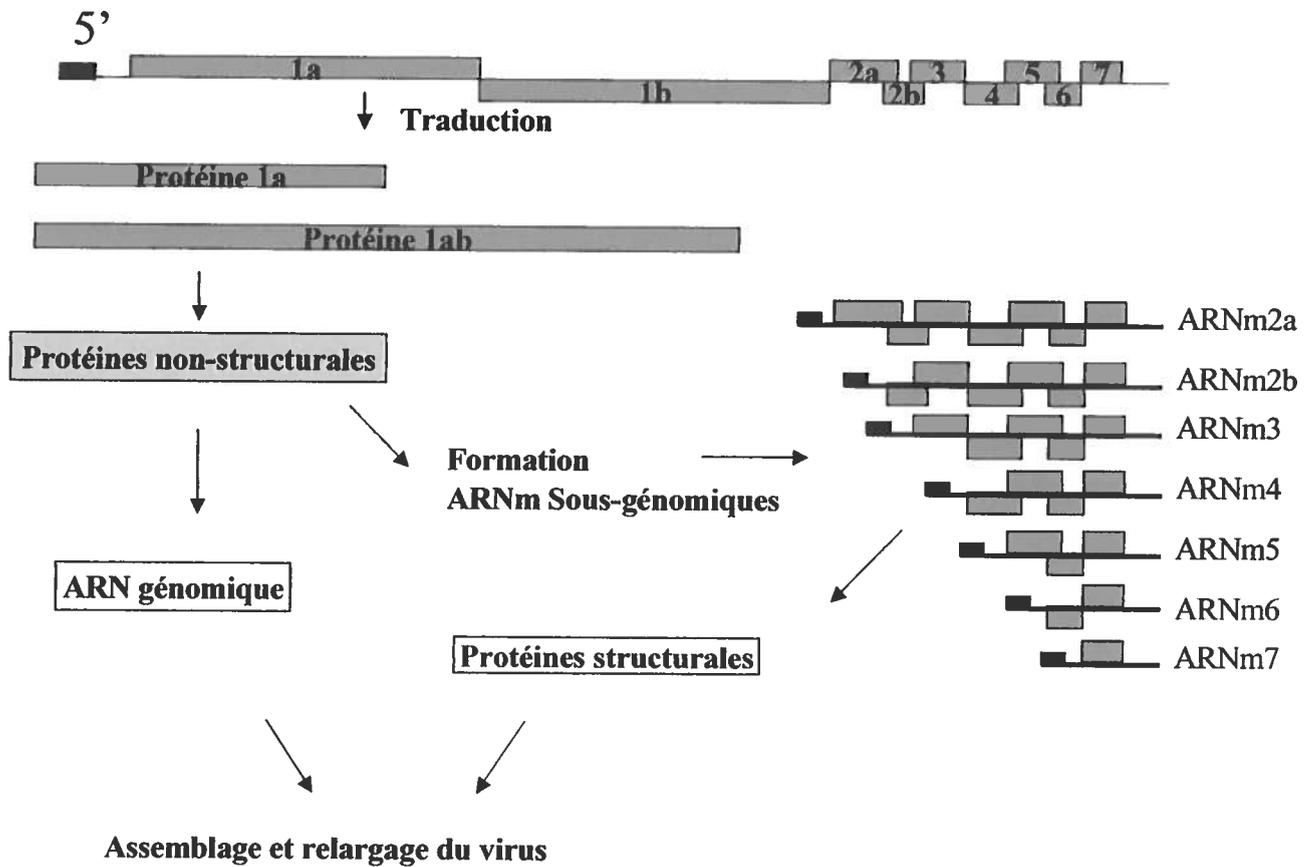


Figure 2. Schématisation de la réplication du VSRRP

Adapté de Snijder et Meulenberg, 1998

1.7.3 Les protéines structurales

1.7.3.1 La protéine N de la nucléocapside

La protéine N, le produit de l'ORF 7, est une protéine hautement basique d'environ 14 à 15 kDa (Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995). Cette protéine est fortement exprimée dans les cellules infectées et constitue entre 20 et 40 % du contenu du virion (Bautista et al., 1996; Mardassi et al., 1994; Nelson et al., 1993). Sa composition riche en acides aminés basiques (26 %) comme l'arginine, l'histidine et la lysine, permet son interaction avec l'ARN génomique du virus (Mardassi et al., 1994b; Meulenberg et al., 1995). Des expériences d'immunoprécipitation démontrent que la protéine N du VSRRP est normalement présente sous forme d'un dimère lié par lien disulfure (Mardassi et al., 1996; Meulenberg et al., 1995). L'expression de la N, la première à être observée en immunofluorescence indirecte (IFI), est suivie d'une multimérisation qui prendra la forme d'une structure icosaédrique dans la cellule infectée, soit la capsidie du VSRRP (Mardassi et al., 1994a; Pol et Wagenaar, 1992). En raison de sa forte immunogénicité, cette protéine, ou les anticorps monoclonaux dirigés contre elle, ont été utilisés pour fabriquer des outils diagnostiques. La séquence en ARN de la N est très conservée entre les différents isolats nord américains, mais beaucoup moins entre les isolats européens et américains (Dea et al., 2000). L'une de ces différences est une délétion de 5 acides aminés chez les isolats nord-américains (Mardassi et al., 1994). Toutefois, plusieurs anticorps monoclonaux sont en mesure de reconnaître les isolats américains et européens (Nelson et al., 1997). Une région conservée de 54 acides aminés présente chez les isolats américains et européens contient des domaines antigéniques conformationnels (Meulenberg et al., 1998).

1.7.3.2 La protéine M de la matrice

La protéine M, produit de l'ORF6, possède une masse moléculaire de 18 à 19 kDa. Sa séquence nucléotidique est la plus conservée entre tous les isolats du VSRRP (Dea et al., 2000). Le pourcentage d'identité est de plus 96 % entre les isolats du même génogroupe et entre 78 à 81 % entre les deux génogroupes (Gagnon et Dea, 1998; Meng et al., 1995). La structure de cette protéine ressemble à celle observée chez la protéine de la matrice

des coronavirus (Dea et al., 2000). On y retrouve trois régions hydrophobes dans sa partie N-terminale qui représentent possiblement des segments transmembranaires de cette protéine (Mardassi et al., 1995; Rottier et al., 1986). Lors d'infection *in vitro* avec le VSRRP, mais également dans le cas de l'EAV et du LDV, l'interaction entre la M et la GP₅ via des ponts disulfures a été observée (Mardassi et al., 1998; Devries et al., 1995; Faaberg et al., 1995). Le rôle de la M semble être lié à l'assemblage du virus et au bourgeonnement de celui-ci, en raison de son association avec la membrane du virus et ses interactions avec les autres protéines virales. Des expériences ont démontré que la protéine M du VSRRP induit la plus forte immunité de type cellulaire (Baustita et al., 1999).

1.7.3.3 La GP₂

La GP₂ est un produit de l'ORF2 qui possède une masse moléculaire d'environ 29 à 30 kDa. Cette protéine est une constituante mineure de l'enveloppe du VSRRP (Dea et al., 2000). Elle contient deux régions riches en acides aminés hydrophobes et deux sites de N-glycosylation (Meulenberg et Pedersen-Den Besten, 1996; Morozov et al., 1995). Des analyses par électrophorèse sur gels SDS-PAGE en conditions non-réductrices ont démontré que cette protéine ne forme pas d'homo- ou d'hétérodimères (Meulenberg et Pedersen-Den Besten, 1996). Le traitement avec des glycosidases indique que cette protéine contient une portion carbohydate (Meulenberg et Pedersen-Den Besten, 1996). Peu d'informations sont disponibles quant à la fonction de cette protéine. Cependant des analyses de comparaison de séquences indiquent qu'elle s'apparente à la protéine Gs de l'EAV (Dea et al., 2000). Cette protéine est essentielle pour la réplication du virus chez l'EAV (Van Dinten et al., 1997). Récemment, un nouveau cadre de lecture ouvert, ORF2a, a été identifié dans la partie 5' de l'ORF2 (aussi appelé ORF2b) pour les *Artérovirus* (Snijder et al., 1999). Il a été démontré que ce gène code pour une protéine de 10 kDa, appelée GP_{2a} ou E, qui serait essentielle à la réplication du VSRRP (Wu et al., 2000). Comme pour la GP₂ le rôle de cette protéine est encore inconnu.

1.7.3.4 La GP₃

Produit de l'ORF3, la GP₃ est la plus grosse protéine, à l'exception de celles encodées par l'ORF1a et 1b, du VSRRP. Elle possède une masse qui varie entre 42 à 50 kDa, selon le degré de glycosylation (Gonin et al., 1998; Mardassi et al., 1995; Meulenberg et al., 1995). Elle est la protéine la plus riche en carbohydrates du VSRRP, avec 7 sites de N-glycosylation (Dea et al., 2000). Cette protéine est également la moins conservée entre les isolats des deux génogroupes (Mardassi et al., 1995; Murtaugh et al., 1995). Un segment de 12 acides aminés, qui est absent chez les souches du génogroupe nord-américain à l'extrémité C-terminale, change grandement le profil ionique de la protéine (Gonin et al., 1998; Katz et al., 1995). La fonction de la GP₃ n'a pas encore été définie, cependant elle pourrait en avoir plusieurs et avoir un effet sur la virulence des souches. En effet, cette protéine a été identifiée comme constituante du virion chez la souche européenne LV (Van Nieuwstadt et al., 1996). Ce qui est différent chez la souche nord-américaine IAF-Klop où cette protéine serait en grande partie bloquée dans le réticulum endoplasmique et serait absente du virion (Gonin et al., 1998; Mardassi et al., 1998). Une fraction soluble est également sécrétée à l'extérieur de cellule infectée (Gonin et al., 1998; Mardassi et al., 1998). Cette protéine semble être très immunogène chez les porcs infectés (Dea et al., 2000). La vaccination avec cette protéine pourrait protéger contre l'infection du VSRRP par un mécanisme autre que des anticorps neutralisants (Plana Duran et al., 1997).

1.7.3.5 La GP₄.

La GP₄ est le produit de l'ORF4 qui possède une masse moléculaire prédite d'environ 20 kDa, mais en raison de sa forte glycolysation, sept sites de N-glycosylation, cette protéine lorsqu'associée au virion, possède une masse de 31 à 35 kDa (Dea et al., 2000; Van Nieuwstadt et al., 1996). Comme la plupart des protéines du VSRRP, sa séquence est relativement bien conservée chez les isolats de même génogroupe, mais très variable entre des souches provenant de l'autre génogroupe (Dea et al., 2000). Des anticorps monoclonaux contre cette protéine ont démontré que la GP₄ possède des épitopes impliqués dans la neutralisation (Meulenberg et al., 1997). Cependant ces épitopes ne sont pas conservés entre les deux génogroupes (Meulenberg et al., 1997; Weiland et al., 1999). Pour les isolats nord-américains, une étude sur des sérums de porcs infectés a

démontré que plus de 60 % des animaux possédaient des anticorps contre la GP₄, mais que ceux-ci ne semblaient pas être impliqués dans la neutralisation (Gonin et al., 1999). Le rôle de la GP₄ n'a pas encore été défini. Cependant, la possibilité que cette protéine possède des domaines impliqués dans la neutralisation suggère son implication dans l'entrée du virus (Meulenberg et al., 1997).

1.7.3.6 La GP₅

La GP₅, protéine majeure de l'enveloppe du VSRRP, est encodée par l'ORF5. Cette protéine possède une masse moléculaire d'environ 24,5 à 26 kDa. C'est dans le gène de l'ORF5 que l'on retrouve le plus de variabilité entre les différents isolats (Dea et al. 2000). Comme pour la protéine G_L de l'EAV, cette protéine interagit avec la protéine de la matrice par des ponts disulfures (Mardassi et al., 1996). Son rôle dans l'infection du VSRRP n'a pas encore été déterminé. Cependant, cette protéine est capable d'induire des anticorps neutralisants (Pirzadeh et Dea, 1997). Plusieurs hypothèses ont été soulevées quant à son rôle dans l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule cible. Cependant, Dobbe et al., (2001) ont démontré à l'aide de virus chimères (formés de l'EAV et de l'ectodomaine de la GP₅ du VSRRP) que la GP₅ de l'EAV n'est pas impliquée dans la détermination du tropisme en culture cellulaire. Les anticorps contre la GP₅ sont normalement les premiers à être observés dans le cadre d'une infection normale avec du VSRRP (Loemba et al., 1996). La GP₅ a été démontrée comme étant apoptotique (Suarez et al., 1996) et impliquée dans le phénomène communément appelé "antibody-dependant enhancement" (ADE) (Yoon et al., 1994). L'immunisation génétique de porcelet avec l'ORF5 diminue grandement les lésions causées par le VSRRP (Pirzadeh et Dea, 1998). Cette protéine est donc une cible de choix pour l'élaboration de vaccin.

