

Université de Montréal

**CRÉATION D'UN MODÈLE CELLULAIRE DES VOIES
RESPIRATOIRES DU PORC POUR ÉTUDIER LES EFFETS D'UNE CO-
INFECTION VIRALE AU VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR
ET RESPIRATOIRE PORCIN ET AU CIRCOVIRUS PORCIN**

par

Fernando Alvarez

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Août 2013

© Fernando Alvarez, 2013

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

**CRÉATION D'UN MODÈLE CELLULAIRE DES VOIES
RESPIRATOIRES DU PORC POUR ÉTUDIER LES EFFETS D'UNE CO-
INFECTION VIRALE AU VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR
ET RESPIRATOIRE PORCIN ET AU CIRCOVIRUS PORCIN**

Présenté par :

FERNANDO ALVAREZ

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Daniel Martineau, président-rapporteur
Dr Carl A. Gagnon, directeur de recherche
Dr. David Silversides, membre du jury

RÉSUMÉ

Le circovirus porcin de type 2 (PCV2) est un pathogène majeur pour l'industrie porcine et est associé à une longue liste de maladies associées au circovirus porcin (MACVP). Les premières tentatives pour reproduire ces maladies ont montré que le virus doit être combiné à d'autres agents pathogènes du porc ou à différents stimulants du système immunitaire. De ces agents, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) est celui qui est le plus souvent co-isolé avec le PCV dans les fermes. Une grande partie des efforts faits pour étudier les interactions entre ces deux virus ont été menés *in vivo*. Les interactions *in vitro* ont jusqu'à maintenant été peu étudiées du fait qu'il n'existe pas de modèle cellulaire permettant la réplication efficace des deux virus. L'objectif de ce projet était donc de développer un modèle cellulaire propice à la réplication des deux virus et d'étudier leur interaction en co-infection. Une lignée cellulaire provenant de la trachée d'un porcelet nouveau-né (NPTr), permissive au PCV, a été génétiquement modifiée pour exprimer la protéine CD163, un récepteur majeur du VSRRP. Ce projet a montré que cette nouvelle lignée cellulaire (NPTr-CD163) est permissive au VSRRP ainsi qu'à plusieurs génotypes de PCV (PCV1, PCV2a, PCV2b et PCV1/2a). De plus, les résultats obtenus lors d'infections mixtes suggèrent que la réplication du VSRRP et du PCV conditionne de façon génotype-dépendante celle du PCV puisque la réplication du PCV1 est inhibée en présence de VSRRP, alors que celle du PCV2b est significativement augmentée dans les mêmes conditions. Ni la mortalité cellulaire, ni la réponse cellulaire en cytokines n'a permis d'expliquer ces résultats. La modulation de la réplication du PCV par le VSRRP serait donc liée à un mécanisme spécifique qui demeure inconnu. De plus, cet effet varierait en fonction du génotype de PCV.

Mots-Clés : Circovirus porcin (PCV), Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), lignée cellulaire NPTr, interactions virales.

SUMMARY

Porcine circovirus (PCV) type 2 (PCV2) is a major pathogen in the swine industry and has been described as the causative agent of a long list of conditions under the designation of porcine circovirus-associated diseases (PCVAD). Attempts to replicate PCVAD initially failed, as it was discovered that an immune trigger could facilitate the reproduction of clinical signs, either by co-infecting with other swine pathogens or using immune stimulants. Of these, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the most frequently co-isolated agent in the field. Most effort has been made to understand this interaction *in vivo* since most *in vitro* cellular models lack the ability to efficiently replicate both viruses. To answer the lack of an *in vitro* model, we developed a cell line that allows the replication of both PRRSV and PCV. A neonate porcine tracheal cell line (NPTr) was genetically modified to stably express CD163 (NPTr-CD163), a major PRRSV receptor. NPTr-CD163 cells were able to replicate all PCV genotypes (PCV1, PCV1/2a, PCV2a and PCV2b) and PRRSV. A significant effect of PRRSV on PCV replication was found to be genotype dependent, as PCV1 replication was down regulated in the presence of PRRSV and PCV2b replication was up regulated in the same conditions. Neither cell mortality assays nor cytokine expression analysis were able to provide an explanation for these results. The effect of PRRSV on PCV1 and PCV2b replication is suggestive of a more specific, yet still unknown, mechanism. Furthermore, this effect is PCV-genotype dependant.

Keywords: Porcine Circovirus (PCV), Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), NPTr-CD163 cell line, virus-virus interactions

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| RÉSUMÉ | iii |
| SUMMARY | iv |
| LISTE DES FIGURES..... | viii |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | xi |
| REMERCIEMENTS..... | xiv |
| I. INTRODUCTION | 1 |
| II. REVUE DE LITTÉRATURE | 5 |
| 1. CIRCOVIRUS PORCIN (PCV) | 6 |
| 1.1 Historique et définition..... | 6 |
| 1.2 Description du virus | 8 |
| 1.2.1 Taxonomie | 8 |
| 1.2.2 Morphogénèse virale..... | 9 |
| 1.2.3 Entrée et réplication virale..... | 13 |
| 1.2.4 Survie dans l'environnement et voies d'infection | 15 |
| 1.3 Pathogenèse virale | 16 |
| 2. VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN (VSRRP)..... | 18 |
| 2.1 Historique et définition..... | 18 |
| 2.2 Description du virus | 20 |
| 2.2.1 Taxonomie | 20 |
| 2.2.2 Morphogénèse virale..... | 22 |
| 2.2.3 Entrée et réplication virale..... | 29 |
| 3. Méthodes connues de réplication des virus VSRRP et PCV <i>in vitro</i> | 37 |
| 3.1 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP)..... | 37 |
| 3.2 Le circovirus porcin (PCV)..... | 38 |
| 3.2.1 Les cellules NPTr | 39 |
| 4. La réponse immune dirigée contre le VSRRP et le PCV | 41 |
| 4.1 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP)..... | 41 |
| 4.1.1 Immunité innée | 41 |
| 4.1.2 Immunité adaptative | 48 |
| 4.2 Le circovirus porcin (PCV)..... | 51 |
| 4.2.1 Mécanismes de l'immunité innée | 51 |
| 4.2.2 Mécanismes de l'immunité adaptative..... | 55 |
| 5. Les rétrovirus en ingénierie cellulaire | 57 |
| III. MÉTHODOLOGIE | 61 |
| Les souches virales | 64 |

| | |
|--|-------------|
| Création de cellules NPTr permissives au VSRRP | 65 |
| Détection de l'ARNm de CD163 par RT-PCR | 69 |
| Modèle de co-infection | 70 |
| Détermination du titre viral..... | 71 |
| Test d'immunofluorescence sur les cellules modifiées et infectées..... | 72 |
| Détermination de la mortalité cellulaire..... | 74 |
| Détermination de la viabilité cellulaire..... | 74 |
| Détection des caspases 3, 8 et 9..... | 75 |
| Évaluation de l'expression des ARNm cytokinaires..... | 76 |
| Évaluation de l'expression du TNF α par ELISA..... | 77 |
| Analyses statistiques..... | 78 |
| IV. RÉSULTATS | 76 |
| 1. Expression de la protéine CD163 dans la lignée cellulaire NPTr..... | 77 |
| 1.1 Caractérisation de la lignée NPTr et modification génétique | 77 |
| 1.2 Confirmation de la réplication du VSRRP et du PCV par immunofluorescence dans les cellules NPTr-CD163 | 83 |
| 1.3 Confirmation de la co-localisation des deux virus dans la même cellule | 86 |
| 2. Étude de la cinétique de réplication des virus PCV et VSRRP lors de co- infections..... | 89 |
| 2.1 Cinétique de réplication du PCV en présence du VSRRP | 89 |
| 2.2 Cinétique de la réplication virale du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) lors d'une co-infection avec le PCV. | 91 |
| 3. Évaluation de la mortalité cellulaire lors d'une co-infection PCV-VSRRP | 93 |
| 4. Induction de la cascade de l'apoptose lors d'une co-infection PCV-VSRRP dans les cellules NPTr | 95 |
| 5. Modulation de l'expression des ARNm des cytokines lors d'une co-infection PCV- VSRRP | 99 |
| 5.1 Cytokines pro-inflammatoires | 99 |
| 5.2 Cytokines de la réponse anti-virale..... | 101 |
| 5.3 Expression d'autres cytokines d'intérêt dans le modèle de co-infection PCV- VSRRP..... | 103 |
| V. DISCUSSION..... | 105 |
| VI. CONCLUSIONS | 116 |
| VII. RÉFÉRENCES | 119 |
| VIII. PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET FINANCEMENT | xv |
| IX. ANNEXE..... | xvii |

LISTE DES TABLES

| | |
|--|----|
| Tableau I. Fonctions et caractéristiques connues de protéines structurales et non-structurales du VSRRP. Adapté de (Music et Gagnon, 2010) | 27 |
| Tableau II. Résumé des études <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> de la production de cytokine lors d'infection au VSRRP de type 2. Adapté de (Gomez-Laguna et al. 2012)..... | 46 |
| Tableau III. Résumé des études <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i> de la production de cytokine lors d'infection au PCV2. | 54 |
| Tableau IV. Description des souches de circovirus et identifiant Genbank. | 65 |
| Tableau V. Description des amorces nucléotidiques utilisées pour la détection et l'amplification des récepteurs cellulaires du VSRRP..... | 70 |
| Tableau VI. Description des amorces utilisées pour évaluer l'expression des ARNm cytokinaires..... | 77 |
| Tableau VII. Représentation en % de l'identité entre les différents cadres de lectures des génotypes de circovirus étudiés. | xx |
| Tableau VIII. Représentation des mutations en acides aminés entre les différents génotypes de circovirus étudiés..... | xx |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Histogramme représentant la fréquence et les écarts génétiques qui existent entre 196 différents ORF2 de circovirus retrouvés dans les fermes de manière à différencier les trois principaux génotypes. | 9 |
| Figure 2. Représentation schématique du génome viral du PCV. | 10 |
| Figure 3. Représentation linéaire du génome viral de PCV2 avec détails sur la localisation des cadres de lecture. | 11 |
| Figure 4. Illustrations schématique et informatisée du PCV2. | 12 |
| Figure 5. Illustration représentant l'attachement et l'internalisation du PCV. | 14 |
| Figure 6. Illustration du mécanisme de réplication de l'ADN viral de PCV par rolling-circle. | 15 |
| Figure 7. Description graphique de l'ordre <i>Nidovirales</i> (Cavanagh, 1997). ©Springer par citation de l'auteur. | 21 |
| Figure 8. Représentation schématique du virion du VSRRP. | 24 |
| Figure 9. Représentations schématiques des différents récepteurs du VSRRP. | 33 |
| Figure 10. Co-localisation des virus PCV2 et VSRRP au niveau du parenchyme pulmonaire d'un porc au moyen de sondes d'ARN anti-sens spécifiques marqués à la fluorescéine (VSRRP) et à la digoxygénine (PCV). Adapté de (Sirinarumitr et al., 2001). | 35 |
| Figure 11. Détection d'antigènes du VSRRP par immunoperoxydase dans un cœur de porcelet gnotobiotique, 9 jours post-infection. Adapté de (Halbur et al., 1995). | 36 |
| Figure 12. Cinétique de la réplication du PCV2b dans les cellules PK-15 et dans les cellules NPTr non modifiées après plusieurs passages. (N.Music, mémoire 2008). Avec permission de l'auteur. | 40 |
| Figure 13. Représentation schématique de l'entrée du virion du VSRRP au niveau des voies respiratoires du porc à partir de plusieurs études <i>in vitro</i> | 42 |
| Figure 14. Représentation schématique des voies de production d'interférons de type 1 et sites d'inhibition par des protéines virale du VSRRP. (Sun et al., 2012). | 44 |

| | |
|--|----|
| Figure 15. Cinétique de la production d'anticorps lors d'infection par le VSRRP <i>in vivo</i> . (Fernando Alvarez, <i>mémoire</i> 2013). | 50 |
| Figure 16. Représentation schématique de la modulation des cytokines par le PCV2. (Fernando Alvarez, <i>mémoire</i> 2013) | 52 |
| Figure 17. Représentation de la production de rétrovirus possédant le plasmide d'intérêt. (Clontech Retroviral Expression System®). | 59 |
| Figure 18. Représentation schématique de l'inactivation de la réplication du plasmide rétroviral intégré dans la cellule hôte. | 60 |
| Figure 19. Protocole expérimental utilisé lors de la co-infection PCV-VSRRP. | 71 |
| Figure 20. Détection des gènes CD169, CD163 et CD151 dans les cellules NPTr non- modifiées et les cellules modifiées génétiquement avec le gène du CD163 (NPTr- CD163). | 79 |
| Figure 21. Illustration de l'épissage alternatif ou d'un gène tronqué du CD169 retrouvé dans les cellules NPTr. | 80 |
| Figure 22. Détection de la protéine CD163 par immunofluorescence dans les cellules génétiquement modifiées NPTr-CD163. | 82 |
| Figure 23. Détection des antigènes du PCV dans les cellules NPTr-CD163. | 84 |
| Figure 24. Détection des antigènes du VSRRP dans les cellules NPTr-CD163 par immunofluorescence. | 85 |
| Figure 25. Détection par immunofluorescence des antigènes du VSRRP et du PCV dans les cellules NPTr-CD163 infectées. | 88 |
| Figure 26. Cinétique de la réplication virale du circovirus porcin en présence du VSRRP. | 90 |
| Figure 27. Cinétique de réplication virale du VSRRP lors d'une co-infection avec le PCV. | 92 |
| Figure 28. Détection relative de la LDH extra-cellulaire lors de la co-infection VSRRP- PCV. | 94 |
| Figure 29. Expression relative de l'activité de la caspase 3 dans les cellules NPTr- CD163 lors d'une co-infection PCV-VSRRP. | 97 |

| | |
|---|-------|
| Figure 30. Expression relative de l'activité des caspases 8 (A) et 9 (B) lors d'une co-infection PCV-VSRRP | 98 |
| Figure 31. Expression de l'ARNm codant pour l'IL-1 α (N=6), l'IL-6 (N=5) et le TNF- α . (N=6) lors d'une co-infection PCV-VSRRP. | 100 |
| Figure 32. Expression de l'ARNm codant pour l'IFN- α et l'IFN- β . (N=6) lors d'une co-infection PCV-VSRRP | 102 |
| Figure 33. Expression de l'ARNm codant pour le TGF- β et l'IL-10 (N=3) lors d'une co-infection PCV-VSRRP | 104 |
| Figure 34. Expression de l'ARNm codant pour l'IL-8 (N=3) lors d'une co-infection PCV-VSRRP. | 105 |
| Figure 35. RT-PCR pour détecter l'ARNm du CD163 à partir de macrophages alvéolaires porcins. | xviii |
| Figure 36. Cinétique de la réplication virale du circovirus porcine en présence de 1,0 MOI de VSRRP lors d'une co-infection PCV-VSRRP. | xix |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| aa | Acides aminés |
| AAVP-AASV | Association Américaine des Vétérinaires du Porc- <i>American Association of Swine Veterinarians</i> |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AVE | Artérite viral équine |
| BFDV | Virus de la maladie du bec et des plumes des psittacidés |
| BHK-21 | Baby hamster kidney cells (Cellules de rein de hamster nouveau-né) |
| CaCV | Circovirus de canari |
| Cap | Protéine de la capsid du circovirus |
| CAV | Chicken anemia virus (Virus de l'anémie infectieuse du poulet) |
| CRFK | Feline kidney cell line (Cellules de rein félin) |
| EAV | Equine arteritis virus (Virus de l'artérite équine) |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| FBS | Sérum foetal bovin |
| IFA | Immunofluorescence assay |
| IFN-γ/α/β | Interféron gamma/alpha/beta |
| IHC | Immunohistochimie |
| JAK-STAT | Voie de la <i>Janus</i> kinase (JAK) dans l'activation du système de transduction et d'activation de la transcription (STAT). |
| kDA | kilo Dalton |
| LDV | Lactate dehydrogenase-elevating virus (Virus |

| | |
|--------------------------------|--|
| | élevateur de la lactate déshydrogénase) |
| LV | Virus de Lelystad (Souche de référence du VSRRP de type I) |
| MAb | Anticorps monoclonal |
| MARC-145 | Cellules de rein de singe vert d'Afrique dérivées des cellules MA-104 |
| MDCK | Madin-Darby Canine Kidney cells (Cellules Madin-Darby de rein de chien) |
| MOI | Multiplicity of infection (Multiplicité d'infection) |
| MSD | Mystery swine disease (Maladie mystérieuse du porc) |
| NPT_r | Newborn piglet tracheal epithelial cell line (Cellules de la trachée de porcelets nouveau-nés) |
| nm | Nanomètre |
| ORF | Open reading frame (Cadre de lecture ouvert) |
| PAM | Porcine alveolar macrophage (Macrophage alvéolaire porcin) |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells (Cellules mononuclées du sang périphérique) |
| PBS | Phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin) |
| PCR | Réaction de polymérisation en chaîne |
| PCVAD (MACVP) | Porcine circovirus associated disease (Maladie associée au circovirus porcin) |
| PCV1 | Porcine circovirus type 1 (Circovirus porcin de type 1) |
| PCV2 | Porcine circovirus type 2 (Circovirus porcin de type 2) |
| PCV1/2a | Porcine circovirus type 1 and type 2a recombinant |
| p.i. | Post-infection |
| pTNFα | Protéine porcine du TNF α |

| | |
|---------------------------------|--|
| PK-15 | Porcine kidney cells (Cellules de rein porcin) |
| rpTNFα | Protéine recombinante porcine du TNF α |
| SNDP | Syndrome de néphropathie et dermatite porcine |
| SDPS | Syndrome de dépérissement post-sevrage |
| SHFV | Simian hemorrhagic fever virus (Virus du syndrome hémorragique simien) |
| SIRS | Syndrome d'infertilité et respiratoire du porc |
| SJPL | St-Jude porcine lung cells (Cellules Saint-Jude de poumon porcin) (Silversides et al., 2010) |
| SRCR | Superfamille des récepteurs riches en cystéine |
| VSRRP | Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin |
| 3D4/31 | Lignée cellulaire immortalisée de macrophage alvéolaire porcin |

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon professeur, le Dr. Carl A. Gagnon, pour son enseignement, son soutien et ses conseils. Je remercie mon comité conseil, le Dr Daniel Martineau et Dre Josée Harel.

Je remercie tout particulièrement Dre Chantale Provost, pour son implication dans mon enseignement et sa grande patience.

Je remercie les membres du laboratoire, Dr. Christian Savard, Dr. Christian Bellehumeur, Yenney Hernandez, Vincente Pinilla, Nedzad Music et le Dr Younes Chorfi qui ont su m'encadrer et m'apporter du soutien tout au long de ces années.

Je remercie tous les membres du GREMIP et du CRIPA pour leurs efforts à entretenir un excellent milieu d'apprentissage pour les étudiants. Une mention toute particulière à Dre Josée Harel et au Dr. Daniel Dubreuil.

Finalement, je remercie ma famille et ma conjointe pour leur soutien et leurs bons conseils à travers ces années.

Merci à la Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) pour l'octroi de la bourse d'étude qui m'a permis de persévérer dans ces dernières années. Une mention particulière à Mr Claude Miville, directeur de la section recherche et développement du FPPQ.

I. INTRODUCTION

Le circovirus porcin (PCV) est un pathogène majeur pour l'industrie porcine et est associé à une longue liste de maladies (maladies associées au circovirus porcin – MACVP). Décrit pour la première fois en 1991 comme étant l'agent causal du syndrome de dépérissement en post-sevrage (SDPS) (Clark, 1997; Harding, 1996), le circovirus porcin a ensuite été retrouvé lors du syndrome de dermatite et néphropathie porcine (SDNP) et la pneumonie nécrosante (Drolet et al., 2003). Alors que le premier circovirus isolé (PCV1) n'a jamais été associé à une maladie (Tischer et al., 1974), le nouveau génotype (PCV2) était devenu en peu de temps un des agents les plus dévastateur en production porcine (Clark, 1997). Depuis cette découverte, de nouveaux génotypes ont été décrits, dont le PCV2b en 2007 (Gagnon et al., 2007), le PCV2c en 2008 (Segales et al., 2008), le PCV1/2a en 2008 (Gagnon et al., 2010). Les génotypes de PCV que l'on retrouve sur les fermes canadiennes sont le PCV1, PCV1/2a, PCV2a et PCV2b. Le génotype PCV2c n'a été découvert que dans un cas isolé au Danemark et jamais plus par la suite. Les dernières publications sur les cas de MACVP au Québec présentaient une augmentation des cas de circovirose dans les fermes porcines (Drolet et al., 2003; Gagnon et al., 2007). Une résurgence de la mortalité associée au circovirus porcin est apparue en 2005 avec l'arrivée du nouveau génotype, PCV2b (D'Allaire et al., 2007; Gagnon et al., 2007). Mondialement, plusieurs études ont décelé une augmentation de la sévérité des MACVP associée à un plus grand nombre de cas de PCV2b plutôt que de PCV2a (Rose et al., 2012; Tribble et Rowland, 2012). Cela a exposé l'importance d'étudier les différences entre les génotypes et les facteurs qui influencent leur réplication.

Les tentatives pour reproduire le SDPS en condition expérimentale ont initialement échoué (Allan et al., 1999). Il a été découvert que le circovirus nécessitait des facteurs supplémentaires pour causer la maladie chez le porc (Opriessnig et Halbur, 2012). Le parvovirus porcin (PPV) a été le premier agent capable de reproduire en condition expérimentale la forme sévère du SDPS lorsqu'il était en co-infection avec le PCV2 (Allan et al., 1999; Magar et al., 1995). Toutefois, des infections simultanées de ces deux virus en conditions réelles se sont révélés être des

évènements sporadiques (Ellis et al., 2000; Rovira et al., 2002). C'est plutôt le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) qui est l'agent le plus souvent isolé, en association avec le PCV, lors de SDPS sur les fermes (52 à 84% des cas, variant selon les études et les régions géographiques) (Ramamoorthy et Meng, 2009; Wellenberg et al., 2004). Le PCV2 et le VSRRP sont aussi co-détectés dans 41% des cas de Syndrome de Dermatite et Néphropathie Porcine (SDNP) et 45% des cas de pneumonie nécrosante (Drolet et al., 2003; Grau-Roma et Segales, 2007).

Le VSRRP est devenu dans les derniers 20 ans l'un des agents les plus dévastateurs en production porcine à travers le monde. Ce virus, identifié en 1991 en Europe (Wensvoort et al., 1992) et en 1992 en Amérique du Nord (Benfield et al., 1992) cause des pertes économiques majeures à l'industrie porcine. Au Canada seulement, ces pertes tournent autour de 100 à 300 millions de dollars annuellement (Drolet et al., 2003) . Il est ainsi devenu le pathogène causant le plus de pertes économiques dans l'industrie porcine.

Des études de co-infection *in vivo* de PCV2 et de VSRRP ont montré qu'il existe une action synergique entre les deux virus dans le développement du SDPS et le complexe respiratoire porcin (Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002). Une surinfection par le VSRRP provoque une augmentation significative de la virémie du circovirus porcin (Rovira et al., 2002). Puisqu'il existe une corrélation directe entre le titre de PCV sérique et la sévérité des signes cliniques de circovirose (Gagnon et al., 2008), les plus récentes études cherchent à déterminer la nature de cette interaction. Une grande partie des efforts actuels visent à comprendre l'effet du VSRRP sur la réplication du PCV. Toutefois les moyens demeurent encore limités. En fait, il n'existait jusqu'à maintenant aucun modèle cellulaire efficace pour étudier la co-infection PCV-VSRRP et évaluer leur pathogénèse. Malgré le fait qu'il ait été montré que le VSRRP et le PCV2 pouvaient se retrouver simultanément dans les cellules épithéliales du parenchyme pulmonaire (Halbur et al., 1995; Rossow et al., 1995; Rovira et al., 2002), aucun modèle cellulaire actuel de l'épithélium pulmonaire porcin ne permet l'étude de l'infection simultanée par ces virus. Cela vient d'une part du fait

que le VSRRP est difficile à cultiver *in vitro*. Le VSRRP se réplique principalement dans des macrophages alvéolaires porcins (PAMs), mais ceux-ci ne sont conservés qu'en cultures primaires (*ex vivo*) (Wensvoort et al., 1991; Yoon et al., 1992) ou dans des cellules de reins de singes, les MARC-145 (*in vivo*) (Wensvoort et al., 1992), des cellules génétiquement éloignées du modèle porcine. D'autre part, le circovirus porcine demande une culture exhaustive de par sa lente réplique et sa faible pathogénicité *in vitro*. Les lignées utilisées disponibles pour étudier la réplique du circovirus sont les cellules de rein de porc, PK-15 (Meehan et al., 1998; Rovira et al., 2002). Toutefois, cette lignée ne permet pas la réplique du VSRRP (Delrue et al., 2010). Une nouvelle lignée cellulaire porcine, permettant la réplique du circovirus, a été découverte dans le laboratoire du Dr. Gagnon (Music - *mémoire*, 2008). Ces cellules proviennent de la trachée de porc nouveau-né (NPTr). Des travaux dans le cadre d'un mémoire de maîtrise ont pu déterminer la permissivité des ses cellules au circovirus porcine, mais pas au VSRRP (Music, 2008).

Partant de la notion qu'il existe des mécanismes par lesquels le VSRRP influence la réplique du PCV *in vivo*, l'hypothèse de cette étude est que ces mêmes mécanismes peuvent être reproduits dans un modèle cellulaire des voies respiratoires du porc (*in vitro*). Conséquemment, les objectifs de ce projet sont (1) de modifier génétiquement la lignée cellulaire NPTr pour la rendre permissive au VSRRP, (2) d'étudier les variations dans la réplique des différents génotypes de PCV en présence du VSRRP et (3) de dresser un premier portrait de la réponse cellulaire face à cette co-infection, via l'étude des cytokines formant l'immunité innée et l'étude de la mortalité cellulaire.

II. REVUE DE LITTÉRATURE

1. CIRCOVIRUS PORCIN (PCV)

1.1 Historique et définition

À la fin des années 1990, un nouveau circovirus porcin était identifié et caractérisé à travers le monde (Allan et Ellis, 2000). Ce virus était différent de l'isolat obtenu en 1974 à partir de cultures de cellules PK-15 (ATCC CCL-33) (Tischer et al., 1974). Alors que le premier isolat de circovirus porcin ne causait aucune maladie clinique et était non pathogène chez le porc, ce nouveau circovirus a été isolé à partir de porcs malades au Canada en 1991. Ces porcs présentaient des signes de dépérissement, de jaunisse, de complications respiratoires et de déplétion lymphoïde (Allan et Ellis, 2000). Ce syndrome a été conséquemment nommé Syndrome de Dépérissement en Post-Sevrage (SDPS) par Harding et Clark (Clark, 1997; Harding, 1996).

Une variante du circovirus porcin a été confirmé comme l'agent causal du syndrome en 1997 (Allan et al., 1998; Ellis et al., 1998). Il a été proposé que le circovirus porcin isolé à partir de cellules PK-15 soit nommé PCV1 et le virus émergent PCV2. Ce dernier a été associé à divers syndrome dont le Syndrome de Dermatite et Néphropathie du Porc (SDNP), l'entérite granulomateuse, des lymphadénites nécrosantes et des cas d'infertilité (Chang et al., 2006a; Harding, 2004). Pour cette raison, lors d'une réunion de l'Association Américaine des Vétérinaires du Porc (AASV) en mars 2006, la dénomination de la pathologie causée par le PCV est passé de SDPS à maladies associées au circovirus porcin (MACVP) (Gillespie et al., 2009). Des études rétrospectives ont permis de déceler des anticorps spécifiques au PCV2 dans des échantillons datant de 1969 en Belgique, 1970 au Royaume-Unis, 1973 en Irlande et 1985 au Canada et en Espagne (Gillespie et al., 2009; Magar et al., 2000). La prévalence aurait même atteint 13,6% des tissus de porcs collectés au Canada en 1985 (Grierson et al., 2004). L'analyse de la séquence du virus sur ces tissus a montré une haute similarité entre les isolats de porc

diagnostiqués en 2000 et une autre maladie associée au PCV2, soit le SDNP, ce qui tend à indiquer que le PCV2 a très peu changé sur une période de 30 ans (Grierson et al., 2004). À la suite d'une augmentation soudaine de mortalité liée au SDPS au Canada en 2005, un séquençage des nouveaux isolats a montré une première variante de la souche PCV2, nommée PCV2b pour le différencier du premier PCV2, qui prit le nom de PCV2a (Gagnon et al., 2007). Les génotypes PCV2a et PCV2b ont été identifiés ailleurs dans le monde, de même qu'une variante classée PCV2c, provenant d'isolats congelés au Danemark dans les années 1980 (Segales et al., 2008). Avec le développement d'une technique de détection des variantes du PCV2 par PCR, cette même équipe a découvert une nouvelle variante chez des porcs sains provenant de la recombinaison génomique du PCV1 et PCV2a, soit le PCV1/2a en 2009 (Gagnon et al., 2010). La provenance de cette souche n'est pas claire, puisqu'il peut provenir d'une recombinaison naturelle entre le PCV1 et le PCV2a ou d'un vaccin tué mal inactivé qui a conservé sa capacité infectieuse (le vaccin commercial est une souche chimère PCV1/2a inactivée) (Gagnon et al., 2010). Le PCV2b présente une nature épidémique lorsqu'elle entre dans un troupeau, causant plus souvent l'apparition de signes cliniques et des pertes économiques par rapport au PCV2a (Gagnon et al., 2008; Rose et al., 2012; Vidigal et al., 2012). De plus, il représente maintenant entre 75 et 80% de tous les cas de MACVP soumis aux laboratoires de diagnostic au Québec (D'Allaire et al., 2007).

1.2 Description du virus

1.2.1 Taxonomie

La famille virale *Circoviridae* est divisée en trois genres : (1) les *Gyrovirus*, dont le seul membre connu est le virus de l'anémie infectieuse du poulet (CAV- Chicken infectious anemia virus), (2) les *Cyclovirus* et (3) les *Circovirus*, où l'on retrouve le circovirus porcine de type 1 et 2, le virus de la maladie du bec et des plumes des psittacidés (BFDV), le circovirus du pigeon (PiCV), le circovirus du canari (CaCV) et le circovirus de la dinde (Finsterbusch et Mankertz, 2009; Studdert, 1993). Il existe dans le groupe des circovirus porcins différents types, soit le type 1 (PCV1) et le type 2 (PCV2). De plus, il y a au sein de ces types des sous-types, soit le type 2a, 2b et 2c ainsi que la récente recombinaison 1/2a (Gagnon et al., 2010). Pour différencier ces génotypes, des chercheurs ont proposé de séquencer l'ORF2 des virus isolés, puis de les placer dans un diagramme qui représente la distance p (chaque fois que 2 nucléotides divergent) sur la fréquence à laquelle on retrouve ces génomes (Figure 1). Le site de différenciation coïncide avec l'origine de différenciation des deux distributions, soit 3,5% (Segales et al., 2008). Il est possible de distinguer des haplotypes de PCV2 sur la base de leur distance génétique. De cette manière, on dénombre jusqu'à maintenant 112 virus de PCV de type 2 (Vidigal et al., 2012). À titre d'exemple, les haplotypes les plus souvent rencontrés au Canada sont le H50 (PCV2b) et le H105 (PCV2a) (Vidigal et al., 2012).

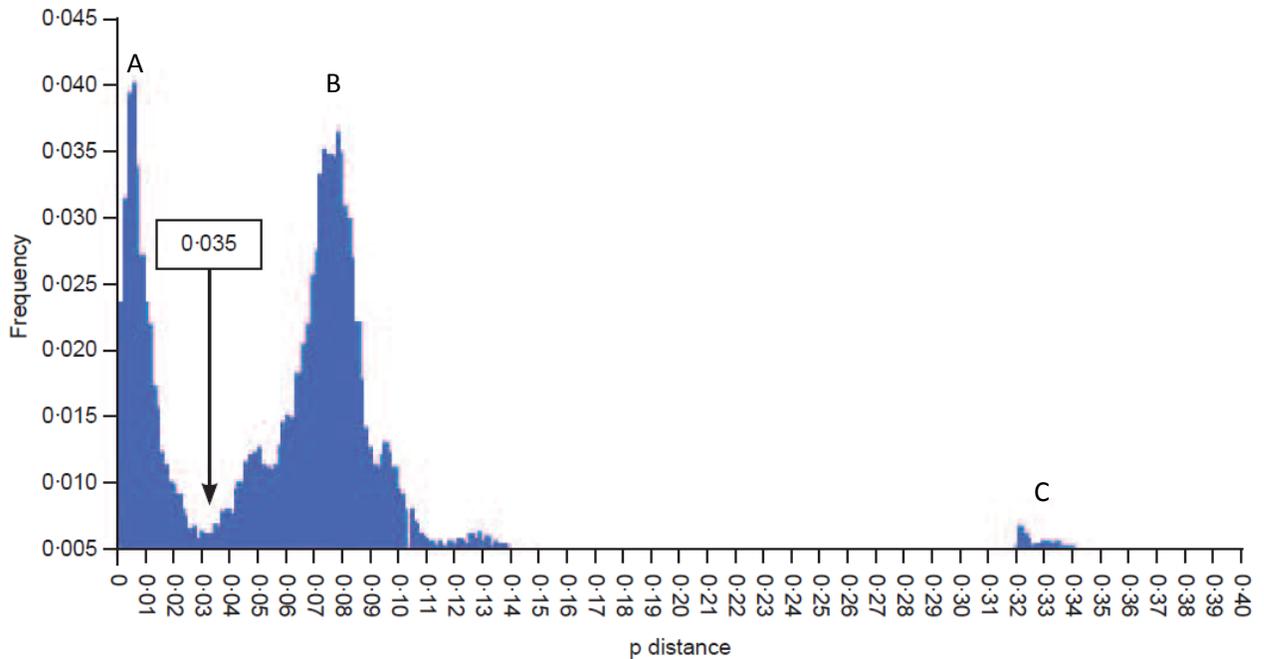


Figure 1. Histogramme représentant la fréquence et les écarts génétiques qui existent entre 196 différents ORF2 de circovirus retrouvés dans les fermes de manière à différencier les trois principaux génotypes.

Valeurs exprimées selon la distance en nucléotides (p) et la fréquence d'apparition (amplitude) de chacun et illustrant le point de distinction entre les génotypes PCV2a (A) et PCV2b (B). La différence en nucléotides de l'ORF2 du PCV1 (C) permet une distinction plus nette. (Segales et al., 2008). ©BJM Publishing Group Ltd. Permission de reproduction accordée.

1.2.2 Morphogénèse virale

Le circovirus porcine (PCV) est l'un des plus petits virus connus pour infecter les animaux avec un diamètre de 17 nm (Tischer et al., 1986). Comme les autres membres de la famille *Circoviridae*, il est de symétrie icosaédrique (T=1) et ne possède pas d'enveloppe (Figure 4a). Le génome du virus est formé d'ADN, dans un arrangement circulaire simple brin (ss), le tout fermé de manière covalente (Figure 2). Le génome du PCV1 montre 68 à 76% d'homologie avec celui du PCV2 (Mankertz et al., 2004). Le PCV2a possède un génome de 1768 paires de bases alors que le PCV2b en possède 1767. Le PCV2 est organisé selon deux cadres de lectures

majeurs (ORF1 et 2) et un mineur (ORF3) (Finsterbusch et Mankertz, 2009; Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998). Les deux cadres de lectures majeurs du PCV sont ambisens (qui sont codés dans des sens opposés sur l'ADN - voir Figure 2). Le troisième cadre de lecture (ORF3) est inséré dans l'ORF1, mais est transcrit dans le sens opposé. Finalement, le produit d'un quatrième cadre de lecture, l'ORF4 (Figure 3), a récemment été décrit dans la région de l'ORF3 (He et al., 2013).

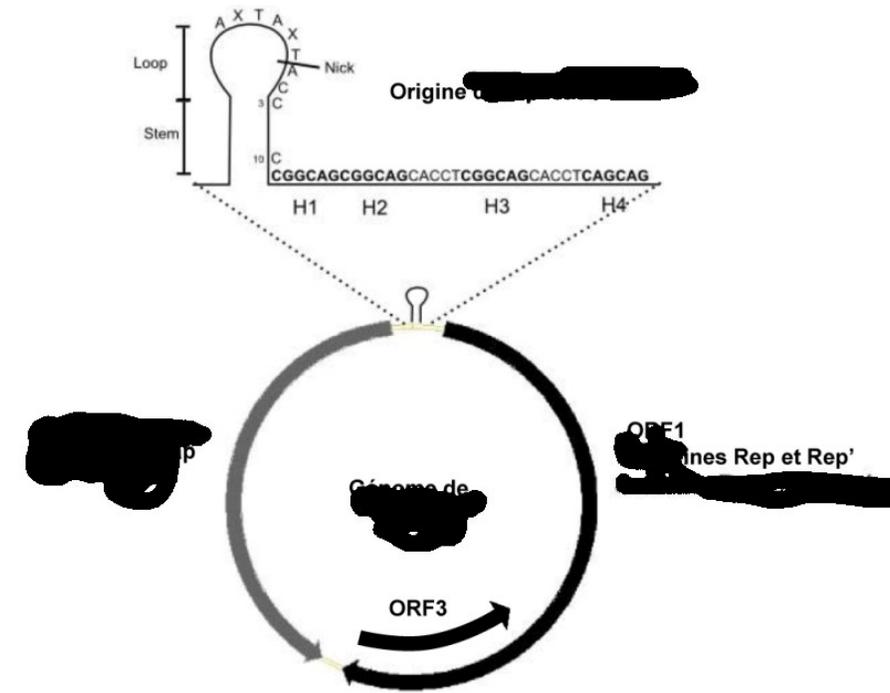


Figure 2. Représentation schématique du génome viral du PCV.

Cette représentation du génome circulaire de PCV montre l'origine de réplication du génome viral et la localisation des cadres de lectures ORF1, ORF2 et ORF3. (Faurez et al., 2009). ©Creativecommons. Permission accordée.

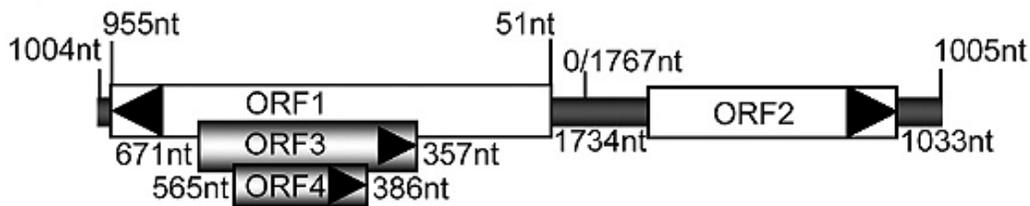


Figure 3. Représentation linéaire du génome viral de PCV2 avec détails sur la localisation des cadres de lecture.

Cette représentation du génome de PCV montre l'origine des cadres ORF1, ORF2 et ORF3 et inclut le nouveau cadre de lecture, ORF4. L'origine de réplication (Ori) se situe au point 0/1767nt. (He et al., 2013) ©ASM permission accordée avec citation.

Les protéines exprimées par l'ORF1, Rep et Rep', sont nécessaires à la réplication du génome viral. La protéine Rep est traduite par l'ensemble du transcript (PCV1: 312 aa ; PCV2: 314aa), alors que la protéine Rep' est le produit d'une transcription tronquée de l'ORF1 (PCV1: 168aa ; PCV2: 178aa).

Le deuxième cadre de lecture (ORF2) code pour la protéine structurale majeure de la capsid nommée Cap, seule protéine qui a été identifiée jusqu'à maintenant dans la capsid du PCV (PCV1: 232 aa ; PCV2: 233 aa). Il s'agit du déterminant antigénique majeur du virus. Cette protéine possède une région N-terminale riche en arginine, ce qui laisse supposer qu'elle joue un rôle dans l'attachement de l'ADN viral (Finsterbusch et Mankertz, 2009) et son encapsidation (Figure 4a et 4b). De plus, deux mutations ponctuelles sur la protéine Cap ont su augmenter la réplication du PCV2 *in vitro* lors de passages dans des cellules PK-15, ce qui permet de penser que la protéine Cap joue aussi un rôle dans la réplication virale (Fenaux et al., 2004). Cette protéine est exprimée 6 à 12 heures post-infection (p.i.) et sa relocalisation nucléaire survient entre 12 à 24 heures p.i. dans les cellules PK-15 (Meerts et al., 2005a). La structure icosaédrique du virus provient d'un auto-assemblage de la protéine Cap, qui possède aussi une affinité avec la réplicase (Rep) (Timmusk et al., 2006) (Figure 4).

