

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTREAL

EXPRESSION CHEZ LES PLANTES DE PROTÉINES RECOMBINANTES
POUR DES PROCÉDURES VACCINALES :
CAS DE L'ARTERIVIRUS PORCIN ET DE LA FLAGELLINE DE *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
WILFRIED SARON

Mai 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*Je dédie cette thèse à ma fille, Reiko, véritable rayon de soleil dans ma vie. Avec tout
l'amour d'un père à sa fille. Et à sa merveilleuse Maman.*

REMERCIEMENTS

Merci, tout d'abord à mon directeur, le docteur Denis ARCHAMBAULT, et à mon co-directeur, le docteur Fathey SARHAN de l'Université du Québec à Montréal (UQAM), pour m'avoir donné l'opportunité de faire ce doctorat, pour leurs conseils et leur soutien tout au long de ces années. J'espère que je ne les aurai pas trop déçus.

Merci aux organismes subventionnaires et à nos partenaires sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour : le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), la Fédération des Producteurs de Porcs du Québec (FPPQ), le Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec (CDAQ) de concert avec les Conseils d'adaptation de l'Alberta, du Manitoba et de la Saskatchewan, Wyeth Canada (Santé animale, Dre Johanne Elsener), F. Ménard Inc. (Dr. Charles Surprenant), Agriculture et Agroalimentaire Canada (le Centre de Recherche et de Développement sur le bovin laitier et le porc, Dr. Martin Lessard) et le Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP).

Merci au département des sciences biologiques de l'UQAM qui m'a décerné une bourse FARE (Fond de l'Accessibilité à la Réussite des Étudiants) et de nouveau le CRIP pour m'avoir offert une bourse de dépannage pour la fin de mes études et une bourse de déplacement pour les congrès de l'*International PRRS Symposium* (IPRRSS) et de la *Conference of Research Workers in Animal Diseases* (CRWAD) (Chicago, IL, US).

Merci au docteur Francine MAYER de l'UQAM pour m'avoir permis d'être son démonstrateur de génétique pendant toutes ces années et pour sa gentillesse.

Merci aux différentes personnes des laboratoires dans lesquels j'ai évolué pour leurs conseils, leur expérience et leur temps quand tout ne fonctionnait pas toujours comme je l'aurai souhaité.

Merci à mes amis pour leur présence et leur support moral, bien que lointain le plus souvent, en particulier Thomas et Aurélie qui sont ceux qui me supportent depuis le plus grand nombre d'année et qui ont su égayer ma vie.

Enfin, un dernier merci, et non des moindres, à mes parents sans qui cette histoire n'aurait jamais pu commencer et qui m'ont toujours soutenu, encouragé et supporté. Pour tout ce qu'ils m'ont apporté et donné pendant ces 32 ans. À mon frère Geoffrey pour son soutien et à Yoko, pour m'avoir donné le plus beau cadeau qui puisse être, notre fille Reiko, et pour tout le reste aussi.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xii
RÉSUMÉ	xvii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1. Arterivirus	5
1.2. Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV).....	10
1.2.1. Morphologie et survie du virus.....	11
1.2.2. Protéines structurales mineures du PRRSV.....	12
1.2.2.1. La protéine mineure glycosylée de l'enveloppe virale (GP2a)	14
1.2.2.2. La protéine mineure non glycosylée de l'enveloppe virale (E).....	16
1.2.2.3. La protéine mineure glycosylée de l'enveloppe virale (GP3)	17
1.2.2.4. La protéine mineure glycosylée de l'enveloppe virale (GP4)	18
1.2.3. Protéines majeures du PRRSV	19
1.2.3.1. La protéine de la nucléocapside (N)	19
1.2.3.2. La protéine de membrane de l'enveloppe (M)	21
1.2.3.3. La glycoprotéine 5 (GP5)	22
1.2.4. Les protéines non-structurales du PRRSV et des arterivirus.....	27
1.2.5. Tropisme et entrée du virus	33
1.2.6. Réponse immunitaire adaptative.....	35
1.2.6.1. Immunité humorale.....	35
1.2.6.2. Immunité à médiation cellulaire	37
1.2.7. Modulation de la réponse immunitaire par le PRRSV	38
1.2.7.1. Interférons.....	38