1.8 Réponse Immunitaire contre le VSRRP

Les connaissances sur la réponse immunitaire contre le VSRRP sont peu approfondies et ont été utilisées principalement dans le développement d'outils diagnostiques pour le virus (Bøtner, 1997a). On peut expliquer ce fait par le caractère récent de ce virus, et par son tropisme *in vivo* restreint au porc. De plus les connaissances sur le système

immunitaire porcine, ainsi que les réactifs pour en permettre son étude, sont très peu élaborés. Les animaux qui survivent à une première infection au VSRRP sont normalement protégés lors d'infections ultérieures par une souche homologe (Lager et al., 1997 et 1999). Cependant les éléments impliqués dans cette protection n'ont pas été encore clairement définis. Les porcelets nouveau-nés sont protégés contre l'infection au VSRRP pour environ 3 semaines par le colostrum de mères immuno-compétentes (Albina et al., 1994). De plus, il a été rapporté que l'injection d'anti-sérum hyperimmun neutralisant à des truies en gestation protège complètement contre les problèmes de reproduction (Osorio et al., 2002). Ces études suggèrent que la réponse humorale est suffisante pour contrer l'infection. Cependant le rôle de l'immunité de type cellulaire et de l'immunité muco-sale dans la protection contre cette infection n'a pas encore été réellement étudiées.

1.8.1 Réponse humorale

La présence d'anticorps contre le VSRRP peut-être détectée à partir du cinquième jour post-infection (Albina et al., 1992; Loemba et al., 1996; Nelson et al., 1994; Vézina et al., 1992; Yoon et al., 1992). Les IgM, le premier type d'anticorps à apparaître, atteignent leur titre maximum après 2 semaines post-infection, mais par la suite ils décroissent graduellement jusqu'à n'être plus détectables après 6 semaines (Loemba et al., 1996). Les IgG apparaissent eux aussi assez tôt après l'infection, mais leur niveau maximum est observé entre la troisième et la sixième semaine post-infection. Ces niveaux ultérieurement peuvent perdurer pendant plusieurs mois (Loemba et al., 1996; Yoon et al., 1995). Des études sur la cinétique d'apparition des anticorps ont démontré que la GP₅ était normalement reconnue une semaine post-infection, alors que la M et N sont normalement reconnues que lors de la deuxième semaine post-infection (Loemba et al., 1996). Malgré l'apparition tardive d'anticorps contre la N, cette protéine est la plus immunogénique, ce qui en fait une cible de choix pour le diagnostic sérologique du VSRRP. Cependant, les anticorps contre la N, en dépit de leur abondance, ne sont pas neutralisants. La N n'est donc pas considérée comme une cible de choix dans l'élaboration d'un vaccin (Yoon et al., 1995). Il a été démontré que l'ensemble des protéines produites à partir des ORFs 2 à 7 sont en mesure de générer une réponse en anticorps (Gonin et al.,

1998; Gonin et al., 1999; Kreutz et Mengeling, 1997; Loemba et al., 1996; Meulenberg et al., 1996; Nelson et al., 1994; Wu et al., 2000; Yoon et al., 1995). Dans le cas des protéines codées par l'ORF 1a et 1b, peu de travaux ont été réalisés sur leur antigénicité. Cependant il a été observé que des épitopes linéaires de la protéines NSP 2 sont reconnus par des sérums d'animaux infectés par le VSRRP (Oleksiewicz et al., 2001).

La présence d'anticorps neutralisants est normalement détectée à partir de 4 à 6 semaines post-infection (Albina et al., 1994; Loemba et al., 1996; Nelson et al., 1994). Jusqu'à maintenant, seuls des anticorps monoclonaux dirigés contre la GP4 et la GP5 ont été en mesure de neutraliser le VSRRP (Meulenberg et al., 1997; Ostrowski et al., 2002; Pirzadeh et Dea, 1997; Weiland et al., 1999). Des anticorps neutralisants ont été générés suite à l'immunisation de porcelet avec un plasmide contenant le gène de l'ORF5, suggérant un avenir prometteur pour cette nouvelle génération de vaccin (Pirzadeh et Dea, 1998).

1.8.2 Réponse cellulaire

Peu de travaux ont été réalisés sur la réponse cellulaire durant l'infection par le VSRRP. En fait, les connaissances sur l'immunité cellulaire du porc sont peu approfondies. Néanmoins, des tests de prolifération lymphoblastique utiles pour caractériser la fonction des lymphocytes T auxiliaire, avec l'utilisation de protéines du SRRP purifiés à partir de SDS-PAGE, ou des protéines recombinantes produites dans un vecteur du virus de la vaccine comme antigènes ont été réalisés (Bautista et al., 1999). Les épitopes lymphocytes T-spécifiques contenus dans la protéine M du VSRRP ont été ceux qui génèrent le plus haut niveau de prolifération, et ceci peu importe la source de l'antigène utilisé (Bautista et al., 1999). L'induction de prolifération lymphoblastique a également été observée en présence de la GP₂ et la GP₅, mais à des niveaux inférieurs à la M (Bautista et al., 1999). Dans ces mêmes travaux, la GP₄ et la N n'induisent aucune prolifération (Bautista et al., 1999). La détection d'hypersensibilité de type retardée (DTH), normalement représentative de la fonction TH2 chez l'homme et la souris, a aussi été observée chez des porcelets infectés avec le VSRRP (Bautista et Molitor, 1997). Des travaux réalisés sur les lymphocytes T et NK ont démontré: 1) une diminution du ratio

CD4/CD8; 2) l'augmentation du niveau IFN- γ , cytokine multifonctionnelle et caractéristique de la fonction TH₁; 3) l'augmentation de l'activité cytotoxique non-spécifique via les cellules NK (Lopez et al., 1999; Osorio 2002; Samsom et al., 2000; Shimizu et al., 1996). Ces résultats suggèrent la présence d'une activité cytotoxique spécifique médiée par les lymphocytes T CD8⁺. Il y a donc une activation de la réponse cellulaire lors de l'infection par le VSRRP. Cependant le rôle de l'immunité cellulaire dans l'élimination et la protection contre le VSRRP reste à être évalué.

1.9 Relations virus-hôtes

De part leur évolution, les virus ont développé une multitude de mécanismes pour atteindre leur but ultime, la survie. Ils peuvent être au niveau de l'attachement, la pénétration, la réplication de son génome, la prise de contrôle de la machinerie cellulaire, l'évasion du système immunitaire, de sa propagation dans d'autres cellules ou individus, et même dans sa subsistance dans l'environnement hors de son hôte. L'hôte, principalement par l'intermédiaire de son système immunitaire, a pour objectif d'éliminer cet envahisseur gênant et nuisible à sa survie. L'effet de ces mécanismes d'attaques et de défenses peut être dévastateur pour l'intégrité de la fonction des organes de l'hôte et même pour sa survie. La compréhension de ces différents mécanismes est essentielle dans l'élaboration de mesures préventives et prophylactiques. Dans le cadre de ce mémoire, nous étudierons seulement les événements précoces du cycle viral, soit l'attachement et la pénétration.

1.9.1 Tropisme *in vivo* du VSRRP

L'une des caractéristiques des *Artérovirus* est leur tropisme restreint à des populations de macrophages tissulaires. Le VSRRP infecte normalement en premier les macrophages alvéolaires de porc. Par la suite, il se propage vers d'autres tissus pour infecter d'autres types de macrophages dans le foie, la rate, le coeur et dans certains cas les cellules de la microglie (Larochelle et al., 1996; Sur et al., 1996). Cependant, des études ont démontré qu'il ne pouvait pas infecter les cellules souches de la moelle osseuse, les macrophages

péritonéaux et les monocytes du sang périphérique (Molitor et al., 1997; Duan et al., 1997). Dans le cas des monocytes, les opinions sont contradictoires en raison de la difficulté à conserver leur état non-différencié en culture cellulaire. Les cellules germinales testiculaires, les spermatides, peuvent aussi être infectées par le VSRRP *in vivo* (Sur et al., 1997). La présence de ces cellules, ainsi que de macrophage patrouillant ces tissus, sont probablement responsables du mode de transmission via le sperme.

1.9.2 Tropisme *in vitro* du VSRRP

L'étude du VSRRP *in vitro* n'est pas sans difficulté. Peu de lignées cellulaires sont en mesure de répliquer le virus. De plus les titres viraux obtenus ne dépassent que rarement 10^6 particules virales par ml. Une des deux façons d'isoler ou de propager le virus *in vitro*, est l'utilisation de cultures primaires de macrophages tissulaires porcins. Principalement les macrophages alvéolaires, qui sont obtenus suite à des lavages broncho-alvéolaires (Wensvoort et al., 1991). Ces cellules sont les seules capables de répliquer l'ensemble des différentes souches de SRRP et normalement aux titres viraux les plus élevés. Cependant, cette technique nécessite une chirurgie complexe pour extraire les poumons, non sans risque de contamination, ainsi que le sacrifice de l'animal. De plus, l'âge de l'animal, son pedigree ainsi que d'autres facteurs inconnus, peuvent avoir un effet sur la permissivité des MAPs au VSRRP *in vitro* (Albina 1997, Kim et al., 1993). L'isolement de virus à partir de cellules du sang périphérique porcine, mises en culture au moins 24 heures avant infection, est possible mais génère des rendements insuffisants, même si le sacrifice de l'animal est évité (Voicu et al., 1994).

Plusieurs groupes de recherches ont tenté, sans succès, de répliquer le virus sur une panoplie de lignées cellulaires couramment utilisées *in vitro* (Meng et al., 1996). Seules les cellules dérivant de la lignée MA-104, les cellules MARC-145 et les cellules CL2621, sont en mesure de répliquer le VSRRP à de hauts titres *in vitro* (Benfield et al., 1992; Kim et al., 1993). L'utilisation de ces cellules facilite l'étude du VSRRP, notamment chez les isolats nord-américains. Cependant, dans le cas de plusieurs souches européennes et de rares cas chez des souches nord-américaines, l'isolation du virus ne

peut être réalisée sur ce type de cellules. Ces cellules peuvent aussi répliquer l'EAV et le SHFV *in vitro* (Plagemann, 1996).

1.9.3 Différences entre MAP et les cellules MARC-145

La permissivité des cellules MARC-145 au VSRRP et la capacité du virus d'infecter presque qu'exclusivement des cellules de type macrophage *in vivo*, soulèvent de nombreuses questions sur les facteurs qui régissent ce tropisme restreint du virus. Les cellules MARC-145 partagent peu de caractéristiques avec les macrophages porcins. Cette lignée de cellules origine de cellules épithéliales de rein de singe. Les cellules MA-104, sont couramment utilisées pour le diagnostic de différentes infections virales (Kim et al., 1993). Les macrophages sont des cellules très différenciées présentes dans les différents tissus de l'individu. Ils proviennent de cellules progénitrices de la moelle osseuse. Les monocytes du sang périphérique se différencieront en macrophage suite à leur passage du sang périphérique aux tissus via endothélium des vaisseaux sanguin et à leur activation sous l'effet de différentes cytokines ou de chemokines. Les fonctions des macrophages peuvent varier selon le type de tissus où ils ont émigré. En général, ils éliminent les déchets cellulaires à l'aide de la phagocytose et de leurs lysosomes. Ils peuvent présenter des antigènes via leur complexe majeur d'histocompatibilité pour activer la réponse immune spécifique. Ils reconnaissent et détruisent les complexes antigène-anticorps, et peuvent éliminer de façon spécifique différents pathogènes par la reconnaissance via les récepteurs Toll (TLR) (Janeway et al., 2001).

1.9.4 Récepteurs généralités

Pour sa survie, un virus doit cibler la bonne cellule à infecter. La reconnaissance de cette cellule se fait par l'interaction d'une ou des protéines de la surface externe des virus avec une ou des molécules spécifiques de la membrane cytoplasmique (appelée récepteur cellulaire) de la cellule hôte. Cette interaction ne requiert aucune énergie et est réversible. Une cellule est dite susceptible si elle possède à sa surface un récepteur cellulaire capable d'attacher le virus. Cependant la présence du récepteur n'est pas suffisante pour l'accomplissement du cycle d'infection. Une cellule est dite permissive si l'infection de

celle-ci génère de nouvelles particules virales infectieuses. La permissivité peut-être liée à d'autres étapes du cycle viral ultérieures à la liaison du récepteur. La présence d'un co-récepteur peut-être requise.