Le troisième cadre de lecture (ORF3) varie grandement entre le PCV1 (621 paires de bases) et le PCV2 (315 paires de bases). Il a été montré que son

expression n'est pas nécessaire à la réplication du virus, mais que son rôle se situerait dans l'induction de l'apoptose cellulaire (Liu et al., 2005). Le quatrième cadre de lecture, l'ORF4, code pour une protéine qui joue un rôle dans l'inhibition de la cascade des caspases et dans la régulation des lymphocytes CD4+ et CD8+ lors de l'infection (He et al., 2013), et ferait ainsi partie des protéines associées à la virulence du virus *in vivo*, puisqu'elle permettrait la dissémination du circovirus par les cellules du système immunitaire.

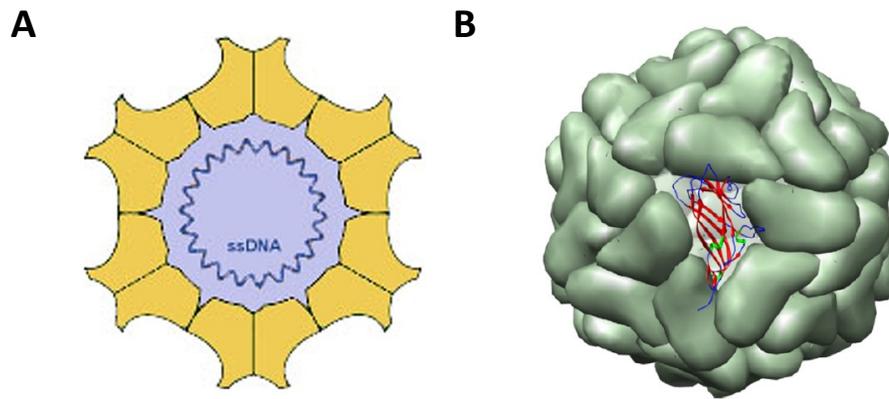


Figure 4. Illustrations schématique et informatisée du PCV2.

(A) Schématisation de la structure avec la forme icosahédrique des protéine Cap (ViralZone®, Swiss Institute of Bioinformatics, 2008) **(B)** Représentation tridimensionnelle de la structure du PCV2 avec emphase sur la forme quaternaire de la protéine Cap (au centre) (Trible et al., 2012). ©ASM publications. Permission avec citation.

1.2.3 Entrée et réplication virale

Les mécanismes d'attachement à la surface cellulaire du circovirus porcine ne sont pas encore totalement élucidés. L'absence d'héparan sulfate et de glycosaminoglycans (GAGs) sur des cellules génétiquement modifiées a permis de bloquer l'entrée du PCV et a ainsi révélé l'importance de ces récepteurs pour l'entrée du virus (Misinzio et al., 2006). Les récepteurs cellulaires demeurent inconnus. Une étude sur le mécanisme d'entrée du PCV2 dans la lignée porcine 3D4/31 (monocytes porcins) a montré que le virion pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose médié par la clathrine (Figure 5). Dans les cellules PK-15, l'internalisation du virus peut prendre (1) la voie de la clathrine ou (2) la voie indépendante de la dynamine et du cholestérol (Nauwynck et al., 2012). Toutefois, l'internalisation du PCV par endocytose est peu efficace.

La décapsidation présente aussi des différences selon le type cellulaire qui est infecté par le PCV. Dans les cellules 3D4/31, l'acidification de l'endosome permet la relâche du génome, alors que dans les PK-15, le blocage de l'acidification favorise la réplication du PCV2 (Misinzio et al., 2005). C'est par l'action de la sérine protéase que le génome du PCV serait libéré (Nauwynck et al., 2012). Toutefois, le PCV2 n'est pas capable de procéder à sa décapsidation dans les macrophages porcins et dans les cellules dendritiques (Nauwynck et al., 2012). L'étiologie derrière cette différence d'une lignée cellulaire à l'autre n'est pas encore élucidée.

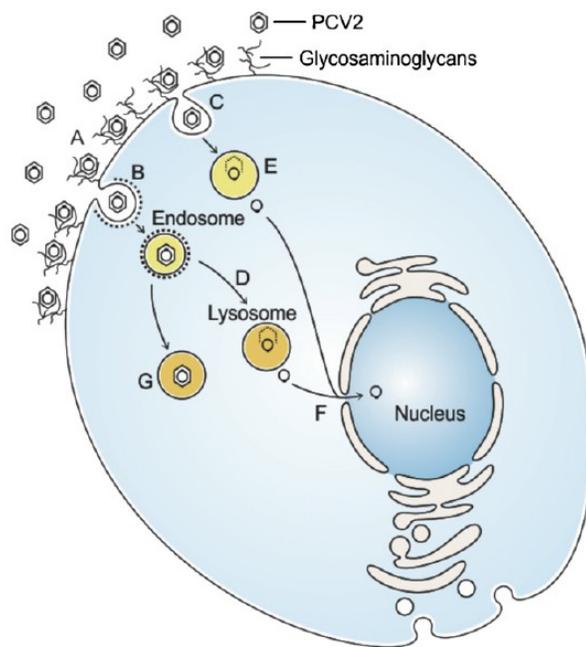


Figure 5. Illustration représentant l’attachement et l’internalisation du PCV. **(a)** attachement par les glycosaminoglycans. **(b)** Internalisation par la voie de la clathrine ou **(c)** internalisation par la voie indépendante de la dynamine; **(d et e)** changement de pH pour devenir un endosome et permettre la décapsidation du virus; **(f)** libération du génome circulaire et entrée dans le noyau. **(g)** accumulation de circovirus sans dégradation dans les cellules des lignées monocytes/macrophages (Nauwynck et al., 2012). ©Elsevier. Permission accordée.

Tous les virus identifiés jusqu’à maintenant dans la famille *Circoviridae* semblent avoir la même stratégie de répllication. La répllication du génome se fait au moment de la phase S du cycle cellulaire, lorsque l’ADN circulaire viral simple brin se trouve en contact avec l’ADN polymérase de la cellule hôte. La répllication suit le mécanisme de *rolling circle* (RCR – rolling circle replication). Celle-ci débute par une répllication du simple brin viral qui provoque la formation d’une forme d’ADN circulaire double brin enroulé (*supercoiled*) (Figure 6). Par la suite, un complexe protéique formé de Rep et Rep’ se lie au site d’initiation de la répllication (caractérisé chez les circovirus par la présence d’une tige-boucle) pour ainsi cliver et libérer une extrémité 3’OH (voir Figure 2). L’ADN polymérase peut alors initier la répllication du génome viral. Lorsqu’une unité a ainsi été répliquée, le complexe viral Rep referme le site (Faurez et al., 2009).

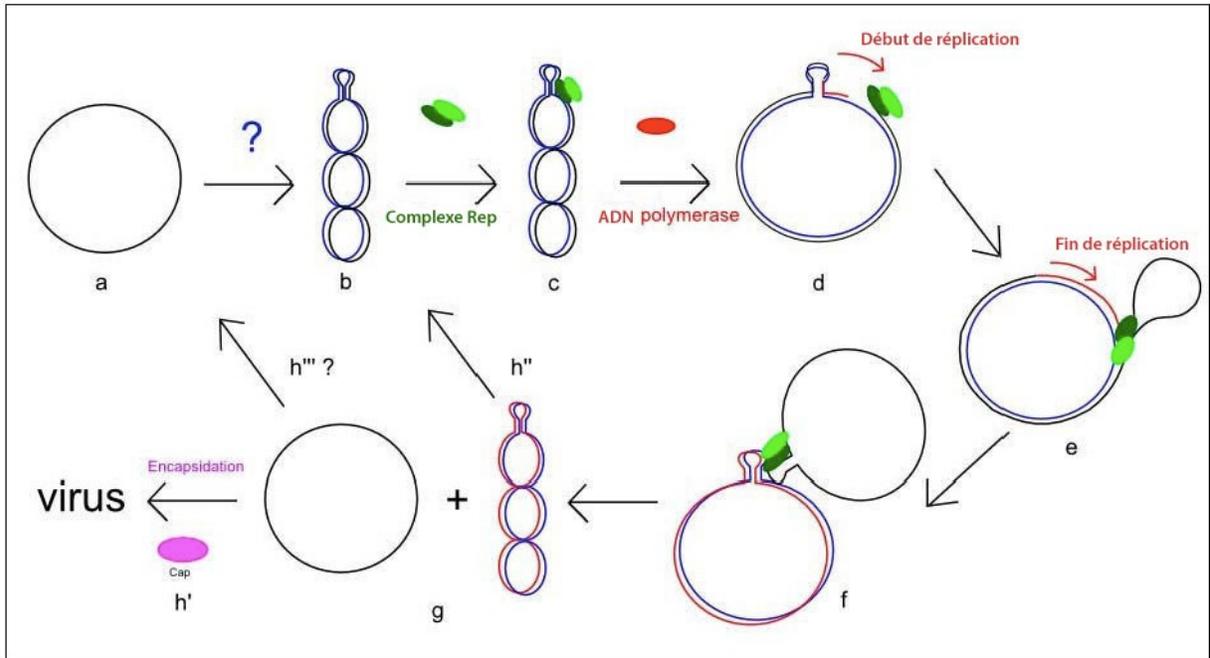


Figure 6. Illustration du mécanisme de réplication de l'ADN viral de PCV par rolling-circle.

(a) Brin positif du génome viral initial. **(b)** Par un mécanisme encore inconnu, le génome prend une forme en boucle pour produire un brin négatif dans la cellule hôte. **(c et d)** Les protéines du complexe REP sont alors traduites et se lient à la tige-boucle pour permettre la réplication du génome en coupant spécifiquement l'ADN à ce site. **(d et e)** L'ADN polymérase de l'hôte initie la réplication à partir de l'extrémité 3'OH laissée libre alors que le complexe REP demeure lié à l'extrémité 5' de la tige-boucle. **(f et g)** Après une ronde de réplication, le complexe REP referme l'ADN et relâche 1 brin d'ADN simple et un brin d'ADN double brin. **(h', h'' et h''')** L'ADN peut alors être utilisé de nouveau dans le cycle de réplication ou être encapsulé. (Adapté de Faurez et al. 2009). ©Creativecommons. Permission accordée.

1.2.4 Survie dans l'environnement et voies d'infection

Le PCV2 est considéré comme un virus ubiquitaire. Il possède un facteur de sédimentation de 57S et est résistant aux produits désinfectants à pH 3,0, au chloroforme et à un traitement à 70°C durant 15 minutes (Allan et al., 1994). Cela signifie qu'il s'agit d'un virus très résistant dans l'environnement.

Le PCV semble spécifique aux suidés (Ségaes et Domingo, 2002) . L'exposition oronasale est considérée comme la voie d'entrée naturelle du virus. Des virions

infectieux de PCV2 ont été détectés dans les aérosols de fermes porcines (Verreault et al., 2010). Le PCV2 peut être transmis verticalement, puisqu'il a été détecté dans le lait maternel de truies et chez des porcelets au premier jour de leur naissance en élevage, et ce, même si les truies présentaient un haut taux d'anticorps circulant contre le PCV2 (Gerber et al., 2012). Le PCV2 est aussi transmis par contamination horizontale. En effet, l'ADN génomique de PCV2 a été détecté dans les excréments nasales, le sperme et les selles de porcs infectés (Bolin et al., 2001; Calsamiglia et al., 2004; Krakowka et al., 2000) et ce, jusqu'à 28 semaines d'âge (Rodriguez-Arrioja et al., 2002). Les facteurs de risques entourant les risques d'infection horizontale sont la densité de population à la ferme, le taux faible en anticorps contre le PCV2 chez la truie (Fraile et al., 2009), le poids des porcelets à la naissance, le poids des porcelets au sevrage (Corrégé et al., 2001) et le niveau hygiénique de la litière d'origine (Madec et al., 2000).

1.3 Pathogenèse virale

Les MACVP varient dans leur présentation clinique, mais possèdent un facteur commun, soit la présence du PCV2. La présence du virus ne résulte pas nécessairement en l'apparition d'une maladie. Un diagnostic de MACVP requiert (1) la présence de signes cliniques comme du dépérissement, une perte de poids ou une maladie respiratoire, (2) la présence de lésions histologiques typiques au PCV2 (déplétion lymphoïde et/ou l'invasion histiocytaire des follicules dans le tissu lymphoïde, la formation de cellules géantes ou multinucléées) et (3) la détection d'antigènes ou d'acide nucléique par immunohistochimie (IHC) ou hybridation in situ, respectivement (Segales, 2012). Une nouvelle nomenclature tend à classer les différents syndromes par un acronyme plus précis cliniquement (Opriessnig et al., 2007; Segales, 2012). Le SDPS a été renommé « MS-PCV2 » (maladie systémique), la maladie pulmonaire « MP-PCV2 », la maladie entérique « ME-PCV2 », la maladie

reproductrice « MR-PCV2 » et l'infection subclinique « IS-PCV2 ». Seul le syndrome de dermatite-néphrite porcine (SDNP) a conservé son ancienne appellation.

Le PCV2 est rarement retrouvé seul chez des porcs malades. Il est le plus souvent accompagné du virus du SRRP (41%), de *Mycoplasma hyopneumoniae* (27%), d'une septicémie bactérienne (10%), d'une pneumonie bactérienne (6%) et de l'influenza porcine (4%) (Opriessnig et al., 2011; Ramamoorthy et Meng, 2009). Le virus PCV2 seul n'a été retrouvé que dans 1% des cas (Drolet et al., 2003; Ellis et al., 2000; Grau-Roma et Segales, 2007). Chez des porcs atteints du SDPS, le VSRRP a été co-isolé dans 83% des cas analysés aux Pays-Bas (Wellenberg et al., 2004) et 52% des cas aux États-Unis (Ramamoorthy et Meng, 2009). Le VSRRP possède aussi une forte association avec le syndrome de dermatite et néphropathie porcine (41%) et de pneumonie nécrosante (45%) (Drolet et al., 2003; Grau-Roma et Segales, 2007). De plus, il a été montré qu'une infection au PCV2 pouvait réduire l'efficacité des vaccins contre le VSRRP (Opriessnig et al., 2006b). Parmi les autres virus qui ont été retrouvés en infection mixtes chez les porcs, le parvovirus porcine (PPV) a été co-isolé avec le PCV2 dans 15% des cas de problème reproducteur chez des truies (Ellis et al., 2000). *M. hyopneumoniae* est retrouvé fréquemment chez des porcs infectés par le PCV2 qui manifestent le syndrome de dépérissement post-sevrage. Étonnamment, il a été découvert que des porcs vaccinés contre le *M. hyopneumoniae* étaient plus susceptibles au SDPS que les porcs qui n'ont pas été vaccinés contre cet agent (Krakowka et al., 2007; Opriessnig et al., 2006a; Opriessnig et al., 2004). La conclusion de ces études était que le vaccin vivant atténué de *M. hyopneumoniae* pouvait potentialiser l'infection au PCV2, et qu'il devait en conséquence être administré plus tôt (deux semaines d'âge) soit avant l'exposition des porcelets au PCV2 dans la pouponnière (Opriessnig et al., 2006a). Ce n'est que dans une étude plus récente qu'il a été montré que l'adjuvant utilisé dans ces vaccins potentialisait l'infection au PCV2 (Opriessnig et al., 2011).

La morbidité en présence de circovirus varie de 4 à 30% avec des pointes atteignant 50 à 60% pour certains élevages. La mortalité se situe à 4%, avec des pointes pouvant atteindre 20% dans certains élevages (Segales et Domingo, 2002).

Le SDPS affecte principalement les porcs de 2 à 4 mois d'âge. En Angleterre, une étude publiée en 2009 a montré une augmentation de 3,3 à 6,5% de la mortalité dans une ferme porcine lorsque le PCV2 avait fait son entrée. De plus, dans 50% des fermes infectées, la mortalité se situait au-dessus de 9,7% (Gillespie et al., 2009). Le PCV2 est aujourd'hui présent dans la majorité des pays producteurs de porcs et le nombre de cas est en progression. En 1998, le laboratoire de santé animale de l'Université de Guelph n'avait diagnostiqué que 20 cas d'infections au PCV2 en Ontario, alors qu'en 2005, ce chiffre est monté à 350 et continue à augmenter (Carman et al., 2006). Au Québec, un recensement réalisé entre 2004 et 2005 montrait une augmentation de la mortalité liée à la présence du PCV2 tournant autour de 50% comparativement à l'année précédente (D'allaire et al. 2007). Aux États-Unis, la maladie coûtait en 2006 aux producteurs 3 à 4\$ en moyenne par porc avec des pertes pouvant atteindre 20\$ par porc dans certaines fermes (Gillespie et al., 2009). Les conséquences économiques de cette maladie ont poussé les différents intervenants à encourager la recherche visant à identifier les facteurs de risque, puis à les minimiser à travers des pratiques de régie et le développement de stratégies vaccinales (Gillespie et al., 2009).

2. VIRUS DU SYNDROME REPRODUCTEUR ET RESPIRATOIRE PORCIN (VSRRP)

2.1 Historique et définition

À la fin des années 1980, une maladie inconnue frappait les fermes porcines du mid-ouest américain. Elle se caractérisait par une pneumonie en post-sevrage, des avortements, des cas d'infertilité, un ralentissement de la croissance et une baisse de performance. Ce syndrome à l'étiologie inconnue a été décrit pour la première fois en

1987 dans des échantillons de fermes de la Caroline du Nord, de l'Iowa et du Minnesota, aux États-Unis (Keffaber, 1989) et en Allemagne et aux Pays-Bas, en Europe, en 1991 (Wensvoort et al., 1991). En Amérique du Nord, sa première dénomination a été la « maladie mystérieuse du porc » (MSD). Après plusieurs tentatives infructueuses, l'agent étiologique (VSRRP) a finalement été identifié en 1991 en Europe (Wensvoort et al., 1992) et en 1992 en Amérique du Nord (Benfield et al., 1992). Le virus européen fut alors nommé le virus Lelystad, de la ville d'origine au Pays-Bas où a été faite sa découverte. Aux États-Unis, le groupe du docteur Collins qui a identifié cet agent l'a nommé VR-2332 (Collins et al., 1992). Il a été retrouvé au Canada la même année (Dea et al., 1992).

Le syndrome provoqué par le VSRRP a porté plusieurs noms dans la littérature : « le syndrome abortif et respiratoire épidémique du porc (porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)) », « Seuchenhafter Spatabort der Schweine », « maladie des oreilles bleues (blue ear disease) » et « syndrome d'infertilité et respiratoire du porc (swine infertility and respiratory syndrome (SIRS)) ». En 1992, lors d'un symposium international sur le SIRS, le nom de « syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) » a été définitivement adopté.

Depuis sa description, le syndrome a pris des allures épidémiques pour s'étendre au reste des États-Unis et en Europe, causant des pertes économiques estimées à 664 millions US\$ par année en 2013 (contre 560 millions en 2005) aux États-Unis (Holtkamp et al., 2013; Neumann et al., 2005). Au Canada, ces pertes tournent autour de 100 et 300 millions de dollars annuellement (Drolet et al., 2003). En Europe, le VSRRP s'est répandu en Espagne (Plana et al., 1992), en Angleterre (Paton et al., 1992), en France (Baron et al., 1992), au Danemark (Botner et al., 1994), en Pologne (Pejsak et Markowska-Daniel, 1997), en République Tchèque (Valicek et al., 1997) et en Suède en 2009 (Carlsson et al., 2009). Le virus a été isolé en Asie dès 1991 (Murakami et al., 1994).

2.2 Description du virus

2.2.1 Taxonomie

Le virus du SRRP est un membre de l'ordre des *Nidovirales*, de la famille des *Arteriviridae*, du genre *Arterivirus*. Il est enveloppé et possède un ARN simple brin à polarité positive. Le virus fait approximativement 50 à 65 nm de diamètre. Le premier arterivirus a été découvert il y a déjà 50 ans, soit le virus élévateur de la lactate déshydrogénase (LDV). Le virus de l'artérite virale équine (EAV) et le virus de la fièvre hémorragique du singe (SHFV) ont été décrits dans les années qui ont suivi (Snijder et Meulenberg, 1998). Après de multiples débats sur la taxonomie des arterivirus, le Comité International sur la Taxonomie des Virus approuva en 1996 les propositions du docteur Cavanagh d'intégrer la famille *Arteriviridae* à l'ordre des *Nidovirales* (Cavanagh, 1997).

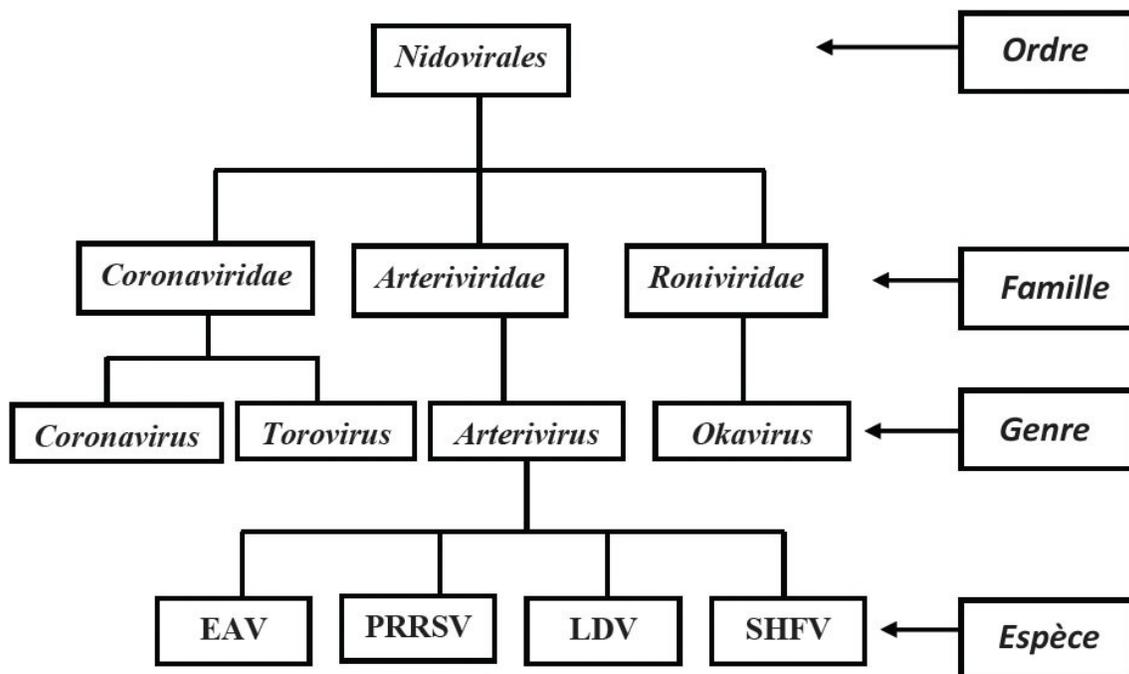


Figure 7. Description graphique de l'ordre *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). ©Springer par citation de l'auteur.

Les caractéristiques des virus de cette famille sont la capacité d'induire des virémies prolongées, des infections persistantes et la capacité de répliquer dans des macrophages (Snijder et Meulenberg, 1998).

Très tôt, il a été démontré que le virus Lelystad et le ATCC VR-2332 représentaient deux génotypes différents (Magar et al., 1995; Nelson et al., 1994; Wensvoort et al., 1992). Le virus Lelystad a dans un premier temps pris l'acronyme de virus du génotype Européen, puis plus récemment VSRRP de type 1. Le virus ATCC VR-2332, anciennement lignée Nord-Américaine, a pris le nom de VSRRP de type 2. Les deux types n'ont que 63% d'homologie au niveau de leur génome entier (Allende et al., 1999). Une étude a même montré qu'il n'y avait que 55% d'homologie entre les ORF5 et 79% entre les ORF6 des deux virus (Murtaugh et al., 1995). Toutefois, les divisions subséquentes des arbres phylogéniques de chacun des

génotypes ne suivent pas le même système. Les européens classent le VSRRP de type 1 en trois sous-types. Le sous-type 1 (Europe de l'ouest) est lui-même divisé en 12 sous-groupes (A, B, C, etc) selon la distance génétique qui sépare leur ORF5. Les nord-américains classent le VSRRP de type 2 en 9 sous-classes, puis en sous-groupes (Shi et al., 2010a; Shi et al., 2010b) selon la séquence de l'ORF5. Les nord-américains ont aussi utilisé une autre méthode, moins robuste au niveau de l'analyse épidémiologique et qui aujourd'hui est plutôt délaissée au profit de la première, qui consistait à classer les virus selon leur polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (Gagnon et Dea, 1998; Shi et al., 2010b). Même si la méthode de comparaison de l'ORF5 semble la plus robuste, la comparaison génétique en utilisant les séquences d'autres cadres de lecture (comme l'ORF7) peut mener à l'élaboration d'arbres phylogéniques distincts. Une analyse de ces arbres permet de distinguer des groupes qui rejoignent plusieurs sous-groupes et qui correspondent souvent à des similitudes régionales. Malgré tout, des différences dans l'interprétation des clades et des groupes, ainsi que des différences sur la base de l'élaboration des arbres phylogéniques (l'ORF5 ou une autre référence) suscitent un débat sur l'étude de la diversité du VSRRP (Shi et al., 2010b). Finalement, l'appartenance à une même sous-division n'est pas garant d'un même phénotype. En effet, des virus possédant de très petites variations génomiques peuvent présenter un patron de pathogénicité très différent (Stadejek et al., 2008).

2.2.2 Morphogénèse virale

Le VSRRP est un virus enveloppé, ce qui lui confère une sensibilité accrue à différents pH, à des températures élevées et à l'exposition aux détergents. Le virion peut survivre à des températures allant de -20°C à -70°C. Toutefois, sa capacité infectieuse diminue de 50% lorsqu'il est incubé pendant 12 heures à 37°C et il est complètement inactivé lorsqu'il est incubé pendant 48 heures à 37°C ou pendant 45 minutes à 56°C (Benfield et al., 1992). Le virion est stable entre des pH de 6,5 et 7,5

(Bloemraad et al., 1994). Il survit dans l'eau 11 jours, mais est rapidement inactivé au séchage. Le gradient de densité du virion est de 1.13-1.15 g/ml dans le sucrose et de 1.18–1.19 g/ml dans du chlorure de césium (CsCl) (Benfield et al., 1992; Mardassi et al., 1995; Wensvoort, 1993).

Le virion du VSRRP est constitué d'une capsidie icosaédrique composée d'une seule protéine, la nucléoprotéine (N). Les premières études sur le sujet parlent d'une capsidie de forme icosaèdre de 20 à 30 nm de diamètre (Benfield et al., 1992; Dea et al., 2000). Toutefois, une analyse structurale plus récente au moyen d'un microscope à cryo-électron et d'une reconstruction tomographique indique qu'il s'agit d'une capsidie hélicoïdale (Spilman et al., 2009). La structure du VSRRP est ainsi semblable à celle des autres membres de la famille *Nidovirales* (Spilman et al., 2009). De plus, la nucléocapsidie est recouverte d'une enveloppe de phospholipides où l'on retrouve sept protéines structurales de surface : la petite protéine E, la protéine membranaire M, le groupe de glycoprotéines GP2, GP3, GP4, GP5 et la protéine codée par l'ORF5a. Lors de la même étude, l'équipe de Spilman a rapporté que le virus possède une morphologie pléomorphe dans une même population, c'est-à-dire que l'on peut retrouver des formes allant de sphériques à ovales, avec des diamètres variant de 50 à 65 nm (Spilman et al., 2009).

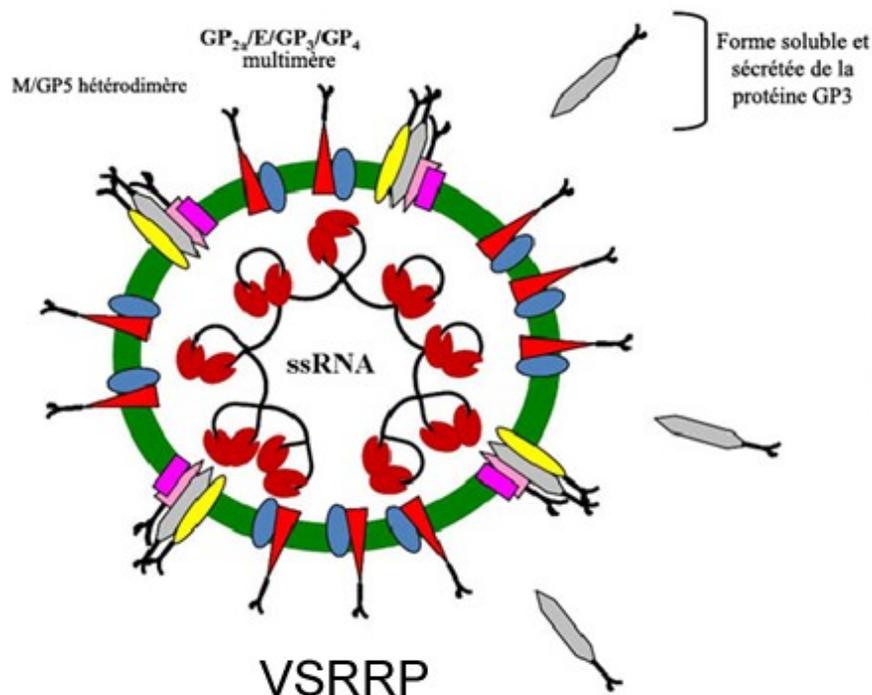


Figure 8. Représentation schématique du virion du VSRRP.

(Music et Gagnon, 2010). ©Cambridge University Press. Permission accordée.

Parmi les protéines structurales, les protéines M, N (interne) et GP5 sont les protéines dites majeures, parce qu'elles possèdent un rôle structural essentiel et sont présentes en grande quantité au niveau de l'enveloppe virale, alors que GP2, GP3, GP4 et E sont des composants dits mineurs (Van Breedam et al., 2010). M et GP5 sont des protéines liées par un lien disulfide pour former un premier complexe, alors que GP2, GP3, GP4 et E forment un second complexe au niveau de la membrane virale. La protéine N non glycosylée possède 123 ou 128 acides aminés selon le génotype type 1 et 2 respectivement, avec un poids moléculaire de 15 kDa. Cette protéine est le produit de l'ORF7 (Music et Gagnon, 2010). Elle possède plusieurs rôles au sein du VSRRP (Tableau I). Elle est activée par phosphorylation à la position 120 lorsqu'elle est dans le cytosol des cellules infectées (Wootton et al., 2002). La phosphorylation est un processus d'activation retrouvé chez plusieurs virus. Cela leur

permet de réguler des activités essentielles comme l'attachement de l'acide nucléique, l'oligomérisation et le transport à travers la membrane nucléaire (Music et Gagnon, 2010). Une particularité importante de la phosphoprotéine N est sa haute antigénicité chez le porc, ce qui favorise le développement d'essais immunologiques à base de N pour la détection d'anticorps précoces chez les porcs infectés (Loemba et al., 1996). La protéine M fait partie des protéines membranaires de classe III (multiples domaines transmembranaires). Elle possède un poids moléculaire de 18 à 19 kDa et est composée de 174 et 173 acides aminés (type 1 ou type 2, respectivement) (Music et Gagnon, 2010). Elle est codée par le gène ORF6. La protéine M joue vraisemblablement le même rôle que son homologue retrouvé chez les coronavirus, où elle a un rôle dans l'assemblage et le bourgeonnement viral (de Haan et al., 2000; Vennema et al., 1996).

La protéine GP5 est l'une des protéines majeures de la structure du VSRRP. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 25 kDa. Elle est codée par le cadre de lecture ORF5. L'ORF5 est l'une des régions les plus variables du génome du VSRRP (Andreyev et al., 1997; Mardassi et al., 1995; Meng et al., 1995). L'ORF5 d'une même population virale (dans un seul porc infecté) ne présente que de 89 à 94% d'identité entre les virions circulants lorsqu'on séquence une population de VSRRP nord-américaine (type 2) et 87 à 99% lorsqu'on étudie la variante européenne (type 1) (Suarez et al., 1996). Ce phénomène porte le nom de quasi-espèce, et est retrouvé dans les maladies causées par différents virus à ARN (Domingo et al., 2012). Cela expliquerait partiellement la faible efficacité de la vaccination contre VSRRP (Music et Gagnon, 2010). De plus, la protéine GP5 possède différents épitopes, ou déterminants antigéniques, qui sont les cibles des anticorps (Ostrowski et al., 2002). Les anticorps neutralisants qui ont été extraits du sérum de porcs infectés sont dirigés principalement contre l'épitope B de la protéine GP5 (Kheyar et al., 2005; Pirzadeh et Dea, 1997, 1998). Pour expliquer la difficulté à développer des anticorps neutralisants, il a été mentionné que l'épitope A de la protéine agissait comme un leurre immuno-dominant non neutralisant (Plagemann, 2004). D'autre part, la présence de domaines de glycolysation dans et autour de l'épitope B pourrait réduire l'antigénicité de la GP5 (Wissink et al., 2003).

Finalement, une protéine, découverte en 2011, serait le produit de l'épissage alternatif de l'ORF5. Appelée protéine ORF5a, celle-ci fait entre 46 et 51 aa chez le VSRRP de type 2 et 43 aa chez le type 1. Sa structure suggère un rôle dans le clivage et le transport de l'ARN viral (Johnson et al., 2011). Le tableau suivant décrit les connaissances actuelles des gènes et de ce qu'ils codent pour le virus du SRRP (tableau I).

Tableau I. Fonctions et caractéristiques connues des protéines structurales et non-structurales du VSRRP. Adapté de (Music et Gagnon, 2010)

| Protéines | Gènes | Acides aminés (taille) | | Fonctions et Caractéristiques |
|-----------|-------|---------------------------|--------------|---|
| | | EU lignée | NA lignée | |
| nsp1 | ORF1a | 385 | 383 | Protéine non-structurale régulatrice aux fonctions multiples (biogénèse virale, transcription, traduction); activité protéolytique; inhibition IFN. |
| nsp2 | | 861 | 980 | Protéine non-structurale, plus grosse protéine de la réplication du VSRRP; Protéine possédant la plus grande variation génétique entre les génotypes NA et EU; marqueur idéal pour l'étude de la variabilité entre les génotypes et dans le développement de tests diagnostiques; activité protéolytique; inhibition IFN. |
| nsp3 | | 447 | 446 | Protéines non-structurales; activité protéolytique; nsp4: inhibition IFN. |
| nsp4 | | 203 | 204 | |
| nsp5 | | 170 | 170 | |
| nsp6 | | 16 | 16 | |
| nsp7 | | 269 | 259 | |
| nsp8 | | 45 | 45 | |
| nsp9 | ORF1b | 645 | 640 | Protéines non-structurales; réplication et transcription virales; nsp9: ARN Polymérase dépendante d'ARN et NTPase; nsp10: hélicase; nsp11: inhibition IFN. |
| nsp10 | | 442 | 441 | |
| nsp11 | | 224 | 223 | |
| nsp12 | | 152 | 153 | |
| GP2a | ORF2a | 249 | 256 | Protéine structurale mineure; contient 2 sites très conservés théoriques (non confirmés) de N-glycosylation; essentielle pour l'infectivité virale; incorporée dans des virions comme un complexe multimère; protéine d'attachement viral. |
| E | ORF2b | 70 | 73 | Protéine structurale mineure, non glycosylée et myristoylée; essentielle pour l'infectivité du virus; incorporée dans les virions sous forme de complexe multimère; possède des propriétés semblable aux canaux ioniques et pourrait avoir la fonction d'une viroporine dans l'enveloppe. |
| GP3 | ORF3 | 265 | 254 | Protéine structurale mineure, une des protéines les plus variables du VSRRP; très glycosylée avec potentiellement 7 oligosaccharides liés à la protéine N (<i>N-linked</i>); sa topologie membranaire varie selon la lignée virale; protéine très antigénique qui pourrait être impliquée dans la neutralisation |

| | | | | |
|--------|-------|-----|-----|---|
| | | | | virale; essentielle pour la capacité infectieuse du virus; Incorporée dans les virions sous forme de complexe multimérique. |
| GP4 | ORF4 | 183 | 178 | Protéine structurale mineure très glycosylée (4 sites de glycosylation liés à la protéine N (<i>N-linked</i>); essentielle à la capacité infectieuse du virus; protéine clé pour la formation du complexe multimérique incorporé dans les virions; médie l'interaction entre les complexes multimériques des glycoprotéines virales mineures et le GP5; c'est une protéine d'attachement viral qui pourrait être impliquée dans la neutralisation virale. |
| GP5 | ORF5 | 201 | 200 | Protéine structurale majeure, transmembranaire, avec un nombre variable de sites de N-glycosylation; protéine du VSRRP la plus variable avec GP3; impliquée dans la neutralisation et la protection; l'association covalente de GP5 et M est cruciale pour l'assemblage viral; Impliquée dans le mécanisme d'entrée virale dans les cellules hôtes et dans le phénomène de l'apoptose. |
| pORF5a | ORF5a | 43 | 51 | Nouvelle protéine structurale; (Johnson et al., 2011); la structure suggère un rôle dans le clivage et le transport de l'ARN. |
| M | ORF6 | 173 | 174 | Protéine structurale majeure non-glycosylée qui est la plus conservée; joue un rôle clé dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus; l'hétérodimérisation de GP5-M est cruciale pour l'infectivité virale. |
| N | ORF7 | 128 | 123 | Protéine structurale majeure, non glycosylée, phosphorylée; très immunogénique et candidat intéressant pour la détection d'anticorps spécifiques au virus pour le diagnostic. Seule composante de la capsid virale, elle interagit avec elle-même à travers des liens covalents et non-covalents. Elle peut être localisée dans le nucléole/noyau cellulaire et interagir avec les facteurs de transcription de l'hôte. |

ORF: *Open reading frames* (Cadres de lectures ouverts). EU: lignée européenne de VSRRP. NA: lignée nord-américaine de VSRRP. ©Cambridge University Press. Permission accordée.

2.2.3 Entrée et réplication virale

Les premières études sur l'entrée du virus SRRP dans les cellules datent de 1996, lorsque l'équipe de Kreutz étudia les effets d'un pH bas dans l'internalisation du virion (Kreutz et Ackermann, 1996). À ce moment là, il n'était pas possible d'observer la fusion membranaire entre le virus et les cellules hôtes, et il a été jugé que son entrée se faisait par endocytose. Cela supposait que l'activation des facteurs impliqués dans la décapsulation du virion se déroule à de faibles pH, ce qui a été confirmé en 1998 (Duan et al., 1998b). Lors de ces mêmes travaux, l'équipe néerlandaise a isolé une protéine de 210-220 kDa qui a été décrite comme étant un récepteur essentiel à l'attachement viral. L'équipe a pu isoler, séquencer et reproduire ce récepteur qui a été identifié plus tard comme étant la sialoadhésine du porc (CD169) (Vanderheijden et al., 2003). D'autres récepteurs cellulaires ont été découverts par la suite, soit le récepteur héparane sulfate à partir de PAMs (Delputte et al., 2002), la protéine vimentine au niveau des MARC-145 (Kim et al., 2006), le CD163 à partir de PAMs (Calvert et al., 2007) et le CD151 au niveau des MARC-145 (Shanmukhappa et al., 2007).

La sialoadhésine (CD169) est une glycoprotéine membranaire de 210-220 kDa de la famille des lectines liant l'acide sialique (siglec – sialic acid binding immunoglobulin-like lectins) (Figure 9b). L'incubation de cellules PAMs avec des anticorps monoclonaux pour la sialoadhésine bloque l'infection au VSRRP (Duan et al., 1998a). De plus, des études sur des cellules PK-15 (cellules normalement non permissives au VSRRP) qui ont été modifiées pour présenter la sialoadhésine à leur surface ont montré que ce récepteur leur conférait la capacité d'internaliser le virus. Toutefois, celui-ci demeurerait bloqué au stade de la décapsulation (Vanderheijden et al., 2003). Il a donc été jugé que la sialoadhésine est un facteur dans l'adhésion et l'internalisation du virion du VSRRP (Delrue et al., 2010).

Le récepteur héparane sulfate a été étudié sous la prémisse que la protéine de 210 kDa (sialoadhésine) n'était pas la seule protéine permettant l'attachement du

VSRRP puisque des anticorps monoclonaux anti-210kDa empêchaient l'infection, mais pas l'attachement (Duan et al., 1998a). Le groupe de Jusa a démontré que l'infection de MARC-145 par le VSRRP était grandement diminuée lors d'une pré-incubation du virus avec de l'héparine (Jusa et al., 1997). La même équipe a alors traité au préalable des cellules PAMs avec de l'héparinase I, ce qui a fortement réduit l'infection au VSRRP (Delputte et al., 2002). De plus, des colonnes d'héparine sépharose ont permis d'identifier les protéines virales liant l'héparine, soit les protéines M, N et le complexe M-GP5 (Delputte et al., 2002). L'héparane sulfate serait donc un facteur dans l'adhésion du virion.