1.2.7.2. Cytokines	38
1.2.7.3. Présentation d'antigène.....	39
1.2.7.4. La réponse humorale.....	39
1.2.8. La diversité génétique du PRRSV	40
1.2.9. Les vaccins contre le PRRSV	42
1.2.9.1. Généralité sur les vaccins	42
1.2.9.2. Différentes stratégies de vaccination contre le PRRSV	44
1.3. Les vaccins à base de plante.....	47
1.3.1. Statut actuel et défi	47
1.3.2. La stabilité des transgènes nucléaires intégrés	49
1.3.3. Expression transitoire avec des vecteurs viraux	51
1.3.4. Protéines pharmaceutiques dérivées du noyau	54
1.3.5. Les antigènes vaccinaux et thérapeutiques dérivant de chloroplastes	55
1.4. Adjuvants	58
1.4.1. Exemples d'adjuvant	60
1.4.2. Découverte de potentiateurs immunitaires	62
1.4.3. La protéine flagelline d'origine bactérienne.....	63
1.4.3.1. Les mécanismes sous-jacents aux effets adjuvants de la flagelline.....	68
1.4.3.2. Avantages des vaccins à base de flagelline	71
1.5. Hypothèses et Objectifs	72
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	74
2.1. Matériels consommables.....	74
2.2. Constructions des gènes d'intérêt pour l'expression chez les plantes.....	74
2.3. PCR – Réaction de polymérase en chaîne.....	77
2.4. Clonage	78
2.5. <i>Escherichia coli</i> chimio-compétentes	79
2.6. Mini-préparation d'ADN plasmidique sur terre de diatomée	79
2.7. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	81

2.8. Agroinfiltration de <i>Nicotiana benthamiana</i>	82
2.9. Extraction d'ARN et RT-PCR	83
2.10. Extraction protéique et immunobuvardage de type western	84
2.11. Immunisation des souris avec la protéine M::GP5 mutante	86
2.12. Test de dosage d'immunoabsorption par enzyme lié (ELISA) pour le PRRSV	88
2.13. Expression de la flagelline	88
2.14. Expression de la flagelline chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	89
2.15. Immunisation des souris avec la flagelline	90
2.16. Tests ELISA indirects	92
2.16.1. Anticorps sériques anti-OVA ou anti-FljB	92
2.16.2. Anticorps intestinaux anti-OVA ou FljB spécifiques	93
2.17. Test de lymphoprolifération	93
2.18. Analyses statistiques	94
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	95
3.1. Expression des protéines virales M et GP5 chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	95
3.1.1. Clonages et transformations avec les constructions obtenues	95
3.1.2. Détection des ARNm et des protéines d'intérêt	97
3.1.3. Anticorps sériques spécifiques de la GP5	99
3.2. FljB recombinante exprimée chez <i>Nicotiana benthamiana</i> comme adjuvant mucosal par administration orale	102
3.2.1. Expression de la FljB recombinante chez les plantes	102
3.2.2. Réponse humorale contre l'OVA	103
3.2.3. FljB induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'OVA	108
3.2.4. Réponse immunitaire contre la FljB	109
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	112
4.1. Expression chez les plantes des protéines M et GP5 du PRRSV	112

4.2. Effet adjuvant de la protéine FljB recombinante produite chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	118
4.3. Conclusions.....	125
APPENDICE A SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES OPTIMISÉES POUR L'EXPRESSION DANS LES PLANTES	127
APPENDICE B TABLEAU DES AMORCES	132
APPENDICE C EXPRESSION DE LA PROTEINE FLJB CHEZ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	133
APPENDICE D PROTOCOLE DE RÉGÉNÉRATION DE <i>MEDICAGO SATIVA</i>	139
RÉFÉRENCES.....	143

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1. Structure génomique des arterivirus sur le modèle de l'EAV.....	6
1.2. Schéma du cycle de réplication du PRRSV.....	7
1.3. Modèles pour la transcription chez les arterivirus	9
1.4. Modèle de la structure de la nucléocapside du PRRSV	11
1.5. Représentation schématique d'une particule de PRRSV	13
1.6. Domaines de la protéine GP5 du PRRSV isolat NA.....	24
1.7. Schéma du clivage protéolytique des polyprotéines des artérvirus	28
1.8. Diagramme de cinétique des anticorps suite à une vaccination.....	42
1.9. Schéma du système d'expression MagnICON®.....	52
1.10. Structure tertiaire d'un monomère de flagelle	63
1.11. Activation du système immunitaire par la flagelline	68
2.12. Schéma du vecteur pCAMBIA1380mod, exemple du gène <i>gp5</i>	76
2.13. Cédule d'immunisation pour le PRRSV	87
2.14. Cédule d'immunisation pour la flagelline	91
3.15. Morphologie des feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i> agroinfiltrées	96
3.16. Expression des transcrits dans les feuilles de <i>Nicotiana benthamiana</i> par RT-PCR	97
3.17. Expression des protéines recombinantes GFP, M, GP5 et M::GP5	98
3.18. Cinétique des IgG sériques des groupes	99
3.19. IgG sériques au 51 ^{ème} jour chez les souris individuelles	100
3.20. Expression de la protéine FljB	102
3.21. Cinétique de la réponse en IgG sérique anti-OVA	103
3.22. Titre en IgG au jour 48 des <i>sera</i> des souris individuelles dans chaque groupe	104
3.23. Détection des sous-types d'IgG et des IgA sériques spécifiques de l'OVA ..	105
3.24. Anticorps spécifiques de l'OVA dans les lavages intestinaux	106