Les molécules à la surface du virus appelées protéines virales d'attachement (PVA) dicteront le tropisme cellulaire. Dans le cas du VIH, par exemple, la protéine gp120 reconnaît spécifiquement la molécule CD4. Cependant elle possède des régions variables qui dicteront l'interaction avec le co-récepteur, et de ce fait, le tropisme (Clapham et McKnight, 2002). Chez d'autres virus, comme l'herpesvirus félin, plusieurs molécules du virus sont en mesure de reconnaître seule ou en synergie la cellule cible (Maeda et al., 1997). Des anticorps dirigés contre les PVAs sont souvent neutralisants, car ils bloquent l'initiation de l'infection, soit par un encombrement stérique ou par liaison avec le ou les sites spécifiques d'interaction avec le récepteur cellulaire. La détermination de ou des PVAs d'un virus peut donc être utile dans la génération de vaccins efficaces.

Différentes molécules à la surface des cellules peuvent servir de récepteur cellulaire pour les virus. De part leur évolution, certains virus ont choisi des molécules présentes sur l'ensemble des cellules et d'autres uniques à des types cellulaires. Chez un même type cellulaire, le stade de différenciation peut-être crucial pour l'expression de molécule spécifique servant de récepteur cellulaire. Une molécule peut-être le récepteur de plusieurs virus comme la molécule CD4 pour le VIH et le virus de l'herpès 7 (Maddon et al., 1986; Flint et al., 2000), ou le sulfate d'héparan pour le CMV, FMDV, HSV et le virus de la vaccine (Chung et al., 1998; Flint et al., 2000; Shieh et al., 1992). Un même virus peut également utiliser différents récepteurs pour entrer dans une cellule (Flint et al., 2000).

1.9.5 Attachement et récepteur pour le VSRRP

Les facteurs impliqués dans la reconnaissance par le VSRRP de sa cellule hôte ont été peu étudiés. Aucune protéine virale a été identifiée comme responsable de l'attachement à la cellule cible, même si des anticorps neutralisants contre la GP₄ et GP₅ ont été obtenus (Meulenberg et al., 1997; Ostrowski et al., 2002; Pirzadeh et Dea, 1997; Weiland et al.,

1999). Des travaux avec le génome d'ARN positif du virus ont mis en évidence l'importance d'un ou des récepteurs spécifique(s) à la surface des cellules cibles. Lorsque l'ARN est transfecté dans des cellules reconnues comme réfractaire à l'infection par le VSRRP, la production de nouvelles particules virales infectieuses a été observée (Kreutz, 1998; Meulenberg et al., 1998). La présence de polyéthylène glycol, un agent qui permet la fusion des membranes bi-lipidiques, permet également au VSRRP d'infecter les cellules Vero, normalement réfractaires à l'infection par le VSRRP (Kreutz, 1998). Ces résultats suggèrent la présence d'un second récepteur cellulaire lors de l'infection par le VSRRP. Une protéine de 210 kDa a été identifiée comme un récepteur cellulaire potentiel à la surface des macrophages alvéolaires de porc (Duan et al., 1998). Cette protéine est reconnue par deux anticorps monoclonaux qui bloquent l'infection par le VSRRP sur les MAP. Ces anticorps ont été produits par immunisation de MAP à des souris préalablement rendues immunotolérantes aux monocytes du sang périphérique de porc (Duan et al., 1998). Des expériences de co-localisation en immunofluorescence indirecte démontrent que les sites de liaison de ces anticorps sur les MAP correspondent également au site d'attachement du virus sur ces cellules (Nauwinck et al., 1999). Cependant, la détermination du gène codant pour cette protéine et la vérification de son activité biologique via la transfection de ce gène dans des lignées non-permissives à l'infection du VSRRP, preuves nécessaires et incontestables dans la caractérisation de récepteurs pour des virus, n'ont toujours pas été réalisées. Dans le cadre de l'infection au LDV, il a été suggéré que l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), Ia chez la souris, pourrait être impliqué dans l'entrée de ce virus (Inada et Mims, 1985). Cependant des traitements de macrophages murins à la trypsine empêchaient l'attachement du virus sans toutefois altérer l'expression de l'antigène Ia (Buxton et al., 1988)

Il a été rapporté que le VSRRP possède une activité d'hémagglutination des globules rouges de souris (Jusa et al., 1997a et 1997c). De plus cette activité semble être retrouvée chez l'EAV (Kubota et al., 1997; Sano et al., 1998). Cette activité hémagglutinine n'a pas été encore associée avec une protéine virale spécifique. Comme pour d'autres virus, cette activité pourrait avoir un rôle dans la reconnaissance des cellules cibles. L'héparine inhibe cette activité ainsi que la propagation du virus (Jusa et al., 1997a et 1997b;

Vanderheijden et al., 2001). Ceci indique que le VSRRP pourrait avoir plus d'une façon d'entrer chez la cellule hôte. Une molécule de type héparine ou sulfate d'héparan à la surface des cellules cibles pourrait être à l'origine de l'infection (Delputte et al., 2002; Jusa et al., 1997b). Plusieurs virus, dont les herpesvirus, ont été identifiés comme utilisant des glycoprotéoglycans, sulfate d'héparan, à la surface des cellules pour récepteur cellulaire (Flint et al. 2000). Cependant dans le cas du VSRRP, comme pour d'autres virus, cette voie d'entrée n'est peut-être qu'une conséquence de l'adaptation à la culture cellulaire *in vitro*.

Étant donné que les macrophages tissulaires porcins possèdent la propriété d'attacher la portion Fc des anticorps, il a été suggéré que le VSRRP pouvait également entrer dans la cellule cible via ce mécanisme. L'ADE, pour «antibody-dependent enhancement», qui peut être traduit comme la facilitation de l'infection dépendante d'anticorps, est une problématique importante dans des infections par des virus comme la fièvre jaune et le VIH (Fust 1997; Lei et al., 2001). La diminution de la réponse humorale inférieure au niveau de protection augmente l'infektivité de ces virus. Des expériences *in vivo* ont révélé, dans le cas du VSRRP, des infections plus sévères chez des animaux préalablement immunisés que les non-traités (Yoon et al., 1994; Pirzadeh et Dea, 1998). Ce phénomène semble être attribué aux anticorps dirigés contre la gp5 du VSRRP (Yoon et al., 1994; Pirzadeh et Dea, 1998). Ces données mettent en évidence ce phénomène comme une porte d'entrée du virus chez le macrophage porcin et doivent être prises en considération lors de l'élaboration de protocole de vaccination.

1.9.6 Pénétration du VSRRP et entrée de son génome dans la cellule

Après l'attachement du VSRRP à la cellule, une polarisation des molécules de clathrine s'effectue autour de la liaison virus-récepteur. Une invagination de la membrane se produit et on observe un phénomène appelé «puits de clathrine». Ce phénomène a été décrit lors de l'infection *in vitro* de MAP et de cellules MARC-145 (Kreutz et Arkermann, 1996; Nauwynck et al., 1999). Cette invagination se referme autour du virus et forme un endosome qui va fusionner avec d'autres vacuoles où le virus subira les attaques enzymatiques de la cellule qui provoqueront la destruction de son enveloppe et

de sa capsid ainsi que la libération de son génome d'ARN dans le cytoplasme de la cellule (Flint et al., 2000). Cet endocytose est sensible au pH et est efficace seulement à pH acide. Des expériences avec des substances comme le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) ou de la chloroquine, substances qui induisent à l'endosome une déprotonification et une neutralisation du pH, bloquent la réplication du virus (Kreutz et Arkermann, 1996). De plus, des expériences en microscopie confocale ont démontré que les particules virales, qui normalement disparaissent après 6 heures d'infection dans le cytoplasme de la cellule, restent intactes suite à ces traitements (Nauwynck et al., 1999). Les mécanismes impliqués dans la destruction de la membrane virale et la décapsidation du virus n'ont pas encore été identifiés dans le cadre des infections par les Artérovirus.

Deuxième Partie : Résultats

Chapitre 1

Mise en évidence de l'attachement du VSRRP sur différentes lignées cellulaires.

Introduction

Le tropisme du VSRRP *in vitro* est spécifique aux MAP, aux leucocytes du sang périphérique de porc, et aux lignées de cellules dérivées de la lignée épithéliale de rein de singe MA-104, soit les cellules MARC-145 et CL2621. Les macrophages porcins et les cellules de rein de singe sont très différents au niveau de leur fonction et de leur origine. Il n'existe aucune étude sur les caractéristiques que ces cellules pourraient partager. Des études ont cependant démontré que l'entrée artificielle du génome viral dans le cytoplasme (par transfection) chez des lignées cellulaires reconnues pour être réfractaires à l'infection par le VSRRP pouvait permettre la réplication du virus (Kreutz et al., 1998; Meulenberg et al., 1998). Ces résultats suggèrent que la restriction du tropisme lors de l'infection par le VSRRP est liée à des événements précoces du cycle viral, soit l'attachement du virus à la cellule ou à sa pénétration.

Dans le but d'obtenir d'avantage d'information sur les phénomènes liés à la restriction du tropisme du VSRRP, un test a été élaboré pour suivre l'attachement du virus à la surface des cellules. Brièvement, les cellules étaient incubées en présence du virus pour une période d'une heure à 4°C. Après des lavages, les cellules étaient incubées avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine de la nucléocapside. Cet anticorps avait été biotinylé au préalable, ce qui a permis par la suite le marquage du complexe anticorps-virus-cellules avec la streptavidine conjuguée à un fluorochrome, la phycoerythrine. La fluorescence émise était analysée par cytométrie de flux. Le déplacement du niveau de fluorescence vers des niveaux de fluorescence de plus forte intensité signifie la présence de particules virales attachées à la surface des cellules. Diverses expériences ont été réalisées par la suite afin de vérifier la spécificité du test et la nature du ou des facteurs responsables de l'attachement. Finalement, d'autres analyses ont été effectuées pour identifier quel était le phénotype des leucocytes du sang périphérique pouvant être infectés par le VSRRP et pour démontrer si l'attachement du VSRRP était restreint aux cellules permissives à l'infection.

Article 1

Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells.

Dominic Therrien, Yves St-Pierre et Serge Dea

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

Archives of Virology 2000. 145: 1099-1116

Contribution des auteurs

Cette première publication a pour sujet l'attachement du VSRRP sur différentes lignées cellulaires. Les principaux objectifs consistaient à: 1) vérifier si l'attachement du virus VSRRP sur les cellules susceptibles via un récepteur cellulaire était l'unique étape nécessaire à l'amorce d'un cycle complet d'infection et, 2) à déterminer le phénotype des leucocytes du sang périphérique de porc susceptibles à l'infection par le virus. Nos résultats ont démontré que les cellules exprimant les CD14 et SWC3, marqueurs de monocytes circulants chez le porc, étaient susceptibles au VSRRP. De plus, les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence un ou plusieurs facteur(s) de nature protéique responsable(s) de l'attachement du VSRRP à la surface des cellules permissives. De plus, nous avons démontré que l'attachement n'était pas spécifique aux lignées cellulaires permissives.

L'ensemble du travail technique, incluant la production de virus, l'enrichissement des cellules leucocytaires de porc, la culture et propagation des différentes lignées cellulaires testées, de même que leur infection, la biotinylation d'anticorps monoclonaux et les expériences de marquage ont été réalisées par Dominic Therrien, qui a également participé à l'élaboration des protocoles d'analyse en cytométrie en collaboration avec Marcel Desrosiers. Dominic Therrien a également rédigé l'article avec l'aide du Dr Serge Dea. L'ensemble des travaux a été sous la supervision des Drs S. Dea et Y. St-Pierre. Le Dr. St-Pierre a également révisé le manuscrit.

Résumé

Chez son hôte naturel, il a été démontré que le VSRRP possède un tropisme restreint pour les cellules de type monocyte/macrophage. *In vitro*, les cellules MARC-145 et CL2621, clonées à partir de la lignée de cellules de rein singe MA-1 04, sont les seules lignées de cellules non-porcines reconnues pour leur permissivité au VSRRP. L'article qui suit présente les résultats de la mise au point d'un test pour suivre l'attachement du

VSRRP à la surface de cellules permissives et non-permissives à l'infection virale. L'attachement du VSRRP aux macrophages alvéolaires de porc et les cellules en lignée continue MARC-145 fut d'abord confirmé. Nous avons également démontré que le VSRRP s'attache spécifiquement aux monocytes parmi les leucocytes du sang périphérique de porc, ce qui suggère que les lymphocytes sont réfractaires à l'infection par ce virus. La capacité des cellules MARC-145 à lier le VSRRP a pu être bloquée lorsque ces cellules étaient préalablement incubées avec la chymotrypsine et la pronase E, mais non avec la neuraminidase. Les cellules traitées avec les protéases récupéraient leur activité d'attachement 8 heures après le traitement. Cependant, si les cellules au cours de cette période étaient incubées en présence de cycloheximide, un agent pharmacologique qui inhibe la synthèse protéique, il n'y avait pas de régénération de l'activité d'attachement. Ces résultats confirment la nature protéique du facteur d'attachement. Des expériences conduites sur des lignées cellulaires reconnues comme étant réfractaires à l'infection par le VSRRP ont démontré que plusieurs lignées non-permissives pouvaient attacher le virus. Les données obtenues démontrent que l'interaction entre le VSRRP et un facteur d'attachement spécifique à la surface de la cellule n'est pas suffisante pour obtenir une infection productive. La présence d'un second récepteur ou d'un autre phénomène survenant peu après la pénétration du virus est donc requise pour la poursuite du cycle viral.