La vimentine est une protéine de la famille des filaments intermédiaires. Bien qu'elle soit généralement intra-cellulaire, une étude sur la localisation de la vimentine dans des MARC-145 a montré qu'elle était aussi exprimée à la surface de la cellule (Kim et al., 2006). Dans cette même étude, une pré-incubation de ces cellules avec des anticorps monoclonaux contre la vimentine a totalement bloqué l'entrée du VSRRP. Finalement, une transformation de cellules BHK-21 (Fibroblastes de rein de hamster nouveau-nés) et CRFK (Cellules de rein félin) avec la protéine vimentine de singe les a rendu permissives au VSRRP (Kim et al., 2006). Cette dernière expérience a montré que le VSRRP pouvait pénétrer dans les cellules, mais ne pouvait s'y répliquer. La vimentine serait donc un facteur dans la mobilisation du VSRRP à travers la membrane cellulaire pour favoriser sa pénétration dans le cytosol (Delrue et al., 2010).

Le CD163 est une protéine membranaire (Figure 9b) de la superfamille des récepteurs riches en cystéine (SRCR) qui possède un rôle dans la réponse anti-inflammatoire et dans l'endocytose du complexe haptoglobine (Hp)-hémoglobine (Hb) dans la circulation sanguine (Graversen et al., 2002). La transfection de cellules BHK-21, PK 032495 (porcine kidney), NLFK (feline kidney) avec l'ADN complémentaire de CD163 établie à partir de PAMs permet l'entrée et la décapsidation du VSRRP (Calvert et al., 2007; Lee et Lee, 2010; Patton et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés dans une étude sur l'importance relative de la sialoadhésine et du CD163, dans laquelle les auteurs concluent que la sialoadhésine est essentielle à

l'internalisation du virus, mais que le CD163 est nécessaire à la décapsidation (Van Gorp et al., 2008). Le titre viral sortant de ces cellules exprimant les 2 récepteurs était de 10 à 100 fois supérieur à celui des cellules n'exprimant que CD163 (Van Gorp et al., 2008). Fait intéressant, des chercheurs ont pu utiliser des homologues du CD163 porcin provenant d'autres espèces animales (humain, singe, chien et souris) pour l'introduire dans la lignée cellulaire BHK1, ce qui a rendu ces cellules permissives au VSRRP (Calvert et al., 2007). Étant donné le tropisme strict du VSRRP pour les porcs *in vivo*, les auteurs émettent l'hypothèse qu'un co-facteur encore inconnu des cellules permissives (lignées MARC-145 et PAM) permet la réplication complète du virus (Calvert et al., 2007; Delrue et al., 2010). Des résultats sur les fonctions des différents domaines du CD163 dans l'entrée et la décapsidation virale ont montré que le domaine extra-cytoplasmique seul est suffisant pour convertir des cellules BHK1 non permissives au VSRRP en cellules permettant la réplication du virus (Lee et al., 2010). Plus précisément, une étude dans laquelle les régions riches en proline-sérine-thréonine (PST 1 et PST 2 – figure 9b) de la protéine CD163 ont été retirés a su démontrer leur importance dans la phase d'infection du virus (Van Gorp et al., 2010).

À la recherche du facteur inconnu, une équipe s'est penchée sur les protéines hôtes qui se lient à la jonction 3'UTR du génome viral du VSRRP et qui sont essentielles à la réplication du virus (Shanmukhappa et al., 2007). L'équipe a ainsi fait un parallèle avec des virus à ARN connus (Virus du Nil Occidental, virus de la Dengue, virus de la mosaïque du tabac et le virus de l'hépatite virale de la souris) chez qui cette interaction a été découverte (Blackwell et Brinton, 1997; De Nova-Ocampo et al., 2002; Nanda et al., 2004; Zeenko et al., 2002). Pour trouver la protéine qui se liait à la séquence 3'UTR du VSRRP, ils ont construit une banque d'ADNc à partir de cellules MARC-145 pour ensuite produire une banque de protéines dans des bactéries. Ainsi, ils ont pu procéder à une hybridation *North-Western* (ARN-protéine) en introduisant la séquence 3'UTR du génome du VSRRP marquée au phosphore radioactif dans les clones bactériens. De cette façon, ils ont pu isoler un clone bactérien produisant une protéine qui se lie à la séquence 3'UTR

du VSRRP, cette protéine s'est révélé être le CD151. De plus, l'utilisation d'anticorps anti-CD151 dans des MARC-145 a bloqué complètement la réplication du VSRRP (Shanmukhappa et al., 2007). La protéine CD151 joue donc un rôle important dans l'infection par le VSRRP, mais n'est pas spécifique du porc puisqu'il y a 95% d'homologie entre la séquence CD151 simienne et porcine, et que les MARC-145 (cellules de singe) l'expriment de manière constitutive (Shanmukhappa et al., 2007).

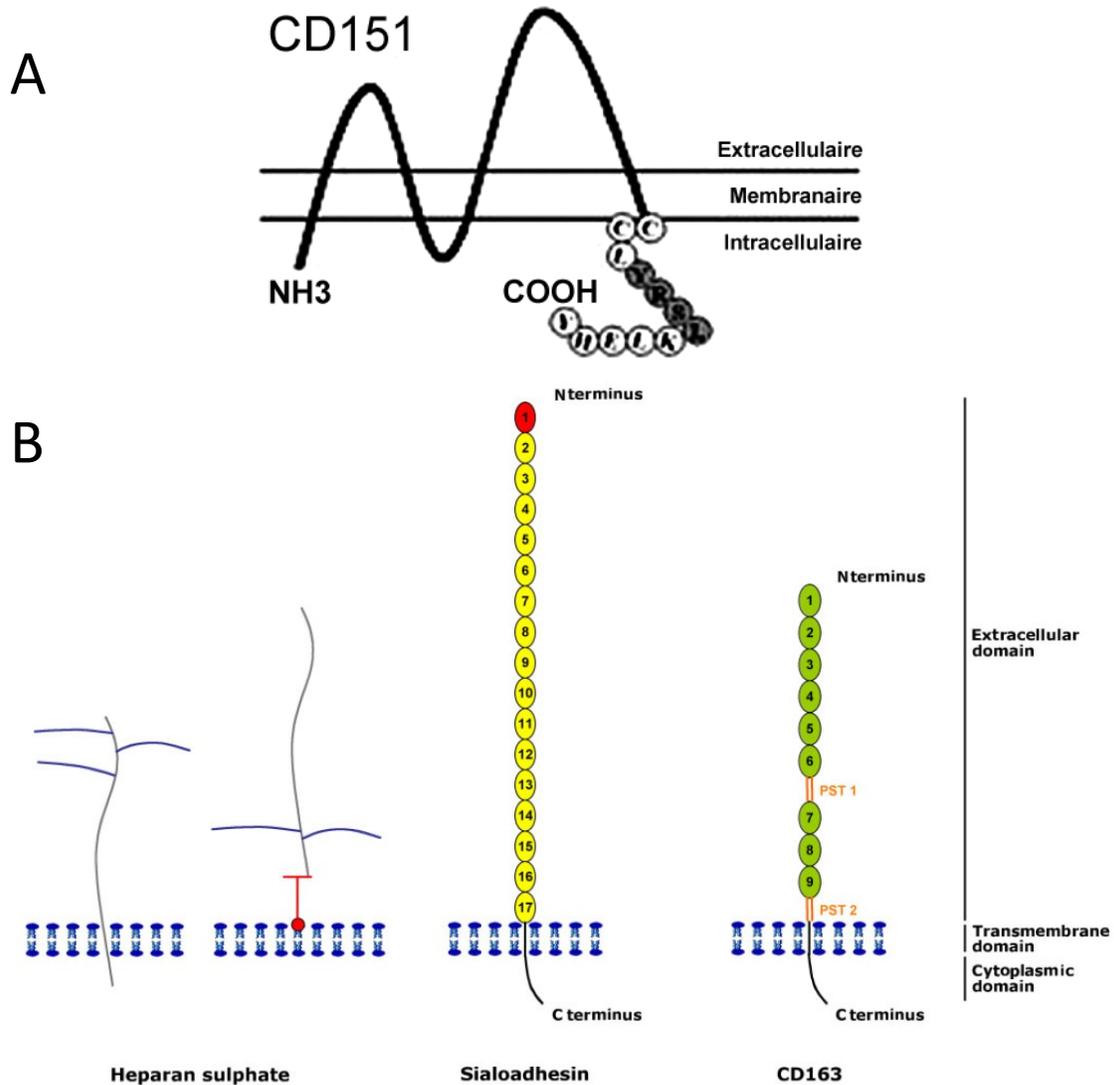


Figure 9. Représentations schématiques des différents récepteurs du VSRPP.

(A) Illustration du CD151 transmembranaire (Liu et al., 2007) **(B)** Illustration de l'héparane sulphate sous deux formes, la sialoadhesine et le CD163. (Van Breedam et al., 2010). ©Society for general Microbiology. Permission accordée.

2.3 Pathogenèse virale

Le VSRRP est transmis principalement par aérosol, mais peut aussi se disperser au sein d'une même ferme par un contact étroit entre les animaux, soit par des lésions cutanées ou par exposition des muqueuses. Même si le virion est relativement sensible à l'environnement, le virion en aérosol demeure infectieux dans un rayon de 150 mètres autour d'une ferme. De plus, s'il y a une météo favorable (vent fort, humidité relative élevée, température basse et ensoleillement faible), les aérosols peuvent transmettre du virus infectieux jusqu'à 4,7 km de distance (Dee et al., 2005). La chronologie de l'infection du VSRRP a été étudiée *in vivo* sur des porcs gnotobiotiques, privés de colostrum ou conventionnels (Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1996; Rossow et al., 1996; Rossow et al., 1995). Après une exposition par aérosol, l'entrée du virion passe par l'épithélium nasal, les macrophages des amygdales, les macrophages alvéolaires et le parenchyme pulmonaire pour rapidement s'étendre aux noeuds lymphatiques (Rossow et al., 1996). Les souches virulentes du VSRRP peuvent induire une virémie dès les 12 premières heures suivant l'exposition. La grande majorité des antigènes de VSRRP sont retrouvés dans les poumons et les noeuds lymphatiques, mais des antigènes du virus ont été retrouvés dans les macrophages du cœur, des reins et du cerveau (Halbur et al., 1995; Rossow et al., 1996; Sur et al., 1996). En plus des macrophages, l'ARN du VSRRP a été retrouvé dans les cellules de l'épithélium des voies respiratoires du porc par immunohistochimie *in situ* (Figure 10b et d) (Rossow et al., 1996) et l'endothélium cardiaque par immunoperoxidase (Figure 11) (Halbur et al., 1995; Halbur et al., 1996). Ces auteurs suggèrent qu'il existe une relation encore inconnue entre les macrophages alvéolaires et les cellules du parenchyme dans la réplication du VSRRP *in vivo*.

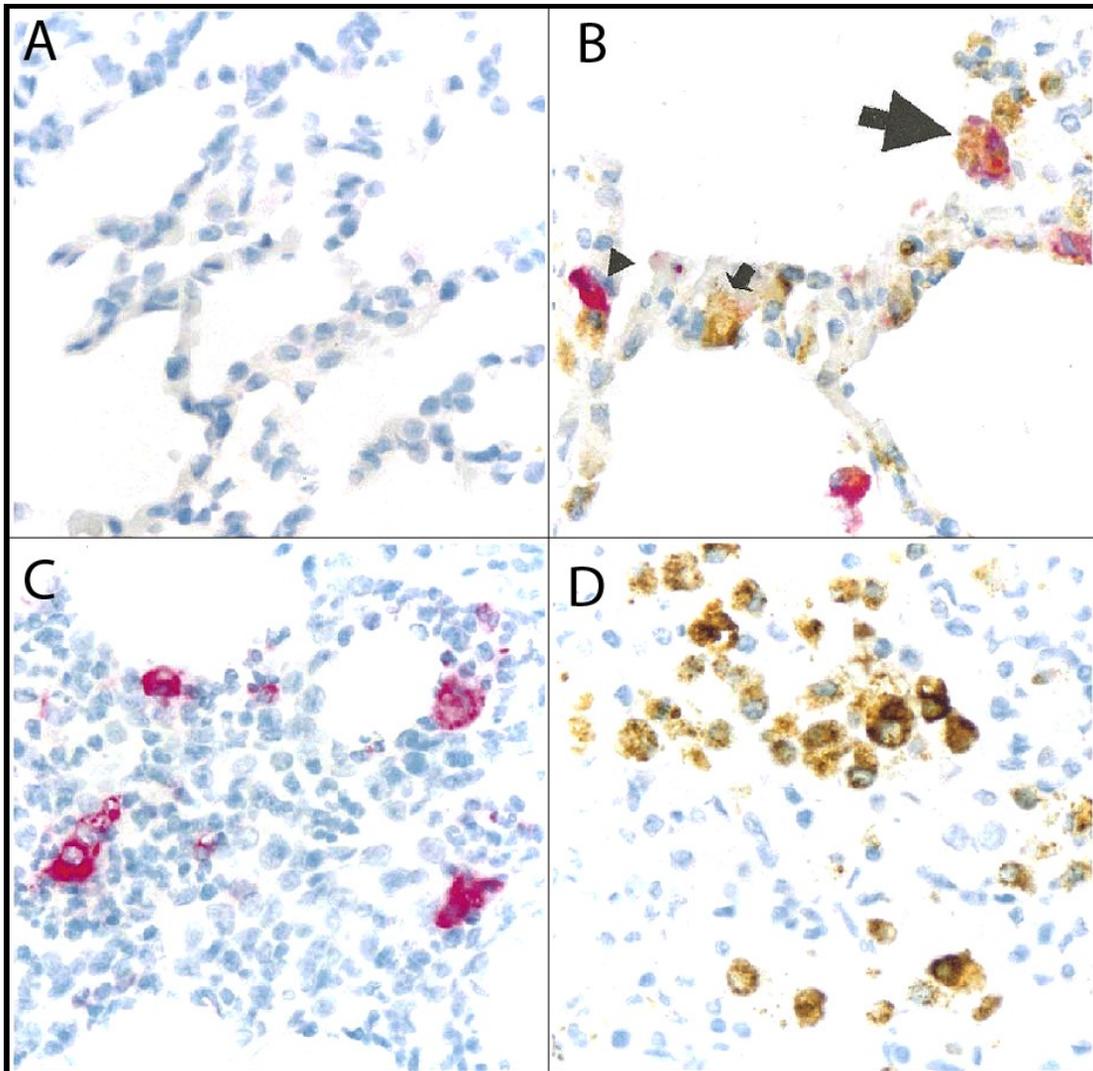


Figure 10. Co-localisation des virus PCV2 et VSRRP au niveau du parenchyme pulmonaire d'un porc au moyen de sondes d'ARN anti-sens spécifiques marqués à la fluorescéine (VSRRP) et à la digoxygénine (PCV). Adapté de (Sirinarumitr et al., 2001)

(A) Parenchyme pulmonaire d'un porc non infecté. **(B)** Co-localisation des deux virus; la flèche complète montre le VSRRP, la petite, le PCV et la grosse pointe de flèche, une co-localisation. **(C)** Poumon d'un porc infecté par le PCV seul. **(D)** Poumon d'un porc infecté par le VSRRP seul. ©Sage publications permission accordée.

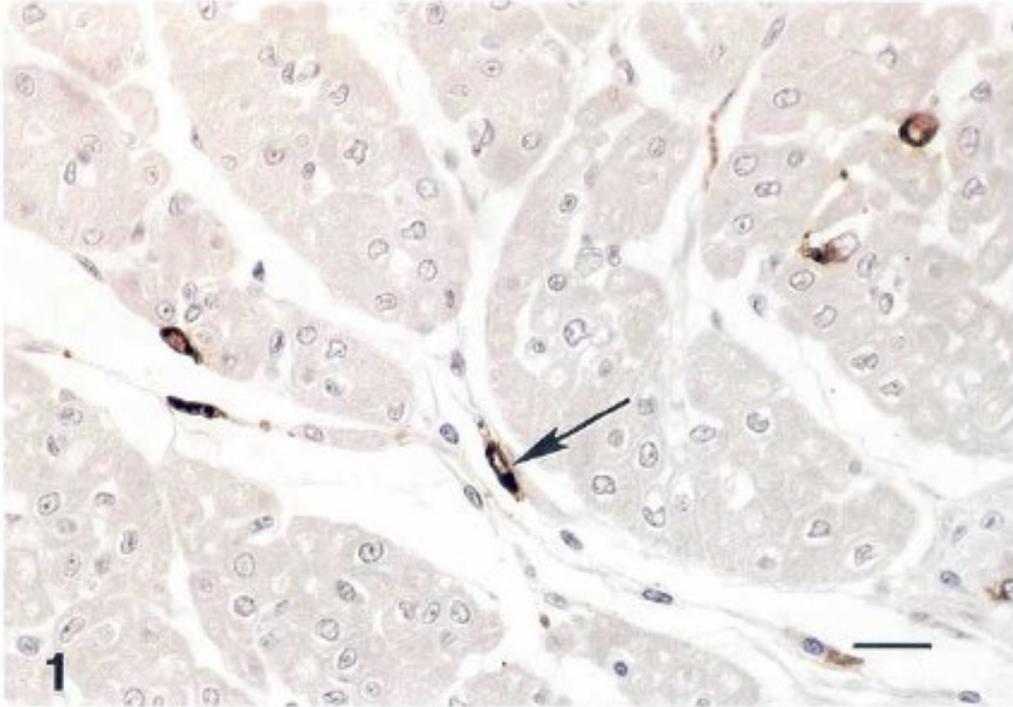


Figure 11. Détection d'antigènes du VSRRP par immunoperoxydase dans un cœur de porcelet gnotobiotique, 9 jours post-infection. Adapté de (Halbur et al., 1995).

Coloration à l'immunoperoxydase par la méthode du complexe de streptavidine-biotine et hematoxyline en arrière plan. Barre : 21 μ m. ©Sage publications pour utilisation académique.

3. Méthodes connues de réplication des virus VSRRP et PCV *in vitro*

3.1 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP)

Les difficultés entourant la réplication du VSRRP *in vitro* ont été révélées très tôt. Comme il a été mentionné précédemment, le virion du VSRRP s'attache principalement sur les cellules exprimant une protéine membranaire de la famille de l'acide sialique, soit la sialoadhésine (Dunbar et Emmons, 1994; Vanderheijden et al., 2003). Cette protéine, aussi nommée CD169, possède un rôle dans l'immunité innée et est ainsi retrouvée principalement dans les macrophages (Munday et al., 1999). Le VSRRP possède ainsi un tropisme particulier pour les PAM en culture primaire, mais ces cellules ne survivent pas à plusieurs passages (Wensvoort et al., 1992; Yoon et al., 1992). Cela limite la capacité de production du virus et l'étude de sa pathogénicité. Les cellules qui ont été adoptées pour la réplication du VSRRP sont des dérivés des cellules de rein de singe vert d'Afrique, les MARC-145 et les CL-2621 (Wensvoort et al., 1992). De plus, certaines variantes du virus VSRRP ne peuvent infecter ces lignées (Howerth et al., 2002). Des tentatives pour développer une lignée cellulaire à partir de cellules endothéliales aortiques porcines et d'endothélium artériel pulmonaire pour étudier la réplication du VSRRP ont échoué (Howerth et al., 2002). Récemment, la réplication complète du VSRRP a été réalisée dans une lignée cellulaire épithéliale de singe, dont l'origine tissulaire exacte demeure inconnue, nommée SJPL (Provost et al., 2012). L'incertitude qui entoure la provenance de ces cellules réduit toutefois leur potentiel à servir de modèle cellulaire.

Le développement technique permet aujourd'hui de s'attarder à la création de modèles *in vitro* plus complexes. Le développement de lignées cellulaires génétiquement modifiées permet l'entrée du VSRRP. Des macrophages alvéolaires porcins (PAM) immortalisés ont été récemment décrits. Toutefois, ceux-ci ont perdu des protéines de surfaces essentielles à l'entrée du VSRRP, puisqu'ils ne permettent plus la réplication du VSRRP (Lee et al., 2010). Ils doivent être génétiquement

modifiés par l'incorporation du gène CD163 (Lee et al., 2010). Tout aussi récemment, une lignée de cellules de rein de porc (PK15) et de cellules d'ovaires de hamster (CHO) ont été transformée pour exprimer les gènes du CD163 et de la sialoadhésine (Delrue et al., 2010). Ces cellules ont acquis la capacité de répliquer différentes souches du VSRRP.

3.2 Le circovirus porcin (PCV)

Les cellules cibles *in vivo* du PCV2 sont peu connues. Il a été possible de retrouver des antigènes et de l'ADN viral du PCV2 dans plusieurs types cellulaires *in vivo* (Allan et Ellis, 2000). De l'ADN génomique de PCV2 a été isolé de macrophages et de cellules dendritiques des follicules des nœuds lymphatiques lors des premiers stades d'infection. L'ADN a aussi été détecté dans les amygdales, les hystiocytes de la rate, les cellules de Kupffer, les septa alvéolaires et les macrophages péri-bronchiques et péri-alvéolaires (Chianini et al., 2003). Des études *in vitro* remettent en question l'usage des macrophages alvéolaires primaires comme modèle de réplication, puisque le PCV2 n'est pas capable de compléter son cycle de réplication dans les macrophages (Gilpin et al., 2003). Toutefois, le PCV2 n'est pas dégradé dans ces cellules. De même, aucune évidence de réplication n'a été observée dans les cellules dendritiques *in vitro* (Misinzo et al., 2006; Nauwynck et al., 2012). Deux lignées primaires porcines (PAM et monocytes périphériques sanguin – PBMC) ont permis la réplication du PCV2 s'ils étaient co-stimulés avec du lipopolysaccharide bactérien (LPS) ou de la concanavalin A (Con A) (Chang et al., 2006b; Lefebvre et al., 2008; Music, 2008). Finalement, une étude faite *in vitro* a révélé que le circovirus porcin possédait la capacité d'infecter les lymphocytes, mais ne pouvait s'y répliquer (Morozov et al. 1998). Toutefois, une activation de ces lymphocytes par de la concavalanin A a permis la réplication du virus (Yu et al. 2007, Lefebvre 2008, Lin et al. 2008). Ces résultats suggèrent que seuls les lymphocytes activés permettent la réplication du circovirus. De plus, il a été rapporté que le statut prolifératif de ces

cellules activées n'influence pas la réplication du PCV (Yu et al. 2008). Cela signifie que la réplication du circovirus dans ces cellules ne dépend pas du fait qu'elles sont en mitose, mais plutôt du fait qu'elles soient activées (Darwich 2012).

En lignée continue, les PK-15 ont longtemps été les seules cellules permettant la réplication du PCV2 *in vitro* (Meehan et al., 1998). Les PK-15 sont couramment utilisées pour la production de vaccins et pour l'isolation du circovirus. Toutefois, l'effet cytopathique du PCV2 est rarement observé (Music, 2008). Plus récemment, une nouvelle lignée cellulaire issue de cellules de la rétine de fœtus de porc (VR1BL) permet une réplication jusqu'à 40 fois plus efficace du circovirus porcin de type 2 (PCV2) comparativement aux PK-15 (Dvorak et al., 2013).

3.2.1 Les cellules NPTr

Puisque la transmission du PCV2 survient principalement par la voie oronasale, le laboratoire du Dr. Carl A. Gagnon s'est mis à la recherche de cellules des voies respiratoires du porc pour étudier le virus. Il a été montré *in vivo* que les cellules épithéliales de la trachée de porc souffrant de MACVP contiennent de grandes quantités d'antigènes de PCV2 (Candotti, 2001). Dans la recherche pour une lignée cellulaire immortelle porcine permettant la replication efficace du circovirus, le laboratoire du Dr. Gagnon a étudié les cellules de trachée de porc nouveau-né (NPTr) (Music, 2008). Ces cellules avaient déjà été utilisées dans l'étude de pathogènes bactériens du système respiratoire du porc (Auger et al., 2009). Elles se rapprochent des cellules épithéliales pulmonaires par lesquelles transitent le PCV2 et le VSRRP dans l'établissement de lésions pulmonaires.

Les travaux de N. Music ont mis en évidence que les cellules NPTr sont permissives à tous les génotypes de PCV. De plus, la réplication du circovirus s'est avéré être aussi efficace que dans le modèle de référence, soit les cellules PK-15 (Music, 2008) (Figure 12).

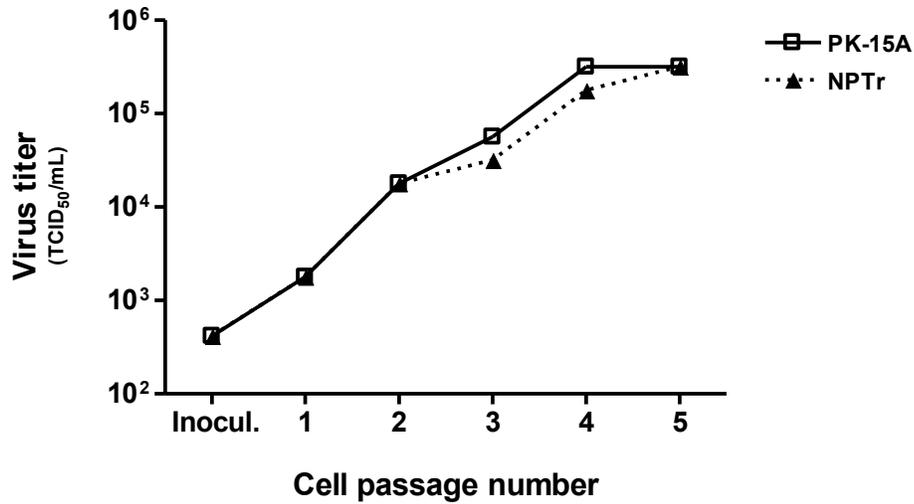


Figure 12. Cinétique de la réplication du PCV2b dans les cellules PK-15 et dans les cellules NPTTr non modifiées après plusieurs passages. (N.Music, mémoire 2008). Avec permission de l'auteur.

Les NPTTr offrent un modèle d'étude intéressant puisqu'elles proviennent du système respiratoire qui est la voie d'entrée principale du circovirus. Toutefois, ces cellules ne permettent pas la réplication du VSRRP (Gagnon – *données non publiées*).

4. La réponse immune dirigée contre le VSRRP et le PCV

4.1 Le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP)

4.1.1 Immunité innée

Le virus du VSRRP représente un défi de taille pour les chercheurs qui tentent de développer un vaccin. Ce virus à ARN possède une grande capacité de mutation, ce qui tend à générer un grand bassin de variants de chaque type (1 et 2) à travers le monde. Qui plus est, les différentes souches de VSRRP varient quant à leur virulence et leur capacité à stimuler le système immunitaire (Diaz et al., 2006; Diaz et al., 2012). Ainsi, différentes souches d'un même type de VSRRP peuvent induire la production de cytokines différentes (Gimeno et al., 2011; Lee et al., 2004). Enfin, le VSRRP possède une stratégie bien particulière pour moduler la réponse immunitaire innée et adaptative à son avantage.

La stratégie d'évasion du VSRRP commence dans les premières étapes de l'infection. Sa cible principale lors de son entrée par aérosol est le PAM. Il est ensuite retrouvé dans les macrophages intravasculaires pulmonaires (PIM), les cellules dendritiques dérivées de la lignée des monocytes et les cellules stromales des organes lymphoïdes.

La figure qui suit (Figure 13) est un schéma développé à partir d'une série d'études *in vitro*. Ce modèle théorique est clairement limité par l'absence de données sur l'interaction horizontale entre les cellules qui, *in vivo*, font partie d'un même système. De plus, l'absence de cellules de la lignée épithéliale du poumon de porc dans les modèles d'infection *in vitro* du VSRRP est flagrante, puisque les cellules utilisées sont des MARC-145, soit des cellules de rein de singe.

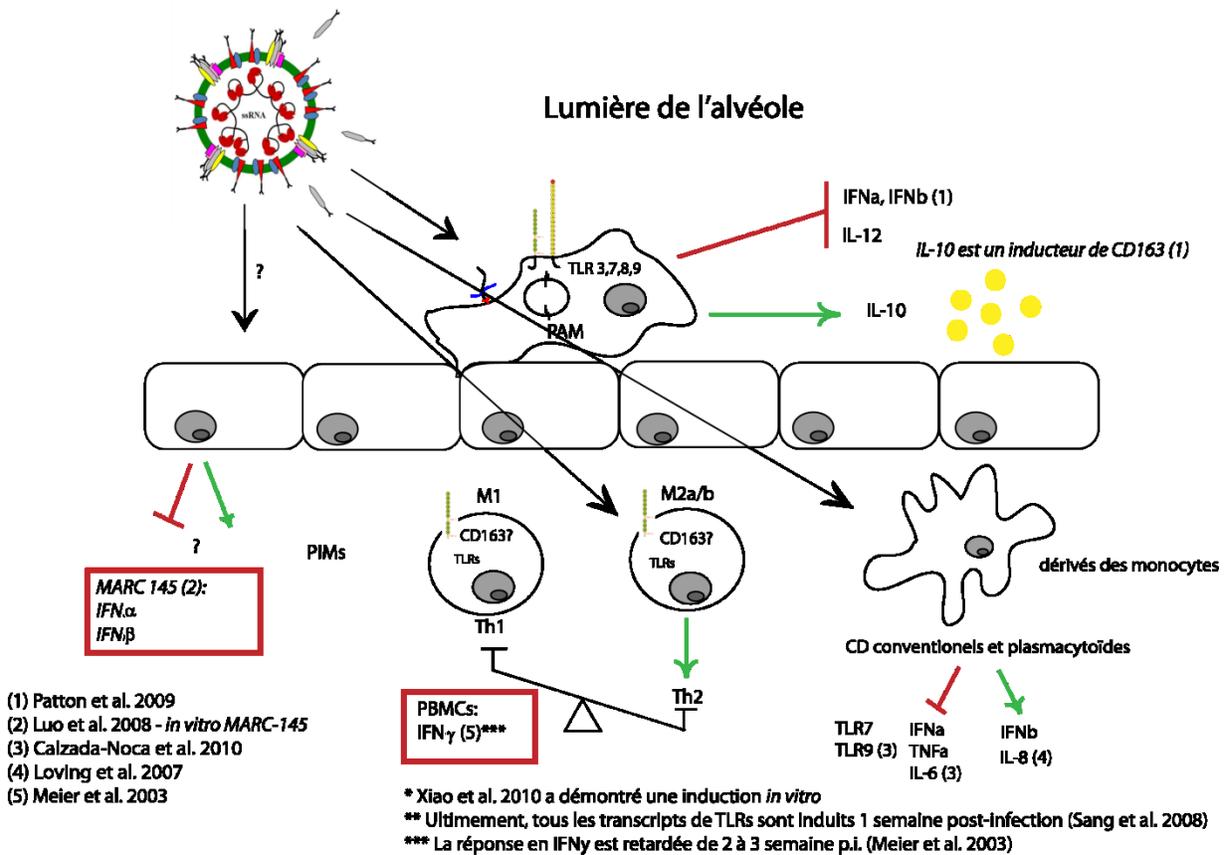


Figure 13. Représentation schématique de l'entrée du virion du VSRRP au niveau des voies respiratoires du porc à partir de plusieurs études *in vitro*.

Les carrés/flèches rouges représentent une inhibition significative par la présence du VSRRP alors que les flèches vertes représentent une augmentation en présence du VSRRP. PIMs (macrophages interstitiels pulmonaires); M1 et M2a/2b (sous-populations de macrophages activés qui retournent à la circulation), PAM (macrophages alvéolaires, PBMcs, (cellules mononuclées du sang périphérique); TLR (Récepteur *Toll-like*). (Fernando Alvarez, mémoire 2013).

Le VSRRP inhibe la production d'IFNα et IFNβ lorsqu'il infecte les PAMs (Patton et al., 2009) et les MARC-145 (Luo et al., 2008). De plus, le VSRRP induit la production d'IL-10, un modulateur de la réponse immunitaire, qui à son tour stimule la production de CD163 (récepteur majeur pour la permissivité au VSRRP) à la surface des cellules de la lignée des monocytes/macrophages et atténue la réponse immune cellulaire dans les premiers jours de l'infection (Patton et al., 2009). L'infection de la

lignée dendritique *in vitro* par le VSRRP a montré des effets similaires sur l'inhibition de l'IFN α et du TNF α , mais, contrairement aux PAMs, a révélé une induction de la production d'IFN β (Loving et al., 2007).

Les mécanismes spécifiques qu'utilise le VSRRP pour bloquer la production de l'interféron α et β ne sont pas entièrement élucidés. Le blocage de la production des interférons de type I se produit tôt dans la transcription de l'ARNm dans les cellules MARC-145 (Miller et Fox, 2004). Des études subséquentes ont montré qu'après la décapsidation du virus, les protéines nsp1 α et nsp1 β sont rapidement traduites. Cela permet à la protéine virale nsp1 de bloquer la phosphorylation de l'IRF3, ce qui empêche son entrée dans le noyau et son attachement au promoteur de l'IFN β . Des études plus poussées ont proposé que nsp1 agit avec la protéine liante du CREB (*CBP*), un co-facteur de l'IRF3, plutôt que directement avec celle-ci (Kim et al., 2010). De plus, la protéine virale nsp2 possède la capacité d'inhiber la polyubiquitination de NF- κ B, un important facteur de transcription des interférons de type 1 (Chand et al., 2012). Finalement, Luo et al. ont montré que le VSRRP bloque les voies précoces d'activation des IFNs, soient les voies RIG et TLR3 (Luo et al., 2008). Les protéines nsp11 et N sont aussi impliquées à un niveau moins important (Figure 14). Sur ce sujet, certains chercheurs insistent sur le fait que l'inhibition des interférons par le VSRRP se situe plutôt au niveau post-transcriptionnel dans le processus de production des interférons (Wang et Christopher-Hennings, 2012). En effet, ils font mention de la différence qui existe entre les modèles cellulaires d'origine épithéliale (MARC-145) qui sont de faibles producteurs d'interférons, avec les modèles, plus proches de la réalité selon eux, de cellules de la lignée des monocytes/macrophages. Cette affirmation découle de la découverte d'une grande quantité d'ARNm d'IFN α et d'IFN β dans des macrophages alvéolaires porcins et des cellules dendritiques infectés par la VSRRP. Ces macrophages présentaient tout de même une inhibition de la production de ces cytokines (Lee et al., 2004; Zhang et al., 2012). Le mécanisme d'inhibition post-transcriptionnel reste à être élucidé. Ainsi, même si les deux modèles présentent une inhibition significative de la production d'IFN de type 1 en présence de VSRRP, les mécanismes d'inhibition sont différents.

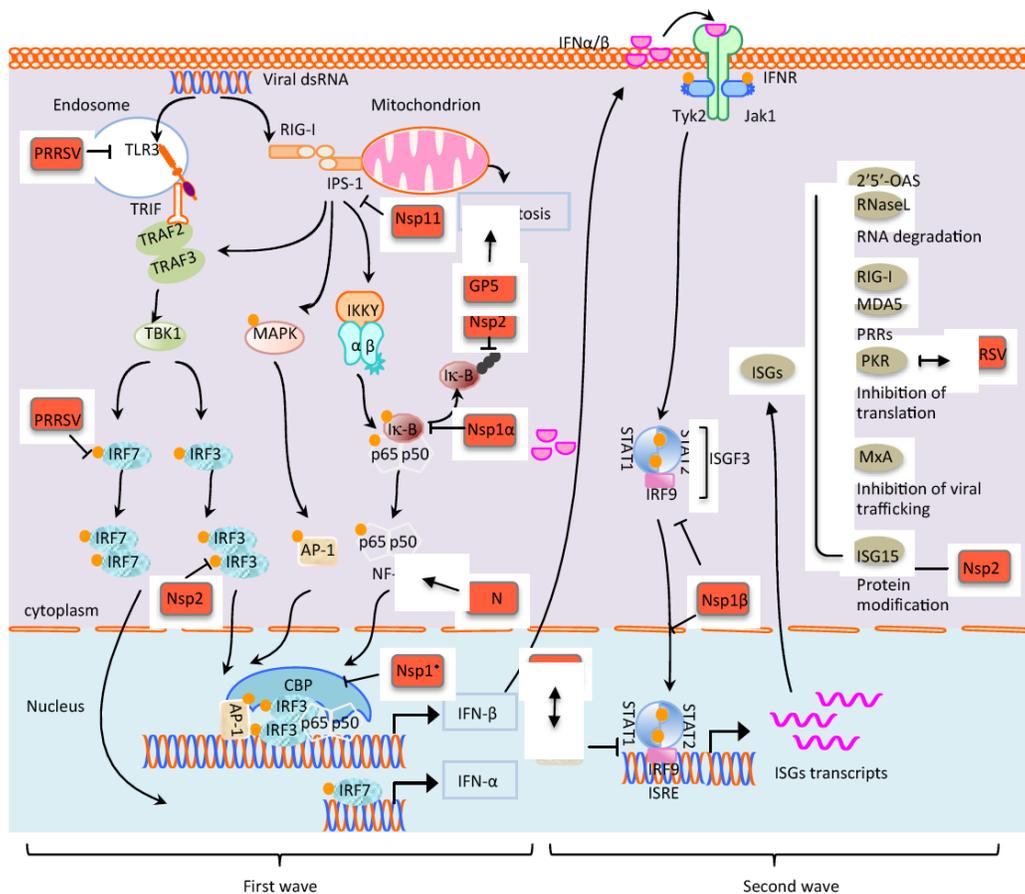


Figure 14. Représentation schématique des voies de production d'interférons de type 1 et sites d'inhibition par des protéines virale du VSRRP. (Sun et al., 2012).

TLR : récepteurs *toll-like*; TRIF : facteur d'activation de l'interféron β possédant un domaine TIR et répondant à une activation par les TLR; TRAF : récepteur du TNF impliqués dans la régulation de la réponse anti-virale; Nsp (protéine non-structurale du VSRRP); STAT : *Signal Transducer and Activators of Transcription*; N : protéine du VSRRP; ISGs : catégorie de gènes stimulés par les interférons; IRF : facteur de régulation des interférons; RIG-1 : gène inductible à l'acide rétinolique 1; ISRE : élément de réponse stimulé par la présence d'interféron; MAPK : protéine kinase activée par un mitogène; JAK1 : Janus kinase 1; Tyk2 : tyrosine kinase 2; IKK γ : sérine/thréonine protéine kinase. ©Creativecommons. Permission accordée.

Les études *ex vivo* et *in vivo* présentent un tableau plus complexe encore quant aux effets du VSRRP dans la production de cytokines (Tableau 2), tout en

confirmant plusieurs des résultats obtenus *in vitro*. Pour se faire une idée la plus complète possible de la production de cytokines lors d'une infection au VSRRP, il faut procéder à une évaluation temporelle et régionale. En effet, la production de cytokines *in vivo* reflète les étapes de la pathogenèse virale, soit lors de la primo-infection, lors du pic de virémie et lors de la phase de guérison. Le VSRRP (type 1 et type 2) présente habituellement un pic de virémie au 7^{ième} jour post-infection puis diminue graduellement pour disparaître au jour 28. Une virémie prolongée ou une réapparition périodique n'est pas rare avec ce virus. Des études à long terme ont toutefois déterminé qu'il n'était plus détectable après 300 jours post-infection (Rowland et al., 2003). Des mesures de cytokines prises sur des macrophages alvéolaires porcins extraits de porcs infectés montrent que le pic d'IL-10, d'IL-12, d'IFN α et de TNF α survient seulement 7 jours après la primo-infection, et que cela coïncide avec le pic de virémie (Gomez-Laguna 2010). Une étude sur l'expression de cytokines sur des cellules mononucléaires périphériques du sang (PBMC) prélevées de porcs infectés à différents jours montre une augmentation retardée de l'IFN γ avec un pic entre 14 et 21 jours p.i., un pic d'IL-1 β au jour 7 p.i., un pic d'IL-10 à partir du jour 14 p.i. et un pic d'IL-6 au jour 14 p.i. (Borghetti et al. 2011).