3.25. Lymphoprolifération spécifique de l'OVA	108
3.26. Lymphoprolifération spécifique de la protéine FljB	109
3.27. Production d'anticorps contre la protéine FljB	110
5.1. Expression de la protéine FljB	134
5.2. Croissance des différents clones sélectionnés sur milieu de sélection	135
5.3. Expression de la protéine FljB à la génération T2	136
5.4. Germination des différents sous-clones de la génération T3	137
5.5. Expression de la protéine FljB à la génération T3	138
5.6. Régénération de <i>Medicago sativa</i>	141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1. Caractéristiques et fonctions des protéines structurales et non structurales du PRRSV	14
1.2. Effecteurs induits par la vaccination	43
1.3. Types d'adjuvants et systèmes de livraison	61
1.4. Vaccins à base de flagelline	66
2.1. Constructions et tailles des gènes d'intérêt	77
Appendice B. Tableau des amorces	132

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

°C	Degrés Celsius
2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
3CLpro	Protéase de type 3C
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADE	Augmentation dépendante des anticorps (<i>Antibody Dependent Enhancement</i>)
APC	Cellules présentatrices d'antigène (<i>Antigen-Presenting Cells</i>)
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARN sg	Acide ribonucléique sous-génomique
APS	Ammonium persulfate
BAP	6-benzylaminopurine
BeYDV	Virus du pois jaune nain (<i>Bean Yellow Dwarf Virus</i>)
BSA	Albumine sérique bovine
CaMV	Virus de la mosaïque du chou-fleur (<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CIPA	Comité institutionnel de protection des animaux
Con A	Concanavaline A
CFU	Unité formant des colonies (<i>Colony Forming Unit</i>)
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité II
CPM	Coup par minute
CPV	Parvovirus canin (<i>Canine Parvovirus</i>)

CSF	Virus de la fièvre porcine classique (<i>Classic Swine Fever Virus</i>)
CT	Toxine cholérique (<i>Cholera Toxin</i>)
CTB	Toxine B du choléra (<i>Cholera Toxin B</i>)
CTL	Lymphocyte T cytotoxique (<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
Da	Dalton
DMV	Vésicule à double membrane (<i>Double Membrane Vesicule</i>)
D.O.	Densité optique
DTS	<i>DownStream Element</i>
DTT	Dithiothréitol
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EAV	Virus de l'artérite équine
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	Dosage d'immuno-adsorption par enzyme liée (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EU	Européen
FBS	<i>Serum foetal bovin</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GFP	Protéine de fluorescence verte (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)
GST	S-Transférase du glutathion (<i>Glutathione-S-Transferase</i>)
Gus	β -Glucuronidase
HA	Hémagglutinine
HBsAg	Antigène de surface de l'hépatite B (<i>Hepatitis B surface Antigen</i>)
HBcAg	Antigène de noyau de l'hépatite B (<i>Hepatitis B core Antigen</i>)
HBV	Virus de l'hépatite B (<i>Hepatitis B Virus</i>)
HCV	Virus de l'hépatite C (<i>Hepatitis C Virus</i>)
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)