Chapitre 2

Production d'anticorps monoclonaux contre les protéines de surface des
cellules MARC-145

Introduction

Jusqu'à ce jour, peu de travaux ont été réalisés en regard du ou des récepteurs cellulaires des Artérovirus des animaux domestiques. Aucun récepteur cellulaire n'a été identifié chez les membres de la famille *Arteriviridae*. Cependant, les travaux récents de Duan et al., (1998) suggèrent qu'une molécule de 210 kDa exprimée à la surface des MAP pourrait potentiellement agir comme récepteur cellulaire. Dans le but d'approfondir les travaux présentés dans la première partie, d'autres expériences ont été réalisées afin d'identifier et de caractériser ou les facteur(s) d'attachement à la surface des MAP et des cellules MARC-145 spécifique(s) au VSRRP. Pour ce faire, des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines de surface des MAP et des cellules MARC-145 ont été générés. Des souris Balb/c ont été immunisées par la voie intra-péritonéale avec des lysats de cellules enrichies en protéines de surface ou avec du virus semi-purifié. L'utilisation du virus semi-purifié est basée sur l'hypothèse selon laquelle, lors de sa purification, le virus migre sur un gradient de sucrose 30 % avec son récepteur cellulaire lié à l'enveloppe virale. Cette stratégie permet d'obtenir une préparation enrichie de récepteurs cellulaires malgré la présence en grande concentration des protéines structurales d'origine virale. Ce type d'immunisation a été fructueux dans notre cas car il nous a permis d'obtenir plusieurs hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre les protéines de surface des cellules MARC-145. Environ 25 anticorps monoclonaux dirigés contre les MAP et ou les cellules MARC-145 ont été ainsi obtenus. Des tests de blocage de l'infection et de l'attachement ont été réalisés. Parmi les anticorps testés, seul l'anticorps monoclonal 18-F6 s'est avéré efficace pour bloquer entièrement l'infection et partiellement l'attachement. Des études ont été réalisées pour identifier la protéine reconnue par cet anticorps à la surface des cellules MARC-145. Un autre anticorps a été caractérisé comme étant spécifique à un épitope de la nucléocapside du VSRRP. Cet anticorps monoclonal s'est avéré très utile dans l'élaboration d'un test d'ELISA de compétition pour détecter la présence d'anticorps anti-VSRRP dans les sérums d'animaux de champ.

Article II

Monoclonal antibody directed against a membranous protein of
MARC-145 cells blocks infection by PRRSV.

Dominic Therrien et Serge Dea

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

Advances in Experimental Medecine Biology 2001. 494: 395-399.

Contribution des auteurs

Cette seconde publication porte sur les caractéristiques d'un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine membranaire des cellules MARC-145, et ayant la capacité d'empêcher l'infection de ces cellules par le VSRRP. La génération de cet anticorps découle de travaux visant à établir une banque d'anticorps monoclonaux capables de bloquer l'attachement ou l'infection du VSRRP afin d'éventuellement identifier le récepteur du VSRRP. Nos résultats indiquent qu'une protéine de 66 kDa pourrait potentiellement agir comme récepteur ou co-récepteur cellulaire pour le VSRRP. Nos résultats démontrent également que l'entrée du VSRRP se fait via des récepteurs cellulaires différents chez les cellules MARC-145 et les MAP.

La préparation de lysats cellulaires, l'immunisation des souris, les expériences de fusions, la sélection et le sous-clonage, les tests d'attachement et de blocage, ainsi que les tests d'immunofluorescence et d'immunobuvardage ont été réalisées par Dominic Therrien, sous la supervision Dr Serge Dea. Une partie des travaux présentés dans cet article proviennent de ceux réalisés dans le premier article de ce mémoire. Le manuscrit a été rédigé entièrement par Dominic Therrien sous la supervision du Dr Serge Dea.

Résumé

In vivo, le VSRRP possède un tropisme restreint aux cellules de type monocyte/macrophage ainsi qu'aux cellules germinales testiculaires. *In vitro*, le VSRRP peut se répliquer uniquement sur les cultures primaires de macrophages alvéolaires de porc et les cellules MARC-145 ou CL2621, sous-clones d'une lignée de reins de singe, les cellules MA-104. Les facteurs impliqués dans le tropisme sont très peu connus. Une protéine de 210 kDa a été proposée comme un récepteur potentiel pour le VSRRP à la surface des macrophages alvéolaires de porc (Duan et al., 1998). Cependant cette molécule n'est pas présente à la surface des MARC-145. Dans l'étude qui suit, des anticorps monoclonaux ont été produits chez des souris immunisées avec des lysats de

cellules MARC-145 ou de MAP ou du VSRRP purifié sur coussin de sucrose 30 %. Après sélection et sous-clonage et production de liquide d'ascites, les anticorps ont été caractérisés pour leur capacité à bloquer l'infection et l'attachement du virus aux cellules cibles. L'anticorps monoclonal 18-F6, dirigé contre une protéine de 60 à 66 kDa, bloque complètement l'infection et partiellement l'attachement du VSRRP sur les cellules MARC-145. Ces résultats suggèrent que cette protéine pourrait agir comme un récepteur potentiel ou second récepteur à la surface des cellules MARC-145.

Article III

Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant E. coli-expressed nucleocapsid protein as antigen.

Serge Dea, Louise Wilson, Dominic Therrien et Estella Cornaglia

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

Journal of Virological Methods 87 2000:109-122

Contribution des Auteurs

Ce troisième article discute de l'élaboration et de la validation statistique d'un test de compétition ELISA pour la détection d'anticorps anti-VSRRP dans des sérums de porcs utilisant comme antigène la protéine de nucléocapside recombinante exprimée chez *E. coli*. L'objectif principal consistait à démontrer l'efficacité de ce test ELISA de compétition comme outil diagnostique pour l'identification d'animaux infectés par le VSRRP. Le clonage du gène dans le vecteur pGEX, de même que l'expression, la production, et la purification de la protéine de fusion recombinante, et l'ensemble des paramètres du test ELISA, ont été réalisés par Louise Wilson. J'ai été responsable de la production de l'anticorps monoclonal IAF-2B4, ainsi que des épreuves d'immunoprécipitation de la protéine de la nucléocapside après incubation en présence des anticorps IAF-2B4 et IAF-K8. Les sérums de champs ont été fournis et testés par Estella Cornelia de Biovet Recherche Inc. Les analyses statistiques ont été réalisées par le Dr Serge Dea. La rédaction du manuscrit a été réalisée par le Dr Serge Dea avec ma collaboration pour la présentation des résultats. N. Sawyer et G. Laganière ont également participé à cette article principalement pour les expériences d'immunofluorescence indirecte.

Bien que l'objectif principal de cet article, i.e. la détection d'anticorps anti-VSRRP à partir d'un test ELISA, ne correspond pas aux objectifs spécifiques de ce mémoire, il est important souligner que ces mêmes AcMo ont été utilisés dans les tests de cytofluorométrie pour l'identification des cellules susceptibles au VSRRP. Il est également important de noter que lors de l'immunisation des souris, du virus semi-purifié a été utilisé pour l'immunisation. Ceci dans l'hypothèse que le VSRRP, lors de la purification sur un coussin de sucrose, sédimente avec son récepteur cellulaire par l'entremise de la protéine d'attachement du virus, inconnue encore dans le cas du VSRRP. Ce type d'immunisation a été fructueux dans notre cas, car l'anticorps monoclonal 18-F6 bloque l'infection des cellules par le virus. L'anticorps monoclonal 2B4, un outil très important dans le test de compétition par sa capacité à reconnaître la

souche vaccinale NEB-1, provient également de cette expérience. Une partie de la discussion commentera l'hypothèse mentionné ci-haut.

Résumé

La protéine de la nucléocapside est la plus abondante du VSRRP. Cette protéine est hautement antigénique, ce qui en fait une bonne candidate pour la détection d'anticorps spécifiques au VSRRP. Un segment d'ADN complémentaire au gène de la nucléocapside de souche IAF-KLOP a été cloné dans le vecteur d'expression procaryotique pGEX-4T-1 en aval du gène codant pour la glutathione S-transférase. La protéine recombinante de fusion, exprimée chez *E. coli*, a été purifiée par chromatographie d'affinité et utilisée comme antigène pour la mise au point d'une épreuve ELISA de compétition. Deux anticorps monoclonaux spécifiques (IAF-K8 et IAF-2B4) pour la nucléocapside ont été obtenus à partir d'expériences de fusion avec les splénocytes de souris immunisées avec du VSRRP semi-purifié sur un coussin de sucre 30 %. Ces deux anticorps reconnaissent des épitopes conformationnels très conservés chez les isolats nord-américains de VSRRP. Les sérums de 95 porcs infectés expérimentalement avec la souche IAF-KLOP ont été testés dans un ELISA de compétition. Au total, 86 % des sérums positifs en immunofluorescence indirecte et 92,6 % des sérums positifs avec le test ELISA commercial HerdCheck® (IDEXX) ont été détectés par le test ELISA de compétition. La spécificité du test était de 100 % par rapport à l'immunofluorescence indirecte et 96,2 % par rapport au test ELISA commercial HerdCheck®. Des tests réalisés sur des échantillons cliniques provenant de troupeaux positifs ou négatifs pour le VSRRP ont permis de déterminer que cet ELISA de compétition donne au niveau individuel des résultats similaires à ceux obtenus en immunofluorescence indirecte ou avec le test ELISA commercial HerdCheck®. Au niveau des troupeaux, la sensibilité et la spécificité du test ELISA de compétition sont de 100 %.

Troisième Partie : Discussion

L'agent étiologique du SRRP, le VSRRP, possède un tropisme restreint aux cellules de type monocyte/macrophage et aux cellules germinales testiculaires chez son unique hôte naturel, le porc. *In vitro*, des cultures primaires de macrophages alvéolaires et de leucocytes du sang périphérique de porc ainsi que les cellules MARC-145 et CL2621 peuvent répliquer le virus. Les facteurs qui dictent cette restriction dans le tropisme n'ont pas été encore identifiés. Les deux principaux objectifs de ces travaux de maîtrise furent l'étude des facteurs responsables du tropisme restreint du VSRRP et la caractérisation préliminaire du récepteur du VSRRP chez ces cellules cibles. Afin de faciliter la lecture de ce la discussion, il est bon de réitérer la définition des termes susceptibilité et permissivité. Ainsi, une lignée cellulaire est dite susceptible à l'infection par le VSRRP si elle est en mesure d'attacher le virus à sa surface alors qu'une lignée cellulaire est dite permissive à l'infection par le VSRRP si de nouvelles particules virales sont produites suite à l'infection.

L'attachement du virus à sa cellule cible est la première étape essentielle à l'initiation du cycle viral. Ce processus se produit normalement sans aucun apport énergétique et est réversible. Dans but de mieux comprendre cette étape du cycle viral dans le cadre de l'infection au VSRRP et les facteurs impliqués dans ce phénomène, un test d'attachement a été développé. La propriété d'une lignée cellulaire à attacher le VSRRP était déterminée suite à l'analyse en cytométrie de flux du niveau de fluorescence de cellules qui ont été mises en présence de virus à une température de 4°C, empêchant ainsi l'internalisation du complexe virus-récepteur, et ensuite marquées à l'aide d'un anticorps biotinylé, conjugué ensuite avec un conjugué streptavidine-fluorochrome. L'utilisation de virus marqués à l'aide d'un isotope radioactif, comme le S^{35} , pour l'étude de récepteur cellulaires s'avère une technique fort utile pour suivre l'attachement de virus (Lachance et al., 1998). Cependant le choix de la technique d'observation de l'attachement par cytométrie de flux se justifie pour deux raisons. Premièrement, la préparation d'une suspension virale de titre supérieur à 10^7 particules infectieuses par millilitre, quantité minimale pour ce type d'essai avec un isotope radioactif, est difficile à obtenir dans le cas du VSRRP et nécessite beaucoup de matériel cellulaire. Deuxièmement, la cytométrie en flux permet l'analyse de la capacité d'attachement d'une cellule ou d'une population de cellules, en plus de permettre d'observer les différences dans le niveau d'attachement de

cellules d'une même suspension cellulaire. De plus, grâce à des analyses multiparamétriques avec des marqueurs de surface spécifiques, il est possible de déterminer le phénotype des cellules dans une population hétérogène qui attachent le virus, comme c'est le cas avec les leucocytes du sang périphérique.