Tableau II. Résumé des études *ex vivo* et *in vivo* de la production de cytokine lors d'infection au VSRRP de type 2. Adapté de (Gomez-Laguna et al. 2012).

| Cytokines | Effet du VSRRP | Rôle | Références |
|------------------|--|--|--|
| IL-1 | Augmentation précoce dans le poumon Concentration faible et retardée dans le sang | Chimiotactisme des monocytes et des neutrophiles | <i>Thanawongnuwech et al. (2001)</i> <i>Labarque et al. (2003)</i> <i>Gómez-Laguna et al. (2010)</i> |
| IL-4 | Augmentation précoce dans le sang | Blocage de l'expression d'IL-6 Blocage de la production d'anticorps* | <i>Dwivedi et al. (2012)</i> |
| IL-6 | Augmentation précoce dans le poumon | Induction des protéines de la phase aigüe** (Hp, CRP, SAA) | <i>Asai et al. (1999)</i> <i>Gómez-Laguna et al. (2010b)</i> |
| IL-10 | Augmentation précoce dans les poumons | Inhibition de l'expression d'IFN γ et augmentation du recrutement de lymphocytes Tregs | <i>Díaz et al. (2006)</i> <i>Gómez-Laguna et al. (2010)</i> <i>Flores-Mendoza et al. (2008)</i> |
| IL-12 | Augmentation de IL-12p40 dans les poumons | Stimule la production d'IFN γ Oriente la réponse immunitaire adaptative vers la voie Th1 (cellulaire) Diminue la production d'IL-10 | <i>Carter et al. (2005)</i> <i>Gomez-Laguna, (2010)</i> <i>Thanawongnuwech et al. (2003)</i> |

| | | | |
|---------------|--|---|--------------------------------------|
| TNF- α | Inhibition dans les PAMs infectés | Inhibition de la réplication de VSRRP | <i>López-Fuertes et al. (2000)</i> |
| | | Induction des protéines de la phase aigüe | <i>Gómez-Laguna et al. (2010b)</i> |
| IFN- α | Inhibition dans les PAMs et les PBMCs infectés Faible augmentation dans le sang | Interférence avec la réplication du VSRRP | <i>Albina et al. (1998)</i> |
| | | | <i>Van Reeth et al. (1999)</i> |
| | | | <i>Royae et al. (2004)</i> |
| | | | <i>Dwivedi et al. (2012)</i> |
| IFN- γ | Retard de la production | Inhibition de la réplication du VSRRP | <i>Bautista et Molitor, 1999</i> |
| | | | <i>Meier et al. (2003)</i> |
| | | | <i>Thanawongnuwech et al. (2003)</i> |
| | | | <i>Díaz et al. (2005, 2006)</i> |
| TGF- β | Augmentation dans les poumons et organes lymphoïdes | Recrutement de Tregs | <i>Silva-Campa et al. (2009)</i> |
| | | | <i>Gómez-Laguna et al. (2012)</i> |

* Contrairement à ce qui survient chez l'homme et la souris où l'IL-4 stimule la prolifération des lymphocytes B et ainsi la réponse Th2 (Murtaugh et al., 2009).

** Les protéines de phase aigüe surviennent lorsque le foie, en période d'inflammation, se met à synthétiser des protéines spécifiques qui jouent des fonctions immunitaires. Celles-ci sont utilisées comme marqueurs diagnostics de l'inflammation en clinique.

En résumé, la stratégie du VSRRP consiste à atténuer spécifiquement la réponse antivirale (interféron de type 1 (α et β) et de type 2 (γ)) et provoquer une atténuation de la réponse cellulaire à travers la production d'IL-10.

4.1.2 Immunité adaptative

4.1.2.1 Immunité cellulaire

Les effets du VSRRP sur l'expression des cytokines retardent le développement d'une réponse adaptative efficace. En utilisant un test D'ELISPOT à l'IFN γ , des équipes ont découvert que les cellules sécrétrices d'IFN γ spécifiques contre le VSRRP ne sont détectées qu'après 2 à 3 semaines post-infection (Darwich et al., 2010). Les protéines qui induisent la réponse à médiation cellulaire (CMI) semblent être préférentiellement les protéines M, N et GP4 dans cet ordre. La population cellulaire qui en ressort est majoritairement composée de lymphocytes T double positives CD4+CD8+ qui seraient des lymphocytes T mémoires (Meier et al., 2003). Des lymphocytes T CD8+ ont été détectés après infection au VSRRP, mais ceux-ci ne montrent pas d'effet cytotoxique, ce qui s'expliquerait soit par un mécanisme d'inhibition spécifique du virus, soit par le fait que ces CD8+ ne sont pas spécifiquement activés par le VSRRP (Costers et al., 2009; Darwich et al., 2010).

Une des particularités du VSRRP de type 2 (et non de type 1) est sa capacité à recruter des lymphocytes T régulateurs (CD4+/CD25+/FoxP3+) qui produisent de l'IL-10 et du TGF- β (Silva-Campa et al., 2010; Silva-Campa et al., 2009; Silva-Campa et al., 2012). De plus, le VSRRP favorise la réponse adaptative humorale Th2 par la stimulation préférentielle de macrophages de type 2a/b (Meier et al., 2003). En somme, le VSRRP est capable de moduler la réponse cellulaire à son avantage de manière à retarder une réponse efficace et faciliter sa réplication.

4.1.2.2 Immunité humorale

Le VSRRP possède la particularité de retarder fortement la production d'anticorps neutralisants (NA) et de provoquer la production d'anticorps facilitants (*antibody dependent enhancement*- ADE). Dans les premiers temps de l'infection, le VSRRP provoque l'apparition d'anticorps facilitants plutôt que neutralisants. La figure

15 illustre comment ces anticorps peuvent être détectés après seulement 5 jours et sont composés d'IgM (Darwich et al., 2010). À cet effet, plusieurs études montrent que les sites de glycosylation (sites N-glycans) sur les protéines de surface du VSRRP, soit la GP3, la GP4 et la GP5, cachent les antigènes propices à l'effet neutralisant des anticorps (Costers et al., 2009; Faaberg et al., 2006; Plagemann et al., 2002; Vu et al., 2011). Les anticorps facilitants (ADE), qui découlent d'un faible effet d'attachement des premiers anticorps, jouent en défaveur du système immunitaire puisqu'ils facilitent la reconnaissance et l'internalisation des virions dans les macrophages, qui sont leur cible (Cancel-Tirado et al., 2004). Le mécanisme se ferait par l'attachement d'un faible nombre d'anticorps à la surface du virus, ce qui faciliterait l'attachement au récepteur Fc des macrophages et des cellules dendritiques et ainsi l'internalisation du virion, sans qu'il y ait dégradation ou neutralisation du virion. Un épitope situé sur la protéine N, pourtant une protéine structurale interne du virion, et l'épitope A situé sur la protéine GP5 seraient responsables de l'apparition d'anticorps facilitants dans les premiers jours de l'infection (Cancel-Tirado et al., 2004; Yoon et al., 1996). Les anticorps qui ciblent les protéines non structurales du VSRRP (nsp1 et nsp2) sont aussi parmi les premiers détectés (Johnson et al., 2007). Ces premiers anticorps ont été classés parmi les anticorps facilitants non-neutralisants (Darwich et al., 2010). Les raisons pour lesquelles beaucoup de ces cibles antigéniques sont des protéines de la structure interne du virion n'ont pas encore été élucidées.

Les anticorps qui ciblent la protéine M, la GP3, la GP4 et différents épitopes de la GP5 sont neutralisants (NA) (Figure 15). Plusieurs études affirment que l'épitope B de la GP5 est l'épitope neutralisant principal (Darwich et al., 2010; Plagemann, 2004).

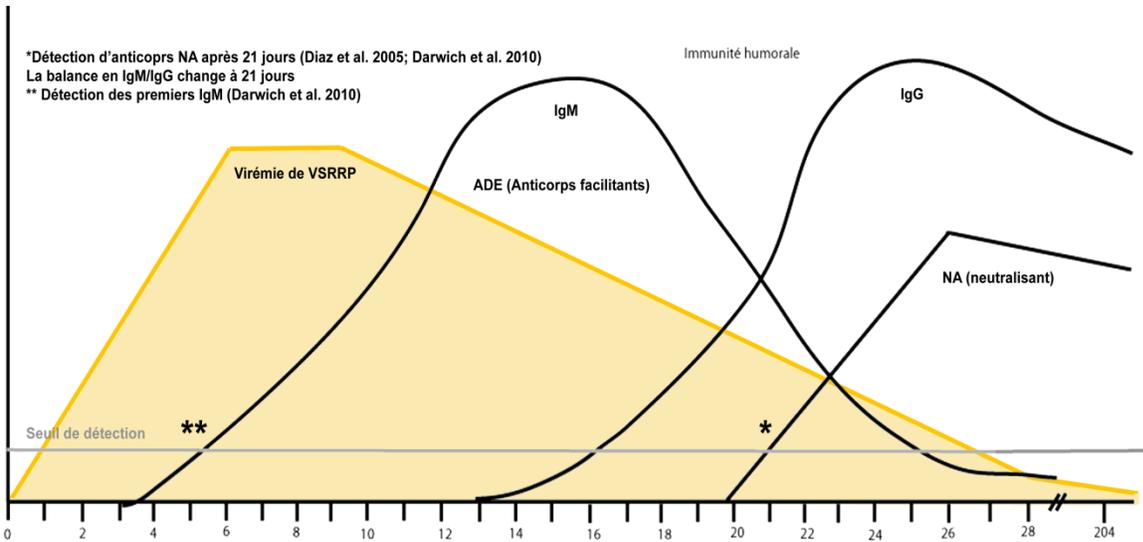


Figure 15. Cinétique de la production d'anticorps lors d'infection par le VSRRP *in vivo*. (Fernando Alvarez, *mémoire 2013*).

La ligne grise représente le seuil de détection des anticorps. * Seuil de détection des anticorps neutralisant. ** Seuil de détection des anticorps facilitants. En arrière-plan : illustration du pic de virémie détectée dans le sang de porcs infectés au VSRRP.

4.2 Le circovirus porcin (PCV)

Le circovirus porcin est un pathogène persistant. Il possède la capacité de moduler la réponse immunitaire pour s'en protéger et demeurer latent. Il semble tirer profit de la présence d'agents plus virulents qui stimulent le système immunitaire. Lorsque se déclare une maladie associée au PCV (MACVP), il est souvent possible de trouver un autre agent pathogène et cela se reflète dans les études sur sa réplication dans des modèles cellulaires de lignées primaires. Parmi les agents pathogènes qui provoquent l'apparition de signes cliniques lors d'expériences *in vivo*, il y a le VSRRP (Harms et al., 2001; Opriessnig et Halbur, 2012; Rovira et al., 2002), le parvovirus porcin (Allan et al., 1999), le Torque-Teno virus porcin (pTTV) (Ellis et al., 2008) et possiblement *Mycoplasma hyopneumoniae* (Opriessnig et al., 2004). Cette dernière étude a toutefois été contredite en 2012 (Sibila et al., 2012).

4.2.1 Mécanismes de l'immunité innée

Des études réalisées *ex vivo* avec des macrophages alvéolaires porcins (PAMs) infectés par le PCV2 ont montré la production de hauts niveaux de TNF α et d'IL-8 (Figure 16) (Chang et al., 2006a). De plus, le PCV2 induit la production d'IL-1 β et d'IL-8 lors de l'infection de cellules mononucléaires récoltées à partir de sang de porc (PBMC) (Darwich et al., 2003). L'un des mécanismes d'inhibition de la production d'IFN α proviendrait de la structure secondaire en tige-boucle (*hair-pin*) du génome du PCV2, mais son rôle est encore mal compris (Wikstrom et al., 2011).

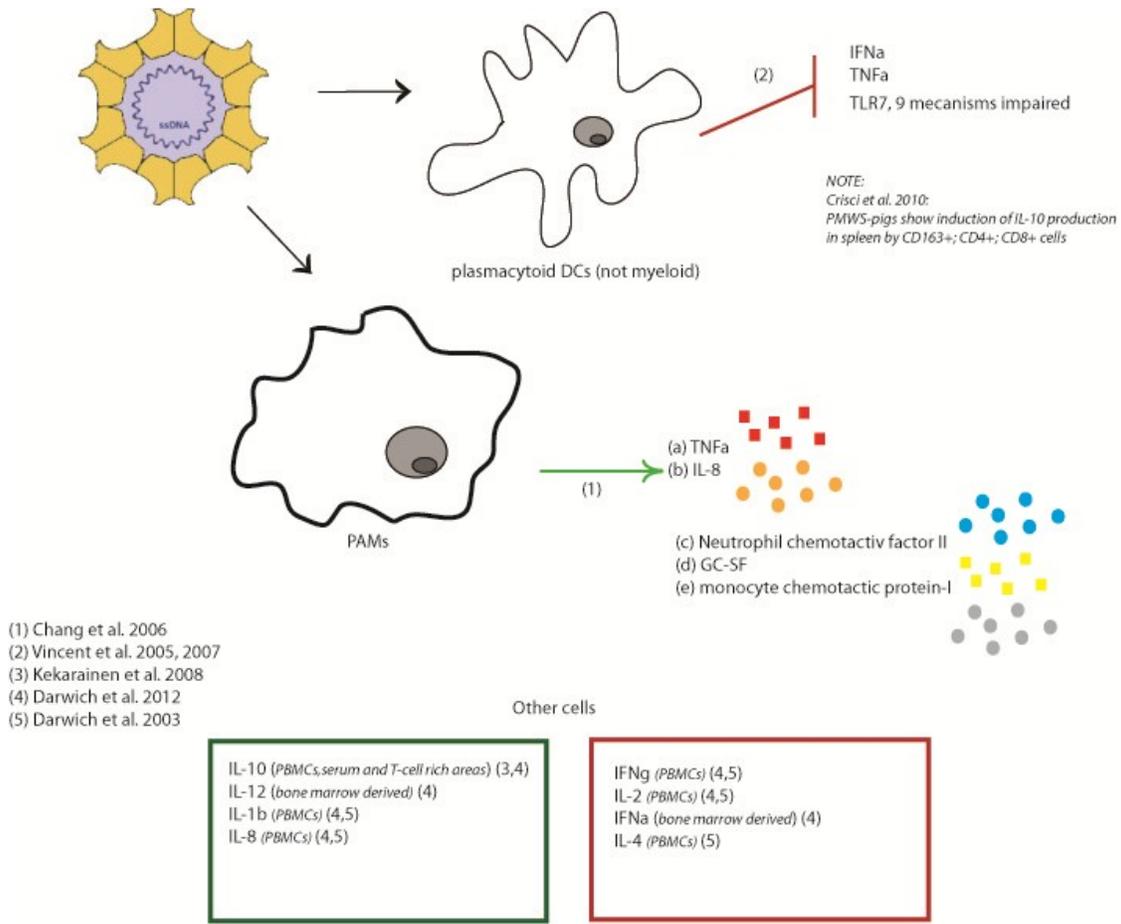


Figure 16. Représentation schématique de la modulation des cytokines par le PCV2. (Fernando Alvarez, mémoire 2013)

Carré et flèche verte : induction; carré et trait rouge : inhibition.

En analysant l'ARNm total de nœuds lymphatiques trachéobronchiques d'un porc infecté au PCV2, Zang et al. (2011) ont décelé une augmentation significative de la production d'IFN γ , d'IL-8 et des chemokines CCL2, CCL5 et CXCL10 et une inhibition significative IFN α et d'IL-4. Ces résultats étaient corrélés à une augmentation des signes cliniques et la présence d'antigène du PCV2 (Zhang et al., 2011). Toutefois, le niveau d'IL-8, même s'il est augmenté au niveau sérique par rapport à un porc non-infecté, demeure bas lorsqu'on le compare à des animaux vaccinés, et ce niveau est directement corrélé au développement du syndrome de dépérissement post-sevrage (SDPS) (Borghetti et al., 2013). Cela signifie que le

PCV2 module la réponse de l'IL-8 en l'atténuant, ce qui pourrait faciliter sa dissémination, possiblement en limitant la réponse inflammatoire lors de l'établissement de l'infection au niveau pulmonaire (Borghetti et al., 2013). D'autres études ont rapporté une augmentation de l'IL-10 dans les nœuds lymphatiques mandibulaires, le thymus, la rate et les amygdales (Darwich et al., 2003; Doster et al., 2010). En résumé, le circovirus module la réponse innée différemment en fonction de la population cellulaire qu'il infecte (Darwich et Mateu, 2012). Le tableau III résume les effets du PCV2 sur la production de cytokines.

Le génome du circovirus porcin possède des séquences appelées éléments de réponse à l'interféron (ISRE). Ces séquences sont des promoteurs de la réplication du virus et répondent à l'IFN α et l'IFN β (Gu et al., 2012; Ramamoorthy et al., 2009). Toutefois, une étude *in vitro* a montré que les mutants sans ISRE peuvent se répliquer aussi efficacement que la souche sauvage dans des cellules PK-15, ce qui signifierait que son absence n'affecte pas sa réplication (Ramamoorthy et al., 2009). De plus, une infection *in vivo* avec un PCV2 muté aux sites d'ISRE a provoqué une réduction significative de la réplication dans les premiers jours de l'infection, mais a étonnamment présenté une augmentation de la virémie et des signes cliniques associés au 28^{ième} jour par rapport au PCV2 non muté (Ramamoorthy et al., 2011). Cela renforce l'idée que ces séquences jouent un rôle encore mal compris dans le développement de la circovirose.

Tableau III. Résumé des études *ex vivo* et *in vivo* de la production de cytokine lors d'infection au PCV2.

| Cytokines | Effet du PCV2 | Rôle | Références |
|------------------|---|--|---|
| IL-1 β | Atténuation de la capacité à la produire (PBMCs) | Chimiotactisme des monocytes et des neutrophiles | <i>Darwich et al. (2003)</i> |
| IL-8 | Augmentation précoce de la production par des PAMs Atténuation générale de la production | Réponse à des infections bactériennes | <i>Chang et al. (2006)</i> <i>Borghetti et al. (2013)</i> |
| IL-10 | Augmentation dans les PBMCs (<i>ex vivo</i>) | Inhibition de l'expression d'IFN γ et recrutement de lymphocytes Tregs | <i>Kekaranein et al. (2008)</i> <i>Darwich et al. (2012)</i> |
| IL-12 | Augmentation dans des cellules dendritiques (DCs) d'origine myéloïde | Stimule la production d'IFN γ Oriente la réponse immunitaire adaptative vers la voie Th1 (cellulaire) Diminue la production d'IL-10 | <i>Kekaranein et al. (2008)</i> |
| TNF- α | Augmentation dans les PAMs infectés | Recrutement des cellules inflammatoires | <i>Chang et al. (2006)</i> |
| IFN- α | Inhibition dans les cellules dendritiques (DCs) infectées Augmentation dans des PBMCs (effet souche dépendant) | Réponse innée à l'infection virale | <i>Vincent et al. (2007)</i> |
| IFN- γ | Atténuation de la capacité à la produire (PBMCs) | Réponse innée à l'infection virale | <i>Darwich et al. (2003)</i> |

4.2.2 Mécanismes de l'immunité adaptative

L'une des manifestations cliniques les plus importantes du SDPS est une déplétion lymphoïde qui s'exprime macroscopiquement par une lymphadénopathie généralisée. Des coupes histologiques ont montré une perte de l'intégrité architecturale des nœuds lymphatiques secondaires avec une déplétion marquée des lymphocytes T et B (Darwich et al., 2002) qui s'étend aussi aux cellules NK (Nielsen et al., 2003). Toutefois, cette déplétion ne semble pas provenir de l'infection des organes lymphoïdes primaires qui produisent les lignées cellulaires (Darwich et Mateu, 2012). Les mécanismes responsables de cet état sont donc encore incompris.

Du côté de la réponse humorale, les anticorps contre le PCV2 sont généralement neutralisants. Les anticorps d'origine maternelle sont détectés jusqu'à 12 semaines après la naissance et jouent un rôle dans l'atténuation des signes cliniques liés au PCV2, tout en potentialisant l'effet de la vaccination précoce (Opriessnig et al., 2008). Lors d'une infection expérimentale, les IgM apparaissent dès le 7^{ième} jour et atteignent un pic autour du 21^{ième} jour post-infection. Les IgG apparaissent au 21^{ième} jour (Fort et al., 2007). Par contre, il existe une différence marquée entre une infection par le PCV2a et une infection par le PCV2b. Le PCV2b semble induire une plus forte réponse humorale, avec une production d'anticorps spécifiques significativement plus élevée que le PCV2a (Fort et al., 2010). L'immunité cellulaire varie aussi grandement. Des tests de lympho-prolifération sur des PBMCs récoltés de porcs infectés aux virus PCV2a ou PCV2b ont démontrés une habileté à proliférer en présence de la protéine viral Cap dès le 7^{ième} jour chez le groupe infecté par le PCV2b, alors que ce même test ne pouvait pas distinguer la prolifération des PBMCs du groupe PCV2a de celle du groupe témoin (Fort et al., 2010). Cette même expérience a montré que ce n'est qu'au jour 21 après l'infection au PCV2a que la prolifération spécifique à la protéine Cap se distingue du groupe contrôle et elle demeure significativement plus basse que celle obtenue avec le groupe infecté au

PCV2b. Le PCV2b induirait donc une plus forte réponse cellulaire dans les premiers temps de l'infection. Finalement, le vaccin commercial contre le PCV2 s'est révélé être efficace pour contrôler la maladie, mais les porcs peuvent encore en être porteurs et sécréter du PCV2 (O'Neill et al., 2011). Il existe 4 vaccins commerciaux qui ciblent le PCV2. *Circumvent PCV*® (Intervet) et *Ingelvac CircoFLEX*® (Boehringer) sont basés sur l'antigène Cap codée par l'ORF2 du PCV2a et exprimé dans un baculovirus. Le vaccin *Fostera PCV2*® (Pfizer) est composé d'un virus recombinant tué de PCV possédant l'ORF1 du PCV1 et l'ORF2 du PCV2a. Finalement, *Circovac*® (Merial) est un vaccin développé à partir d'une souche de PCV2a inactivée (Trible et Rowland, 2012). Tous ces vaccins sont développés à partir d'une souche de PCV2a ou à partir du matériel génétique du PCV2a plutôt que du PCV2b.

5. Les rétrovirus en ingénierie cellulaire

La famille virale *Retroviridae* est composée de virus à ARN simple brin. Ils sont sphériques et mesurent entre 80 et 120 nanomètres de diamètre (Vogt et Simon, 1999). La particule rétrovirale contient 2 copies d'ARN de sens positif. Le génome est divisé en 3 cadres de lectures, codant pour les gènes de l'enveloppe *env*, de la capsid *gag* et de la transcriptase inverse *pol*. Les rétrovirus introduisent leur génome dans celui de la cellule hôte pour profiter de sa machinerie de réplication puisqu'ils ne possèdent pas d'ADN polymérase. La capacité des rétrovirus à introduire leur génome dans celui de la cellule qu'ils infectent est l'élément clé de leur utilisation en ingénierie cellulaire.

L'usage des rétrovirus dans la transformation génétique de lignées cellulaires *in vitro* s'est rapidement répandu dans les années 1980. Des lignées de fibroblastes (St Louis et Verma, 1988), de cellules souches hématopoïétiques (Stead et al., 1988), de l'endothélium (Nabel et al., 1990) et d'hépatocytes (Wilson et al., 1988) ont été les premières transformées avec des rétrovirus. À partir des années 2000, les principaux travaux se sont concentrés à augmenter la sécurité de la méthode de transformation (Escors et Breckpot, 2010). Aujourd'hui, il est possible d'acheter des ensembles commerciaux permettant de créer des rétrovirus ayant perdu leur capacité de réplication, mais pouvant introduire un gène d'intérêt dans le génome d'une cellule cible. Ces rétrovirus sont sécuritaires, peuvent être produits à de hauts titres dans la cellule génératrice et sont le remplacement idéal à la transformation classique avec un plasmide. En effet, lorsque l'on introduit un plasmide dans une cellule, les cycles cellulaires subséquents contribuent à rendre sa distribution hétérogène parmi les clones cellulaires. Cet effet limite leur usage dans les protocoles expérimentaux qui demandent plusieurs passages cellulaires.

Dans le cas de cette étude, la technique qui a été utilisée provient d'une trousse commerciale de la compagnie Clontech (Clontech Labs Inc., Californie, États-Unis). Elle consiste à insérer le gène d'intérêt dans un plasmide possédant un signal

de l'encapsidation virale (le gène signal ψ^+). Une lignée cellulaire est préalablement modifiée pour exprimer de manière stable le produit des gènes env, gag et pol du rétrovirus (Miller et Chen, 1996; Morgenstern et Land, 1990). Ces cellules sont alors transfectées avec le plasmide recombinant. Le segment ψ^+ est alors reconnu par les protéines GAG et le plasmide entier est intégré dans un virion (Figure 17). Pour empêcher le virion de se répliquer, les sites de réplication sur le génome rétroviral sont retirés (Morgenstern et Land, 1990). Le virion ne transporte alors que le plasmide et la rétro-transcriptase. Lorsque le rétrovirus pénètre la cellule cible, le plasmide subit une rétro-transcription dans le cytoplasme (Figure 18), puis est transporté dans le noyau pour s'intégrer au génome de la cellule cible. Finalement, la figure 18 présente le mécanisme moléculaire par lequel le plasmide lui-même ne peut être reproduit après son intégration dans la cellule hôte. Brièvement, lors de l'intégration du plasmide linéarisé dans le génome, le promoteur de réplication du plasmide est inactivé, ce qui laisse le promoteur interne P_{CMV} en amont du gène d'intérêt. Dans cette cassette, en plus du gène d'intérêt, on retrouve le gène de sélection et quelquefois des gènes rapporteurs (GFP).

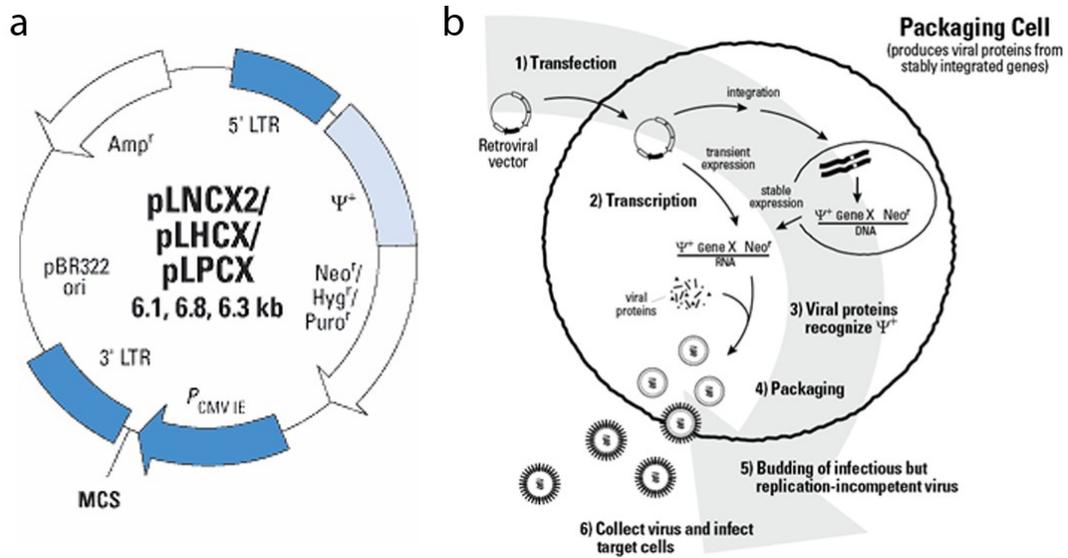


Figure 17. Représentation de la production de rétrovirus possédant le plasmide d'intérêt. (Clontech Retroviral Expression System®).

(a) Illustration des différents plasmides rétroviraux utilisés avec leur origine de réplication, le site de clonage (MCS), le signal d'activation rétroviral et les différents gènes de résistance. (b) Étapes de production du rétrovirus dans les cellules intermédiaires. (Adapté de Clontech Labs Inc., Californie, États-Unis). ©Clontech Labs.

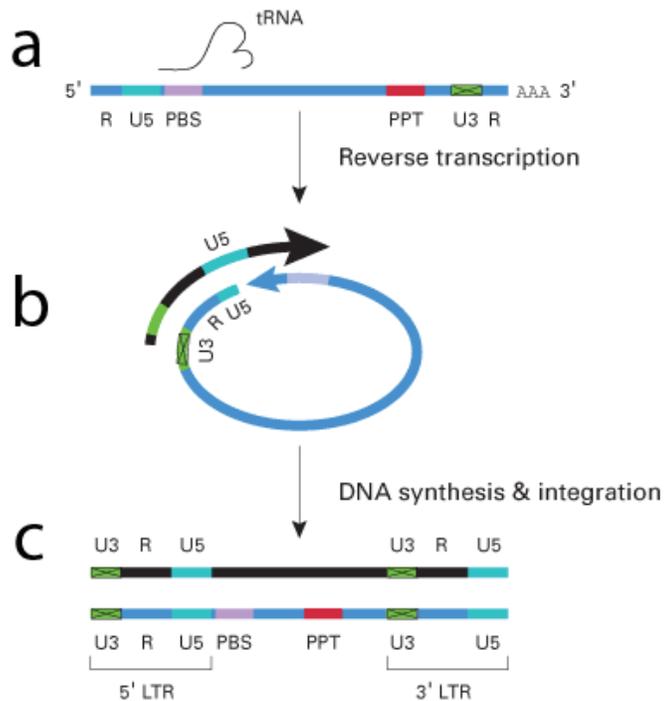


Figure 18. Représentation schématique de l'inactivation de la réplication du plasmide rétroviral intégré dans la cellule hôte.

(a) le brin positif d'ARN subit une transcription inverse. **(b)** Un intermédiaire circulaire est alors formé qui, lors de son intégration dans le génome de l'hôte (noir) ajoute un segment U3 dans la région 3'LTR. **(c)** Ce segment inactive le promoteur hybride CMV/MSV dans la région 5'LTR du rétrovirus et fait en sorte que toutes les transcriptions qui suivent ne peuvent être réalisées qu'à partir du promoteur interne $P_{CMV\ IE}$. ©Clontech Labs

III. MÉTHODOLOGIE

Les lignées cellulaires

Les cellules de rein de porc (PK-15) qui sont utilisées pour la production de tous les génotypes de circovirus porcin (Meehan et al., 1998) ont été conservées dans du milieu Eagle *Minimum Essential Medium* (EMEM) (Multicell™, Wisent, Saint-Bruno, Qc. Canada) contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS) (Wisent Inc, QC, Canada), 1 mM de sodium pyruvate, 1 mM de HEPES, 1 µM d'acides aminées non essentiels, 10U/mL de pénicilline G sodique, 10 µg/mL de streptomycine et 250 g/L de solution antimycotique (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada).

Le milieu de culture cellulaire pour la lignée MARC -145 (sous-clone de cellules de rein de singe Africain vert MA104) (Kim, et al., 1993) est du MEM (Minimum Essential Medium) (Gibco, NY, États-Unis) contenant 10% sérum foetal bovin (Wisent Inc, QC, Canada), 1% HEPES 1M, 1% L-glutamine (200 mM), 1% pénicilline/streptomycine 100X et 1% fungizone (250µG/ml) (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada). Les MARC-145 sont utilisées dans la production du VSRRP (Wensvoort et al., 1992).

Les cellules de trachée de porcelet nouveau-né (NPTr) ont été conservées dans du milieu *Minimum Essential Medium* (MEM) (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada) contenant 10% de sérum foetal de veau (FBS) (Wisent Inc, QC, Canada), 1 mM de sodium pyruvate, 2 mM de L-glutamine, 1 µM d'acides aminées non essentiels, 10U/mL de pénicillin, 10 µg/mL de streptomycine et 250 g/L de solution antimycotique (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada).

Les macrophages alvéolaires primaires (PAMs) qui ont été utilisés pour extraire la séquence d'ARNm complète du récepteur CD163 ont été recueillis de poumons frais de porcs âgés de 2 à 14 semaines. Les porcs ont été sacrifiés selon les normes éthiques stipulées dans le protocole 12-Rech-1640 approuvé par le comité éthique institutionnel de la Faculté de Médecine Vétérinaire qui applique les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Brièvement, 400 mL de tampon phosphate salin (PBS) contenant 10 U/mL de pénicilline G sodique, 10

ug/mL de streptomycine et 100 mg/L de gentamicine (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada) ont été versés dans les poumons recueillis par nécropsie de porcs euthanasiés. Le mélange cellulaire a ensuite été aspiré et centrifugé à 2500 rpm (2028R Napco, Virginia, États-Unis) pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été suspendues dans du milieu DMEM (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada) contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS) (Wisent Inc, QC, Canada), 1 mM de HEPES, 1 µM d'acides aminés non essentiels, 2 mM de L-glutamine, 10U/mL de pénicilline, 10 µg/mL de streptomycine et 250 g/L de solution antimycotique (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada) et séparées dans des pétris de 100 mm² (Corning, NY, États-Unis). Après 24 heures à 37°C et 5% de CO₂, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées avec du PBS stérile. Par la suite, 250 µL de Trizol® (Invitrogen, GibcoBRL, ON, Canada) a été ajouté pour lyser les cellules et procéder à l'extraction de l'ARN. Ces PAMs ont été conservés dans du milieu DMEM (décrit ci-haut). Pour conserver les PAMs entre les expériences, une quantité de 2x10⁶ cellules ont été suspendues dans une solution de 10% de glycérol dilué dans du sérum foetal bovin, puis conservées pendant 8 heures à -80°C avant d'être déposées dans un réservoir d'azote liquide (-196°C).

Les macrophages alvéolaires porcins immortels (PAMs immortels- ATCC 3D4/21) ont été conservés dans du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) auquel ont été ajoutés 1 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamine, 10U/mL de pénicilline, 10 µg/mL de streptomycine et 250 g/L de solution antimycotique (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada). Ces cellules sont un don du laboratoire du Dr. Marcelo Gottschalk de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal.

Les cellules Eco-Pack® GP2-293, des cellules issues de rein humain, (Clontech Laboratories Inc., California, États-Unis) qui ont été utilisées pour produire le rétrovirus recombinant pLNCX2-CD163 ont été conservées dans du milieu DMEM (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada) avec 100 U/mL de pénicilline G sodique, 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen Corporation, GibcoBRL, ON, Canada), 4mM de L-glutamine, 1mM de sodium pyruvate et 10% de sérum foetal

bovin (Wisent Inc, QC, Canada). Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

Toutes les cellules utilisées ont été testées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la présence de circovirus (PCV1 et PCV2) ou de mycoplasmes (ARN 16S de mycoplasmes) dont la présence provoquerait une contamination non discernable à l'œil nu et pourrait affecter les résultats.

Les souches virales

Les souches de circovirus porcins étudiées dans cette étude sont énumérées dans le tableau IV. La souche Stoon 1010 de PCV2a nous a été donnée par le Dr John Ellis (Université de Saskatchewan). La souche de PCV2b (FMV-06-0732) a été isolée d'un cas clinique au Québec en 2006 (Gagnon et al., 2007). La souche de PCV1 (PK15-IAF) a été isolée de cellules PK-15A infectées de manière persistante par le virus. La séquence virale de ce PCV1 est 100% identique à la souche de référence PCV PK-15 (numéro de référence U49186) (Meehan et al., 1998). La souche PCV1/2a (FMV08-1133505) a été isolée d'un homogénat de tissus pulmonaires et de nœuds lymphatiques d'un porc en santé (Gagnon et al., 2010). La souche du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin de type II (PRRSV type II) utilisée dans cette étude est la souche de référence au Québec, soit le IAF-Klop, don du défunt Dr Serge Dea (INRS) (Mardassi et al., 1994). Plusieurs séquences nucléotidiques de gènes de ce virus ont été rapportées dans Genbank, tels que l'ORF5 (numéro de référence U64928), l'ORF2 (numéro de référence AF003343), l'ORF3 (numéro de référence AF003344) et l'ORF4 (numéro de référence AF003345).

Tableau IV. Description des souches de circovirus et identifiant Genbank.

| Identification | Génotypes | Identifiant GenBank | Références |
|-----------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Stoon 1010 | PCV2a | AF055392 | <i>Meehan et al., 1998</i> |
| FMV-06-0732 | PCV2b | JQ994270 | <i>Gagnon et al. 2008</i> |
| FMV08-1133505 | PCV1/2a | FJ655419 | <i>Gagnon et al., 2010</i> |
| PK15-IAF | PCV1 | U49186 | <i>Meehan et al., 1998</i> |

Préparation des stocks viraux

Tous les génotypes de PCV ont été produits dans des PK-15A libres de PCV1 en infectant avec 0,05 MOI de PCV une flasque de 150 ml (Costar, Corning, NY, États-Unis) contenant 5×10^6 cellules PK15 en suspension, puis conservés sur 5 passages pour obtenir une concentration virale autour de 10^5 MOI (Music, 2008). Les virus ont par la suite été purifiés et concentrés par ultracentrifugation sur un coussin de 20% de sucrose dilué dans un tampon de PBS à pH 7,4 (137mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de phosphate de sodium et 2 mM de phosphate de potassium) stérile au moyen d'un rotor SW28 Beckman Coulter (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) à 25000 rpm pendant 3 hrs. Le virus du SRRP de type II (IAF-Klop) a été répliqué dans les cellules MARC-145 comme décrit précédemment (Mardassi et al., 1994).

Création de cellules NPTr permissives au VSRRP

Dans le but de modifier la lignée de cellule NPTr pour la rendre permissive au virus du SRRP, le gène CD163, un récepteur connu du VSRRP (Calvert et al. 2007), a été intégré dans son génome. En résumé, la séquence d'ARNm du CD163 a été obtenue suite à l'extraction de l'ARN total des macrophages alvéolaires (PAMs) obtenus de poumons de porcs (de Abin et al. 2009). L'extraction d'ARN a été réalisée avec une solution de Trizol® (Invitrogen, GibcoBRL, ON, Canada). Une RT-PCR (polymérisation en chaîne suite à une transcriptase inverse) a été réalisée en utilisant

les amorces CD163-HindIII-F (5'-AAG CTT AAG CTT ATG GAC AAA CTC AGA ATG GTG CTA C- 3') et CD163-ClaI-Reverse (5'- ATC GAT ATC GAT TCA TTG TAC TTC AGA GTG GTC TCC TGA GGG ATT TAG -3') avec la trousse SuperScript® One-Step RT-PCR for long template (Invitrogen, GibcoBRL, ON, Canada) puisque le transcript possède une taille de 3623 paires de bases (Genbank: DQ067278.1). Les conditions du RT-PCR sont les suivantes : (1) une transcription inverse à 50°C pendant 30 minutes; (2) suivie d'une inactivation de la reverse-transcriptase et d'une première séparation des brins d'ADNc à 95°C pendant 2 minutes; (3) pour ensuite débiter 35 cycles de séparation à 95°C pendant 30 secondes, avec une température d'annélation à 64°C pendant 30 secondes, puis une élongation à 72°C pendant 5 minutes. L'amplicon qui en a résulté a été digéré avec les enzymes de restriction *HindIII* et *ClaI* à 37°C pendant 3 heures suivi d'une inactivation à 65°C pendant 5 minutes (New England Biolabs, Ipswich, MA, États-Unis). Le plasmide rétroviral pLNCX2 (Clontech Laboratories Inc., California, États-Unis) a lui aussi été digéré avec ces deux enzymes dans les mêmes conditions. L'insert a ensuite été intégré dans le plasmide avec une T4 ligase (Invitrogen, GibcoBRL, ON, Canada). Des bactéries *E. Coli* T10 ont été transformées avec l'amplicon, puis ont subi une période de croissance sur gélose avec milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Sigma-Aldrich, Minnesota, États-Unis). Plusieurs colonies ont été récoltées puis vérifiées pour la présence du gène de CD163 par PCR en utilisant une amorce dans le plasmide pLNCX2 (fournie dans la trousse Clontech) et une autre dans l'insert (CD163-ClaI-Reverse). Parmi les colonies positives au PCR, quelques unes ont été choisies pour faire une purification à grand volume par la technique du MIDIPREP (Qiagen™, Mississauga, ON, Canada). Le plasmide purifié a ensuite été digéré avec les mêmes endonucléases décrites précédemment. Une migration sur gel de 1% d'agarose dans un tampon de TAE 1X a permis de vérifier la présence de l'insert. Le plasmide avec l'insert (pLNCX2-CD163) a ensuite été envoyé pour séquençage à l'externe (Université de Laval, plateforme de séquençage) pour valider la cassette d'expression du gène CD163. La séquence de nucléotide de l'ARNm de CD163 a été analysée avec l'aide du programme Geneious bioinformatics, version 5.4.6 (Biomatters, Ltd., Auckland, New Zealand).

Ces techniques nous ont permis de synthétiser un plasmide recombinant contenant le gène de CD163 sous un promoteur CMV (pLNCX2-CD163). Pour s'assurer que les cellules NPTr synthétisent correctement la protéine CD163 à partir du plasmide, 2×10^5 cellules NPTr ont été transformées avec 5 μ g de pLNCX2-CD163 par électroporation en faisant une pulsation 140V pendant 25ms dans une cuvette Micropulser™ de 2mm à l'aide d'une machine à électroporation BioRad GenePulser Xcell™ (Biorad, Mississauga, ON, Canada). La présence de la protéine CD163 a été évaluée par immunofluorescence indirecte tel que décrite plus loin avec des cellules NPTr non transformées comme contrôle.

Intégration de l'ADNc de CD163 dans le génome cellulaire.