3.1 Présence d'un facteur d'attachement spécifique pour le VSRRP à la surface des cellules permissives.

Les premiers essais ont été réalisés avec des lignées cellulaires permissives à l'infection. Le VSRRP est en mesure de s'attacher de façon spécifique à ces cellules. En effet, l'ensemble des MAP et des cellules MARC-145 lient le virus. Ceci se traduit par un déplacement vers des niveaux de fluorescence plus élevés chez l'ensemble des cellules. Étant donné que ces lignées sont assez homogènes (les cellules MARC-145 origine d'un même clone (Kim et al., 1994) et 90 à 99 % des cellules extraites après des lavages broncho-alvéolaires sont des macrophages (Ganter, 1997), ce n'est pas surprenant que l'ensemble de ces populations possède la capacité d'attacher le VSRRP. Ces résultats sont en accord avec ceux normalement obtenus lors d'infection *in vitro* de ces lignées cellulaires. L'ensemble des cellules, après 48 heures post-infection, sont positives en IFI avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine N. Pour ce qui est des leucocytes du sang périphérique, seulement une partie des cellules peuvent attacher le virus, ce qui corrobore également avec des résultats obtenus lors de l'infection *in vitro* de ces cellules (Voicu et al., 1994). Ces résultats suggèrent la présence d'un ou des facteur(s) d'attachement spécifique(s) au VSRRP à la surface des cellules permissives.

Plusieurs données obtenues démontrent la spécificité de ce ou ces facteurs d'attachement. Premièrement, on observe, 48 heures post-infection, que l'ensemble des cellules est infecté lorsque les cellules MARC-145 sont incubées une heure en présence du virus à 4°C, dans des conditions similaires au test d'attachement, et remises en culture par la suite. Cependant, si ces cellules sont traitées au préalable avec de la chymotrypsine ou de la pronase E, et incubées par la suite avec le virus à 4°C, l'attachement du virus sur les cellules est fortement réduit, atteignant des niveaux de fluorescence similaires à ceux obtenus avec les cellules en absence de virus. De plus, lorsque ces cellules traitées et

infectées sont par la suite mises en culture, seuls quelques foyers d'infection sont observés après 48 heures. Cette présence de cellules infectées pourrait être une conséquence de cellules dont la protéolyse du ou des facteur(s) d'attachement n'a(ont) pas été complète(s) ou par du virus résiduel qui a été en mesure d'infecter ces cellules après un certain temps en culture, lorsque le ou les facteur(s) d'attachement ont été synthétisés de nouveau. Ces résultats suggèrent que le virus qui s'attache aux cellules susceptibles est infectieux.

Deuxièmement, l'anticorps monoclonal IAF-K8 a été utilisé pour détecter la présence de virus à la surface des cellules susceptibles au VSRRP. Cet anticorps monoclonal reconnaît un épitope sur la nucléocapside du VSRRP (Dea et al., 1996). La nucléocapside est une protéine basique et très adhérente et théoriquement non-exposée à la surface du virus (Dea et al., 2000). On pourrait croire dans ce contexte que cet anticorps ne devrait pas être en mesure de détecter des particules virales infectieuses, mais ce n'est pas le cas. Des essais avec des anticorps monoclonaux dirigés contre la GP₅ du virus ne donnent pas des résultats clairs comme ceux obtenus avec IAF-K8. Probablement en raison du fait qu'ils sont dirigés contre des épitopes linéaires qui ne sont peut-être pas exposés lorsque le virus est attaché à la cellule (Pirzadeh et Dea, 1997). L'utilisation de sérums polyclonaux monospécifiques de lapins, dirigés contre la GP₅, ou des sérums de porcs convalescents n'a pas été retenue. Bien que donnant des résultats de meilleures intensités chez les MAP, leur réactivité contre la lignée cellulaire MARC-145 était trop forte pour que l'on puisse déterminer de façon convaincante si le virus était attaché. Nous avons plutôt choisi d'utiliser l'anticorps monoclonal IAF-K8, avec lequel on pouvait facilement suivre la présence ou non de virus à la surface des cellules et dont la réactivité contre les différentes lignées cellulaires utilisées dans ces travaux était négligeable. Selon nos résultats, il semble que l'enveloppe du VSRRP est perméable au passage des anticorps ou qu'elle soit suffisamment endommagée pour permettre au complexe anticorps-nucléocapside de se former. Des traitements du virus, avec des substances comme le chloroforme ou le trichloro-trifluoroéthane (communément appelé le fréon), qui libèrent soit en totalité ou en partie l'enveloppe du VSRRP donnant des particules non-infectieuses essentiellement composé de la nucléocapside, ont été réalisés. Ces nucléocapsides libres ont été démontrées comme étant incapables de s'attacher à la

surface des cellules permissives, confirmant ainsi l'hypothèse que la présence de particules attachées à la surface est reconnue de façon spécifique par l'anticorps monoclonal biotynilé IAF-K8.

Troisièmement, les essais avec les leucocytes du sang périphérique démontrent que seulement une partie des cellules est en mesure d'attacher le virus. Le phénotype de ces cellules correspond à celui de monocytes, de part leur expression de CD14 et de CD11b/CD18 à leur surface. Ces expériences démontrent clairement que le test d'attachement développé dans le cadre de cette étude pouvaient différencier les cellules susceptibles et non-susceptibles et que l'attachement généralement observé n'est pas un phénomène induit par le traitement fait aux cellules. L'ensemble de ces résultats démontrent donc que le test d'attachement est spécifique et qu'il existe un ou des facteurs spécifique(s) d'attachement à la surface des cellules permissives au VSRRP. Des travaux sur l'entrée du VSRRP chez les MAP et MARC-145 démontrent que la pénétration du virus dans la cellule se produit par endocytose suite à l'attachement du virus à la surface de la cellule. (Kreutz et Arkermann, 1996; Nauwynck et al., 1999). Ces résultats, comme ceux de notre étude, démontrent également la présence d'un récepteur spécifique ou facteur d'attachement à la surface des cellules permissives.

3.2 VSRRP peut infecter seulement les cellules CD14 et CD11b/CD18 positives dans le sang périphérique porcin.

Il est possible de retrouver du VSRRP dans l'ensemble des tissus où se trouve des cellules de type macrophages lors de l'infection *in vivo* (Molitor et al., 1997; Sur et al., 1996). Les deux voies connues pour l'entrée du VSRRP chez les animaux sains sont la voie aérienne et par le sperme des verrats (Wensvoort et al., 1991; Sur et al., 1997). Dans les deux cas, la propagation du virus à travers les différents tissus de l'animal corrobore avec la présence d'une virémie élevée dans le sang périphérique. Voicu et al. (1994) ont émis l'hypothèse que les monocytes agissait comme réservoir dans le cadre de l'infection avec le VSRRP suite à l'infection de leucocytes du sang périphérique de porc. Dans les présents travaux, l'infection des leucocytes a été reproduite *in vitro*. De plus, à l'aide de marquage avec différents marqueurs de surface des leucocytes porcins, il a été possible

de déterminer que les cellules CD14⁺ et CD11b/CD18⁺ (SWC3 ou Mac-1) étaient les seules capable d'attacher le VSRRP lors de notre essai. Ce phénotype cellulaire est caractéristique des monocytes chez le porc (Dominguez et al., 1998; Goyert et al., 1988; Kielian et al., 1994). Duan et al. (1997) suggèrent que les monocytes du sang périphérique ne peuvent pas être infectés *in vivo*, car *in vitro* ces cellules ont besoin d'être 24 heures en culture avant de produire une infection complète par le VSRRP. Cependant, dans la présente étude, les leucocytes de porc étaient immédiatement utilisés dans le test d'attachement. La différenciation du monocyte en macrophage, phénomène observé après 24 heures en culture de leucocytes du sang périphérique, n'est donc pas essentielle pour permettre l'attachement du virus *in vitro*. Toutefois, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la poursuite du cycle viral est possible chez les monocytes. Les lymphocytes étant incapables d'attacher le virus ne peuvent être infectés *in vivo* ou *in vitro*.

3.3 Effet de l'infection du VSRRP sur la réponse immune.

Les fonctions lymphocytaires n'étant pas affectées directement par l'infection du VSRRP, tel que démontré dans les présents travaux, il est possible de spéculer sur l'effet virus dans le cadre d'infections secondaires. Lors de l'infection par le VSRRP, il a été suggéré qu'en raison d'une fréquence accrue d'infections secondaires comme *Mycoplasma hyorinis*, *Streptococcus suis* ou par le circovirus porcin, les animaux peuvent développer une immunodéficiences (Galina et al., 1994; Van Reeth et al., 1996). Plusieurs symptômes pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal lors de l'infection du VSRRP sont souvent dus à la présence de ces infections secondaires (Albina, 1997). Les expériences d'infection mixte *in vivo*, pour évaluer si le VSRRP favorise l'infection et amplifie les symptômes de d'autres pathogènes, n'ont pas produits des résultats éloquentes et sont contradictoires dans certains cas (Cooper et al., 1995; Galina et al., 1994; Solano et al., 1997; Van Alstine et al., 1996; Van Reeth et al., 1996). Cependant, ce type d'expérience n'est peut-être pas représentatif des conditions physiologiques retrouvées dans les troupeaux infectés. Ces données soulèvent par contre la possibilité que l'infection du VSRRP affecte la capacité de l'animal de générer une réponse immune normale, rendant propice l'apparition de d'autres pathogènes. Les macrophages

tissulaires, composantes importantes dans l'amorce de l'immunité cellulaire, et également composante centrale dans l'immunité innée, sont les principales cibles du VSRRP. La perte importante de macrophages lors de l'infection, combinée également avec une baisse de monocytes, macrophages non-différenciés, pourrait réduire les fonctions de défenses du système immunitaire contre d'autres organismes. Lors d'infection bactérienne, les récepteurs TLR, molécules qui reconnaissent spécifiquement des motifs de paroi externe de bactérie ou de l'ADN nu (Akira et al., 2001) permettent aux macrophages d'éliminer des agents pathogènes avant même d'avoir un foyer d'infection ou du moins réduisent le nombre de pathogènes et les dommages qu'ils produisent, jusqu'à la réponse immune spécifique soit effectrice. Or, l'infection au VSRRP doit nécessairement altérer ce mécanisme de défense, et pourrait en être ainsi la cause de cette immunodéficience temporaire. Cependant, l'infection par le VSRRP ne semble pas affecter la génération d'une réponse humorale, facteur important dans l'élimination de pathogène de type bactérien (Loemba et al., 1996). Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet négatif par l'infection du VSRRP lors d'infection mixte.

3.4 Nature du facteur d'attachement.

Au cours de l'évolution, les virus ont trouvé différents moyens d'entrer dans leurs cellules hôtes via différents types de récepteur. Certains virus utilisent des protéines spécifiques à des cellules particulières, comme le CD4 et les récepteurs de chemokines pour le VIH, ou des glycanes largement répandus sur un bon nombre de cellules, comme le sulfate d'héparan pour le CMV (Bourg et al., 1993; Compton et al., 1993). Duan et al. (1998) suggèrent qu'une protéine de 210 kDa, à la surface des MAP agit comme récepteur pour le VSRRP. Nos études avec des traitements avec des protéases et des inhibiteurs de synthèse protéique ont permis de déterminer la nature protéique du ou des facteur(s) d'attachement spécifique(s) pour le VSRRP. En effet, la chymotrypsine et la pronase E diminuent la présence de virus à la surface de la cellule à des niveaux similaires à ceux obtenus avec les contrôles non-infectés. Cette activité d'attachement est rétablie après une période de 8 heures d'incubation en culture à 37°C. De plus la présence de cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, empêche la formation de nouveaux facteurs d'attachement à la surface des MARC-145. La génération d'anticorps

monoclonaux a permis également d'identifier une protéine d'environ 60-66 kDa à la surface des cellules MARC-145 qui est un potentiel facteur d'attachement pour le VSRRP. Ces résultats démontrent que le ou les facteur(s) d'attachement étudié(s) sont de nature protéique. Cependant, les travaux avec la tunicamicine, un inhibiteur de la glycosylation, n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle de groupement glycosylés dans l'attachement du VSRRP à la surface des MARC-145 (Therrien et al., 1999a). Par contre, lorsque le virus est incubé en présence d'héparine, sa capacité à s'attacher au MARC-145 est fortement réduite (Therrien et al., 1999b). L'héparine semble donc bloquer l'attachement du VSRRP à la surface des cellules MARC-145, laissant supposer que le VSRRP est capable de s'attacher à des structures « heparin-like » à la surface des cellules. Les travaux sur l'activité hémagglutinine et la propagation du VSRRP en présence d'héparine suggèrent également la présence d'une molécule « heparin-like » à la surface des cellules MARC-145, servant de facteur d'attachement pour le VSRRP (Jusa et al., 1997a et 1997b). La protéine M du VSRRP, même si elle ne possède qu'un court segment exposé à la surface du virus, serait responsable de la liaison avec cette structure de type « heparin-like » (Dea et al., 2000; Delputte et al., 2002). Plusieurs virus, notamment le virus de l'herpes féline (Maeda et al., 1997) et le RSV (Bourgeois et al., 1998), sont capables de reconnaître des structures de type « heparin-like » pour infecter leur cellule cible. Dans le cas du VSRRP, il reste à démontrer si cette liaison avec l'héparine mime le phénomène physiologique de l'attachement ou elle agit comme un antagoniste qui n'a pas de similarité structurale avec le facteur d'attachement cellulaires.

3.5 L'attachement du VSRRP n'est pas restreint aux lignées cellulaires permissives.

Les tests d'attachement réalisés sur des lignées cellulaires reconnues pour être réfractaires à l'infection par le VSRRP ont démontré que l'attachement du virus n'est pas exclusif aux cellules permissives. Des lignées cellulaires comme les RK-13 et BHK-21, reconnues pour être en mesure de répliquer l'EAV, sont capables d'attacher le VSRRP. D'autres lignées cellulaires comme les cellules PK-15, PT et 293A sont également en mesure d'attacher le virus à leur surface. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Kreutz (1998), qui dans ses travaux démontrent que le VSRRP ne s'attache que sur les

cellules Vero, mais pas sur les BHK-21 ou les PK-15. Ces différences peuvent être expliquées par la technique pour évaluer l'attachement. Dans l'étude de Kreutz, la mesure du virus attaché s'est fait par une méthode indirecte. Soit par la titration du virus attaché par l'infection sur d'autres cellules (permissives) ou par la présence de virus sur un gel de SDS-PAGE. Le test d'attachement élaboré dans ces présents travaux utilise la cytométrie en flux, une technique reconnue pour être très sensible. À partir de cette technique, on peut observer le niveau d'attachement sur chaque cellule individuelle au lieu d'une lecture sur l'ensemble des cellules. De plus, le bruit de fond étant bas, l'utilisation de conditions de lavage stringentes ne fut pas nécessaire, ce qui suggère moins de perte de l'intensité de signal. Lors de transfections du génome viral du VSRRP dans les BHK-21 ou les cellules Vero, de nouvelles particules virales infectieuses ont été obtenues (Kreutz, 1998). De plus le traitement des cellules Vero avec du PEG est suffisant pour rendre ces cellules permissives à l'infection par le VSRRP. À la lumière de ces résultats, la restriction du tropisme du VSRRP semble être au niveau de la pénétration du virus. Nos travaux indiquent donc qu'un récepteur présent sur un grand nombre de type cellulaire est en mesure d'attacher le VSRRP, mais qu'un second récepteur, présent uniquement à la surface des cellules cibles pourrait permettre la poursuite du cycle viral.

Il est intéressant de constater que les cellules U-937 ne sont pas capables d'attacher le VSRRP. Ces cellules immortalisées sont des monocytes/macrophages humains. Il est fort probable que ces cellules ont perdu la capacité d'exprimer le facteur d'attachement pour le VSRRP lors de leur transformation. Les cellules U-937 pourrait donc être utilisées en parallèle avec des cellules RK-13 ou BHK-21 afin déterminer la présence d'un seul ou plusieurs récepteurs responsable de l'infection au VSRRP.

3.6 Génération d'une banque d'anticorps monoclonaux

L'utilisation d'anticorps monoclonaux pour identifier un récepteur cellulaire est une technique largement répandue (Flint et al., 1999). Si un anticorps monoclonal, dirigé contre une protéine à la surface des cellules permissives, peut bloquer l'attachement du virus ou l'infection, le produit contre lequel cet anticorps réagi sera un potentiel récepteur cellulaire pour ce virus. Le matériel utilisé pour immuniser et la méthode de sélection des

hybridomes positifs ont une influence majeure dans l'obtention d'anticorps anti-récepteur. Dans le cas du VSRRP, peu de choses sont connues sur l'interaction entre le virus et les cellules hôtes. Cependant, les résultats de cette étude et ceux de d'autres groupes tendent à démontrer la présence d'une molécule spécifique, une protéine, à la surface des cellules permissives. Ne détenant pas d'informations précises sur la protéine virale d'attachement, la génération d'une banque anticorps monoclonaux a été choisie pour tenter d'identifier ce facteur d'attachement spécifique. Pour ce faire, les hybridomes ont été sélectionnés de par leur faculté à attacher à la surface des cellules MARC-145 et des MAP. Suite à cette première sélection, des liquides d'ascites ont été produits pour les hybridomes positifs, et des tests de blocage de l'attachement et de l'infection furent réalisés pour déterminer les clones susceptibles de reconnaître le ou les récepteur(s) potentiel(s) pour le VSRRP. En raison du nombre de molécules différentes présentes à la surface des cellules MARC-145 et des MAP, cette méthode de sélection s'est avérée difficile et inefficace dans le cas des souris immunisées avec des lysats de cellules enrichis avec des protéines membranaires. Le niveau d'expression du récepteur pour le VSRRP pouvant être inférieur à une molécule sur mille. Ce résultat négatif n'est pas surprenant dans notre cas puisqu'une vingtaine de clones seulement ont été sélectionnés pour la deuxième étape de sélection. Cependant l'utilisation d'une suspension de virus obtenue sur coussin de sucrose pour générer des anticorps monoclonaux s'est avérée fructueuse. Nous avons comme hypothèse que lors de la purification, le récepteur migrerait avec le virus dans le culot après ultra-centrifugation. De cette façon, il serait possible d'enrichir la préparation en récepteur cellulaire pour le VSRRP. Les hybridomes 18-A7 et 18-F6, qui sécrètent des anticorps en mesure de bloquer l'infection au VSRRP sur des cellules MARC-145, ont ainsi été obtenus par ce type d'immunisation.

Une autre hypothèse envisageable est que le VSRRP, lorsque libéré hors des cellules, puissent transporter dans son enveloppe des protéines de surface de la cellule infectée. Ce phénomène a été observé dans le cadre de l'infection au VIH (Tremblay et al., 1998). Ces protéines cellulaires associées à la membrane du virus peuvent également agir comme récepteurs ou co-récepteurs. Les anticorps monoclonaux caractérisés dans cette étude ont peut-être été générés via un tel mécanisme.

Les hybridomes provenant de ce type d'immunisation ont également été testés pour leur réactivité contre le VSRRP. Le clone IAF-2B4, dirigé contre la protéine N du VSRRP, s'est avéré très utile dans l'élaboration d'un test ELISA de compétition. En combinaison avec l'anticorps IAF-K8, ces anticorps peuvent reconnaître plusieurs des souches nord-américaines du VSRRP. Bien que la recherche d'hybridomes contre le VSRRP ne fut pas très accentuée, l'obtention d'un clone qui reconnaît la protéine de la nucléocapside est peu surprenant. Dans la préparation utilisée, soit du virus semi-purifié, la protéine N est abondamment présente. De plus cette protéine est hautement immunogénique (Loomba et al., 1996; Dea et al., 2000). Il est également difficile de trouver des anticorps contre les autres protéines du virus. Elles sont souvent peu nombreuses à la surface des cellules et ne sont pas faciles à identifier lors de test de IFI. L'utilisation de tests ELISA spécifiques pour ces protéines virales et ou des cellules fixées à la paraformaldéhyde transfectées au préalable avec des vecteurs exprimant ces protéines virales, dans le cadre d'expérience d'IFI, aurait été utile dans notre recherche d'hybridomes pour ces protéines.

3.7 Facteurs impliqués dans la restriction du tropisme du VSRRP.

Deux hybridomes, 18-A7 et 18-F6, ont été en mesure de bloquer l'infection au VSRRP sur des cellules MARC-145. Des expériences d'IFI et de cytofluorométrie ont démontré que ces deux anticorps monoclonaux reconnaissent uniquement des épitopes à la surface des cellules MARC-145 et non sur les MAP. Des expériences d'immunobuvardage sur des membranes de nitrocelluloses contenant des protéines de cellules MARC-145 extraites à l'aide de détergent et séparées par électrophorèse sur gel de SDS-PAGE ont démontré que l'anticorps 18-A7 et 18-F6 reconnaissent une protéine de 60 à 66 kDa. Cette protéine est considérée potentiellement comme un récepteur cellulaire pour le VSRRP à la surface des cellules MARC-145. Les travaux de Duan et al (1998) suggèrent qu'une protéine de 210 kDa, absente chez les cellules MARC-145, est un récepteur cellulaire à la surface des MAP. Ces résultats suggèrent donc que l'entrée du VSRRP chez les cellules MARC-145 serait différente de l'entrée du VSRRP chez les MAP. Considérant les grandes différences physiologiques de ces deux types de cellules, cette conclusion n'est pas surprenante. En effet, comment le VSRRP peut-il infecter ces deux types de cellules non-apparentées alors qu'il ne peut le faire avec des cellules

physiologiquement plus près du macrophage comme les neutrophiles, ou les cellules souches de la moelle osseuse?

Un autre groupe de recherche a observé qu'une molécule de 27 kDa sur les MARC-145 est une protéine capable d'attacher l'extrémité 3' non-codante (UTR) du VSRRP (Shanmukhappa et Kapil, 2001). Cette protéine serait un analogue simien de CD151, protéine possédant quatre domaines transmembranaires et impliquée dans la motilité des cellules endothéliales (Ashman et al., 1991). La transfection de ce facteur chez des cellules BHK-21 (capables d'attacher le virus, mais non-permissives à l'infection par le VSRRP) permet à cette lignée cellulaire de répliquer le VSRRP (Shanmukhappa et Kapil, 2001). Lors de l'entrée du VSRRP dans la cellule par endocytose, la présence de cette protéine permettrait la poursuite du cycle virale suite à la décapsidation et libération du génome du virus, en interagissant avec la partie 3' non-codante. Selon ces résultats, la présence ou absence d'un ou des récepteurs à la surface des cellules pour attacher le VSRRP et permettre son entrée dans la cellule ne sont pas l'unique facteur qui restreint le tropisme de ce virus. Nos travaux ainsi que ceux de Kreutz (1998) et Shanmukhappa et Kapil (2001) partagent des résultats intéressants qui se complètent ou se contredisent sur les éléments précoces de l'infection du VSRRP chez les cellules Vero, les MARC-145 et les BHK-21. L'évaluation de la présence du facteur de 60 à 66 kDa et de CD151 à la surface de ces cellules ainsi que la transfection de vecteur exprimant un ou ces deux gènes chez des cellules susceptibles ou non-susceptibles à l'infection par le VSRRP, donneront des informations utiles dans la détermination du rôle de ces protéines dans l'infection par le VSRRP.

Les essais réalisés avec les anticorps monoclonaux 18-A7 et 18-F6 pour bloquer l'attachement du virus sur les cellules MARC-145 nous démontrent que la capacité de ces cellules pour attacher le VSRRP est réduite jusqu'à plus de 60 %. Des résultats similaires ont été obtenus avec les anticorps 41D3 et 41D5, qui reconnaissent une protéine de 210 kDa à la surface des MAP (Duan et al., 1998). La capacité pour bloquer l'attachement est dépendante de la quantité d'anticorps dans les deux cas. Ceci suggère qu'à de hautes concentrations d'anticorps, il serait possible de bloquer totalement l'attachement. Mais dans les deux études, la quantité d'anticorps nécessaire pour bloquer l'infection est

moins que celle pour bloquer 60 % de l'attachement. A la lumière de ces résultats, on peut conclure que l'attachement du VSRRP à la surface des MAP et des MARC-145 n'est pas restreinte à la présence de leur récepteur spécifique. Autrement dit, le VSRRP pourrait s'attacher à d'autres molécules à la surface des cellules sans nécessairement mener à la production de nouvelles particules virales. Cette hypothèse peut expliquer le grand nombre de lignées cellulaires de différentes origines, étant en mesure d'attacher le virus selon notre test d'attachement.

Références

AKIRA, S., K. TAKEDA and T. KAISHO. 2001 Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **8**:675-680.

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

ALBINA, E., F. MADEC, R. CARIOLET and 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.

ALBINA, E. 1997. Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin: dix ans d'expérience (1986-1996) sur une infection virale insolite. *Vet. Res.* **4**:305-352.