Pour intégrer le gène du CD163 dans le génome des cellules NPT_r, le protocole de la trousse Retro-X System[®] (Clontech Laboratories Inc., California, États-Unis) a été modifié. Des cellules Eco-Pack[®] GP2-293 spécialement modifiées pour contenir les gènes de réplication du rétrovirus (*env*, *gag* et *pol*) ont été transformées avec le plasmide pLNCX2-CD163, qui contient notamment la séquence signal de l'encapsidation Ψ^+ , et le plasmide pVSV-G[®], qui code pour des protéines d'enveloppe spécifique aux cellules de mammifères (Clontech Laboratories Inc., California, États-Unis). Ce dernier plasmide est ajouté par électroporation dans les cellules GP2-293 pour que les rétrovirus produits possèdent une protéine virale plus spécifique aux récepteurs des cellules de mammifères. La cible de cette protéine virale est une protéine chaperone du réticulum endoplasmique nommée gp96 (Bloor et al., 2010). Les cellules ont donc été transformées avec 5 μ g de plasmide pLNCX2-CD163 et 5 μ g de plasmide pVSV-G[®] dans une cuvette Micropulser[™] de 2 mm avec une pulsation à un voltage de 110V pendant 25 ms à l'aide d'une machine à électroporation BioRad GenePulser Xcell[™] (Biorad, Mississauga, ON, Canada). Les cellules GP2-293 ont ensuite été déposées dans une pétri de 60 mm² (Corning, NY, États-Unis) puis ont été incubées 48 heures à 37°C à 5% de CO₂. Le pétri complet a subi trois cycles de gel/dégel à -70°C pour faciliter l'extraction du rétrovirus. Le lysat cellulaire qui en a résulté a ensuite été mis sur une culture confluente de cellules NPT_r naïves dans un pétri de 60 mm² pendant 8 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Après cette période, le surnageant a été retiré et les cellules NPT_r ont été incubées 12 heures. Ces cellules ont subi une seconde infection de 8 heures avec le lysat cellulaire puis ont été incubées 96 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Après cette période, le milieu cellulaire a été changé pour un milieu NPT_r frais contenant 400 μ g/ml de néomycine (Sigma-Aldrich, Minnesota, États-Unis) pour débiter le processus de sélection des cellules possédant le gène d'intérêt. Après 4 passages dans un milieu contenant de la néomycine, la présence du gène CD163, sa transcription et son niveau d'expression ont été évalués par PCR, RT-PCR et immunofluorescence indirecte, respectivement. Pour choisir une sous-population

avec un haut taux d'expression de la protéine CD163, 2×10^6 cellules NPTr-CD163 ont été diluées 1/100 000 pour arriver à 1 cellule par puits d'une microplaque de 96 puits (Costar 3595, Corning, NY, Canada) pour être incubées pendant 4 semaines jusqu'à atteindre une confluence. Chaque puits a ensuite été évalué par immunofluorescence indirecte pour qualifier le niveau d'expression de la protéine CD163. La sous-population de NPTr-CD163 qui exprimait le plus la protéine CD163 a été conservée pour le reste des expériences. Des sous-populations intermédiaires ont été conservées pour des travaux ultérieurs. Finalement, la permissivité de ces cellules NPTr-CD163 a été évaluée suite à l'infection de 2×10^6 cellules distribuées également dans une plaque 96 puits à 0,5 MOI de VSRRP de type 2 (IAF-Klop) pendant 72 heures avant de procéder à la détection des particules virales.

Détection de l'ARNm de CD163 par RT-PCR

L'extraction de l'ARNm total a été réalisée avec une solution de Trizol® en suivant le protocole de la compagnie (Invitrogen™, New Mexico, USA). Une transcription inverse a été réalisée selon le protocole de la trousse Quantitech Rev. Transcription kit (Qiagen™, Mississauga, ON, Canada) de manière à créer une banque d'ADNc. Pour faciliter la détection, une nouvelle amorce : CD163-detect-R a été utilisée conjointement avec l'amorce préalablement décrite CD163-F (Tableau V). Cette nouvelle amorce permet la détection du transcript de CD163, ce qui donne un produit d'environ 400 pb. La migration sur gel de 1% d'agarose a été faite comme décrit ci-haut. Une approche similaire a été développée pour détecter les gènes CD151 et CD169, qui ont été conservés pour de futures expériences (Tableau V).

Tableau V. Description des amorces nucléotidiques utilisées pour la détection et l'amplification des récepteurs cellulaires du VSRRP.

| Gène | Genbank # référence | Taille de l'amplicon | Sequence F (directe) 5'→3' | Séquence R (inverse) 5'→3' |
|---------------------|---------------------|----------------------|--|--|
| CD163 | DQ067278 | 3623 bp | AAGCTTAAGCTTATGGACAACT CAGAATGGTGCTAC | CTAAATCCCTCAGGAGACCACTCTGA AGTACAATGAATCGATATCGAT |
| CD169 | AF509585 | 5193 pb | GAATTCGAATTCATGGACTTCCT GCTCTGCTCCTCCTCCTGGCTTCA | TGTGAAAACACACAGTCTGTGAAAAG CACAGTCTGAATCGATATCGAT |
| CD151 | NM001243865 | 762 pb | AAGCTTAAGCTTATGGGCGAAT TCGGCGAGAAGGGCGCGCCATGCGGC | ATCGATATCGATTAGTAGTGCTCCA GCTTCAGGCTCTTGTACAGGCA |
| CD163 <i>detect</i> | | 632 bp | <i>Voir CD163-F</i> | CCAGAGAAACTGACAGCACTTCCACATTCA |
| CD169 <i>detect</i> | | 468 pb | GACGCCACCATGACTGTTTTTGT | GTATCTCGGAAGGAAACCACGCAG |

Modèle de co-infection

Dans le but d'étudier l'effet du VSRRP de type 2 sur la réplication du circovirus porcin (PCV), les cellules NPTr-CD163 ont été conservées pour plus de 4 passages avec une infection initiale de 0,05 MOI de chaque génotype de PCV (PCV1, PCV1/2a, PCV2a et PCV2b) afin d'atteindre une infection persistante et un TCID₅₀/ml minimal de 10⁴. Une quantité de 2 x 10⁶ cellules NPTr-CD163 infectées avec le PCV ont été distribuées dans des plaques de 96 puits (Costar 3595, Corning, NY, États-Unis) puis infectées avec 0,5 MOI de VSRRP de type 2 pendant 3 heures à 37°C sous 5% de CO₂. Après ce délai, le milieu a été changé pour retirer le surnageant contenant des particules virales qui n'ont pas adhéré aux cellules. C'est pourquoi le premier échantillon analysé pour la présence des virus PCV et VSRRP est le temps 3. Des échantillons de lysat cellulaire ont alors été récoltés à 3, 12, 24, 48, 72 et 96 heures après l'infection au VSRRP. Pour recueillir les lysats, 4 puits de la plaque contenant les cellules étaient grattés à l'aide d'un embout (Sarstedt Inc., Montréal, Québec, Canada), puis l'ensemble des cellules avec le milieu était récolté. Puisque le modèle

standard (MARC-145) de l'étude du VSRRP présente une forte mortalité à 72 heures p.i., (Mardassi et al., 1994) le protocole expérimental qui a été choisi cible 72 heures.

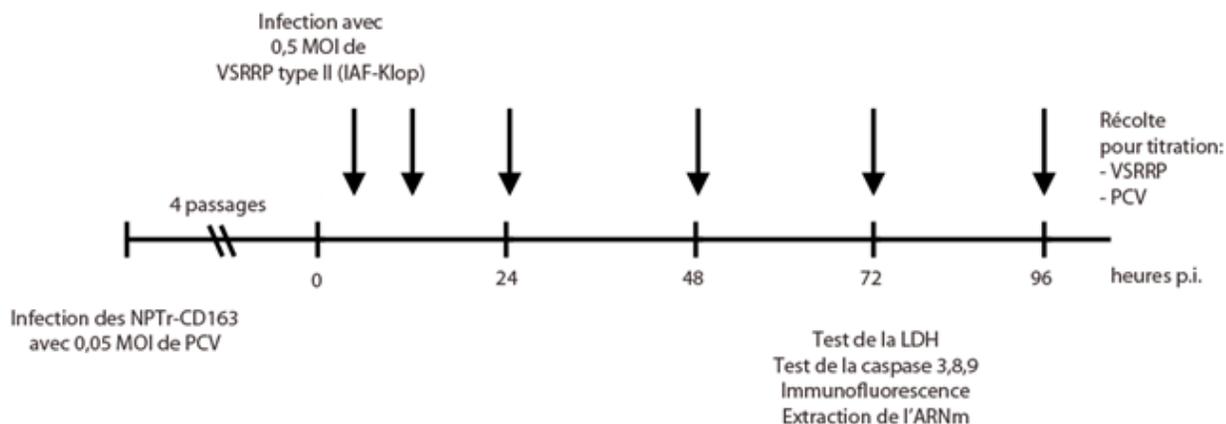


Figure 19. Protocole expérimental utilisé lors de la co-infection PCV-VSRRP.

Les flèches indiquent l'heure à laquelle les échantillons ont été récoltés. L'infection par 0,05 MOI de chacun des génotypes de circovirus a été réalisée 2 semaines auparavant pour obtenir 4 passages cellulaires avant l'infection par 0,5 MOI de VSRRP. Les tests de libération de LDH, de production de caspases et d'expression des cytokines ont été réalisés 72 heures après l'infection par le VSRRP. L'immunofluorescence indirecte a aussi été réalisée sur des échantillons cellulaires 72 heures après l'infection au VSRRP.

Détermination du titre viral

Pour obtenir le titre viral des circovirus, les cellules PK-15A non-infectées au PCV1 ont été déposées dans des plaques de 96 puits (Costar 3595, Corning, NY, États-Unis). Les échantillons à tester ont été dilués en série par un facteur de 10 dans du milieu spécifique pour PK-15, puis ajoutés aux cellules. Après 6 jours d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, le milieu a été retiré et les cellules ont été fixées avec un mélange de d'acétone-méthanol 50-50 à 4°C. Le titre a été obtenu par immunofluorescence. Un puits a été considéré positif si au moins 1 cellule présentait une immunofluorescence spécifique au circovirus (Voir Figures 23 et 25). Le calcul du titre viral a été réalisé par la méthode de Kärber (Payment et Trudel, 1989). La

méthode de Kärber évalue le titre viral par la dose infectieuse médiane (TCID₅₀). La formule est $TCID_{50} = \Delta + \delta (S-0,5)$ où Δ est le log₁₀ de la dilution montrant 100% de mortalité cellulaire, δ est le log₁₀ du facteur de dilution et S est la somme des puits positifs, incluant ceux de la dernière dilution où il y a 100% de cellules positives par immunofluorescence.

Pour obtenir le titre viral du VSRRP, des cellules MARC-145 ont été ensemencées dans une plaque 96 puits (Costar 3595, Corning, NY, États-Unis) puis incubés à 37°C et 5% de CO₂ pour obtenir une confluence. Par la suite, les cellules ont été mises en contact avec 50 µl des échantillons à titrer. La dilution de titrage était de 1/10 dans le premier puits jusqu'à 1/10⁸ dans le dernier. Après une incubation de 6 jours à 37°C et 5% de CO₂, les puits ont été observés au microscope optique pour calculer à partir de l'effet cytopathique du virus le titre viral avec la méthode de Kärber (Payment & Trudel, 1989). Le titre viral est exprimé en dose infectieuse médiane de culture tissulaire par mL de milieu (TCID₅₀/ml).

Test d'immunofluorescence sur les cellules modifiées et infectées.

Pour toutes les immunofluorescences réalisées, les cellules en culture dans des microplaques de 96 puits ont été fixées avec une solution d'acétone-méthanol 50/50 à 4°C pendant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS sans KCl (137mM de NaCl, 10 mM de phosphate de sodium et 1,8 mM de phosphate de potassium à pH 7.2).

Détection de la protéine CD163. Après une incubation avec une solution de blocage (1% de sérum bovin dans du PBS-T pendant 20 min), les cellules ont été incubées dans une dilution 1/200 d'un anticorps anti-pCD163 2A10/11 (AbD Serotec™, Bio-Rad Laboratories Inc, Kidlington, Angleterre) à 37°C pendant 90 min. Par la suite, les cellules ont été lavées trois fois avec une solution contenant 1% de sérum bovin dans du PBS sans KCl, puis ont été incubées avec un anticorps de lapin anti-souris conjugué FITC (MP Biomédical, Solon, OH, États-Unis) dilué à 1 :75 à

37°C pendant 60 min. Finalement, les puits ont été lavés 3 fois avec une solution de PBS.

Détection des antigènes de PCV. Après une incubation avec une solution de blocage (1% de sérum bovin dans du PBS-T pendant 20 min), les cellules ont été incubées dans une dilution 1/200 d'un antisérum polyclonal porcine spécifique pour le PCV2 (Racine et al., 2004) ou d'un antisérum de porc spécifique pour le PCV1 (cette étude) à 37°C pendant 90 min. Par la suite, les cellules ont été lavées trois fois avec une solution contenant 1% de sérum bovin dans du PBS-T, puis ont été incubées avec un anticorps de lapin anti-porc conjugué FITC (MP Biomédical, Solon, OH, États-Unis) dilué à 1 :75 à 37°C pendant 60 min.

Test de co-localisation PCV-VSRRP. Les cellules perméabilisées ont été incubées dans une dilution 1/200 d'un antisérum polyclonal porcine spécifique pour le PCV2 (Racine et al., 2004) ou 1/200 d'un antisérum monospécifique pour PCV1 (cette étude). Pour localiser le VSRRP, un anticorps contre la protéine N du VSRRP, provenant d'un antisérum monospécifique $\alpha 7$ de lapin dilué 1/200 (Provost et al., 2012) a été ajouté à l'anticorps de PCV. Après 3 lavages au PBS, les microplaques ont été incubées dans une dilution de 1/75 d'un anticorps de chèvre anti-porc conjugué à la rhodamine (Jackson ImmunoResearch, PA, États-Unis) pour détecter le PCV et une dilution 1/200 de chèvre anti-lapin conjugué FITC (Invitrogen, GibcoBRL, ON, Canada) pour détecter le VSRRP.

Après trois étapes de lavage, les cellules ont été visualisées à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence DMI 4000B (Leica Microsystems Inc, Richmond Hill, Canada). Les photographies des cellules ont été prises avec un appareil photo numérique DFC 490 et les images ont été prises en utilisant le logiciel Leica Application Suite, version 2.4.0 (Leica Microsystems Inc, Richmond Hill, Canada), puis analysées à l'aide du programme ImageJ (Schneider et al., 2012).

Détermination de la mortalité cellulaire.

La mortalité cellulaire a été évaluée à 72 heures p.i. par le VSRRP par l'étude de la relâche de la lactate déshydrogénase (LDH) grâce aux réactifs de la trousse *CytoTox 96® Non-Radiactive Cytotoxicity Assay* (Promega, Madison, WI, États-Unis). La moitié du milieu extracellulaire, soit 50 µl de surnageant, a été transféré à une nouvelle microplaque de 96 puits à fond plat Maxisorp (Nalge Nunc International, New York, États-Unis). Par la suite, 50 µl du mélange reconstitué de réactifs de la trousse ont été ajoutés à chaque puits. La plaque a été ensuite couverte pour éviter l'exposition à la lumière puis incubée à température pièce pendant 30 minutes. Finalement, 50 µl de la solution d'arrêt est ajouté à chaque puits et la plaque est lue par un lecteur de microplaque à une absorbance de 490 nm (Biotek® Synergy HT plaque reader, Vermont, États-Unis). Pour estimer la relâche maximale possible de LDH, des puits de cellules ont été exposées à 100 µl d'eau distillée puis manuellement décollées avec une micropipette. La quantité maximale de relâche de LDH a été estimée par la somme de (1) la densité optique obtenue dans le milieu de culture des cellules non-infectées après 72 heures et (2) la densité optique obtenue des cellules lysées avec l'eau distillée. Ce résultat sert ainsi de contrôle positif. Le milieu seul a été utilisé pour retirer la densité optique résiduelle normale de tous les échantillons. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité cellulaire. Le calcul est le suivant : $(\text{Absorbance de l'échantillon} - \text{Absorbance résiduelle du milieu}) / (\text{Absorbance maximale du contrôle positif} - \text{Absorbance résiduelle du milieu}) \times 100$.

Détermination de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide de la trousse *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, WI, USA) après 72 heures post-infection. Vingt µl de réactifs de la trousse ont été ajoutés au milieu des cellules dans une plaque de 96 puits. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO₂ puis l'absorbance obtenue a été mesurée à 490 nm (Biotek® Synergy HT plaque reader, Vermont, États-Unis).

Détection des caspases 3, 8 et 9

Les cellules NPTr incubées pendant 4 passages suite à une infection de 0,05 MOI avec les différents génotypes de PCV, puis ont été déposées dans une plaque six puits (2x10⁶) et incubées toute la nuit à 37°C à 5% de CO₂. Les expériences ont été faites sur deux puits différents et répétées 4 fois. Un groupe témoin (NPTr seul, NPTr-PCV1, NPTr-PCV1/2a, NPTr-PCV2a et NPTr-PCV2b) n'a subi qu'un changement de milieu frais. Le deuxième groupe a été infecté avec 0,5 MOI de VSRRP (IAF-Klop). Un troisième groupe a subi une stimulation de l'apoptose par l'ajout d'un mélange de composés pro-apoptotiques contenant 500 ng/ml d'actinomycine D, 50 µg/ml de vinblastine sulfate, 100 µg/ml de cycloheximide et 40 µg/ml de puromycine 2 HCl (Life Technologies, États-Unis). Toutes ces cellules ont ensuite été incubées pendant 72 heures pour les cellules infectées avec les virus et 24 heures pour les cellules traitées avec les inducteurs d'apoptose. Une fois l'incubation terminée, les échantillons ont été lavés avec du PBS 2 fois, puis récupérés en grattant le fond des puits dans 200 µl de tampon de lyse froid (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM DTT, 100 mM EDTA, à un pH de 7,4) et incubés sur glace pendant 5 minutes. Une sonication des cellules a ensuite été faite pendant 10 secondes avec une pulsation à la puissance minimale (Sonifier 450, Branson). Les échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes à 1200g. Le surnageant a été conservé. Pour calculer la concentration de protéines dans les échantillons, le test de Bradford a été utilisé (Quick Strat Bradford Protein assay, Biorad). Les concentrations d'albumine de sérum bovin (BSA) pour la courbe standard variaient de 0 à 1500 µg/ml. Pour quantifier la caspase 3, la caspase 8 ou la caspase 9 dans des puits d'une plaque 96 puits, 50 µg de protéines ont été utilisées pour chaque échantillon. Les protéines ont été diluées dans un tampon de réaction (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1 mM DTT, 100 mM EDTA et 10% glycérol à un pH de 7,4). Une quantité de 5 µl du substrat de la caspase 3 (Ac-DEVD-AFC, Biomol international), du substrat de la caspase 8 (Ac-IETD-AFC) ou du substrat de la caspase 9 (Ac-LEHD-AFC) à une concentration de 2 mM a été ajouté à tous les puits. Pour le témoin négatif, 95 µl de tampon avec 5 µl de substrat a été

utilisé. La plaque a été agitée et la fluorescence a été mesurée dans un lecteur de plaque détectant la fluorescence (excitation 400 nm, émission, 500 nm, Synergy HT, Biotek, Vermont, USA) durant 2 heures.

Évaluation de l'expression des ARNm cytokinaires

Dans le but de quantifier la production de cytokines, une transcriptase inverse suivi d'un PCR quantitatif (PCR en temps réel) a été réalisée sur les cytokines suivantes : IL-2, IL-6, IL-10, IFN α , IFN β , TNF α , et TGF β . 2×10^6 cellules NPTr seules ou infectées en continu (4 à 5 passages) avec PCV1, PCV1/2a, PCV2a ou PCV2b ont été ensemencées dans une plaque de 6 puits (Costar 3615, Corning) puis incubées pendant 24 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Les cellules ont par la suite été infectées avec 0,5 MOI de VSRRP (IAF-Klop) puis incubées pendant 72 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Après cette période, le milieu a été retiré et 200 μ L de solution Trizol® a été ajouté. Le lysat cellulaire a ensuite été gratté et récolté pour réaliser une extraction d'ARN total en suivant le protocole du fabricant (Invitrogen™, New Mexico, États-Unis). La concentration de l'ARN récolté a été déterminée par spectrophotométrie NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, IL, États-Unis). Une réaction de transcriptase inverse a été réalisée avec la trousse Quantitech Rev. Transcription kit (Qiagen™, Missisauga, ON, Canada) selon les directives du fabricant de manière à créer une banque d'ADNc. Finalement, une réaction de PCR quantitatif par la technique de SyBr-Green a été montée à partir du mélanges de réactifs SsoFast EvaGreen Supermic® (Bio-Rad, Missisauga, ON, Canada). Les amorces qui ont été utilisées sont décrites dans le tableau VI. Le gène rapporteur qui a été utilisé pour ajuster les ratios obtenus par qPCR ($\Delta\Delta$ Ct) est la microglobuline B2 de porc (*Sus scrofa*), ssB2M. Le calcul de l'expression relative des ARNm cytokinaires est le suivant : $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (CYTOKINE_{échantillon}-B2M_{échantillon}) - Δ Ct (CYTOKINE_{contrôle}-B2M_{contrôle}). La valeur obtenue représente le nombre de cycles de PCR quantitatif qui différencie l'échantillon du contrôle et doit être converti avec la formule suivante : $2^{(-\Delta\Delta$ Ct)}. Les calculs ont été réalisés avec le programme CFX Manager™ Software version 3.0 (Bio-Rad, Missisauga, ON, Canada).

Tableau VI. Description des amorces utilisées pour évaluer l'expression des ARNm cytokinaires.

| Gène | Genbank # référence | Taille de l'amplicon | Sequence F 5'→3' | Séquence R 5'→3' |
|---------------|---------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|
| IL1a | NM_214029 | 152 bp | TGAAGATGGCCAAAGTCCCTGACCT | ATCCATGCCGTCCCCAGGAAGTG |
| IL6 | NM_214399 | 105 bp | ACTCCCTCTCCACAAGCGCCTT | TGGCATCTTCTTCCAGGCGTCCC |
| IL8 | NW_003300390 | 80 bp | TGTGAGGCTGCAGTTCTGGCAAG | GGGTGGAAGGTGTGAATGCGT |
| IL10 | NM_214041 | 112 bp | GCTGCGGCGCTGTCATCAATT | ACCCATGGCTTTGTAGACACCCC |
| TNF- α | NM_214022 | 112 bp | GCCACCACGCTCTTCTGCCTA | ACGATGATCTGAGTCCTTGGGCCA |
| IFN- α | NM_001164860 | 142 pb | CTGAATGCCATCTACTCTC | GGAATCCAAAGTCCCTTCTG |
| IFN- β | NM_001003923.1 | 146 bp | CTCTCCTGATGTGTTTCTCC | GTTTCATCCTATCTTCGAGGC |
| TGF- β | AF461808.1 | 125 pb | GATACCAACTACTGCTTCAGCTCC | CAGAAATTGGCATGGTAGCCCTTG |
| B2M | NM_213978 | 103 bp | CGTGGCCTTGGTCTGCTCG | TCCGTTTTCCGCTGGGTGGC |

Évaluation de l'expression du TNF α par ELISA

De manière à confirmer les résultats obtenus par la méthode de RT-qPCR, un ELISA a été réalisé à partir du milieu extracellulaire des cellules NPT α -CD163 infectées dans une plaque de 6 puits (décrit ci-haut). Une microplaque 96 puits à fond plat, MaxiSorp (Nalge Nunc International, New York, États-Unis) a été utilisée. Les deux anticorps utilisés ont été dilués dans du PBS 0,02M. Pour commencer, 100 μ L de la dilution 2 μ g/mL d'anticorps primaire anti-pTNF- α monoclonal (R&D Systems, Minneapolis, États-Unis) ont été déposés dans chaque puits, puis la plaque a été incubée pendant 16 heures à 4°C. La plaque a ensuite été rincée avec une solution de PBS-Tween (21,5% PBS 0,02M, 0,05% Tween 20 et 0,15M NaCl) trois fois. Pour bloquer les sites laissés vacants dans les puits, 300 μ L de PBS contenant 1% de BSA (albumine de sérum bovin) ont été déposés dans chaque puits et la plaque a été incubée 2 heures

à température pièce. La plaque a été rincée avec du PBS-tween 3 fois. La microplaque a été séparée en fonction des échantillons (100 µL du milieu extracellulaire des échantillons) en duplicata et de l'échelle formée de différentes concentrations de la protéine recombinante rpTNF-α (protéine recombinante porcine du TNF-α). Cette échelle a été réalisée à partir de 7 dilutions en série 1/2 de la protéine recombinante rpTNF-α de porc ce qui donne des concentrations de 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78 et 0 µg/µL. La plaque a ensuite été incubée 2 heures à température pièce puis lavée 3 fois avec du PBS-Tween. Dans chaque puits, 100 µL d'anticorps secondaire couplé à la biotine (100µg/mL) (R&D Systems, Minneapolis, États-Unis) ont été ajoutés. La plaque a encore une fois été incubée 2 heures à température pièce, puis a été rincée avec du PBS-Tween 3 fois. Pour visualiser la présence de biotine, 100 µL de peroxydase conjuguée à la streptavidine (2 µg/mL) a été ajoutée (Jackson Immunoresearch Laboratories, Pennsylvanie, États-Unis). La plaque a été incubée pendant 1 heure, au noir, à température pièce. La révélation a été faite avec 100 µL de TMB (Tetramethyle benzidine) Single Solution (Invitrogen, Californie, États-Unis). Finalement, la réaction a été arrêtée après la visualisation d'une coloration bleue, puis arrêtée en ajoutant 50 µL de H₂SO₄ par puit. La lecture de la densité optique a été réalisée avec un spectrophotomètre à 450 nm.

Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism version 5.03c (San Diego, CA, États-Unis). En premier lieu, un test de chi-carré à 1 degré de liberté ($\alpha=0,05$, test bilatéral) a été réalisé pour analyser si le pourcentage de cellules double positives (PCV/VSRRP) était lié au hasard (H_0) dans l'analyse de la co-localisation des virus. Les résultats statistiquement représentatifs ont été identifiés grâce à des astérisques (***) $P<0,001$, ** $P<0.01$, * $P<0,05$) dans le cas des analyses de cinétiques de la réplication virale ou en lettres ($P<0.05$) dans le cas de l'analyse des ARNm cytokinaires en RT-qPCR. Tous les tests réalisés sont des tests T de Student sur des données comparées individuellement. L'usage du test ANOVA (une voie, non paramétrique) biaise l'interprétation des résultats lorsque l'on étudie la cinétique

virale. Si l'on prend le test ANOVA, qui est l'analyse de la variance de la moyenne entre les deux groupes, le test échoue à différencier statistiquement la différence entre les titres viraux des deux groupes à un temps donné, puisqu'il ne peut différencier statistiquement que les valeurs qui se situent bien au-delà de la variance de la moyenne des deux groupes. Si l'on fait abstraction de la variable de temps, pour comparer les deux groupes à un temps donné (avec un T de Student), on peut alors détecter des différences statistiques. L'interprétation des résultats doit toutefois tenir compte de ce choix d'analyse statistique. Un test ANOVA avec comparaison de chaque colonne (Comparaison multiples de Tukey) a été réalisé dans l'analyse statistique de l'expression de l'ARNm des cytokines.

IV. RÉSULTATS

1. Expression de la protéine CD163 dans la lignée cellulaire NPTr

1.1 Caractérisation de la lignée NPTr et modification génétique

Après avoir identifié dans la littérature les trois récepteurs cellulaires les plus importants pour la réplication du VSRRP, une analyse de la présence de ces récepteurs dans la lignée de cellule NPTr a été effectuée. Une extraction de l'ARN total des cellules NPTr, suivie d'une transcriptase inverse et d'un PCR a permis d'évaluer la présence de l'ARNm des récepteurs CD151, CD163 et CD169 (sialoadhésine) (Figure 20a).

En premier lieu, le RT-PCR avec les amorces spécifiques pour le gène CD151 qui a été réalisé sur les cellules NPTr révèle une bande de taille identique à celle retrouvée dans les PAMs primaires (Figure 20). Cet amplicon a été séquencé et s'est révélé être 100% identique avec la séquence de CD151 de porc (*Sus scrofa*) qui avait déjà été rapportée (Genbank NM001243865). En second lieu, l'analyse réalisée à partir d'amorces spécifiques pour le gène de la sialoadhésine (CD169) révèle que les cellules NPTr présentent une forme tronquée de l'ARNm de la sialoadhésine (CD169). En effet, après deux séquençages (Plateforme de séquençage, Université de Laval, Québec, Canada), les résultats obtenus étaient identiques entre eux, et la séquence résultante a été comparée aux séquences publiées de la sialoadhésine (GenBank™, NIH, États-Unis). Une étude des exons de la sialoadhésine, réalisée par extrapolation de la séquence complémentaire de l'ARNm complet de la sialoadhésine (Siglec-1, AF09585) sur le chromosome 17 du porc (NM214346), a montré que l'ARNm retrouvé dans les NPTr résulte vraisemblablement d'un épissage alternatif ou d'un gène muté, puisque cet ARNm n'est formé que de l'exon 2, de la dernière moitié de l'exon 19, de l'exon 20 et de l'exon 21 (Figure 21). Cela explique pourquoi, à la Figure 20b, les amorces utilisées dans la détection du CD169 ne montrent aucun signal dans les cellules NPTr. En effet, l'amorce CD196*detect*-F (directe) se situe au niveau de l'exon 18 alors que l'amorce CD169*detect*-R (inverse) se situe au niveau de l'exon 20. Finalement, un PCR réalisé sur la banque d'ADNc au moyen

d'amorces spécifiques pour le CD163, ainsi que des amorces de détection *CD163detect*, montre que les NPTr ne produisent pas d'ARNm complet de CD163 (Figure 20).

Puisque aucun signal n'était présent pour le gène complet du CD163 (Figure 20), nous avons décidé que celui-ci serait notre première cible pour rendre les cellules permissives à la réplication du VSRRP. Néanmoins, des travaux en parallèle pour les deux autres gènes ont également été effectués (données non présentées). Pour chacun des récepteurs, un plasmide rétroviral a été assigné. Ces plasmides divergent quant à leur site de clonage et leur gène de résistance aux antibiotiques (sélection). Pour isoler la séquence codante de chacun des gènes, des macrophages alvéolaires porcins (PAMs) ont été récoltés des poumons d'un porcelet. Une banque d'ADNc a été faite sur l'ensemble de l'ARN extrait de ces cellules. Un PCR avec des amorces spécifiques à nos trois gènes d'intérêt (CD169, CD163 et CD151) a été réalisé.

Toutefois, alors que l'on ne s'attendait à retrouver qu'une seule bande lors de la migration sur gel d'agarose, les amorces pour le gène CD163 en a présenté deux (Annexe- Figure 35). Suite au séquençage, il a pu être déterminé que la bande avec la taille la plus grande, à 3,2 kb, représente le gène complet, alors que celle de plus petit poids moléculaire est une forme tronquée. Celle-ci était pourtant systématiquement retrouvée après plusieurs tentatives. Le résultat du séquençage de cette deuxième bande correspond aux 1100 premières paires de bases de l'ARNm du CD163. Cette version tronquée n'a pas été sélectionnée pour ces travaux et son implication dans les cellules PAMs n'a pas été investiguée. La bande à 3,2 kb a été isolée par la technique de purification sur gel, digérée avec des enzymes de restriction, puis intégrée dans le plasmide pLNCX2. L'intégrité du gène recombinant a encore une fois été vérifiée par séquençage. Finalement, le gène CD151 a été intégré avec succès dans le plasmide pLNPX et conservé pour des travaux ultérieurs.

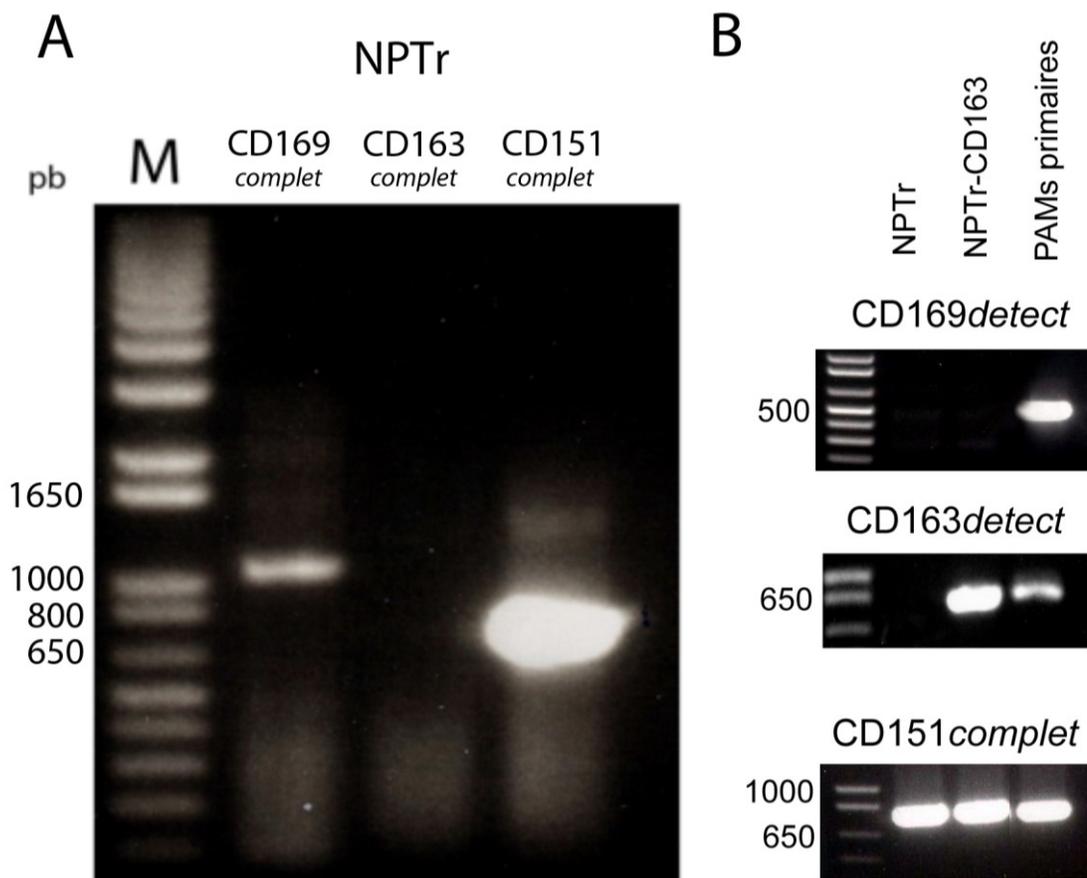


Figure 20. Détection des gènes CD169, CD163 et CD151 dans les cellules NPTr non-modifiées et les cellules modifiées génétiquement avec le gène du CD163 (NPTr-CD163).

Le marqueur utilisé est un Kb + (Invitrogen, États-Unis). **(A)** Résultats du gel d'agarose obtenu par la migration du produit du RT-PCR réalisé avec les amorces utilisées dans le clonage du gène (séquence complète). Le CD169 présente une bande à environ 1100 pb. L'ARNm du gène CD163 n'a pas été détecté par RT-PCR. Le CD151 est présent avec une bande à 750 pb. **(B)** Résultats obtenus avec les amorces de détection pour CD169 et CD163 et les amorces complètes de CD151 avec le contrôle positif (PAMs primaires) et les cellules NPTr-CD163 transformées. Il n'y a pas de détection de l'ARNm du gène CD169 dans les cellules NPTr puisque les amorces choisies se situent sur l'exon 18 (amorce directe) et l'exon 20 (amorce indirecte) (Figure 21).

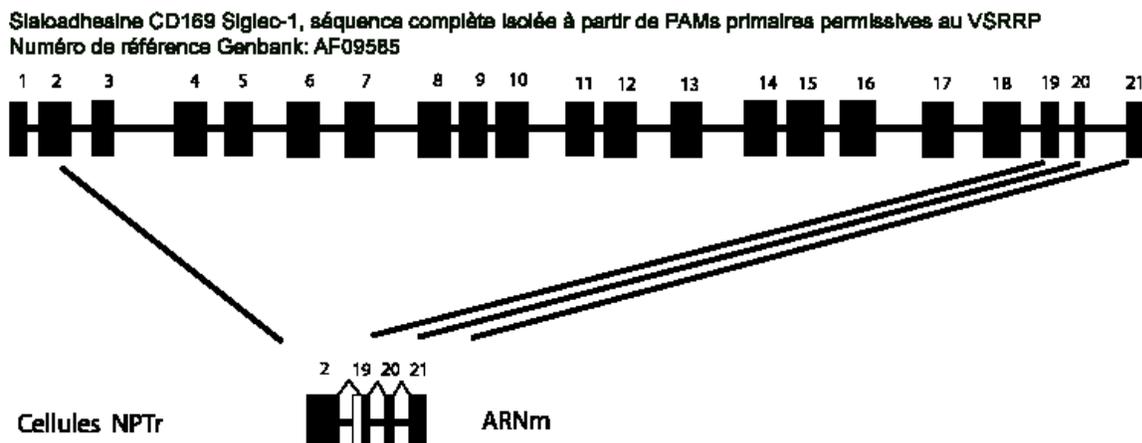


Figure 21. Illustration de l'épissage alternatif ou d'un gène tronqué du CD169 retrouvé dans les cellules NPTr.

Analyse par séquençage du produit de 1100 pb retrouvé par RT-PCR sur des NPTr avec les amorces du CD169. Les carrés noirs représentent les exons répertoriés de la séquence de sialoadhésine après alignement de l'ARNm complet (AF09585) dans le chromosome 17 du porc (*Sus scrofa* chromosome 17, NM214346). **(Haut)** séquence d'ADNc réalisé à partir de l'ARNm du CD169 (AF09585, Sialoadhésine siglec-1; *Sus scrofa*) **(Bas)** Résultat du séquençage sur la bande de taille 1100 pb : les exons 2, la dernière moitié de l'exon 19 et les derniers exons 20 et 21 ont été retrouvés dans l'ordre.

L'ADNc de la séquence d'ARNm du CD163 a été intégré à un site de clonage possédant un promoteur ubiquitaire, le promoteur du cytomégalovirus (CMV), ce qui permet une transcription efficace et constante dans des cellules de mammifères. Une première transfection des cellules NPTr a été réalisée pour s'assurer de la production efficace de la protéine avant de procéder à l'intégration génomique du gène CD163. Ces cellules transformées par électroporation avec le plasmide pLNCX2-CD163 ont présenté une production efficace de la protéine CD163 lorsque observées par immunofluorescence indirecte (résultats non présentés). Il a donc été possible de procéder à la transformation des cellules NPTr par la technique du rétrovirus (Retro-X System®, Clontech).

Pour s'assurer de l'intégration du gène et de sa transcription dans les cellules NPTr-CD163, un RT-PCR a d'abord été réalisé sur les clones de cellules

sélectionnées. La figure 20b présente le résultat de PCR d'un clone qui a été choisi pour la suite des expériences. Comparativement au RT-PCR de la figure 20a, les amorces utilisées ici détectent une séquence de 400 pb qui se situe au début de la séquence complète de CD163, ce qui facilite sa détection par RT-PCR. Cette figure montre que l'ARNm de CD163 peut être détecté comparativement aux cellules non modifiées (NPTr). Les macrophages alvéolaires porcins primaires (PAMs) ont été utilisés comme témoin positif, puisqu'ils sont la source de la séquence de CD163 qui a été isolée. Une immunofluorescence indirecte a ensuite été réalisée pour s'assurer de l'expression de la protéine CD163 dans le clone cellulaire sélectionné (Figure 22).

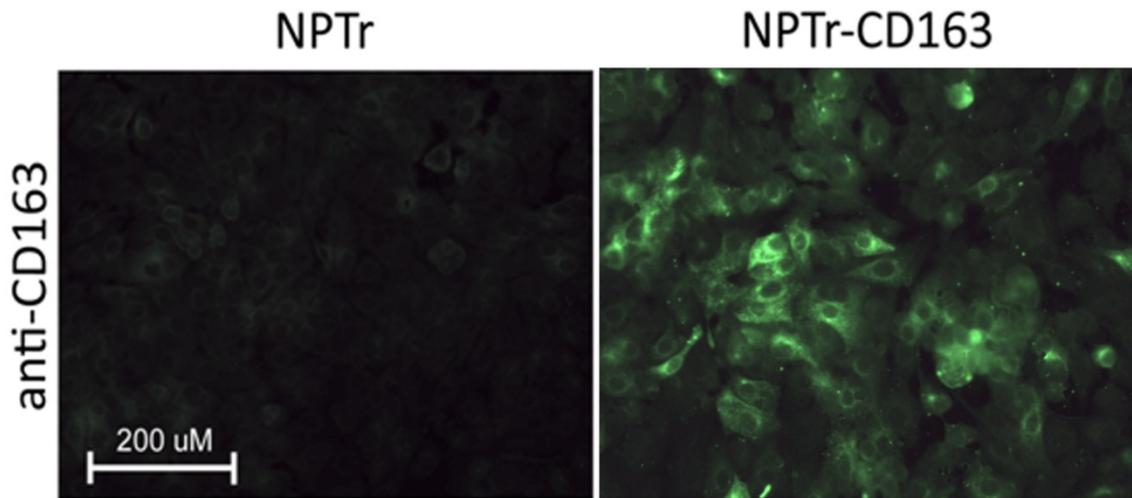


Figure 22. Détection de la protéine CD163 par immunofluorescence dans les cellules génétiquement modifiées NPTr-CD163.