ASHMAN L.K., G.W. AYLETT, P.A. MEHRABANI, L.J. BENDALL, S. NIUTTA, A.C. CAMBARERI, S.R. COLE and M.C. BERNDT. 1991. The murine monoclonal antibody, 14A2.H1, identifies a novel platelet surface antigen. *Br. J. Haematol.* **79**:263-270.

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

BENFIELD, D.A., E. NELSON, J.E. COLLINS, L. HARRIS, S.M. GOYAL, D. ROBISON, W.T. CHRISTIANSON, R.B. MORRISON, D. GORCYCA and D. CHLADEK. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**:127-33.

BAUTISTA, E.M., J.J.M. MEULENBERG, C.S. CHOI and T.W. MOLITOR. 1996. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Arch. Virol.* **141**:1357-1365.

BAUTISTA, E.M. and T.W. MOLITOR. 1997. Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral. Immunol.* **10**: 83-94.

BAUTISTA, E.M., P. SUÁREZ and T.W. MOLITOR. 1999. T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* **144**:117-134.

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

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

BOUR, S., R. GELEZIUNAS and M.A. WAINBERG. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol. Rev.* **59**:63-93.

BOURGEOIS, C., J.B. BOUR, K. LIDHOLT, C. GAUTHRAY, AND P. POTHIER. 1998. Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. *J. Virol.* **72**:7221-7227.

BUXTON, I.K., S.P. CHAN, and P.W.G.PLAGEMANN 1988. The Ia antigen is not the major receptor for lactate dehydrogenase-elevating virus on macrophages from CBA and BALB/c mice. *Virus. Res.* **9**:205-219.

BØTNER A., J. NIELSEN, and V. BILLE-HANSEN. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet. Microbiol.* **40**:351-360.

BØTNER A. 1997a. Diagnosis of PRRS. *Vet. Microbiol.* **55**:295-301.

BØTNER A., B. STRANBYGAARD, K.J. SORENSEN, P. HAVE, K.G. MADSEN, E. SMEDIGAARD MADSEN and S. ALEXANDERSEN. 1997b. Appearance of acute PRRS-like syndrome in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* **141**:497-499.

CARMAN S., S.E. SANFORD and S. DEA. 1995. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario; 1978 to 1982. *Can. Vet. J.* **36**:776-777.

CAVANAGH, D. 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* **142**:629-633.

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

CHUNG, C.S., J.C. HSIAO, Y.S. CHANG and W. CHANG. 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **72**:1577-1585.

CLAPHAM, P.R, and A. MCKNIGHT. 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J. Gen. Virol.* **83**:1809-29.

COLLINS, J.E, D.A. BENFIELD, W.T. CHRISTIANSON, L. HARRIS, J.C. HENNINGS, D.P. SHAW, S.M. GOYAL, S. CULLOUGH, R.B. MORRISON, H.S.

JOO, D. GORCYCA and 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.* 4:17-126.

COMPTON, T., D.M. NOWLIN and N.R. COOPER, 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193:834-41.

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

COOPER, V.L., A.R. DOSTER, R.A. HESSE and N.B. HARRIS. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:313-320.

CROMWIJK M.A.J. 1991. Nieuwe virus zieskte bij varkens. *Tijdschr Diergeneeskde.* 116:247-248.

DEA, S., R. BILODEAU, R. ATHANASSIOUS, R. SAUVAGEAU and G. P. MARTINEAU. 1992. 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. and MARTINEAU G.P. 1994. Diagnostic sérologique et virologique du Syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) au Québec. *Le Médecin vétérinaire du Québec* 24: 176-184.

DEA, S., C.A. GAGNON, H. MARDASSI and G. MILANE. 1996. Antigenic variability among North-American and European strains of PRRSV as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein. *J. Clin. Microbiol.* 34:1488-1493.

DEA, S., C.A. GAGNON, H. MARDASSI, B. PIRZADEH and D. ROGAN. 2000. Current knowledges on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* **145**:659-688.

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

DELPUTTE, P.L., N. VANDERHEIJDEN, H.J. NAUWYNCK and M.B. PENZAERT. 2002. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* **76**:4312-4320.

DE VRIES, A.A.F., M.C. HORZINEK, P.J.M. ROTTIER and R.J. DE GROOT. 1997. The genome organization of the Nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro-, and coronaviruses. *Sem. Virol.* **8**:33-47.

DOBBE, J.C., Y. VAN DER MEER, W.J. SPAAN and E.J. SNIJDER. 2001. Construction of chimeric arteriviruses reveals that the ectodomain of the major glycoprotein is not the main determinant of equine arteritis virus tropism in cell culture. *Virology* **288**:284-294.

DOLL, E. R., R.E. KNAPPENBERGER and J.T. BRYANS. 1957. An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus. *Cornell Vet.* **47**:69-75.

DOMINQUEZ, J., A. EZQUERRA, F. ALONSO, K. MCCULLOUGH, A. SUMMERFIELD, A. BIANCHI, R.J. ZWART, Y.B. KIM, F. BLECHA, S. EICHER, M. MURTAUGH, M. PAMPUSCH and K. BURGER. 1998. Porcine myelomonocytic markers: summary of the Second International Swine CD Workshop. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **60**:329-341.

DUAN, X., H.J. NAUWYNCK and M.B. PENSAERT. 1997. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch. Virol.* **142**:2483-2497.

DUAN, X., H.J. NAUWYNCK, H.W. FAVOREEL and M.B. PENSAERT. 1998. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol* **72**:4520-4523.

FLINT, J.S., L.W. ENQUIST, V.R. RACANIELLO, and A.M. SHALKA. 1999. Principles of virology. 1st ed. ASM Press, Washington. 804p.

FUST, G. 1997. Enhancing antibodies in HIV infection. *Parasitology* **115**:S127-S140.

GALINA, L., C. PIJOAN, M. SITJAR, W.T. CHRISTIANSON, K. ROSSOW and J.E. COLLINS. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen free piglets. *Vet. Rec.* **134**:60-64.

GANTER, M. 1997. Cellular variables in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs. *Res. Vet. Sci.* **63**: 215-217.

GAGNON, C.A. and S. DEA. 1998. Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes. *Can. J. Vet. Res.* **62**:110-116.

GONIN, P., H. MARDASSI, C.A. GAGNON, B. MASSIE and S. DEA. 1998. A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* **143**:1927-1940.

GONIN, P., B. PIRZADEH, C.A. GAGNON and S. DEA. 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:20-26.

GOYAL, S.M. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome; Review article. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5:656-664.

GOYERT, S.M., E. FERRERO, W.J. RETTIG, A.K. YENAMANDRA, F. OBATA and M.M. LE BEAU. 1988. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 239:497-500.

HALBUR, P. G., P.S. PAUL, M.L. FREY, J. LANDGRAF, K. EERNISSE, X.J. MENG, M.A. LUM, J.J. ANDREWS and J.A. RATHJE. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32:648-660.

HALBUR, P.G., P.S. PAUL, X.J. MENG, M.A. LUM, J.J. ANDREWS and J.A. RATHJE. 1996. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:11-20.

HOPPER S.A., M.E.C. WHITE, and N. TWIDDY. 1992. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet. Rec.* 131:140-144.

INADA, T., and C.A. MIMS. 1985. Ia antigens and Fc receptors of mouse peritoneal macrophages as determinants of susceptibility to lactic dehydrogenase virus. *J. Gen. Virol.* 66:1469-77.

JANEWAY, C.A, P. TRAVERS, M. WALPORT and M. SHLOMCHIK 2001. Immunology: The immune system in health and disease. 5th ed. Garland Publishing, New York 732p.

JUSA, E.R., Y. INABA, M. KONO, T. ASAGOE, K. UWATOKO and O. HIROSE. 1997a. Effect of heparin on a hemagglutinin of porcine reproductive and respiratory virus. *Res. Vet. Sci.* **62**:261-264.

JUSA, E.R., Y. INABA, M. KONO and O. HIROSE. 1997b. Effect of heparin on infection of cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* **58**:488-491.

JUSA, E.R., Y. INABA, M. KONO, T. ASAGOE and K. UWATOKO. 1997c. Characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus hemagglutinin. *J. Vet. Med. Sci.* **59**:281-286.

KATZ, J.B., A.L. SHAFER, K.A. EERNISSE, J.G. LANDGRAF et E.A. NELSON. 1995. Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3. *Vet. Microbiol.* **44**:65-76.

KEFFABER K.K. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *A.A.S.P. Newsletter* **1**:1-10.

KIELIAN, T., D.S. MCVEY, W.C. DAVIS, Y.B. KIM and F. BLECHA. 1994. Competitive binding analysis of monoclonal antibodies reactive with porcine alveolar macrophages using anti-CD14 and anti-CD18. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**:273-278.

KIM, H.S., J. KWANG and J.J. YOON. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a homologous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* **133**:477-483.

KREUTZ, L.C. AND M.R. ACKERMANN. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus enters cells through a low pH-dependant endocytic pathway. *Virus Res.* 42:137-147.

KREUTZ, L.C. 1998. Cellular membrane factors are the major determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus tropism. *Virus Res.* 53:121-128.

KUBOTA T., Y. INABA, K. UWATOKO, H. AKASHI and Y. FUKUNAGA. 1997. Hemagglutination with equine arteritis virus. *J. Vet. Med. Sci.* 59:943-945.

LAGER, K.M. and M.R. ACKERMANN. 1994. Pulmonary lesions in fetuses exposed in utero to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6:480-483.

LAGER, K.M., W. L MENGELING and S.L. BROCKMEIER. 1996a. Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet. Rec.* 138:227-228.

LAGER, K.M., W.L. MENGELING and S.L. BROCKMEIER. 1996b. Pathogenesis of fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection during early and late gestation. Proc. 14th Int. Pig Veterinary Society Congress, Bologna, Italy.

LAGER, K.M., W.L. MENGELING and S.L. BROCKMEIER. 1997. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 58:127-133.

LAGER, K.M., W.L. MENGELING and S.L. BROCKMEIER. 1999. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am. J. Vet. Res.* 60:1022-1027.

LAROCHELLE, R., H. MARDASSI, S. DEA and R. MAGAR. 1996. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**:3-10.

LEI, H.Y., T.M. YEH, H.S. LIU, Y.S. LIN, S.H. CHEN and C.C. LIU. 2001. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J. Biomed Sci.* **8**:377-388.

LINDHAUS W and LINDHAUS B. 1991. Rätselhafte Schweinekrankheit. *Prakt. Tierzt.* **5**:423-425.

LOEMBA, H.D., S. MOUNIR, H. MARDASSI, D. ARCHAMBAULT and S. DEA. 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* **141**:751-761.

LOPEZ, F.L., N. DOMENECH, B. ALVAREZ, A. EZQUERRA, J. DOMINGUEZ, J.M. CASTRO and F. ALONSO. 1999. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* **64**:33-42.

MADDON, P.J., A.G. DALGLEISH, J.S. MCDUGAL, P.R. CLAPHAM, R.A. WEISS and R. AXEL. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.

MAEDA, K., N. YOKOYAMA, K. FUJITA, M. MAEJIMA and T. MIKAMI. 1997. Heparin-binding activity of feline herpesvirus type 1 glycoproteins. *Virus Res.* **52**:169-176.

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

MARDASSI, H., S. MOUNIR and S. DEA. 1995. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch. Virol.* **140**:1405-1418.

MARDASSI, H., B. MASSIE et S. DEA. 1996. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **221**:98-112.

MARDASSI, H., P. GONIN, C.A. GAGNON, B. MASSIE AND S. DEA. 1998. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J. Virol.* **72**:6298-6306.

MARTINEAU G.P., R. BILODEAU, R. SAUVAGEAU, C. MOORE and S. DEA. 1991. Syndrome Hyperthermie-anorexie-avortement de la truie et de pneumonie interstitielle virale au Québec. *Journées de Recherche Porcine en France* **23**:179-188.

MENG, X.J., P.S. PAUL, P.G. HALBUR et M.A. LUM. 1995. Phylogenic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Arch. Virol.* **140**:745-755.

MENG, X.J., P.S. PAUL, P.G. HALBUR and M.A. LUM. 1996 Characterization of a high-virulence US isolate of porcine reproductive and respiratory virus in a continuous cell line, ATCC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**:374-381.

MENGELING, W.L., K.L. LAGER and A.C. VORWALD. 1994. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* **55**:1391-1398.

MEULENBERG, J.J.M., M.M. HULST, E.J. DE MEIJER, P.L.J.M. MOONEN, A. DEN BESTEN, E.P. DE KLUYVER, G. WENSVOORT and R.J.M. MOORMANN. 1993. 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., A. PETERSEN-DEN BESTEN, E.P. DE KLUYVER, R.J. MOORMANN, W.M. SCHAAPER and G. WENSVOORT. 1995. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* **206**:155-163.