Des cellules NPTr ont subi deux rondes d'infection avec un rétrovirus contenant la séquence codante de CD163. Les cellules ont ensuite été sélectionnées à la néomycine (gène de résistance Neo^R) puis clonées. Les cellules ont ensuite été passées dans un milieu non sélectif pour deux passages. Finalement, une sous-population de NPTr-CD163 a été sélectionnée après avoir isolé une cellule par puits de microplaque d'une population hétérogène. La présence de CD163 a été évaluée au moyen d'un anticorps anti-CD163, 2A10/11, puis complété avec un anticorps anti-souris couplé à la FITC (droite). Les cellules NPTr non-modifiées ne présentent pas la protéine (gauche) alors que les cellules NPTr-CD163, qui découlent de la sous-population sélectionnée, présentent un fort taux d'expression (à droite).

1.2 Confirmation de la réplication du VSRRP et du PCV par immunofluorescence dans les cellules NPTr-CD163

Pour confirmer que le clone sélectionné de NPTr-CD163 est demeuré permissif au circovirus porcin, les cellules clonées ont été infectées avec 0,05 MOI de PCV1, PCV1/2a, PCV2a ou PCV2b puis maintenues en continu pendant 4 passages (2 semaines) de manière à amplifier la réplication du virus qui est normalement faible au premier passage (Music, 2008). La figure 23 montre les résultats de l'infection par le circovirus porcin (PCV) par immunofluorescence. L'anticorps primaire utilisé pour détecter les antigènes du PCV1 provient d'un sérum d'un porc infecté au PCV1, alors que pour détecter les antigènes de PCV1/2a, PCV2a et PCV2b, il s'agit d'un sérum porcin qui cible le PCV2. Ces résultats montrent que les cellules NPTr-CD163 sont bien infectées par tous les génotypes de PCV. La permissivité des cellules NPTr-CD163 au VSRRP a aussi été déterminée par immunofluorescence. Des cellules non-modifiées (NPTr) et des cellules modifiées avec le CD163 ont été infectées avec 1,0 MOI de VSRRP pendant 72 heures. L'immunofluorescence a été réalisée avec des anticorps polyclonaux contre le VSRRP. La figure 24 montre que les cellules NPTr non-modifiées ne sont pas infectées par le virus, alors que les cellules NPTr-CD163 sont infectées à un taux important. Ces résultats donnent une première appréciation qualitative intéressante de l'infection par les deux virus, ce qui a permis de procéder à la suite des expériences.

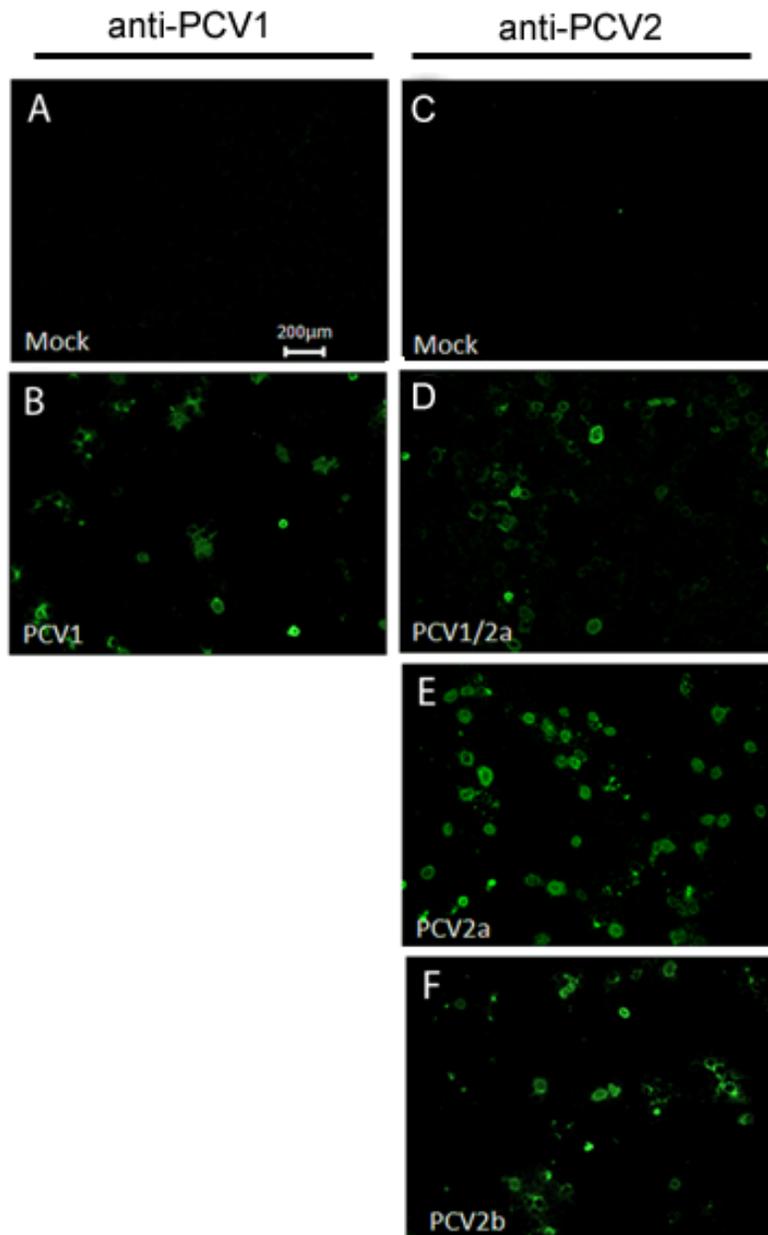


Figure 23. Détection des antigènes du PCV dans les cellules NPTTr-CD163.

Les témoins (A et C) sont des cellules NPTTr-CD163 qui n'ont pas été infectées avec un circovirus et qui ont subi les mêmes étapes lors de l'immunofluorescence. Les NPTTr-CD163 ont été infectées avec 0,05 MOI de (B) PCV1, (D) PCV1/2a, (E) PCV2a ou (F) PCV2b et ont été incubées et passées 4 fois (2 semaines). Grossissement 400 X.

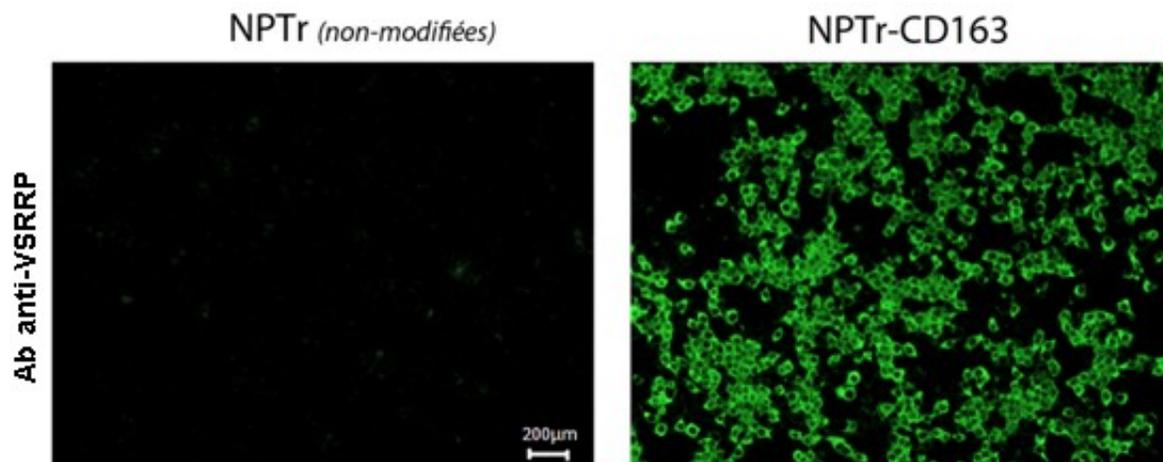


Figure 24. Détection des antigènes du VSRRP dans les cellules NPTr-CD163 par immunofluorescence.

Les cellules non-modifiées (**gauche**) sont comparées aux cellules modifiées (**droite**) qui permettent l'entrée et l'expression des antigènes du VSRRP de type II (IAF KLOP). Les cellules ont été infectées avec 1,0 MOI de VSRRP (IAF-KLOP) pendant 72 heures à 37°C. Grossissement 100X.

1.3 Confirmation de la co-localisation des deux virus dans la même cellule

De manière à observer la proximité des virus dans le modèle de co-infection, une immunofluorescence ciblée contre les antigènes des virus VSRRP et PCV a été réalisée pour chaque génotype de PCV. Un anticorps polyclonal contre le circovirus porcin (anti-PCV1 ou anti-PCV2) a été utilisé. Par contre, un anticorps monoclonal contre la protéine N du VSRRP a remplacé l'anticorps polyclonal de porc de manière à utiliser un anticorps secondaire de nature différente (anticorps primaire de lapin). L'usage d'un anticorps monoclonal a aussi permis de réduire le bruit de fond de ces images. La MOI initiale de VSRRP dans cette expérience est plus faible (0,5 MOI) que celle utilisée dans l'immunofluorescence précédente (1 MOI) et ce MOI a été utilisé pour toutes les expériences subséquentes (Figure 24).

Un compte cellulaire montre qu'environ 20% des cellules NPT_r-CD163 sont infectées avec le VSRRP après 72 heures. Il n'y a pas de différence statistique entre les groupes lorsque l'on considère le taux d'infection par le VSRRP, le PCV ou le pourcentage de co-localisation des virus par analyse des variances (ANOVA une voie, non paramétrique, sur chacune des conditions; $P > 0,05$), ce qui signifie que le pourcentage d'infection individuelle (VSRRP ou PCV) et le pourcentage de co-localisation des deux virus ne varient pas selon le génotype du circovirus qui est étudié après 72 heures d'infection. D'autre part, il est possible de noter que le taux de cellules doublement positives dépasse les probabilités d'une rencontre aléatoire pour chaque génotype de circovirus lorsqu'un test de chi-carré paramétrique est réalisé (H_0 d'égalité des fréquences est rejeté à $P < 0,01$ avec 1 degré de liberté), ce qui tend à signifier que la co-localisation des deux virus dans une même cellule n'est pas due à une rencontre aléatoire. Toutefois, l'analyse statistique est biaisée par le fait qu'il ne s'agit que d'une seule expérience ($N=1$) répétée plusieurs fois ($n=7$), et d'autres expériences sont nécessaires pour réellement conclure que la co-localisation des virus n'est pas aléatoire. Toutefois, lorsque l'on considère ces images comme un outil d'interprétation, on peut considérer que leur objectif a été atteint, soit de démontrer

que les cellules NPT_r-CD163 peuvent être co-infectées avec le PCV et le VSRRP.

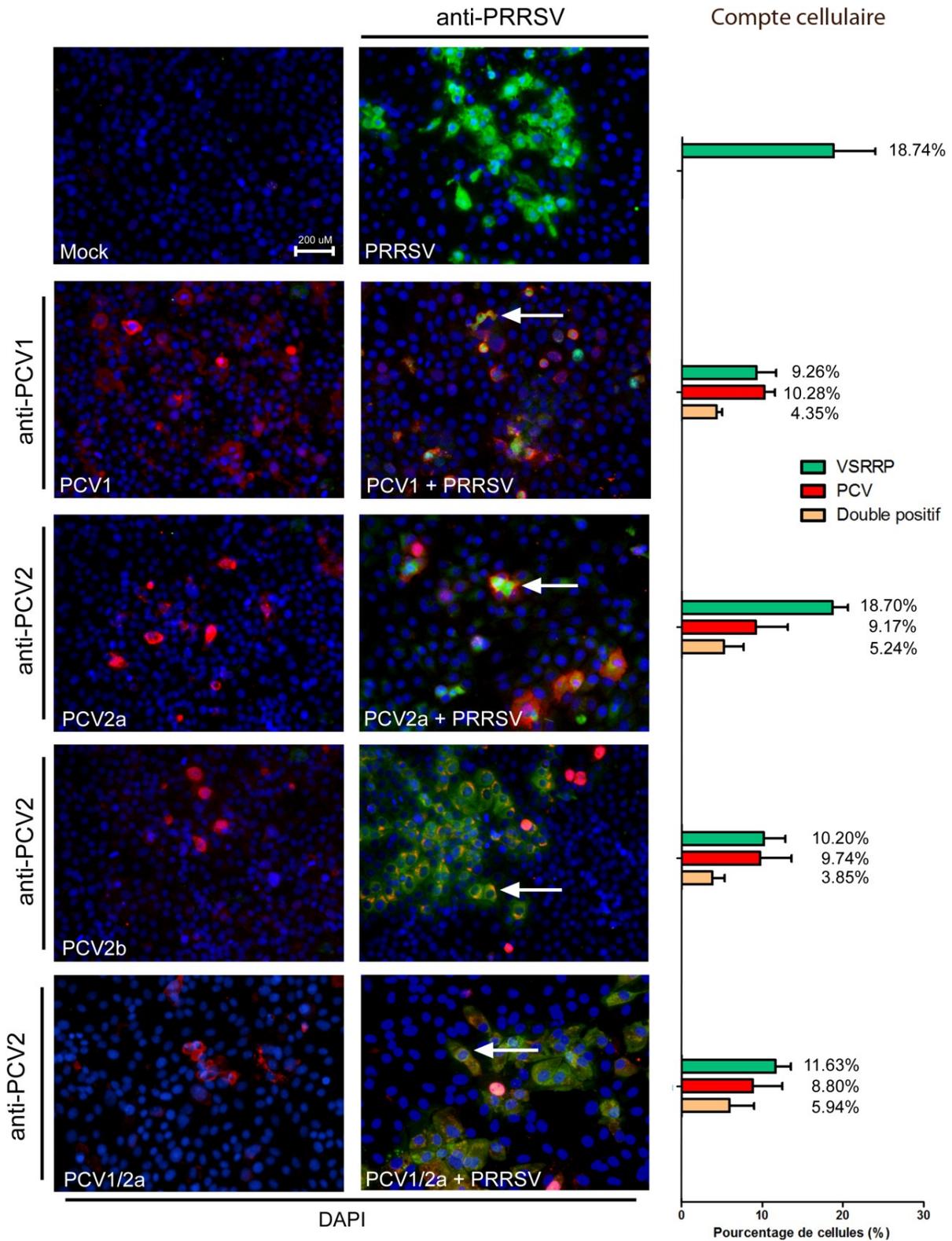


Figure 25. Détection par immunofluorescence des antigènes du VSRRP et du PCV dans les cellules NPTr-CD163 infectées.

VSRRP (FITC vert) et PCV (Rhodamine rouge). **(Gauche- immunofluorescence)** Les cellules NPTr-C163 ont été infectées avec 0,05 MOI de PCV et visualisées après 4 passages cellulaires. Au 4^{ième} passage, les cellules ont ensuite été infectées avec 0,5 MOI de VSRRP et fixées 72 heures post-infection. Grossissement 100X. **(Droite)** Compte cellulaire obtenu par le décompte du nombre de cellules positives à l'infection par le VSRRP (vert), le PCV (rouge) et par les deux virus (jaune) lors de l'immunofluorescence indirecte. (n=7)

2. Étude de la cinétique de répllication des virus PCV et VSRRP lors de co-infections

2.1 Cinétique de répllication du PCV en présence du VSRRP

Pour étudier l'effet du VSRRP sur la répllication du circovirus porcin, des cellules NPTTr-CD163 ont été infectées avec 0,05 MOI de PCV, puis multipliées pendant 4 passages pour obtenir un titre de PCV au temps 0 supérieur à 10^4 TCID₅₀/mL. Tous les titres de PCV ont été évalués par la méthode de titration virale et calculés par la méthode de calcul de Kärber. Au temps 0, les cellules NPTTr-CD163 ont été infectées avec 0,05 MOI de VSRRP. Les titres des quatre génotypes de circovirus au début de l'expérience ne sont pas significativement différents entre eux ($P>0,05$). Le PCV1 présente au temps 0 un titre infectieux de $10^{4,41\pm 0,38}$, le PCV1/2a de $10^{3,81\pm 0,47}$, le PCV2a de $10^{3,94\pm 0,32}$ et le PCV2b de $10^{4,08\pm 0,629}$ TCID₅₀/ml (Figure 26).

En évaluant la cinétique de répllication du PCV1 en présence de VSRRP, on remarque qu'il y a une diminution significative du compte de virions infectieux de PCV1 dans le milieu à 72 et 96 heures post-infection ($P<0,01$; N=4). Le titre de PCV1 atteint $10^{4,83\pm 0,14}$ TCID₅₀/mL à la fin des 96 heures, alors qu'en co-infection il diminue à $10^{3,81\pm 0,239}$ TCID₅₀/mL, ce qui signifie qu'il y a 10 fois moins de virions infectieux après une co-infection avec le VSRRP que lorsque le virus est seul dans des cellules NPTTr-CD163. Par contre, la cinétique de répllication du PCV1/2a et du PCV2a n'a pas été affectée par la présence du VSRRP (Figure 26b et 26c). Finalement, en observant la cinétique de répllication du PCV2b (Figure 26d), on constate une augmentation significative de la présence de virions infectieux de PCV2b à partir de 48 heures post-infection et qui s'étend jusqu'à 96 heures en présence de VSRRP ($P<0,01$). Le titre de PCV2b sans le VSRRP est de $10^{4,41\pm 0,289}$ TCID₅₀/mL à 96 heures, alors qu'il est de $10^{5,92\pm 0,382}$ TCID₅₀/mL en co-infection. Il y a 3200% (32 fois) plus de virions infectieux de PCV2b lorsque les cellules sont co-infectées avec le VSRRP. Des cinétiques de répllication du circovirus ont aussi été réalisées avec une infection de VSRRP à 1,0 MOI, avec des résultats similaires (Figure 36-Annexe).

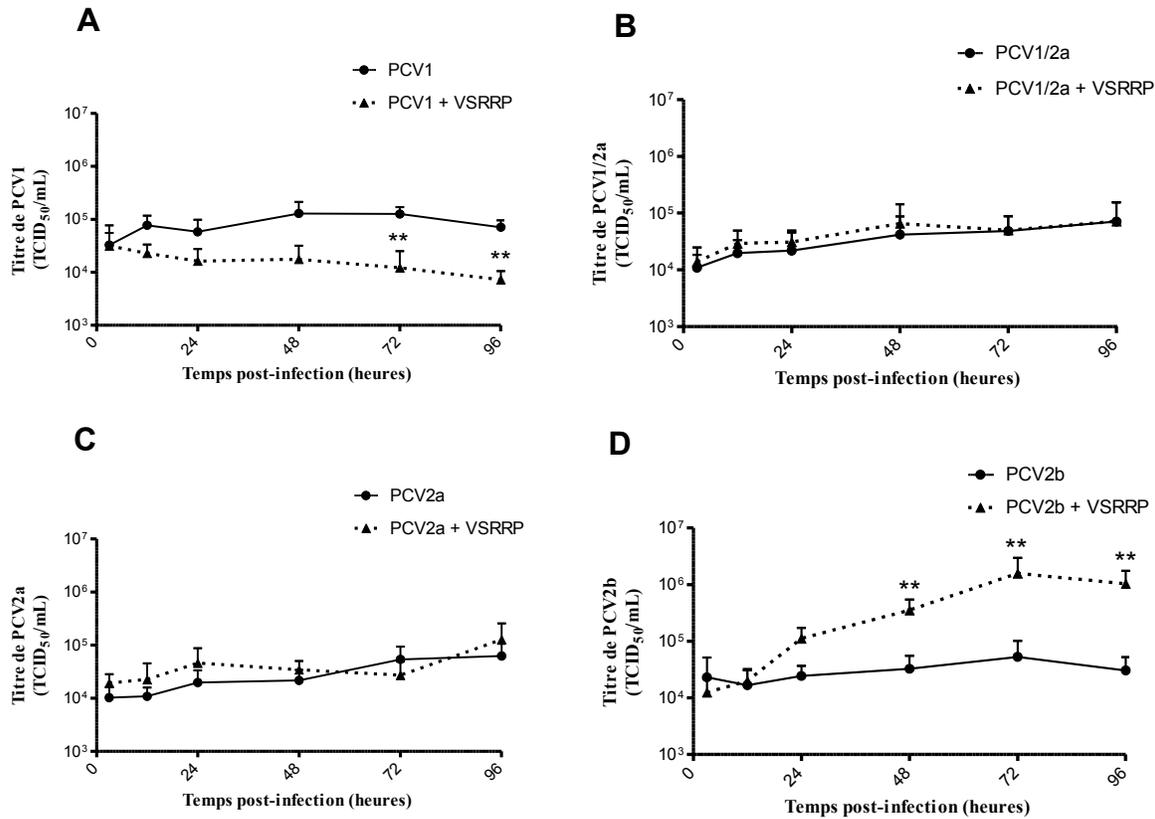


Figure 26. Cinétique de la réplication virale du circovirus porcine en présence du VSRRP.

Les cellules NPTr-CD163 ont été infectées avec 0,05 MOI de (A) PCV1, (B) PCV1/2a, (C) PCV2a ou (D) PCV2b et incubées pour 4 passages cellulaires. Les cellules ont été infectées avec 0,5 MOI de VSRRP (IAF-KLOP) pendant 3 hrs, puis le milieu de culture a été changé (temps 3). À différents temps p.i. à partir du changement de milieu, la quantité de PCV qui se trouve dans les puits (milieu + lysat cellulaire) a été déterminée par un titrage sur cellules PK-15 infectés pendant 6 jours et visualisé par immunofluorescence. N=4 pour tous les génotypes de PCV, barres d'écart-types (SD) sont illustrées. L'analyse statistique réalisée est un t de Student pour tous les groupes indépendants (par heure d'infection) pour tous les génotypes. **P<0,01.

2.2 Cinétique de la réplication virale du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP) lors d'une co-infection avec le PCV.

Après avoir observé les résultats sur la réplication virale du PCV, les mêmes échantillons ont été utilisés parallèlement pour étudier l'effet de la co-infection sur la réplication du VSRRP. Le titre viral du VSRRP, obtenu avec des MARC-145, reflète la présence de virions infectieux (TCID₅₀/ml). Les cellules ont été préalablement infectées avec 0,5 MOI de VSRRP pendant 3 heures avant de remplacer le milieu au temps 3. La figure 27 illustre les résultats obtenus. Les titres de VSRRP à la fin des expériences sont de $10^{4,42 \pm 0,95}$ TCID₅₀/mL pour les cellules NPTr-CD163 infectées seulement avec le VSRRP, de $10^{4,6 \pm 0,56}$ TCID₅₀/mL pour les cellules co-infectées avec le PCV1 (Figure 27a), de $10^{3,50 \pm 0,95}$ TCID₅₀/mL pour les cellules co-infectées avec le PCV1/2a (Figure 27b), de $10^{1,08 \pm 1,70}$ TCID₅₀/mL pour les cellules co-infectées avec le PCV2a (Figure 27c) et de $10^{1,04 \pm 1,61}$ TCID₅₀/mL pour les cellules co-infectées avec le PCV2b (Figure 27d). Il n'y a pas de différence significative entre le titre de VSRRP dans les cellules témoins (NPTr-CD163) et les cellules co-infectées avec le PCV1 ou le PCV1/2a à la fin de l'expérience ($P > 0,05$; $N=4$). Les cellules co-infectées PCV2a-VSRRP présentent une diminution significative d'environ 100 fois le titre viral de VSRRP ($P < 0,01$) à 96 heures par rapport au contrôle. De la même manière, les cellules co-infectées PCV2b-VSRRP présentent une diminution du titre de virions infectieux du VSRRP à partir de 72 heures p.i. ($P < 0,01$) et atteignant 244 fois ($10^{2,38}$) moins de virions de VSRRP à 96 heures p.i.

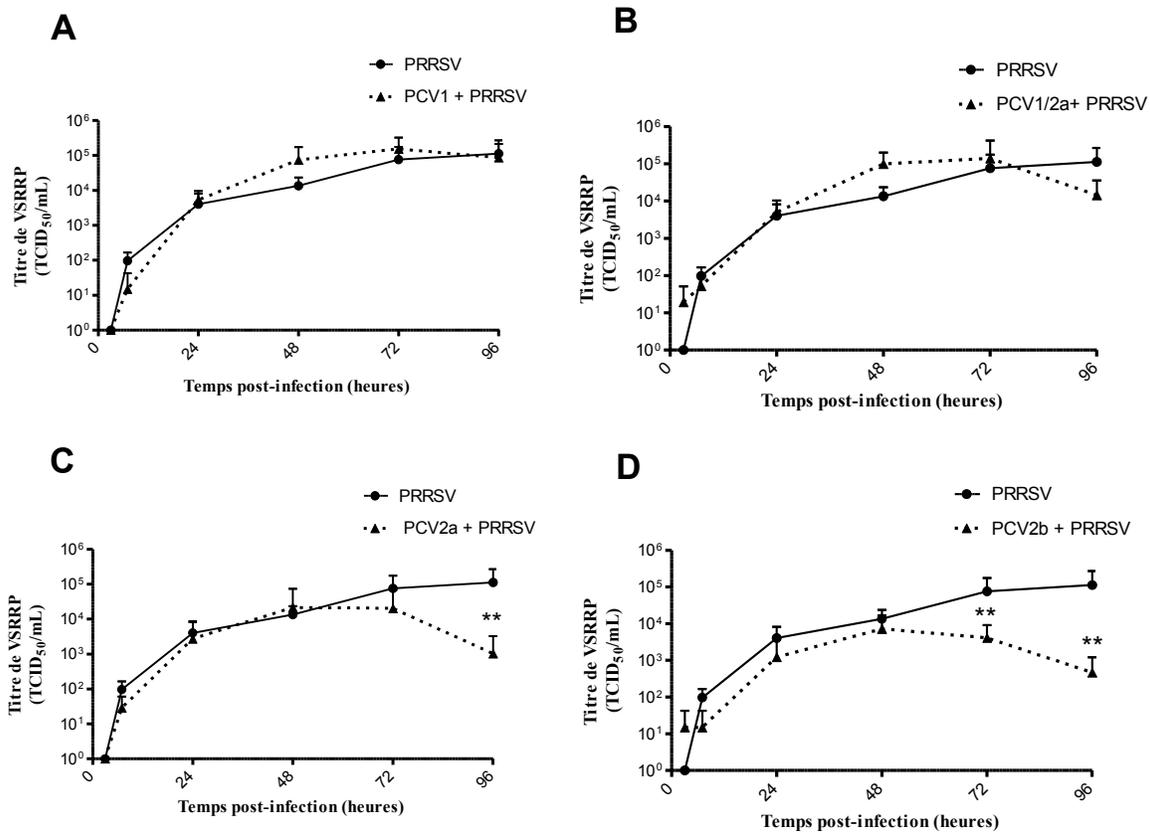


Figure 27. Cinétique de réplication virale du VSRRP lors d'une co-infection avec le PCV.

Les cellules NPTr-CD163 ont été infectées avec 0,05 MOI de PCV1 **(A)**, PCV1/2a **(B)**, PCV2a **(C)** et PCV2b **(D)** et conservées sur 4 passages cellulaires. Les cellules infectées au PCV ont été infectées avec 0,5 MOI de VSRRP, incubées 3 heures, puis le milieu a été changé (temps 3). Le titre viral de VSRRP dans le milieu de culture a été déterminé à différents temps après l'infection. N=4 pour tous les échantillons. Analyse statistique : t de Student pour comparer chaque groupe individuellement à chaque heure p.i., **P<0,01.

3. Évaluation de la mortalité cellulaire lors d'une co-infection PCV-VSRRP

Pour s'assurer que les cinétiques de réplication virales obtenues ne soient pas dues à l'effet des virus sur la mortalité cellulaire, un test de détection par le dosage de la lactate deshydrogénase (LDH) a été réalisé. La LDH, une enzyme normalement présente à l'intérieur des cellules, se retrouve dans le milieu extra-cellulaire lorsqu'il y a perte de l'intégrité membranaire. Les résultats sont exprimés en niveau de cytotoxicité (%), déterminé à partir d'un calcul sur la présence relative de LDH ayant pour référence des cellules artificiellement lysées (témoin positif=100%).

En premier lieu, la figure 28 montre que les cellules infectées avec le VSRRP augmentent significativement la relâche de LDH ($25,66 \pm 5,04\%$) par rapport aux cellules non infectées ($18,32 \pm 3,49\%$) ($P < 0,05$), mais cette augmentation est faible comparativement à l'effet du circovirus porcin. En effet, lorsque les cellules NPTr-C163 sont infectées avec le circovirus porcin, quel que soit le génotype, il est possible d'observer une augmentation significative de la LDH extra-cellulaire ($P < 0,01$) comparativement aux cellules non-infectées ou infectées seulement avec le VSRRP (Figure 28). D'autre part, il n'y a pas de différence significative de la relâche de LDH lorsque l'on compare les cellules infectées avec le PCV1 ($52,74 \pm 16,21\%$), le PCV1/2a ($54,74 \pm 18,91\%$), le PCV2a ($54,09 \pm 11,30\%$) ou le PCV2b ($44,35 \pm 7,39\%$). Finalement, il n'y a pas de différence significative dans la relâche de LDH lorsque les cellules sont co-infectées VSRRP-PCV et ce pour tous les génotypes de PCV. Ces résultats indiquent que la perte de l'intégrité cellulaire, bien qu'elle augmente significativement par l'infection au circovirus porcin, ne varie pas entre les modèles de co-infections PCV-VSRRP et n'offre pas un élément de réponse aux résultats de cinétiques virales qui ont été obtenus.

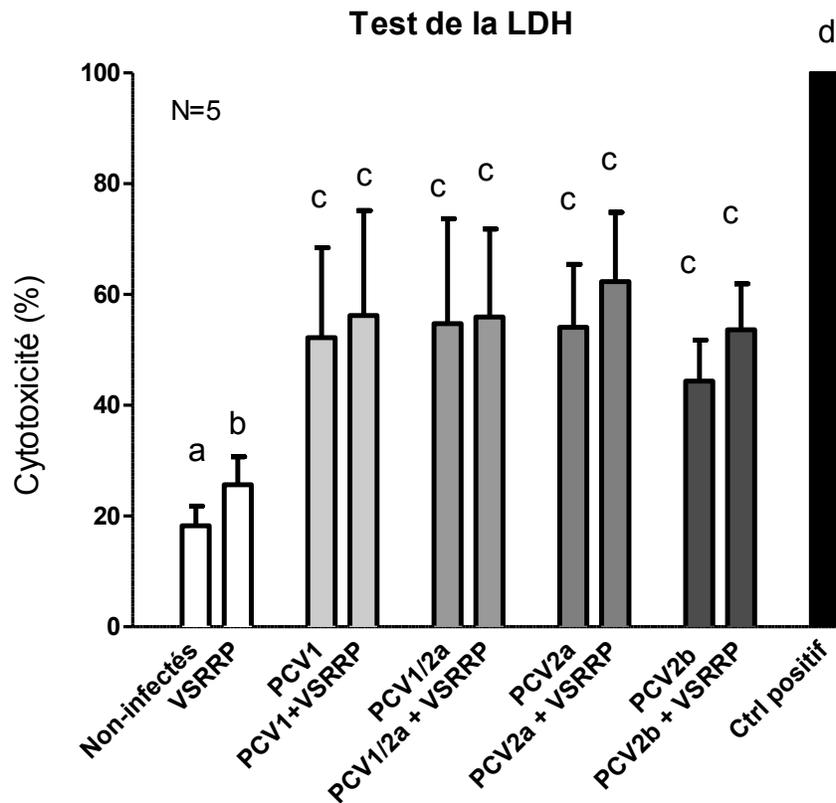


Figure 28. Détection relative de la LDH extra-cellulaire lors de la co-infection VSRRP-PCV.

Représentation graphique de la détection de LDH dans le milieu extracellulaire après une infection de 72 heures au VSRRP. Les données sont exprimées en pourcentage de LDH par rapport au témoin positif (100%). Les barres d'erreur sont présentées en écart-type. Les lettres (a,b,c et d) sont statistiquement différentes entre elles ($P < 0,05$). Le test a été réalisé 5 fois ($N=5$) en triplicata.

4. Induction de la cascade de l'apoptose lors d'une co-infection PCV-VSRRP dans les cellules NPT_r

Puisque la détection de la LDH extra-cellulaire est un test général de l'intégrité de la paroi cellulaire, elle ne permet pas de distinguer la nécrose de l'apoptose. La littérature fait mention de l'effet pro-apoptotique des génotypes de PCV2 sur les cellules PK-15 infectées (Lin et al. 2011). C'est pourquoi il était intéressant d'étudier l'activité des caspases dans notre modèle. La voie commune de l'apoptose entraîne l'activation de la caspase 3, ce qui en fait un test de détection général. Les voies extrinsèques (caspase 8) et intrinsèques (caspase 9) ont aussi été investiguées. Pour évaluer l'activité de ces caspases, un test de leur activité enzymatique a été réalisé 72 heures après le début de l'infection par la VSRRP.

La figure 29 présente les résultats obtenus. Les résultats sont exprimés en expression relative de la caspase comparativement aux cellules non-infectées (non-infectés=1). La figure 29 illustre que la présence de VSRRP induit une production légèrement plus élevée de caspase 3 ($1,23 \pm 0,18$; $P < 0,05$) lorsqu'il infecte les cellules NPT_r-CD163 comparativement aux cellules non infectées.

L'infection des cellules NPT_r-CD163 par le PCV1 cause aussi une augmentation de la caspase 3 ($1,91 \pm 0,79$; $P < 0,05$), mais cette augmentation n'est pas significativement plus élevée que lors d'une infection par le VSRRP seul ou lors d'une co-infection PCV1-VSRRP ($1,66 \pm 0,11$) ($P > 0,1$). La détection de la caspase 3 dans des cellules infectées par le PCV1/2a ($1,58 \pm 0,92$) ne se distingue pas statistiquement des cellules infectées avec le PCV1 ou des cellules non infectées ($P > 0,1$).

Les cellules infectées par le PCV2a ($3,99 \pm 1,54$) présentent un plus haut taux de caspase 3 que les cellules infectées avec le PCV1 ($1,58 \pm 0,92$; $P = 0,03$), mais la grande variabilité obtenue dans les expériences ne permet pas de les différencier statistiquement des cellules infectées par le PCV2b ($2,25 \pm 0,76$; $P = 0,06$). Finalement, lorsque l'on compare chacun des modèles de co-infection par génotype de circovirus, comme par exemple les cellules infectées seulement avec le PCV1 avec celles

infectées au PCV1 et au VSRRP, il n'est pas possible de distinguer statistiquement la production de caspase 3 entre les deux populations cellulaires ($P>0,1$).

En résumé, 1) l'infection au PCV, quel que soit le génotype, provoque une augmentation significative de la caspase 3, mais la grande variabilité limite les distinctions entre les groupes, 2) Le groupe infecté par le PCV2a se distingue statistiquement des groupes infectés par la PCV1 et le PCV1/2a, mais pas le PCV2b, 3) la présence d'une co-infection au VSRRP ne fait pas varier autrement la production de caspase 3.

Dans l'étude des voies extrinsèques (caspase 8) et intrinsèques (caspase 9) de l'induction de l'apoptose (Figure 30), il est impossible de différencier les modèles de co-infection du groupe non-infecté ($P<0,1$). Toutefois, le nombre de répétitions (N=4) pour ces expériences limite la puissance de l'observation.

Ces données permettent d'affirmer que l'apoptose n'est pas un mécanisme impliqué dans les résultats de cinétiques obtenus pour chacun des modèles.

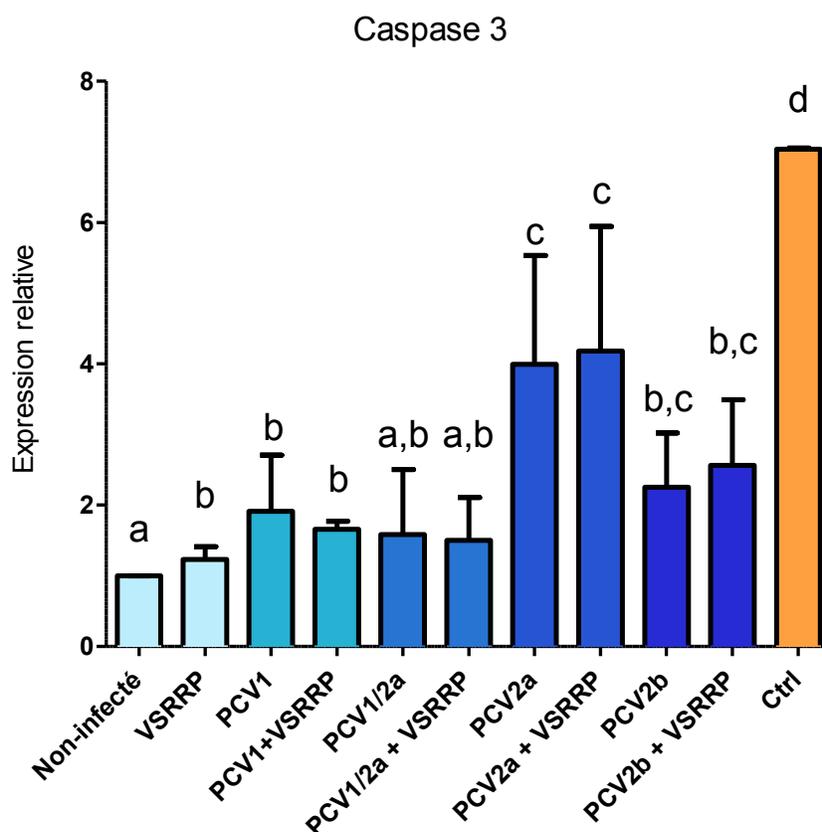


Figure 29. Expression relative de l'activité de la caspase 3 dans les cellules NPT-CD163 lors d'une co-infection PCV-VSRRP.

Les cellules ont été infectées sur une période de 72 heures avec 0,5 MOI de VSRRP et/ou une infection persistante de PCV. Les données sont exprimées en expression relative de la fluorescence par rapport aux cellules non-infectées (non-infectées = 1). Le témoin positif (ctrl) représente la détection de la caspase 3 dans des cellules non infectées exposées à un mélange de molécules pro-apoptotiques. Les lettres (a,b,c et d) représentent un effet significatif entre elles ($P < 0,05$). Lorsque plusieurs lettres sont attribuées à une valeur, cela signifie qu'elle ne peut être différenciée statistiquement des autres valeurs possédant la même lettre. Le test a été réalisé 5 fois (N=5) en duplicata.

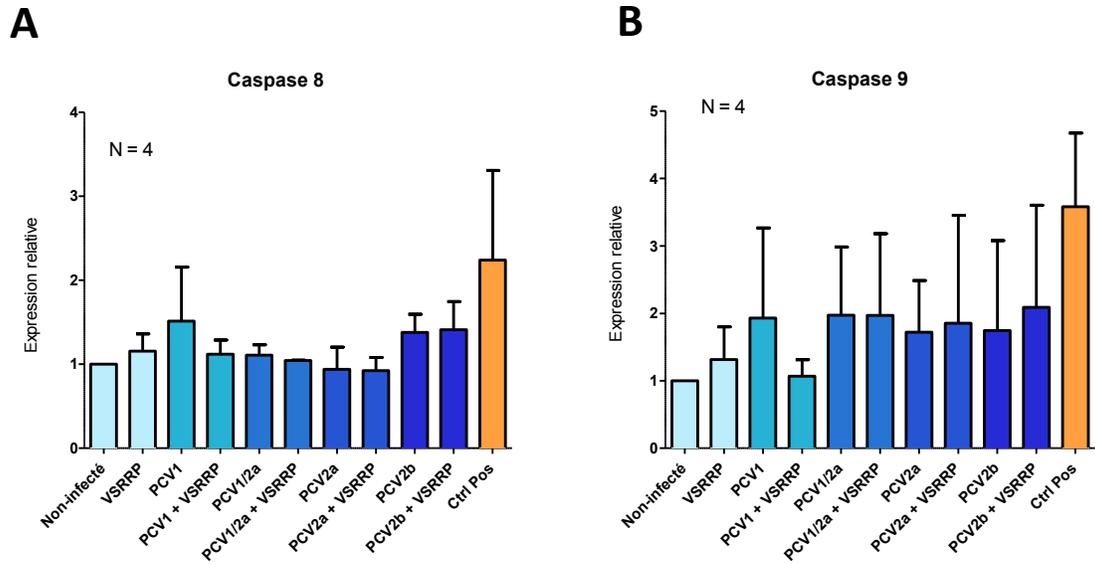


Figure 30. Expression relative de l'activité des caspases 8 (A) et 9 (B) lors d'une co-infection PCV-VSRRP.