MEULENBERG, J.J.M. and A. PETERSEN-DEN BESTEN. 1996. Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particle. *Virology* **225**:44-51.

MEULENBERG, J.J., A.P. VAN NIEUWSTADT, A. VAN ESSEN-ZANDBERGEN and J.P. LANGEVELD. 1997. Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J. Virol.* **71**:6061-6067.

MEULENBERG, J.J.M., R. BOS-DE-RUIJTER, R. VAN DE GRAAF, G. WENSVOORT and R.J.M. MOORMANN. 1998. Infectious transcripts from cloned genomic-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* **72**:380-387.

MEREDITH, M.J. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). ISBN 0-9520409-7-2 Pig Disease Information Centre, Cambridge, UK

MOLITOR, T.W., E.M. BAUTISTA and C.S. CHOI. 1997. Immunity to PRRSV: double-edged sword. *Vet. Microbiol.* **55**: 265-276.

MOROZOV, I., X.J. MENG and P.S. PAUL. 1995. Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* **140**:1313-1319.

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

MURTAUGH, M.P., M.R. ELAM and L.T. KAKACH. 1995. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* **140**:1451-1460.

NAUWYNCK, H.J., DUAN, X, FAVOREEL, H.W., VAN OOSTVELD, P. and PENZAERT, M.B. 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* **80** : 297-305.

NELSEN, C.J., M.P. MURTAUGH and K. FAABERG 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison; divergent evolution on two continents. *J. Virol.* **73**: 270-280.

NELSON, E.A., J.C. HENNINGS, T. DREW, G. WENSVOORT, J.E. COLLINS et D.A. BENFIELD. 1993. 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.T. CHRISTOPHER-HENNINGS and 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.

NIELSEN, H.S., M.B. OLEKSIEWICZ, R. FORSBERG, T. STADEJEK, A. BØTNER, and T. STORGAARD. 2001. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen. Virol.* 82:1263-1272.

OLEKSIEWICZ, M.B., A. BØTNER, P. TOFT, P. NORMANN and T. STORGAARD. 2001. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J. Virol.* 75:3277-3290.

OSLAGE, V., T.H. DAHLE, M. MULLER, M. KRAMER, D. BEIER and B. LIESS. 1994. Antibody prevalence of hog cholera, Aujeszky's disease and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in wild boar in the federal states of Sachsen-Anhalt and Bradenburg (Germany). *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 1:33-38.

OSORIO, F.A., J.A. GALEOTA, E. NELSON, B. BRODERSEN, A. DOSTER, R. WILLS, F. ZUCKERMANN and W.W. LAEGREID. 2002. Passive Transfer of Virus-Specific Antibodies Confers Protection against Reproductive Failure Induced by a Virulent Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Establishes Sterilizing Immunity. *Virology* 302:9-20.

OSTROWSKI, M. J.A. GALEOTA, A.M. JAR, K.B. PLATT, F.A.OSORIO and O.J. LOPEZ. 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76:4241-4250.

OSORIO, F.A. Porcine reproductive and respiratory syndrome. Proceeding of the 17th IPVS congress, Ames, Iowa, USA. 105-112. 2002.

PATON, D.J., I.H. BROWN, A.C. SCOTT, S.H. DONE and S. EDWARDS. 1992. Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. *Vet. Microbiol.* **33**:195-201.

PIRZADEH, B. and S. DEA. 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J. Gen. Virol.* **78**:1867-1873.

PIRZADEH, B. and S. DEA. 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* **79**:989-999

PLAGEMANN, P.G.W. and V. MOENING. 1992. Lactate dehydrogenase elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. Vir. Res.* **41**:99-192.

PLAGEMANN, P.G.W. 1996. Lactate dehydrogenase elevating virus and related viruses. *Field's Virology*. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley. 3th ed. Philadelphia, Lippincott-Raven: 1105-1120.

PLANA-DURAN, J.I., I. CLIMENT, J. SARRASECA, A. URNIZA, E. CORTES, C. VELA and J.I. CASAL. 1997. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus genes* **14**:19-29.

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

POL, J.M.A. and F. WAGENAAR. 1992. Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 4:29.

PRIETO, C., P. SUAREZ, R. SANCHEZ, A. SOLANA, I. SIMARRO, S. MARTIN-RILLO and J. M. CASTRO. 1994. Semen changes in boars after experimental infection with Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS) virus. Proceeding of the 13th International Pig Veterinary Society Congress. Bangkok, Thailand.

PRIETO, C., R. SANCHEZ, S. MARTIN-RILLO, P. SUAREZ, I. SIMARRO, A. SOLANA and J. M. CASTRO. 1996. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Rec.* 138:536-539.

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

ROSSOW, K. D. 1998. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35:1-20.

SAMSOM, J.N., T.G.M. DE BRUIN, J.J.M. VOERMANS, J.J.M. MEULENBERG, J.M.A. POL and A.T.J. BIANCHI. 2000. Changes of leucocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8⁺ cells. *J. Gen. Virol.* 81:497-505.

SANO, Y., Y. INABA, K. UWATOKO, T. KUBOTA, T. ASAGOE, J. KANAYA, P.J. PAN, H. AKASHI and Y. FUKUNAGA. 1998. Effect of heparin on hemagglutination by equine arteritis virus. *J. Vet. Med. Sci.* 60:447-450.

SHANMUKHAPPA, K. and S. KAPIL. 2001. Cloning and identification of MARC-145 cell proteins binding to 3'UTR and partial nucleoprotein gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494:641-646.

SHIEH, M.T., D. WUDUNN, R.I. MONTGOMERY, J.D. ESKO and P.J. SPEAR. 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell. Biol.* **116**:1273-1281.

SHIMIZU, M., S. YAMADA, K. KAWASHIMA, S. OHASHI, S. SHIMIZU and T. OGAWA. 1996. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **50**:19-27.

SNIJDER, E.J. and J.J.M. MEULENBERG. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* **79**:961-979.

SNIJDER, E.J., H. VAN TOL, K.W. PEDERSEN, M.J.B. RAAMSMAN, and A.A.F. DE VRIES. 1999. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J. Virol.* **73**:6335-6345.

SOLANO, G.J., J. SEGALÉS, J.E. COLLINS, T.W. MOLITOR and C. PIJOAN. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) interaction with *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* **55**:247-257.

SUÁREZ, P., M. DÍAZ-GUERRA, C. PRIETO, M. ESTEBAN, J.M. CASTRO, A. NIETO and J. ORTÍN. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.* **70**:2876-2882.

SUR, J.H., V.L. COOPER, J.A. GALEOTA, R.A. HESSE, A.R. DOSTER and F.A. OSORIO. 1996. In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *J. Clin. Microbiol.* **34** : 2280-2286.

SUR, J.H., A.R. DOSTER, J.S. CHRISTIAN, J.A. GALEOTA, R.W. WILLS, J.J. ZIMMERMAN and F.A. OSORIO. 1997. Porcine reproductive and respiratory

syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71:9170-9179

SUR, J.H., A.R. DOSTER and F.A. OSARIO. 1998. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 35:506-514.

TERPSTRA C., G. WENSVOORT and 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.

THANAWONGNUWECH, R., P.G. HALBUR and J.J. ANDREWS. 1997. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in neurovascular lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:334-337.

THERRIEN, D., Y. ST-PIERRE and S. DEA. 1999a. Use of flow cytometry to assess binding and internalisation of PRRS virus by permissive and non-permissive cell lines. PRRS and Aujeszky's disease. Ploufragan, France. June 21-24.

THERRIEN, D., M. BOUTIN, Y. ST-PIERRE and S. DEA. 1999b. Heparin interferes with attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on permissive cells. 18th Annual meeting of the American Society of Virology. University of Massachusetts, Amherst, MA. July 10-14.

TREMBLAY, M.J., J.F. FORTIN and R. CANTIN. 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol. Today* 19:346-351.

VAN ALSTINE, W.G., G.W. STEVENSON and C.L. KANITZ. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Vet. Microbiol.* 49:297-303.

VANDERHEIJDEN, N., R. DELPUTTE, H. NAUWYNCK and M. PENSAERT. 2001. Effects of heparin on the entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into alveolar macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.* 494:683-689.

VAN DINTEN, L.C., J.A. DEN BOON, A.L.M. WASSENAAR, W.J.M. SPAAN and E.J. SNIJDER. 1997. An infectious arterivirus cDNA clones: identification of a replicase point mutation which abolishes discontinuous mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:991-996.

VAN NIEUWSTADT, A.P., J.J. MEULENBERG, A. VAN ESSEN-ZANBERGEN, A. PETERSEN-DEN BESTEN, R.J. BENDE, R.J. MOORMANN et G. WENSVOORT. 1996. Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J. Virol.* 70:4767-4772.

VAN REETH, K., H. NAUWYNCK and M. PENSAERT. 1996. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet. Microbiol.* 48:325-335.

VÉZINA, S.A., H. LOEMBA, M. FOURNIER, S. DEA and D. ARCHAMBAULT. 1996. Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 60:94-99.

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

VYNCKIER, A. and M. PENSAERT. 1993. Porcine reproductive and respiratory syndrome: isolation of the virus and epidemiological research in Belgium. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 62: 118-122.

WEILAND, E., M. WIECZOREK-KROHMER, D. KOHL, K. K. CONZELMANN and F. WEILAND. 1999. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet. Microbiol.* 66:171-86.

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. WAGENAAR, J.M. BROEKHUIJSEN, P.L.J.M. MOONEN, T. ZETSTRA, E.A. DE BOER, H.J. TIBBEN, M.F. DE JONG, P. VAN'T VELD, G.J.R. GROENLAND, J.A. VAN GENNEP, M.T. VOETS, J.H.M. VERHEIJDEN and J. BRAAMSKAMP. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13:121-130.

WU, W.H., J. CHRISTOPHER-HENNINGS and E.A. NELSON. 2000. Expression of a small structural protein from ORF2 transcript of PRRSV. 7th International Symposium on Nidoviruses (Coronaviruses and Arteriviruses). Lake Harmony, Pennsylvania, USA.

YAEGER, M.J., T. PRIEVE, J. COLLINS, J. CHRISTOPHER-HENNINGS, E.A. NELSON and D.A. BENFIELD. 1993. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod.* 1:5-9.

YOON, I.J., H.S. JOO, W.T. CHRISTIANSON, HS. KIM, J.E. COLLINS et R.B. MORRISON. 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, K.J., J.J. ZIMMERMAN, M.J. MCGINLEY, J. LANDGRAF, M.L. FREY, H.T. HILL et K.B. PLATT. 1995. Failure to consider the antigenic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates may lead to misdiagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:386-387.

ZIMMERMAN, J.J., K.J. YOON, E.C. PIRTLE, R.W. WILLS, T.J. SANDERSON and M.J. MCGINLEY. 1997. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet. Microbiol.* **55**:329-326.

Remerciements

J'aimerais remercier premièrement mon directeur de recherche, Serge Dea. Tu as toujours été patient avec moi, parfois même trop. Merci pour la confiance que tu m'as donnée, et de m'avoir permis de participer à quelques congrès scientifiques à l'étranger. J'aurai toujours l'image de toi comme le scientifique équilibré modèle capable de marier recherche originale de niveau élevé avec famille. Je me sens privilégié d'avoir eu la chance de t'avoir côtoyé.

J'aimerais également remercier Yves St-Pierre, pour avoir accepté de remplacer Serge, comme directeur de recherche, et pour ses conseils fort appréciés en cytométrie de flux.

Merci à Marcel Desrosiers pour m'avoir initié à la cytométrie de flux, et aux multiples discussions rattachées à ce domaine.

J'aimerais remercier Louise Wilson, Doris Legault, Nicole Sawyer et Raymonde Jetté, pour leur aide technique et leurs réponses à mes nombreuses questions, toujours avec le sourire.

Un merci spécial à mes collègues de travail, Carl Gagnon et Patrick Cléroux, pour nos discussions scientifiques et surtout leur amitié. Merci aux autres membres du laboratoire de Serge Dea: Anne-Marie, Martine, Kane, Ann, Genevieve, Judith, Manon, Helmi, Hugues, Boroushan, Mourad, Guillaume, François, Sylvie, Marie-Josée, Patrick G, Ghania, Boutheina, Ali, Ahmed, Chendru et à tous les techniciennes et techniciens du 27.

Un merci également à Daniel Oth et les membres de son laboratoire.

Merci à toute communauté de l'Institut Armand-Frappier pour les discussions et activités scientifiques, mais également sociales et sportives.

Merci au MAPAQ, CORPAQ, FCAR, CRSNG et la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier et les bourses d'études.

Merci à mon père, pour son support inconditionnel.

A ma famille et mes amis pour leur soutien moral et leur amour.

Enfin, merci à Annette pour son stage dans le laboratoire de Serge, et d'être le soleil de ma vie de tous les jours.