Les cellules ont été infectées sur une période de 72 heures avec 0,5 MOI de VSRRP et/ou une infection persistante de PCV. Les données sont exprimées en expression relative de la fluorescence détectée par rapport aux cellules non-infectées (non-infectées = 1). Test réalisé 4 fois (N=4) en duplicata. Barres d'erreur exprimées en écart-type. Aucune différence statistique n'a été décelée ($P > 0,1$).

5. Modulation de l'expression des ARNm des cytokines lors d'une co-infection PCV-VSRRP

5.1 Cytokines pro-inflammatoires

Puisqu'il a été montré que les deux virus (PCV et VSRRP) possédaient la capacité de moduler la réponse immunitaire innée, l'expression de différentes cytokines a été étudiée lors d'une co-infection. Un test d'ELISA s'est révélé infructueux après quatre tentatives (N=4) où il n'a pas été possible de détecter l'expression du TNF- α supérieur au seuil de détection (78 ug/ul) (*Données non présentées*). L'usage du RT-qPCR a toutefois permis d'observer des variations dans la transcription génique de différentes cytokines. Les valeurs sont exprimées en quantité relative d'ARNm du contrôle (cellules non-infectées) par rapport à l'échantillon. L'ARNm de tous les échantillons a été préalablement ajusté pour la quantité de matériel au départ de la réaction grâce au gène de contrôle β 2-microglobuline (calcul décrit dans matériel et méthodes). La figure 31 révèle que la présence de VSRRP provoque une augmentation de l'ARNm du TNF- α ($14,44 \pm 2,75$; $P < 0,01$) par rapport aux cellules non infectées (1,00). L'effet de la présence du VSRRP sur la production d'ARNm de TNF α est aussi observé dans les modèles de co-infection PCV1-VSRRP ($14,68 \pm 3,67$; $P < 0,01$) et PCV2a-VSRRP ($8,80 \pm 1,87$, $P < 0,01$). Toutefois, cet effet s'exprime comme une tendance non significative dans le modèle PCV2b-VSRRP ($3,73 \pm 1,09$, $P = 0,0563$) et n'est pas significatif dans le modèle PCV1/2a-VSRRP ($4,77 \pm 1,55$, $P = 0,20$) lorsqu'on les compare aux cellules non infectées ou infectées seulement avec le PCV. De plus, une infection individuelle avec les différents génotypes de PCV ne cause pas une augmentation significative de l'ARNm de TNF- α par rapport aux cellules non-infectées ($P > 0,1$). Ces résultats illustrent qu'une infection par le VSRRP cause une augmentation de l'ARNm codant pour le TNF- α , mais cette augmentation n'est pas significativement différente parmi les génotypes de PCV ($P > 0,1$) et le niveau du TNF- α demeure sous le seuil de détection par ELISA.

D'un autre côté, l'expression de l'IL-1 α (Figure 31) montre encore une fois que la présence du VSRRP augmente la transcription intracellulaire de cette cytokine

($2,73 \pm 0,88$; $P < 0,05$), mais cette augmentation n'a pas été observée dans les modèles de co-infection. Finalement, les résultats obtenus avec les amorces spécifiques pour l'IL-6 (Figure 31) montrent que cette cytokine n'augmente pas significativement en présence du VSRRP, mais qu'elle est significativement plus élevée en présence du circovirus, pour tous les génotypes. Ces résultats montrent que la nature de la réponse inflammatoire varie selon le virus qui infecte les NPT_r, soit une augmentation de l'IL-1 α et du TNF α pour le VSRRP et une augmentation de l'IL-6 pour le circovirus. De plus, il n'y a pas de différence entre les modèles de co-infection.

Cytokines pro-inflammatoires

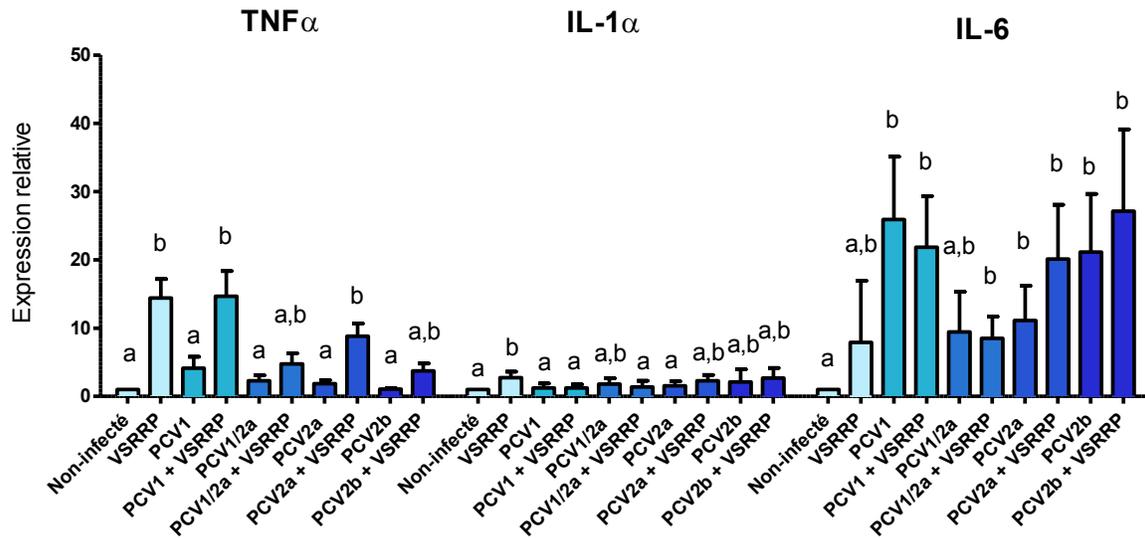


Figure 31. Expression de l'ARNm codant pour l'IL-1 α (N=6), l'IL-6 (N=5) et le TNF- α (N=6) lors d'une co-infection PCV-VSRRP.

Ces représentations graphiques représentent le $\Delta\Delta C_t$, soit l'expression relative à la quantité d'ADNc (B2-microglobuline) en relation avec l'expression relative au contrôle négatif (cellules non-infectées) 72 heures p.i. au VSRRP. Barre d'erreur en écart-type. Les lettres (a et b) représentent une différence statistique entre les groupes ($P < 0,05$), mais ne peuvent pas être comparées entre les groupes (TNF α vs IL-1 α vs IL-6). ANOVA avec comparaison multiple de Tukey.

5.2 Cytokines de la réponse anti-virale

Pour étudier l'influence de la réponse immunitaire innée spécifique à une infection virale, la quantité relative de l'ARNm codant pour l'IFN α et de l'IFN β a été évaluée.

L'étude de l'expression de l'ARNm de l'IFN α (Figure 32) illustre les résultats obtenus en PCR quantitatif. L'infection par le VSRRP ne cause pas une augmentation de l'ARNm de l'IFN α dans les cellules NPTr-CD163 ($1,03 \pm 0,60$; $P=0,98$). Par contre, les cellules co-infectées PCV2b-VSRRP présentent un niveau d'expression plus faible de l'ARNm de l'IFN α ($0,29 \pm 0,16$) par rapport aux cellules non infectées ($P < 0,01$), infectées seulement avec le VSRRP ($P=0,02$) ou infectées par le PCV2b ($P=0,03$). Ces résultats montrent que l'expression de l'ARNm de l'IFN α est influencée par une co-infection PCV2b-VSRRP dans les cellules NPTr-CD163, 72 heures après l'introduction du VSRRP, mais celle-ci demeure très faible.

L'expression d'une autre cytokine anti-virale, l'IFN β , a été étudiée (Figure 32). En premier lieu, il est possible d'observer que l'infection par le VSRRP provoque une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de l'IFN β par rapport aux cellules non infectées ($2,52 \pm 1,18$; $P < 0,05$). Il en est de même dans le modèle de co-infection PCV1-VSRRP ($4,11 \pm 2,81$; $P < 0,01$). Par contre, l'infection par le VSRRP seul ne se distingue pas statistiquement du modèle de co-infection avec le PCV1-VSRRP ($P=0,28$).

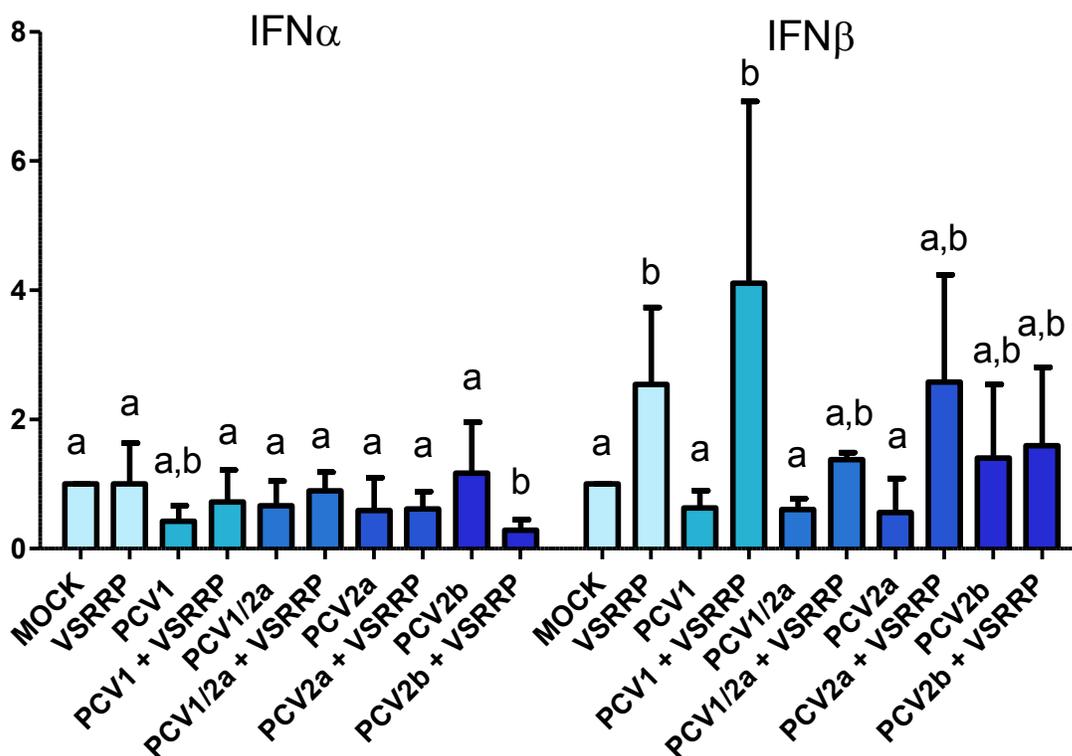


Figure 32. Expression de l'ARNm codant pour l'IFN- α et l'IFN- β . (N=6) lors d'une co-infection PCV-VSRRP.

La représentation graphique représente le $\Delta\Delta C_t$, soit l'expression relative à la quantité d'ARNm (B2-microglobuline) en relation avec l'expression relative au contrôle négatif (cellules non-infectées) 72 heures p.i. au VSRRP. Barres d'erreur en écart-type. Les lettres (a et b) représentent une différence statistique entre les groupes ($P < 0,05$), mais ne peuvent pas être comparées entre les groupes (IFN α \neq IFN β). ANOVA avec comparaison multiples de Tukey.

5.3 Expression d'autres cytokines d'intérêt dans le modèle de co-infection PCV-VSRRP.

Puisque le VSRRP est connu pour influencer l'expression de l'IL-10, du TGF- β et, indirectement, de l'IL-8 dans les modèles cellulaires courants, l'expression de l'ARNm de ces cytokines a été évaluée dans les cellules NPTr-CD163 co-infectées.

En premier lieu, l'expression de l'ARNm du TGF- β n'a pas présenté de variation dans notre modèle cellulaire et ce, même lorsque les cellules sont co-infectées PCV-VSRRP (Figure 33). De plus, les différents modèles de co-infection ne font pas varier la production d'ARNm de TGF- β ($P>0,1$). Par contre, lorsque l'on étudie l'ARNm de l'IL-10, on remarque que l'infection par la VSRRP cause une augmentation significative ($8,00\pm 5,55$; $P=0,02$) de l'ARNm d'IL-10 comparativement aux cellules non-infectées. Une autre augmentation statistiquement significative de l'IL-10 est observée lorsque les cellules sont infectées seulement avec le PCV1 ($30,71\pm 23,42$; $P=0,02$). Les grands écarts-types obtenus illustrent de la grande variabilité qui a été obtenue entre les expériences. D'autre part, l'expression de l'IL-10 ne se distingue pas dans les cellules infectées par le PCV1/2a, le PCV2a et le PCV2b ou dans les cellules co-infectées avec le VSRRP.

Finalement, lorsqu'on étudie la présence d'ARNm de l'IL-8 (Figure 34), il est possible d'observer que seul le modèle de co-infection PCV1-VSRRP ($119,80\pm 70,00$; $P=0,04$) présente une augmentation significative de l'ARNm par rapport aux cellules non-infectées, mais que cette différence ne se distingue pas statistiquement des cellules infectées seulement avec le PCV1, PCV1/2a, pCV2a et PCV2b ($P>0,1$). Toutefois, il n'est pas encore possible de conclure en l'absence d'un effet entre certains de ces groupes étant donné la grande variabilité obtenue entre les expériences (voir les écart-types). De plus, l'infection par le VSRRP seul ne provoque pas une augmentation de l'ARNm de IL-8 dans les cellules NPTr-CD163 ($P=0,17$). Ces résultats illustrent l'action du VSRRP dans l'induction de l'ARNm de cytokines liées à l'immunotolérance tels que l'IL-10, mais montre son incapacité à induire l'expression de TGF- β et d'IL-8 dans les cellules NPTr-CD163.

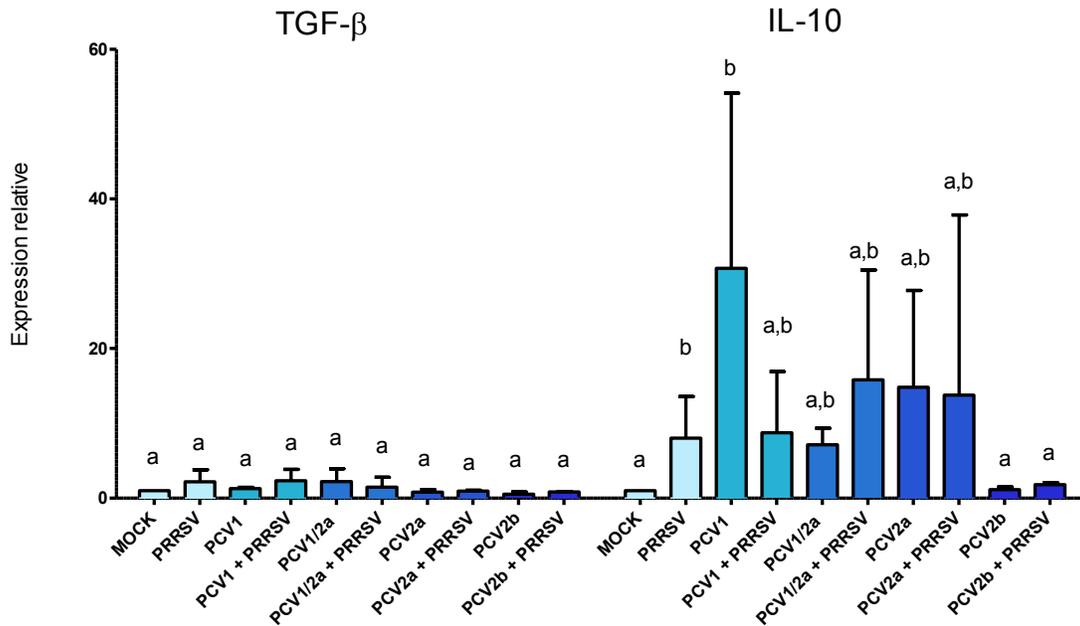


Figure 33. Expression de l'ARNm codant pour le TGF-β et l'IL-10 (N=3) lors d'une co-infection PCV-VSRRP.

Les représentations graphiques représentent le $\Delta\Delta Ct$, soit l'expression relative à la quantité d'ARNm (B2-microglobuline) en relation avec l'expression relative au contrôle négatif (cellules non-infectées) 72 heures p.i. au VSRRP. Barres d'erreur en écart-type. Les lettres (a et b) représentent une différence statistique entre les groupes ($P < 0,05$), mais ne peuvent pas être comparées entre les groupes. ANOVA avec comparaison multiples de Tukey.

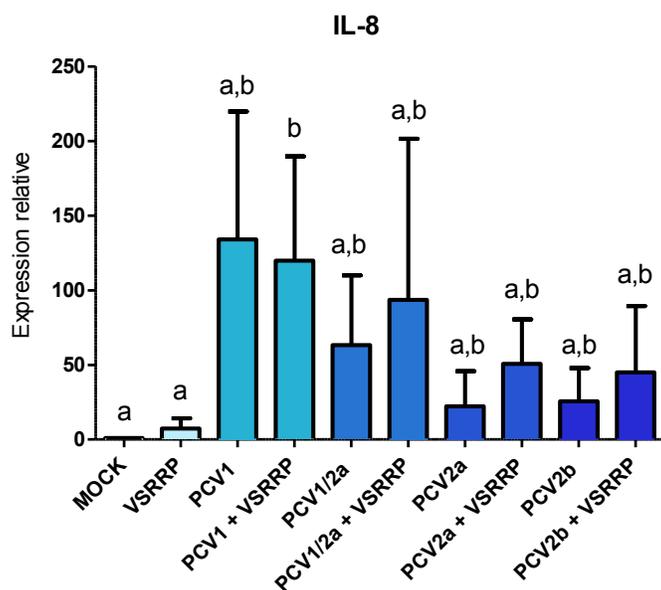


Figure 34. Expression de l'ARNm codant pour l'IL-8 (N=3) lors d'une co-infection PCV-VSRRP.

La représentation graphique représente le $\Delta\Delta Ct$, soit l'expression relative à la quantité d'ADNc (B2-microglobuline) en relation avec l'expression relative au contrôle négatif (cellules non-infectées) 72 heures p.i. au VSRRP. Barres d'erreur en écart-type. Les lettres (a et b) sont significativement différentes entre elles ($P < 0,05$), mais ne peuvent pas être comparées entre les groupes. ANOVA avec comparaison multiples de Tukey.

V. DISCUSSION

Le besoin de développer un nouveau modèle cellulaire pour l'étude d'une co-infection avec le PCV et le VSRRP est apparu après de nombreuses preuves de leur proximité sur le terrain. Les effets synergiques entre ces deux virus ont été décrits en conditions expérimentales *in vivo* (Opriessnig et al., 2012; Rovira et al., 2002) et *ex vivo* (Cecere et al., 2012; Sinha et al., 2012; Tsai et al., 2012). Les porcs co-infectés PCV2/VSRRP y présentaient des signes cliniques plus sévères, des titres viraux plus importants et une mortalité plus élevée comparativement aux porcs infectés seulement avec le PCV2 ou le VSRRP. Des études faisant le lien entre le niveau de la virémie du PCV2 et la sévérité des signes cliniques (Gagnon et al., 2008; Rovira et al., 2002) ont mené à l'hypothèse que le VSRRP exacerbait les signes cliniques du PCV2 en facilitant sa réplication (Opriessnig et Halbur, 2012). Différentes tentatives pour répliquer ces effets synergiques sur la réplication virale dans un modèle cellulaire ont été entreprises avec des résultats variables (Sinha et al., 2012; Tsai et al., 2012). L'absence d'un modèle cellulaire de porc permettant la réplication efficace des deux virus affecte grandement l'interprétation des résultats parus jusqu'à maintenant. L'objectif de ce projet était donc de développer un modèle cellulaire porcin immortel pour étudier l'interaction entre le PCV et VSRRP qui s'approche le plus possible de la réalité. Cette étude a su répondre à cet objectif tout en ouvrant la porte à des phénomènes de la réplication virale encore inconnus. À notre connaissance, il s'agit du premier rapport montrant une interaction entre les virus PCV et VSRRP dans des cellules du système respiratoire porcin.

Les cellules NPTr permettent l'entrée et la réplication efficace du circovirus porcin (Music, 2008). La première partie du projet consistait à modifier génétiquement la lignée NPTr pour qu'elle devienne permissive au VSRRP, et ce, de manière stable. Cela signifie que l'intégration du gène devait être maintenue au fil des passages cellulaires. C'est pourquoi la technique d'intégration génétique par le rétrovirus a été choisie. Le rétrovirus qui a été utilisé perd sa capacité infectieuse après son entrée dans la cellule cible. Il a permis d'intégrer le gène directement dans le génome cellulaire, avec en amont de la région codante un promoteur ubiquitaire (le promoteur du cytomégalovirus).

Les récepteurs cellulaires du VSRRP sont principalement le CD163, le CD169 (Sialoadhésine) et le CD151. La caractérisation des cellules NPTr nous a permis de déterminer qu'elles expriment le CD151, mais pas le CD163, ni la forme complète de l'ARNm de CD169 (Figure 20). Pour isoler l'ARNm complet des gènes CD163 et CD169, des macrophages alvéolaires porcins (PAMs) ont été isolés de poumons de porcs. L'ADN complémentaire du CD163 a été amplifié et séquencé à cette étape. Par contre, le CD169, dont l'ARNm est long de 5,2 kb s'est avéré beaucoup plus difficile à obtenir. Les premiers PAMs qui ont été utilisés ne présentaient pas la forme de 5,2 kb, mais plutôt une forme tronquée de l'ARNm à 1,6 kb. En isolant des PAMs d'un porc provenant d'une autre ferme, la forme complète a été identifiée, mais elle demeurait accompagnée d'une forme tronquée de 1,6 Kb (Annexe, Figure 35). Cette découverte pourrait signifier qu'il existe une différence génétique dans la population porcine, ou que le CD169 subit un épissage alternatif qui donne deux isoformes potentiellement exprimées dans les macrophages alvéolaires. Malheureusement, l'intégration du gène de 5,2 kb dans le plasmide rétroviral a échoué, et ce, même en utilisant une technique qui consiste à sectionner avec des endonucléases le gène en deux parties pour faire une amplification dans un plasmide intermédiaire et ensuite le rassembler par ligation dans le plasmide final (Vanderheijden et al., 2003). Étant donné que seule la CD163 n'avait pas été détectée dans les cellules NPTr, nos efforts ont été concentrés sur ce gène. Par ailleurs, plusieurs publications mentionnaient que l'intégration du CD163 était suffisant pour rendre permissives des cellules épithéliales au VSRRP (Calvert et al., 2007; Provost et al., 2012; Wang et al., 2011; Welch et Calvert, 2010). La sélection de clones a ensuite permis de choisir les cellules qui expriment le plus la protéine CD163 et de développer une lignée cellulaire immortalisée permissive au VSRRP. Cette technique est maintenant privilégiée lorsque l'on doit modifier génétiquement les lignées cellulaires (Lee et al., 2010). Ce premier succès a été confirmé par immunofluorescence, alors que les cellules présentaient des antigènes du VSRRP après 72 heures (Figure 24). De plus, le clone cellulaire qui a été utilisé lors de nos expériences d'infections mixtes, a conservé la capacité de répliquer le circovirus porcine, caractéristique essentielle pour la poursuite de nos travaux. Ce nouveau modèle de cellule épithéliale des voies respiratoires du

porc offre une alternative intéressante aux modèles dérivés des monocytes. En effet, les lignées de monocytes qui sont actuellement utilisées ne permettent pas la réplication virale du circovirus (Sinha et al., 2012).

Les génotypes de circovirus PCV1/2a, PCV2a et PCV2b qui ont été étudiés proviennent de cas cliniques, alors que le PCV1 est 100% identique à la séquence de référence de PCV1 (Tischer et al., 1974). Par contre, le VSRRP de type II (IAF-Klop) qui est utilisé dans cette expérience a été isolé d'un cas clinique survenu au Québec en 1991 (Dea et al., 1992). Cette souche de VSRRP a été adaptée à la lignée cellulaire MARC-145 depuis de nombreuses années. Des travaux complémentaires avec des souches plus récentes et génomiquement différentes de VSRRP seraient importants à réaliser pour déterminer l'impact du génotype de VSRRP sur les interactions et la réplication virale dans un contexte d'infections mixtes PCV/VSRRP. Cependant, nous voulions en premier lieu établir l'effet du génotype de PCV sur sa réplication virale et par la suite dans un contexte d'infections mixtes PCV/VSRRP.

Parmi les premières expériences qui ont été réalisées dans cette étude, l'analyse de la co-localisation a permis de montrer que les deux virus pouvaient infecter les cellules modifiées en même temps (Figure 25). Des expériences plus approfondies sont toutefois nécessaires pour réellement conclure que les deux virus se retrouvent préférentiellement dans une même sous-population cellulaire. Deux hypothèses se dresseront alors pour expliquer le fait qu'un nombre limité de cellules sont co-infectées. La première hypothèse envisagée serait que certaines cellules NPTr-CD163 de cette expérience sont plus permissives aux deux virus que d'autres, ce qui augmente la probabilité d'une co-infection avec le PCV et le VSRRP. Une seconde hypothèse serait que des cellules NPTr-CD163 préalablement infectées au circovirus porcin soient devenues plus permissives au VSRRP par un mécanisme encore inconnu. Ces résultats permettent de poursuivre dans l'étude de la co-infection PCV/VSRRP, mais n'apportent pas de réponses claires quant à l'interaction entre ces deux virus. La prochaine étape consistait donc à étudier les effets de cette co-infection sur la réplication de chacun des virus.

Des études sur la capacité répliquative des différents génotypes de circovirus porcins réalisés *in vitro* ont révélé que les différents génotypes ne sont pas égaux quant à leur capacité répliquative (Beach et al., 2010; Music, 2008). Les études menées sur la répliquation du circovirus sont généralement réalisées sur plusieurs passages cellulaires. En effet, le circovirus se réplique lentement et profite grandement de la phase S du cycle cellulaire (Tischer et al., 1987). Deux études précédentes sur la répliquation du PCV1, PCV1/2a, PCV2a et PCV2b ont révélé que le PCV2a possédait une moins bonne capacité répliquative que les trois autres dans des PK-15 et dans les cellules NPT_r (Beach et al., 2010; Music, 2008). Le PCV1 est un génotype de circovirus qui est adapté aux cellules de laboratoire, et plus particulièrement aux cellules de rein de porc (PK-15) d'où il a été isolé, ce qui lui confère théoriquement un avantage répliquatif. En effet, le développement d'un hybride PCV1/2a, possédant l'ORF1 de PCV1 et l'ORF2 de PCV2a, a montré une plus grande capacité répliquative que le PCV2a suggérant un rôle non négligeable de l'ORF1 dans la répliquation virale (Beach et al., 2010; Music, 2008). Ce n'est pas le cas avec l'hybride PCV1/2b dont la répliquation est demeurée inchangée comparativement au PCV2b (Hua et al., 2013). Cela mène à penser que l'ORF1 (Rep) de PCV2a est moins efficace à assurer la répliquation du virus *in vitro* alors que le PCV2b possède déjà cet avantage répliquatif, et ce, même si le produit de l'ORF1 entre le PCV2a et le PCV2b ne diffère que par 2 acides aminés (Annexe- Tableau VIII). Ces deux acides aminés peuvent donc jouer un rôle majeur dans la répliquation virale, mais leur importance structurale ou fonctionnelle devra être investiguée. Ces données doivent être prises en compte dans le modèle de co-infection lorsque l'on compare les différents génotypes entre eux. C'est donc aussi en partie pour pallier à cette capacité répliquative variable de chacun des génotypes que le modèle de co-infection a été basé sur des cellules infectées de manière persistante, ce qui a permis d'assurer un titre de circovirus statistiquement semblable pour chacun des génotypes au début de l'expérience (Figure 26). L'autre raison derrière cette pratique était que le virus du VSRRP était connu pour causer un effet cytopathique rapide sur les cellules qu'il infecte, ce qui ne laissait pas le temps théorique pour que les cellules soient co-infectées avec le circovirus. Le faible effet cytopathique du VSRRP dans notre modèle cellulaire illustré

par la faible relâche de LDH par les cellules NPT_r-CD163 après 72 heures d'infection (25% comparativement à 18% pour les cellules non-infectées) est ainsi apparu comme une surprise et pourrait refléter l'absence d'une cible cellulaire pour le VSRRP dans ces cellules, ce qui permet l'étude de son interaction avec le circovirus en limitant la mortalité cellulaire. Il est possible d'envisager que des populations cellulaires possédant les mêmes caractéristiques *in vivo* offriraient un milieu propice à l'interaction entre le PCV et le VSRRP.

Notre étude a montré que lorsque le VSRRP infecte des cellules préalablement infectées au PCV1 (Figure 26a), la réplication de ce dernier sur une période de 96 heures est 10 fois moins importante que lorsqu'en infection seule. L'absence de référence dans le domaine de la co-infection du PCV1 avec le VSRRP limite toutefois l'interprétation du résultat. Un élément de réponse pourrait provenir de l'interaction entre le PCV1/2a et le VSRRP, où l'on se rend compte que la réplication du PCV1/2a n'est pas affectée par la présence du VSRRP. Puisque la traduction de l'ORF1 du PCV1 et du PCV1/2a est sensiblement la même (99,4% d'homologie en acide aminés (aa), 2 mutations, voir Annexe-Tableau VII), il est possible de penser que le facteur qui limite la réplication du PCV1 serait plutôt porté sur l'ORF2 (Cap) (66,7% d'homologie entre les aa de l'ORF2 de PCV1 et l'ORF2 du PCV1/2a). De plus, lorsque l'on étudie l'interaction entre le PCV2a et le VSRRP lors d'une co-infection, on ne voit pas d'altération de la réplication du circovirus. Le résultat obtenu est le même que celui du PCV1/2a. Il est donc encore possible de spéculer que le même ORF2 (99,4% d'homologie en a.a. entre le produit de l'ORF2 de PCV2a et celui de PCV1/2a) donne les mêmes résultats : c'est-à-dire que la réplication virale de ces circovirus (PCV1/2a et PCV2a) n'est pas influencée *in vitro* par le VSRRP parce qu'ils possèdent le même ORF2. Comme il a été mentionné précédemment, la protéine Cap qui est codée par le gène ORF2 du PCV joue un rôle dans l'entrée, la décapsidation, l'assemblage et le bourgeonnement du virion. De plus, elle peut se lier à la protéine Rep (Timmusk et al., 2006). La seule hypothèse qui peut être émise à cette étape serait que le facteur génétique qui provoque une diminution de la

réplication du PCV1 en présence du VSRRP serait porté sur l'ORF2 plutôt que sur l'ORF1.

Les résultats obtenus dans le modèle de co-infection PCV2b-VSRRP diffèrent de ceux du PCV1-VSRRP. En effet, la réplication du PCV2b est significativement amplifiée par la présence du VSRRP. Après seulement 72 heures post-infection avec le VSRRP, il y a 32 fois plus de virions infectieux de PCV2b dans le modèle de co-infection que dans les cellules infectées seulement avec le PCV2b. Cette expérience montre que le PCV2b tire avantage de la présence du virus SRRP, alors que ce n'est pas le cas du PCV2a (Figure 26). Lorsque l'on s'attarde aux différences génétiques entre le PCV2b et le PCV2a, on se rend compte que les séquences codantes de l'ORF1 et de l'ORF2 de PCV2b possèdent 98,3% et 93,1% d'homologie en aa, respectivement (Tableau VII). Ces résultats remettent l'emphase sur le rôle de l'ORF2, pourtant un gène codant pour la protéine de la capsid et des facteurs de virulence (ORF3 et ORF4), dans le modèle de co-infection avec le VSRRP. En l'absence d'une étude sur l'interaction entre un mutant PCV1/2b (ORF1 de PCV1 et ORF2 de PCV2b) ou PCV2a/2b (ORF1 de PCV2a et ORF2 de PCV2b) avec le VSRRP, il n'est toutefois pas possible d'exclure les rôles de l'ORF1 ou de l'ORF2 dans l'interaction du PCV2b avec le VSRRP. Pour compléter le tableau, la réplication du VSRRP dans ces modèles de co-infection a été investiguée.

Le VSRRP est un virus qui se réplique plus rapidement que le circovirus dans des modèles cellulaires (Wensvoort et al., 1991). Dans notre modèle, la cinétique de réplication du VSRRP n'était pas affectée par la présence des génotypes de circovirus PCV1 et du PCV1/2a (Figure 27a et b). Par contre, une pré-infection des cellules NPTr-CD163 par les génotypes PCV2a et PCV2b provoquait une diminution de plus de 100X de la réplication du VSRRP après 96 heures (Figure 27c et d). La réplication du VSRRP n'était toutefois pas statistiquement différente entre eux. Cela signifie que la diminution du VSRRP n'explique pas l'augmentation majeure du titre viral de PCV2b qui a été obtenue.

Le VSRRP est connu pour causer une mortalité cellulaire dans le modèle cellulaire MARC-145 et PAM (Wensvoort et al., 1991). L'étape qui a suivi consistait donc à évaluer si la mortalité cellulaire pouvait influencer la réplication virale lors des infections mixtes. Les cellules co-infectées ont présenté le même niveau de mortalité que les cellules qui n'étaient infectés qu'avec le circovirus, ce qui a permis d'exclure ce facteur important des résultats obtenus. Fait intéressant, lorsque l'on a étudié l'activité de la caspase 3, le PCV2a et le PCV2b induisaient une augmentation de la cascade apoptotique, alors que le PCV1 et le PCV1/2a ne l'induisaient pas. Ce résultat est conséquent avec le fait que le seul facteur pro-apoptotique connu du PCV est une protéine virale codée par l'ORF3, qui se situe dans l'ORF1 du PCV2 (He et al., 2013; Lin et al., 2011).

De manière à mieux caractériser le modèle, l'immunité innée qui est déclenchée par la présence des deux virus à été étudiée. Il est important de considérer que l'expression des cytokines varie dans le temps. Cela signifie que nous n'avons pas eu un portrait global de la réponse innée. Il s'agissait de rechercher les différences majeures entre les différentes co-infections et de déterminer si la présence de cytokines pouvait expliquer les différences observées au niveau de la réplication virale.

L'analyse des cytokines pro-inflammatoires dans le modèle de co-infection (Figure 31) montre la faible réponse inflammatoire des cellules NPTr-CD163 en présence des virus du PCV et du VSRRP. Le facteur de nécrose tumoral (TNF α) est un signal inflammatoire et chimiotactique qui est principalement produit par les cellules du système immunitaire, notamment les macrophages, les lymphocytes et les cellules NK (Gomez-Laguna et al., 2010). Ce facteur joue un rôle majeur dans le recrutement des cellules immunitaires aux voies respiratoires et fait partie des cytokines de la phase précoce dans l'infection *in vivo* au VSRRP (Gomez-Laguna et al., 2010; van Reeth et Nauwynck, 2000). Dans notre modèle cellulaire, la production de TNF α n'a pas été assez élevée pour être détectée par ELISA. L'ARNm de ce facteur a néanmoins montré des variations. L'infection par le circovirus n'a pas

influencé la production d'ARNm par les cellules NPTr-CD163 alors que le VSRRP a su faire augmenter l'ARNm codant pour le TNF α . Les autres cytokines pro-inflammatoires qui ont été étudiées sont l'interleukine-1 α (IL-1A) et l'interleukine IL-6. Ces cytokines ont aussi été décrites dans la phase précoce de la réponse inflammatoire des voies respiratoires aux VSRRP (van Reeth et Nauwynck, 2000). Notre modèle montre une augmentation de l'ARNm de ces cytokines lorsque les cellules sont infectées avec le VSRRP, mais pas dans une infection avec le circovirus seul. Fait intéressant, le modèle de co-infection PCV2b-VSRRP a tendance à générer une plus faible stimulation de la réponse inflammatoire (TNF α) que les autres génotypes de PCV. Toutefois, il n'est pas possible de différencier sur cette base les cellules infectées avec le PCV2b des cellules co-infectées PCV2b-VSRRP. Ces résultats ne permettent pas d'expliquer les résultats obtenus de la cinétique de réplication des circovirus.

L'analyse des cytokines antivirales offre un élément intéressant à notre modèle. En effet, un mécanisme d'amplification de la réplication du circovirus a été décrit qui met en place le rôle des interférons de type I (IFN α et IFN β) (Gu et al., 2012; Ramamoorthy et al., 2009) et des interférons de type II (IFN γ) (Meerts et al., 2005b). Les PCV2 possèdent en amont de leur origine de réplication (Ori) un promoteur qui agit comme un élément de réponse aux interférons (ISRE). Les PCV2 ont présenté une augmentation de leur réplication jusqu'à 3,5 fois en présence d'interférons (Ramamoorthy et al., 2009). En alignant la séquence publiée de cet ISRE aux génotypes de PCV que nous avons étudiés, nous avons observé qu'elle n'est homologue qu'à 77% avec les séquences de PCV1 et PCV1/2a, mais qu'elle possède 100% d'homologie avec la séquence promotrice du PCV2a et PCV2b que nous avons utilisée dans notre modèle. Ces deux derniers ne peuvent donc être différenciés sur cette base. D'un autre côté, les interférons de type I possèdent une activité antivirale à travers l'activation des cascades JAK-STAT (Samuel, 2001). Comparativement aux interférons de type III (IFN γ), ceux-ci peuvent être produits dans des cellules épithéliales. Les résultats du RT-qPCR n'ont toutefois pas montré une augmentation significative de la production d'IFN α dans notre modèle. D'un autre

côté, il a été possible de montrer que la présence de VSRRP stimule la production d'ARNm de l'IFN β et que cet effet est observable dans les modèles de co-infection PCV1-VSRRP et PCV1/2a-VSRRP. Cette amplification pourrait fournir une explication quant à la diminution du PCV1, qui ne posséderait pas un ISRE fonctionnel, en présence de VSRRP, alors qu'une infection au VSRRP entraînerait une augmentation de l'IFN β , ce qui augmenterait les défenses cellulaires contre le PCV1.

Les autres cytokines qui ont été étudiées sont l'IL-10, l'IL-8 et le TGF- β . L'IL-10 est une cytokine qui recrute les lymphocytes T régulateurs et qui atténue l'inflammation, elle réduit la production d'interférons de type II et des cytokines pro-inflammatoires (Gomez-Laguna et al., 2013). Le VSRRP induit la production de cette cytokine *in vitro* dans les macrophages alvéolaires primaires (Patton et al., 2009). Nos résultats montrent que cette augmentation est reproduite, à travers la quantification de l'ARNm, dans notre modèle NPTr-CD163 (Figure 33). Fait intéressant, l'infection par le PCV1 seul induit aussi une augmentation comparativement aux cellules non-infectées. La grande variabilité entre les expériences limite les distinctions statistiques dans la modulation de l'IL-10 dans les autres groupes étudiés. Toutefois, il est possible de distinguer que la présence du PCV2b fait diminuer la production d'ARNm de l'IL-10 qui serait autrement induite par le VSRRP (figure 33). Il serait intéressant d'investiguer la nature de cette modulation et ses éventuelles répercussions *in vivo*. D'autre part, le VSRRP est connu pour induire la production de TGF- β , une autre cytokine qui atténue l'inflammation *in vivo* (Gomez-Laguna et al., 2013). Toutefois, notre modèle cellulaire n'a pas montré cette augmentation et ce, que ce soit en infection seule ou dans toutes les conditions de co-infection. L'IL-8 est une cytokine qui est produite dans la réponse aux bactéries. Il a été démontré que le VSRRP induit la production de cette cytokine de manière indirecte puisque cette cytokine est produite lors d'une inflammation des voies respiratoires (Tsai et al., 2012). Les cellules NPTr-CD163 infectées par le VSRRP ne montrent pas une augmentation de l'IL-8, mais les modèles de co-infection avec le circovirus tendent à présenter cette augmentation. Ces résultats présentent toutefois

une grande variabilité entre les expériences de par le trop faible nombre de répétitions et une limite de détection très basse qui pourrait s'expliquer par une incapacité des cellules NPTr à produire ces cytokines. Ainsi, il est difficile de conclure à leur implication dans le modèle de co-infection. Finalement, il n'a pas été possible de démontrer une différence marquée dans la modulation de l'expression de l'ARNm de ces cytokines entre le groupe de cellules infecté seulement par le PCV2b et le groupe co-infecté au PCV2b-VSRRP. L'augmentation importante de la réplication du PCV2b en présence du VSRRP ne semble donc pas être causée par une modulation des cytokines qui ont été évaluées. Le mécanisme d'interaction entre le PCV2b et le VSRRP demeure inconnu.

VI. CONCLUSIONS

Dans la recherche d'une explication rationnelle de l'effet du VSRRP sur la réplication du PCV, il a fallu revoir les mécanismes connus d'interactions virus-virus. Une approche pour systématiser ces interactions a récemment été publiée (DaPalma et al., 2010). Celle-ci sépare les interactions en trois grandes catégories : 1) L'effet direct des produits viraux, 2) Les interactions indirectes (environnementales), 3) Les effets sur le système immunitaire adaptatif. De plus, chacune de ces catégories est sous-divisée. Les interactions directes incluent 1.1) les virus dont la réplication dépend d'un autre (*helper-dependent*), 1.2) les virus pseudotypes (qui contiennent le matériel génétique d'un virus et la capsid de l'autre), 1.3) les exclusions par super-infection (lorsqu'un virus différent, mais d'une même famille infecte les mêmes cellules), 1.4) la recombinaison génomique, 1.5) l'intégration de rétrovirus dans le génome d'autres virus (*embedded virus*), 1.6) la trans-activation hétérologue (le produit d'un virus cause la transcription du matériel génétique d'un second). Parmi les causes d'une interaction indirecte, on note 2.1) la trans-activation hétérologue indirecte (la réponse cellulaire à une infection virale entraîne la production d'un facteur de transcription cellulaire favorable au second virus, 2.2) l'altération de la réponse normale de l'hôte par destruction des barrières physiques naturelles par un premier virus, ce qui favorise l'infection par le second, 2.3) l'altération de la composition en récepteurs cellulaires par l'infection par un premier virus et 2.4) l'altération de la réponse aux interférons de type I (DaPalma et al., 2010). Notre modèle cellulaire permet d'approfondir la recherche de l'interaction PCV-VSRRP. En premier lieu, la réponse immunitaire adaptative ne peut jouer un rôle dans ce

modèle *in vitro*. Parmi les interactions qui peuvent être retenues dans notre modèle, on en retrouve trois types : 1) la trans-activation hétérologue, 2) la trans-activation hétérologue indirecte et 3) l'altération des récepteurs de l'hôte. L'étude que nous avons conduite de la réponse immunitaire innée a montré qu'elle ne varie pas d'un modèle de co-infection à un autre, et ne peut expliquer les variations dans la réplication du PCV que nous avons obtenu. Finalement, il n'est pas impossible que l'on soit en présence d'un type d'interaction virus-virus qui n'est pas encore documenté.

En conclusion, les cellules de trachées de porc nouveau-né (NPT_r) ont été modifiées avec succès pour permettre la réplication efficace du VSRRP de type 2 et des différents génotypes de PCV. En outre, cette étude a su montrer que ces cellules offrent une plateforme intéressante pour l'étude de l'effet du VSRRP sur la réplication du PCV. Les modèles de co-infection ont montré que le VSRRP stimule la réplication du PCV2b au niveau cellulaire, mais qu'il n'a pas d'effet sur le PCV2a. Cette découverte pourrait expliquer, du moins en partie, l'augmentation de la fréquence des MACVP au cours des dernières années et l'augmentation importante de la prévalence en Amérique du nord et par la suite au niveau mondial du PCV2b (Rose et al., 2012). De plus, la nature épidémique du PCV2b dans les troupeaux de porcs par rapport à PCV2a pourrait provenir de cette interaction avec le VSRRP dans le champ car la prévalence du VSRRP est également très élevée dans les troupeaux au niveau mondial.

VII. RÉFÉRENCES

- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121, 1-11.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10, 3-10.
- Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D., McNulty, M.S., 1994. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zbl Vet Med B* 41, 17-26.
- Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R., Osorio, F.A., 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol* 80 (Pt 2), 307-315.
- Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., 1997. Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol* 142, 993-1001.
- Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J.H., Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M., Jacques, M., 2009. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infec Immun* 77, 1426-1441.
- Baron, T., Albina, E., Leforban, Y., Madec, F., Guilimoto, H., Plana Duran, J., Vannier, P., 1992. Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Ann Rech Vet* 23, 161-166.
- Beach, N.M., Juhan, N.M., Cordoba, L., Meng, X.J., 2010. Replacement of the replication factors of porcine circovirus (PCV) type 2 with those of PCV type 1 greatly enhances viral replication in vitro. *J Virol* 84, 8986-8989.
- Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D., 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4, 127-133.
- Blackwell, J.L., Brinton, M.A., 1997. Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *J Virol* 71, 6433-6444.
- Bloemraad, M., de Kluijver, E.P., Petersen, A., Burkhardt, G.E., Wensvoort, G., 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet Microbiol* 42, 361-371.
- Bloor, S., Maelfait, J., Krumbach, R., Beyaert, R., Randow, F., 2010. Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is essential for infection with vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6970-6975.

- Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P., Hamel, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 13, 185-194.
- Borghetti, P., Morganti, M., Saleri, R., Ferrari, L., De Angelis, E., Cavalli, V., Cacchioli, A., Corradi, A., Martelli, P., 2013. Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden. *Vet Microbiol* 163, 42-53.
- Botner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., 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.
- Calsamiglia, O., Segalès, Domingo 2004. Quantification of PCV2 in different routes of excretion: Possible transmission routes and correlation with presence of PMWS characteristic lesions. *Proc Congr Int Pig Vet Soc*, 11.
- Calvert, J.G., Slade, D.E., Shields, S.L., Jolie, R., Mannan, R.M., Ankenbauer, R.G., Welch, S.K., 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 81, 7371-7379.
- Cancel-Tirado, S.M., Evans, R.B., Yoon, K.J., 2004. Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 249-262.
- Candotti, P., Pinoni, C., Lavazza, A., Cantoni, A.M., Di Lecce, R., Ferrari, M., 2001. Necrotizing tracheitis: Is it a new PCV2 Pathological form?, *Proc ssDNA Viruses Plants Birds Pigs Primates*, Saint-Malo. France.
- Carlsson, U., Wallgren, P., Renstrom, L.H., Lindberg, A., Eriksson, H., Thoren, P., Eliasson-Selling, L., Lundeheim, N., Norregard, E., Thorn, C., Elvander, M., 2009. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: detection, response and eradication. *Transbound Emerg Dis* 56, 121-131.
- Carman, S., McEwen, B., DeLay, J., van Dreumel, T., Lusi, P., Cai, H., Fairles, J., 2006. Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Can Vet J* 47, 761-762.
- Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142, 629-633.
- Cecere, T.E., Meng, X.J., Pelzer, K., Todd, S.M., Beach, N.M., Ni, Y.Y., Leroith, T., 2012. Co-infection of porcine dendritic cells with porcine circovirus type 2a (PCV2a) and genotype II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in vitro. *Vet Microbiol* 160, 233-239.
- Chand, R.J., Triple, B.R., Rowland, R.R., 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Curr Opin Virol* 2, 256-263.

Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Liu, J.J., Chiou, M.T., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Jan, T.R., Pang, V.F., 2006a. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Vet Immunol Immunopathol* 110, 207-219.

Chang, H.W., Pang, V.F., Chen, L.J., Chia, M.Y., Tsai, Y.C., Jeng, C.R., 2006b. Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. *Vet Microbiol* 115, 311-319.

Chianini, F., Majo, N., Segales, J., Dominguez, J., Domingo, M., 2003. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 94, 63-75.

Clark, E.G., 1997. Post-weaning multisystemic wasting disease. *Proc Am Assoc Swine Pract* 499-501.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al., 1992. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 4, 117-126.

Corrégé, I., Pirouelle, D., Gaudré, D., Letiran, M., 2001. La Maladie de l'Amaigrissement du Porcelet (MAP): Influence de différents paramètres zootechniques sur son incidence dans un élevage expérimental. *J Rech Porcine France* 33, 283-290.

Costers, S., Lefebvre, D.J., Goddeeris, B., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2009. Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3+CD8high cells. *Vet Res* 40, 46.

D'Allaire, S., Moore, C., Cote, G., 2007. A survey on finishing pig mortality associated with porcine circovirus diseases in Quebec. *Can Vet J* 48, 145-146.

DaPalma, T., Doonan, B.P., Trager, N.M., Kasman, L.M., 2010. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Res* 149, 1-9.

Darwich, L., Balasch, M., Plana-Duran, J., Segales, J., Domingo, M., Mateu, E., 2003. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* 84, 3453-3457.

Darwich, L., Diaz, I., Mateu, E., 2010. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res* 154, 123-132.

Darwich, L., Mateu, E., 2012. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 61-67.

Darwich, L., Segales, J., Domingo, M., Mateu, E., 2002. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy

pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immun* 9, 236-242.

de Haan, C.A., Vennema, H., Rottier, P.J., 2000. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J Virol* 74, 4967-4978.

De Nova-Ocampo, M., Villegas-Sepulveda, N., del Angel, R.M., 2002. Translation elongation factor-1alpha, La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology* 295, 337-347.

Dea, S., Bilodeau, R., Athanassious, R., Sauvageau, R., Martineau, G.P., 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., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D., 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 145, 659-688.

Dee, S.A., Deen, J., Jacobson, L., Rossow, K.D., Mahlum, C., Pijoan, C., 2005. Laboratory model to evaluate the role of aerosols in the transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec* 156, 501-504.

Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 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.

Delrue, I., Van Gorp, H., Van Doorsselaere, J., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010. Susceptible cell lines for the production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by stable transfection of sialoadhesin and CD163. *BMC Biotechnol* 10, 48.

Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E., 2006. Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249-259.

Diaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., Lopez, S., Galindo, I., Segales, J., Martin, M., Pujols, J., Mateu, E., 2012. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res* 43, 30.

Domingo, E., Sheldon, J., Perales, C., 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol R : MMBR* 76, 159-216.

Doster, A.R., Subramaniam, S., Yhee, J.Y., Kwon, B.J., Yu, C.H., Kwon, S.Y., Osorio, F.A., Sur, J.H., 2010. Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs. *J Vet Sci* 11, 177-183.

Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R., 2003. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet Pathol* 40, 143-148.

Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H., Pensaert, M.B., 1998a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of alveolar macrophages can be blocked by monoclonal antibodies against cell surface antigens. *Adv Exp Med Biol* 440, 81-88.

Duan, X., Nauwynck, H.J., Favoreel, H.W., Pensaert, M.B., 1998b. Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 72, 4520-4523.

Dunbar, C.E., Emmons, R.V., 1994. Gene transfer into hematopoietic progenitor and stem cells: progress and problems. *Stem Cells* 12, 563-576.

Dvorak, C.M., Puvanendiran, S., Murtaugh, M.P., 2013. Cellular pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection. *Virus Res* 174, 60-68.

Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39, 44-51.

Ellis, J.A., Allan, G., Krakowka, S., 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torqueto virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 69, 1608-1614.

Ellis, J.A., Bratanich, A., Clark, E.G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D.M., Harding, J., West, K.H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K., McNeilly, F., 2000. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12, 21-27.

Escors, D., Breckpot, K., 2010. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 107-119.

Faaberg, K.S., Hocker, J.D., Erdman, M.M., Harris, D.L., Nelson, E.A., Torremorell, M., Plagemann, P.G., 2006. Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol* 19, 294-304.

Faurez, F., Dory, D., Grasland, B., Jestin, A., 2009. Replication of porcine circoviruses. *Virol J* 6, 60.

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J Virol* 78, 13440-13446.

Finsterbusch, T., Mankertz, A., 2009. Porcine circoviruses--small but powerful. *Virus Res* 143, 177-183.

Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol* 125, 244-255.

Fort, M., Sibila, M., Nofrarias, M., Perez-Martin, E., Olvera, A., Mateu, E., Segales, J., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Vet Immunol Immunopathol* 137, 226-234.

Fraile, L., Calsamiglia, M., Mateu, E., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Domingo, M., Segales, J., 2009. Prevalence of infection with porcine circovirus-2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 73, 308-312.

Gagnon, C.A., Dea, S., 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.

Gagnon, C.A., del Castillo, J.R., Music, N., Fontaine, G., Harel, J., Tremblay, D., 2008. Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *J Vet Diagn Invest* 20, 545-558.

Gagnon, C.A., Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D., Harel, J., 2010. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol* 144, 18-23.

Gagnon, C.A., Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M.H., Houde, A., Elahi, S.M., 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* 48, 811-819.

Gerber, P.F., Garrocho, F.M., Lana, A.M., Lobato, Z.I., 2012. Fetal infections and antibody profiles in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Can J Vet Res* 76, 38-44.

Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V., 2009. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med* 23, 1151-1163.

Gilpin, D.F., McCullough, K., Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Stevenson, L.S., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S., Adair, B.M., Allan, G.M., 2003. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 94, 149-161.

Gimeno, M., Darwich, L., Diaz, I., de la Torre, E., Pujols, J., Martin, M., Inumaru, S., Cano, E., Domingo, M., Montoya, M., Mateu, E., 2011. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Res* 42, 9.

Gomez-Laguna, J., Salguero, F.J., Pallares, F.J., Carrasco, L., 2013. Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *Vet J* 195, 148-155.

Gomez-Laguna, J., Salguero, F.J., Pallares, F.J., Fernandez de Marco, M., Barranco, I., Ceron, J.J., Martinez-Subiela, S., Van Reeth, K., Carrasco, L., 2010. Acute phase response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33, e51-58.

Grau-Roma, L., Segales, J., 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet Microbiol* 119, 144-151.

Graversen, J.H., Madsen, M., Moestrup, S.K., 2002. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 309-314.

Grierson, S.S., King, D.P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T.W., Banks, M., 2004. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol* 149, 1171-1183.

Gu, J., Zhang, Y., Lian, X., Sun, H., Wang, J., Liu, W., Meng, G., Li, P., Zhu, D., Jin, Y., Cao, R., 2012. Functional analysis of the interferon-stimulated response element of porcine circovirus type 2 and its role during viral replication in vitro and in vivo. *Viol J* 9, 152.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A., 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., Paul, P.S., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A., 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.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72, 5262-5267.

Harding, J.C., 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc West Can Assoc Swine Pract*.

Harding, J.C., 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 98, 131-135.

Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 38, 528-539.

He, J., Cao, J., Zhou, N., Jin, Y., Wu, J., Zhou, J., 2013. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J Virol* 87, 1420-1429.

Holtkamp, D., Kliebenstein, J., Neumann, E., Zimmerman, J., Rotto, H., Yoder, T., Wang, C., Yeske, P., Mowrer, C., Haley, C.A., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod* 21, 72-84.

Howerth, E.W., Murphy, M.D., Roberts, A.W., 2002. Failure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to replicate in porcine endothelial cell cultures. *J Vet Diagn Invest* 14, 73-76.

Hua, T., Wang, X., Bai, J., Zhang, L., Liu, J., Jiang, P., 2013. Attenuation of porcine circovirus type-2b by replacement with the Rep gene of porcine circovirus type-1. *Virus Res.*

Johnson, C.R., Griggs, T.F., Gnanandarajah, J., Murtaugh, M.P., 2011. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J Gen Virol* 92, 1107-1116.

Johnson, C.R., Yu, W., Murtaugh, M.P., 2007. Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 88, 1184-1195.

Jusa, E.R., Inaba, Y., Kono, M., Asagoe, T., Uwatoko, K., 1997. Effect of heparin on a haemagglutinin of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Res Vet Sci* 62, 261-264.

Keffaber, K.K., 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc.Swine Pract. News* 1, 1-10.

Kheyar, A., Jabrane, A., Zhu, C., Cleroux, P., Massie, B., Dea, S., Gagnon, C.A., 2005. Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs. *Vaccine* 23, 4016-4022.

Kim, J.K., Fahad, A.M., Shanmukhappa, K., Kapil, S., 2006. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J Virol* 80, 689-696.

Kim, O., Sun, Y., Lai, F.W., Song, C., Yoo, D., 2010. Modulation of type I interferon induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus and degradation of CREB-binding protein by non-structural protein 1 in MARC-145 and HeLa cells. *Virology* 402, 315-326.

Krakovka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Rings, D.M., Allan, G., 2007. *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. *Can Vet J* 48, 716-724.

Krakovka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting

syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. Vet Pathol 37, 254-263.

Kreutz, L.C., Ackermann, M.R., 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. Virus Res 42, 137-147.

Lee, S.M., Schommer, S.K., Kleiboeker, S.B., 2004. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes. Vet Immunol Immunopathol 102, 217-231.

Lee, Y.J., Lee, C., 2010. Deletion of the cytoplasmic domain of CD163 enhances porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. Arch Virol 155, 1319-1323.

Lee, Y.J., Park, C.K., Nam, E., Kim, S.H., Lee, O.S., Lee du, S., Lee, C., 2010. Generation of a porcine alveolar macrophage cell line for the growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol Methods 163, 410-415.

Lefebvre, D.J., Meerts, P., Costers, S., Misinzo, G., Barbe, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2008. Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. Vet Microbiol 132, 74-86.

Lin, W.L., Chien, M.S., Wu, P.C., Lai, C.L., Huang, C., 2011. The Porcine Circovirus Type 2 Nonstructural Protein ORF3 Induces Apoptosis in Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells. Open Virol J 5, 148-153.

Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. J Virol 79, 8262-8274.

Liu, L., He, B., Liu, W.M., Zhou, D., Cox, J.V., Zhang, X.A., 2007. Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. J Biol Chem 282, 31631-31642.

Loemba, H.D., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D., Dea, S., 1996. Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch Virol 141, 751-761.

Loving, C.L., Brockmeier, S.L., Sacco, R.E., 2007. Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. Immunology 120, 217-229.

Luo, R., Xiao, S., Jiang, Y., Jin, H., Wang, D., Liu, M., Chen, H., Fang, L., 2008. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway. Mol Immunol 45, 2839-2846.

Madec, F.E., E., Morvana, P., Hamona, L., Blancharda, P., Carioleta, R., Amennab, N., Morvanb, H., Truonga, C., Mahéa, D., Albinaa, E., Jestina, A., 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. Lifest Prod Sci 63, 223-233.

Magar, R., Larochele, R., Dea, S., Gagnon, C.A., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1995. Antigenic comparison of Canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. *Can J Vet Res* 59, 232-234.

Magar, R., Muller, P., Larochele, R., 2000. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res* 64, 184-186.

Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T., Finsterbusch, T., 2004. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol* 98, 81-88.

Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S., Dea, S., 1994. 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., Mounir, S., Dea, S., 1995. Structural gene analysis of a Quebec reference strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv Exp Med Biol* 380, 277-281.

Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2171-2179.

Meerts, P., Misinzo, G., McNeilly, F., Nauwynck, H.J., 2005a. Replication kinetics of different porcine circovirus 2 strains in PK-15 cells, fetal cardiomyocytes and macrophages. *Arch Virol* 150, 427-441.

Meerts, P., Misinzo, G., Nauwynck, H.J., 2005b. Enhancement of porcine circovirus 2 replication in porcine cell lines by IFN-gamma before and after treatment and by IFN-alpha after treatment. *J Interferon Cytokine Res* 25, 684-693.

Meier, W.A., Galeota, J., Osorio, F.A., Husmann, R.J., Schnitzlein, W.M., Zuckermann, F.A., 2003. Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31.

Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Morozov, I., 1995. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 12), 3181-3188.

Miller, A.D., Chen, F., 1996. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J Virol* 70, 5564-5571.

Miller, L.C., Fox, J.M., 2004. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 131-142.

Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Nauwynck, H.J., 2006. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol* 80, 3487-3494.

Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., Nauwynck, H.J., 2005. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol* 86, 2057-2068.

Morgenstern, J.P., Land, H., 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 18, 3587-3596.

Munday, J., Floyd, H., Crocker, P.R., 1999. Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *J Leukoc Biol* 66, 705-711.

Murakami, Y., Kato, A., Tsuda, T., Morozumi, T., Miura, Y., Sugimura, T., 1994. Isolation and serological characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses from pigs with reproductive and respiratory disorders in Japan. *J Vet Med Sci* 56, 891-894.

Murtaugh, M.P., Elam, M.R., Kakach, L.T., 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.

Murtaugh, M.P., Johnson, C.R., Xiao, Z., Scamurra, R.W., Zhou, Y., 2009. Species specialization in cytokine biology: is interleukin-4 central to the T(H)1-T(H)2 paradigm in swine? *Dev Comp Immunol* 33, 344-352.

Music, N., 2008. (Mémoire) *In vitro* and *in vivo* virulence evaluation of the new genotype of porcine circovirus type 2 and identification of a new cell line permissive to virus replication, Département de pathologie et microbiologie; Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal Saint-Hyacinthe.

Music, N., Gagnon, C.A., 2010. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis. *Anim Health Res Rev* 11, 135-163.

Nabel, E.G., Plautz, G., Nabel, G.J., 1990. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science* 249, 1285-1288.

Nanda, S.K., Johnson, R.F., Liu, Q., Leibowitz, J.L., 2004. Mitochondrial HSP70, HSP40, and HSP60 bind to the 3' untranslated region of the Murine hepatitis virus genome. *Arch Virol* 149, 93-111.

Nauwynck, H.J., Sanchez, R., Meerts, P., Lefebvre, D.J., Saha, D., Huang, L., Misinzo, G., 2012. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. *Virus Res* 164, 43-45.

Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1994. Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest* 6, 410-415.

Neumann, E.J., Kliebenstein, J.B., Johnson, C.D., Mabry, J.W., Bush, E.J., Seitzinger, A.H., Green, A.L., Zimmerman, J.J., 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227, 385-392.

Nielsen, J., Vincent, I.E., Botner, A., Ladekaer-Mikkelsen, A.S., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 92, 97-111.

O'Neill, K.C., Shen, H.G., Lin, K., Hemann, M., Beach, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2011. Studies on porcine circovirus type 2 vaccination of 5-day-old piglets. *Clin Vaccine Immunol* 18, 1865-1871.

Opriessnig, T., Gauger, P.C., Faaberg, K.S., Shen, H., Beach, N.M., Meng, X.J., Wang, C., Halbur, P.G., 2012. Effect of porcine circovirus type 2a or 2b on infection kinetics and pathogenicity of two genetically divergent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the conventional pig model. *Vet Microbiol* 158, 69-81.

Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim Health Res Rev* 12, 133-148.

Opriessnig, T., Halbur, P.G., 2012. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res* 164, 20-32.

Opriessnig, T., Halbur, P.G., Yu, S., Thacker, E.L., Fenaux, M., Meng, X.J., 2006a. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. *Vet Rec* 158, 149-154.

Opriessnig, T., McKeown, N.E., Harmon, K.L., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006b. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 13, 923-929.

Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Elsener, J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clin Vaccine Immunol* 15, 397-401.

Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41, 624-640.

Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J., 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 76, 4241-4250.

Paton, D.J., Brown, I.H., Scott, A.C., Done, S.H., Edwards, S., 1992. Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. *Vet Microbiol* 33, 195-201.

Patton, J.B., Rowland, R.R., Yoo, D., Chang, K.O., 2009. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res* 140, 161-171.

Pejsak, Z., Markowska-Daniel, I., 1997. Losses due to porcine reproductive and respiratory syndrome in a large swine farm. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 20, 345-352.

Pirzadeh, B., Dea, S., 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78 (Pt 8), 1867-1873.

Pirzadeh, B., Dea, S., 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 5), 989-999.

Plagemann, P.G., 2004. The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 102, 263-275.

Plagemann, P.G., Rowland, R.R., Faaberg, K.S., 2002. The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR-2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain. *Arch Virol* 147, 2327-2347.

Plana, J., Vayreda, M., Vilarrasa, J., Bastons, M., Rosell, R., Martinez, M., San Gabriel, A., Pujols, J., Badiola, J.L., Ramos, J.A., et al., 1992. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet Microbiol* 33, 203-211.

Provost, C., Jia, J.J., Music, N., Levesque, C., Lebel, M.E., del Castillo, J.R., Jacques, M., Gagnon, C.A., 2012. Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Virology* 439, 267.

Racine, S., Kheyar, A., Gagnon, C.A., Charbonneau, B., Dea, S., 2004. Eucaryotic expression of the nucleocapsid protein gene of porcine circovirus type 2 and use of the protein in an indirect immunofluorescence assay for serological diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 736-741.

Ramamoorthy, S., Huang, F.F., Huang, Y.W., Meng, X.J., 2009. Interferon-mediated enhancement of in vitro replication of porcine circovirus type 2 is influenced by an interferon-stimulated response element in the PCV2 genome. *Virus Res* 145, 236-243.

Ramamoorthy, S., Meng, X.J., 2009. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev* 10, 1-20.

Ramamoorthy, S., Opriessnig, T., Pal, N., Huang, F.F., Meng, X.J., 2011. Effect of an interferon-stimulated response element (ISRE) mutant of porcine circovirus type 2 (PCV2) on PCV2-induced pathological lesions in a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) co-infection model. *Vet Microbiol* 147, 49-58.

Rodriguez-Arriola, G.M., Segales, J., Calsamiglia, M., Resendes, A.R., Balasch, M., Plana-Duran, J., Casal, J., Domingo, M., 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63, 354-357.

Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 78-89.

Rossow, K.D., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E., 1996. Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol* 33, 551-556.

Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A., 1995. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol* 32, 361-373.

Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 76, 3232-3239.

Rowland, R.R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D.A., 2003. Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet Microbiol* 96, 219-235.

Samuel, C.E., 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778-809, table of contents.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.

Segales, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164, 10-19.

Segales, J., Domingo, M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24, 109-124.

Segales, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 162, 867-868.

- Shanmukhappa, K., Kim, J.K., Kapil, S., 2007. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology* 4, 62.
- Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Hui, R.K., Faaberg, K.S., Wennblom, T., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Leung, F.C., 2010a. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res* 154, 7-17.
- Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Murtaugh, M.P., Davies, P.R., Hui, R.K., Li, J., Wong, L.T., Yip, C.W., Jiang, J.W., Leung, F.C., 2010b. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol* 84, 8700-8711.
- Sibila, M., Fort, M., Nofrarias, M., Perez de Rozas, A., Galindo-Cardiel, I., Mateu, E., Segales, J., 2012. Simultaneous porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *J Comp Pathol* 147, 285-295.
- Silva-Campa, E., Cordoba, L., Fraile, L., Flores-Mendoza, L., Montoya, M., Hernandez, J., 2010. European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virology* 396, 264-271.
- Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Resendiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W., Hernandez, J., 2009. Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387, 373-379.
- Silva-Campa, E., Mata-Haro, V., Mateu, E., Hernandez, J., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4+CD8+CD25+Foxp3+ regulatory T cells (Tregs). *Virology* 430, 73-80.
- Silversides, D.W., Music, N., Jacques, M., Gagnon, C.A., Webby, R., 2010. Investigation of the species origin of the St. Jude Porcine Lung epithelial cell line (SJPL) made available to researchers. *J Virol* 84, 5454-5455.
- Sinha, A., Lin, K., Hemann, M., Shen, H., Beach, N.M., Ledesma, C., Meng, X.J., Wang, C., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. ORF1 but not ORF2 dependent differences are important for in vitro replication of PCV2 in porcine alveolar macrophages singularly or coinfecting with PRRSV. *Vet Microbiol* 158, 95-103.
- Sirinarumit, T., Sorden, S.D., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Double in situ hybridization for simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus (PCV). *J Vet Diagn Invest* 13, 68-71.
- Snijder, E.J., Meulenbergh, J.J., 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79 (Pt 5), 961-979.
- Spilman, M.S., Welbon, C., Nelson, E., Dokland, T., 2009. Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid. *J Gen Virol* 90, 527-535.

St Louis, D., Verma, I.M., 1988. An alternative approach to somatic cell gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3150-3154.

Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Scherbakov, A.V., Timina, A.M., Krabbe, J.S., Chabros, K., Potapchuk, D., 2008. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch Virol* 153, 1479-1488.

Stead, R.B., Kwok, W.W., Storb, R., Miller, A.D., 1988. Canine model for gene therapy: inefficient gene expression in dogs reconstituted with autologous marrow infected with retroviral vectors. *Blood* 71, 742-747.

Studdert, M.J., 1993. Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. *Aust Vet J* 70, 121-122.

Suarez, P., Zardoya, R., Martin, M.J., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A., Castro, J.M., 1996. Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res* 42, 159-165.

Sun, Y., Han, M., Kim, C., Calvert, J.G., Yoo, D., 2012. Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses* 4, 424-446.

Sur, J.H., Cooper, V.L., Galeota, J.A., Hesse, R.A., Doster, A.R., Osorio, F.A., 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.

Timmusk, S., Fossum, C., Berg, M., 2006. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. *J Gen Virol* 87, 3215-3223.

Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Griem, W., 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91, 271-276.

Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 96, 39-57.

Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zbl Bakteriol Orig A* 226, 153-167.

Trible, B.R., Rowland, R.R., 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res* 164, 68-77.

Trible, B.R., Suddith, A.W., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Hesse, R.A., Rowland, R.R., 2012. Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2. *J Virol* 86, 13508-13514.

Tsai, Y.C., Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Lin, C.M., Wan, C.H., Pang, V.F., 2012. The effect of infection order of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on dually infected swine alveolar macrophages. *BMC Vet Res* 8, 174.

Valicek, L., Psikal, I., Smid, B., Rodak, L., Kubalikova, R., Kosinova, E., 1997. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures. *Vet Med (Praha)* 42, 281-287.

Van Breedam, W., Delputte, P.L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., Nauwynck, H.J., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol* 91, 1659-1667.

Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 89, 2943-2953.

Van Gorp, H., Van Breedam, W., Van Doorselaere, J., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2010. Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 84, 3101-3105.

van Reeth, K., Nauwynck, H., 2000. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet Res* 31, 187-213.

Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 77, 8207-8215.

Vennema, H., Godeke, G.J., Rossen, J.W., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.J., Rottier, P.J., 1996. Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* 15, 2020-2028.

Verreault, D., Letourneau, V., Gendron, L., Masse, D., Gagnon, C.A., Duchaine, C., 2010. Airborne porcine circovirus in Canadian swine confinement buildings. *Vet Microbiol* 141, 224-230.

Vidigal, P.M., Mafra, C.L., Silva, F.M., Fietto, J.L., Silva Junior, A., Almeida, M.R., 2012. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Res* 163, 320-327.

Vogt, V.M., Simon, M.N., 1999. Mass determination of rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J Virol* 73, 7050-7055.

Vu, H.L., Kwon, B., Yoon, K.J., Laegreid, W.W., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2011. Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *J Virol* 85, 5555-5564.

Wang, L., Zhang, H., Suo, X., Zheng, S., Feng, W.H., 2011. Increase of CD163 but not sialoadhesin on cultured peripheral blood monocytes is coordinated with enhanced susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 141, 209-220.

Wang, X., Christopher-Hennings, J., 2012. Post-transcriptional control of type I interferon induction by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in its natural host cells. *Viruses* 4, 725-733.

Welch, S.K., Calvert, J.G., 2010. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res* 154, 98-103.

Wellenberg, G.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Boersma, W.J., De Jong, M.F., Elbers, A.R., 2004. The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study. *Res Vet Sci* 77, 177-184.

Wensvoort, G., 1993. Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet Res* 24, 117-124.

Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Pol, J.M., Wagenaar, F., Moormann, R.J., Hulst, M.M., Bloemraad, R., den Besten, A., Zetstra, T., Terpstra, C., 1992. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet Microbiol* 33, 185-193.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., et al., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 13, 121-130.

Wikstrom, F.H., Fossum, C., Fuxler, L., Kruse, R., Lovgren, T., 2011. Cytokine induction by immunostimulatory DNA in porcine PBMC is impaired by a hairpin forming sequence motif from the genome of Porcine Circovirus type 2 (PCV2). *Vet Immunol Immunopathol* 139, 156-166.

Wilson, J.M., Johnston, D.E., Jefferson, D.M., Mulligan, R.C., 1988. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4421-4425.

Wissink, E.H., van Wijk, H.A., Kroese, M.V., Weiland, E., Meulenbergh, J.J., Rottier, P.J., van Rijn, P.A., 2003. The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol* 84, 1535-1543.

Wootton, S.K., Rowland, R.R., Yoo, D., 2002. Phosphorylation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *J Virol* 76, 10569-10576.

Yoon, I.J., Joo, H.S., Christianson, W.T., Kim, H.S., Collins, J.E., Carlson, J.H., Dee, S.A., 1992. Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 4, 139-143.

Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T., Platt, K.B., 1996. Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol* 9, 51-63.

Zeenko, V.V., Ryabova, L.A., Spirin, A.S., Rothnie, H.M., Hess, D., Browning, K.S., Hohn, T., 2002. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with the upstream pseudoknot domain in the 3' untranslated region of tobacco mosaic virus RNA. *J Virol* 76, 5678-5691.

Zhang, H., Guo, X., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., Wang, X., 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates the transcription of interferon alpha/beta (IFN-alpha/beta) in monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC). *Vet Microbiol* 159, 494-498.

Zhang, H., Lunney, J.K., Baker, R.B., Opriessnig, T., 2011. Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in tracheobronchial lymph nodes from pigs singularly infected or coinfecting with porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO). *Vet Immunol Immunopathol* 140, 152-158.

VIII. PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET FINANCEMENT

Publications

(en rédaction). Alvarez F., Provost C., Music N., Mandeville I., Savard C., Jacques M., Gagnon C. A.. *An in vitro PCV genotype-specific replicative advantage is confirmed by two different epithelial cell models and amplified in the presence of PRRSV*. 2013. St-Hyacinthe, Québec, Canada.

Communications

Provost C., Alvarez F. Bellehumeur C. Savard C., Gagnon C.A., *Development of a porcine pulmonary epithelial cell line as an in vitro model to study the impact of co-infection by porcine circovirus (PCV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*, 5e Symposium du CRIP. St-Hyacinthe, 31 mai 2012

Alvarez F., Provost C., Savard C., Gagnon C.A, *Développement d'un nouveau modèle pour l'étude de la co- infection du Circovirus porcin (CVP) de type 1 et 2 avec le virus du syndrome reproducteur respiratoire porcin (VSRRP)*. Journée de la recherche, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, octobre 2012.

Alvarez F., Provost C., Savard C., Gagnon C.A, *The use of a new porcine epithelial cell model for the study of PRRSV-PCV co-infection reveals a PCV genotype dependent effect*. CRWAD, Chicago, Illinois, États-Unis, Décembre 2012.

Alvarez F., Provost C., Savard C., Gagnon C.A, *Un modèle cellulaire pour l'étude des infections mixtes VSRRP-PCV révèle un effet sur la réplication virale qui est PCV génotype dépendant*. 6^e Symposium du CRIP, Québec, Québec, Canada, mai 2013. Premier prix : Présentation orale.

Bourses et financement

Prix d'excellence en recherche porcine - 2012. Fédération des producteurs de porc du Québec. Québec, Canada.

IX. ANNEXE

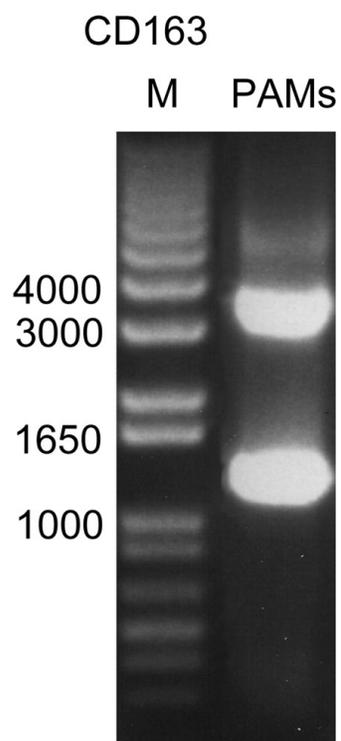


Figure 35. RT-PCR pour détecter l'ARNm du CD163 à partir de macrophages alvéolaires porcins.

Amorces utilisées : CD163 complet (voir tableau V, méthodologie). Séquence complète de l'ARNm de CD163 est 3,2kb.

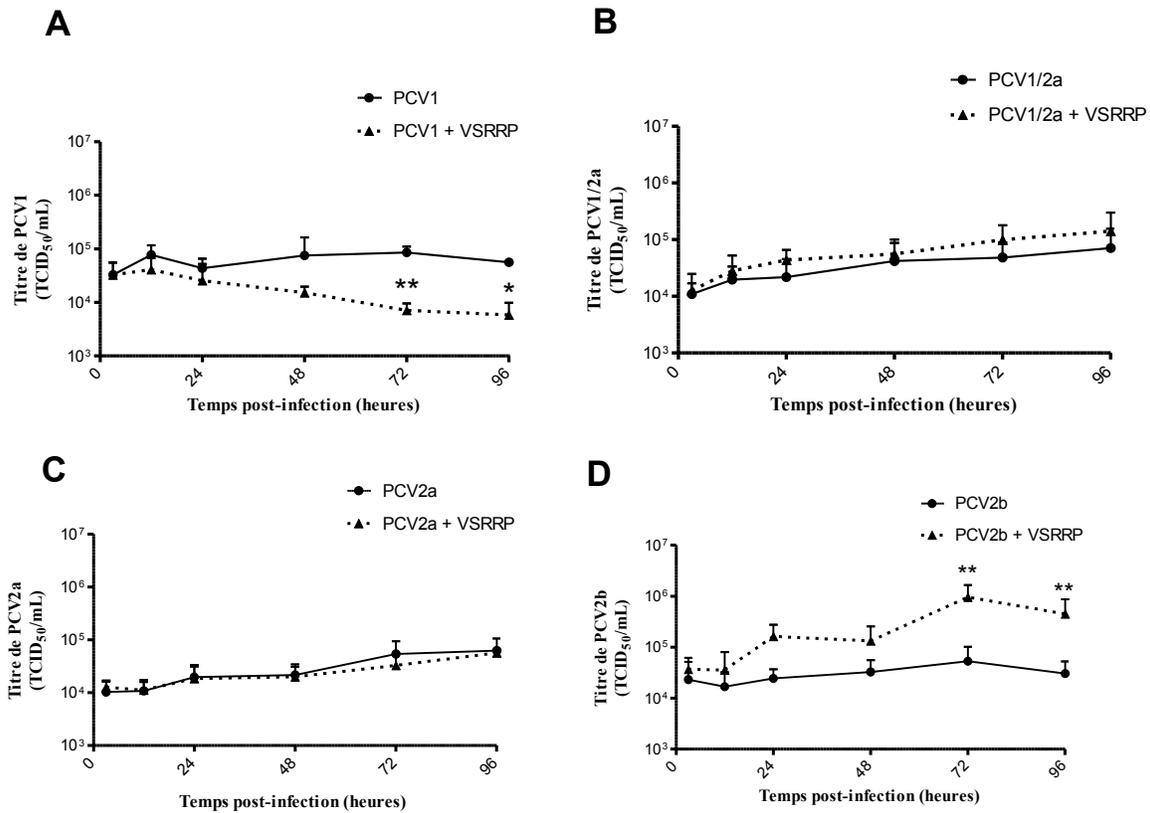


Figure 36. Cinétique de la réplication virale du circovirus porcine en présence de 1,0 MOI de VSRRP lors d'une co-infection PCV-VSRRP.

Les cellules NPTr-CD163 ont été infectées avec 0,05 MOI de **(A)** PCV1, **(B)** PCV1/2a, **(C)** PCV2a ou **(D)** PCV2b et incubées pour 4 passages cellulaires. Les cellules ont été infectées avec 1,0 MOI de VSRRP (IAF-KLOP) pendant 3 heures, puis le milieu a été changé (temps 3). À différents temps p.i, la quantité de PCV qui se trouve dans les puits (milieu + lysat cellulaire) a été déterminée par un titrage sur cellules PK-15 infectés pendant 6 jours et visualisé par immunofluorescence. N=4 pour tous les génotypes de PCV, barres d'écart-types (SD) sont illustrées. L'analyse statistique réalisée est un t de Student pour tous les groupes indépendants (par heure d'infection) pour tous les génotypes. * P<0,05. **P<0,01.

Tableau VII. Représentation en % de l'identité entre les différents cadres de lectures des génotypes de circovirus étudiés.

| | ORF1 | | | | ORF2 | | | |
|---------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|
| | PCV2a | PCV2b | PCV1/2a | PCV1 | PCV2a | PCV2b | PCV1/2a | PCV1 |
| PCV2a | - | 98,3% | 99,4% | 86,0% | - | 93,1% | 97,0% | 66,7% |
| PCV2b | | - | 85,4% | 85,7% | | - | 93,6% | 68,3% |
| PCV1/2a | | | - | 99,4% | | | - | 67,7% |
| PCV1 | | | | - | | | | - |

Comparaison des séquences Genbank (voir numéros section méthodologie) sur Genieous® 6.0.6 (Biomatters Ltd.).

Tableau VIII. Représentation des mutations en acides aminés entre les différents génotypes de circovirus étudiés.

| Position | ORF1 | | ORF2 | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------|-----|------|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 34 | 139 | 57 | 63 | 75 | 77 | 80 | 88 | 89 | 91 | 121 | 151 | 190 | 200 | 206 | 210 | 232 |
| PCV2a | E | H | V | T | K | D | V | K | I | T | T | P | S | A | K | D | K |
| PCV2b | D | Y | I | R | N | N | L | P | R | V | S | T | A | T | I | E | N |

| | ORF1 | |
|---------|------|-----|
| | 4 | 188 |
| PCV1 | R | S |
| PCV1/2a | K | R |

| | ORF2 | | | | | | |
|---------|------|----|----|-----|-----|-----|-----|
| | 59 | 63 | 75 | 185 | 191 | 200 | 205 |
| PCV1/2a | A | R | N | M | R | T | T |
| PCV2a | R | T | K | L | G | A | K |

Comparaison des séquences Genbank (voir numéros section méthodologie) sur Genieous® 6.0.6 (Biomatters Ltd.).