HPV-16	Papillomavirus humain 16 (<i>Human Papillomavirus 16</i>)
HRP	Peroxyde du raifort (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
HSV	Virus de l'herpes simplex (<i>Herpes Simplex Virus</i>)
ICTV	Organisation internationale sur la taxonomie des virus
Ig	Immunoglobuline
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IMC	Immunité à médiation cellulaire
IS	Index de stimulation
j	Jour
kb	Kilobase
km	Kilomètre
LDV	Virus de l'élévation de la lactate déshydrogénase
LT	Thermolabile
LTB	Toxine B thermolabile (<i>Heat-Labile Toxin B</i>)
LV	Virus Lelystad (<i>Lelystad Virus</i>)
MBD	Domaine de liaison aux métaux (<i>Metal-Binding Domain</i>)
MES	Acide 2(N-morpholino) éthanesulfonique
min	Minute
MLA	Lipide A monophosphorylé (<i>Monophosphoryl Lipid A</i>)
MLV	Vaccin vivant atténué modifié (<i>Modified Live Vaccine</i>)
MS	Murashige et Skoog
MVA	Virus de la vaccine modifiée ankara
NA	Nord-Américain
Naip5	Protéine 5 NLR inhibitrice de l'apoptose (<i>NLR family apoptosis inhibitory protein 5</i>)
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramme
NLR	NACHT contenant domaines répétés riches en leucine

Nm	Nanomètre
NP	Nucléoprotéine
nsp	Protéine non structurale (<i>Non-Structural Protein</i>)
NTP	Nucléotides triphosphates
NVCP	Protéine de la capsid du virus Norwalk (<i>Norwalk Virus Capsid Protein</i>)
OVA	Ovalbumine
ORF	Cadre ouvert de lecture (<i>Open Reading Frame</i>)
PADRE	Epitope Pan DR des cellules T auxiliaires (<i>Pan DR helper T cell epitope</i>)
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAM	Macrophages alvéolaires pulmonaires (<i>Pulmonary Alveolar Macrophages</i>)
PBMC	Cellules mononucléaires du sang périphérique (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Solution saline tamponnée en phosphate (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCP	Protéinase cystéine de type papaïne (<i>Papain-like Cystein Protease</i>)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFU	Unité formant des plaques (<i>Plaque forming unit</i>)
pH	Potentiel hydrogène
PI	<i>Post infection</i>
PPS	Sulfure de polypropylène
PRR	Récepteur de reconnaissances de motif (<i>Pattern Recognition Receptor</i>)
PRRS	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
PRRSV	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RE	Réticulum endoplasmique
RFS	Élément du saut ribosomal (<i>Ribosomal FrameShift</i>)
RTC	Complexe de réplication/traduction (<i>Replication/Translation Complex</i>)
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>

s	Seconde
SAUR	<i>Small Auxin Up RNAs</i>
SDS	sodium dodécylsulfate
SH	Schenk and Hildebrandt
SHFV	Virus de la fièvre hémorragique simienne (<i>Simian Hemorrhagic Fever Virus</i>)
siARN	Petits ARN interférents (<i>small interfering RNA</i>)
SICM	Système immunitaire commun aux muqueuses
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne (<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>)
SOCS-1	Suppresseur de la signalisation des cytokines -1
S-PTGS	Interférence au gène <i>post</i> -traductionnel des ARN sens (<i>Sense Post-Transcriptional Gene Silencing</i>)
TCID ₅₀	50% de la dose infectieuse des tissus en culture
TDZ	Thidiazuron
TEMED	N,N,N',N' -tétraméthyléthylènediamine
TEV	Virus de la gravure du tabac (<i>Tobacco Etch Virus</i>)
TGF- β	Facteur transformant de croissance β
Th1	T auxiliaires 1 (<i>T helper 1</i>)
Th2	T auxiliaires 2 (<i>T helper 2</i>)
TLR	Récepteur de type toll (<i>Toll Like Receptor</i>)
TMB	3, 3', 5, 5' -Tetramethyl-benzidine
TMV	Virus de la mosaïque du tabac (<i>Tobacco Mosaic Virus</i>)
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
TNV	Test de neutralisation virale
TRS	Séquences de régulation de la transcription (<i>Transcription Regulation Sequences</i>)
UTR	Région non-traduite (<i>UnTranslated Region</i>)
VLP	Particules de type viral (<i>Viral Like Particule</i>)
Wt	Type sauvage (<i>Wild type</i>)

RÉSUMÉ

Ce projet avait pour but la production de protéines recombinantes pour des procédures vaccinales dans un système végétal. Les protéines choisies ont été d'une part, deux protéines virales d'un *Arterivirus*, le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV), les protéines GP5 et M, et d'autre part une protéine du flagelle, la flagelline ou FljB de *Salmonella typhimurium*. Le PRRSV est responsable de pertes économiques majeures dans l'industrie porcine mondiale et l'efficacité des vaccins actuels contre ce virus est limitée. La protéine M a été choisie pour sa propriété à former un hétérodimère avec la protéine GP5 qui augmente la réponse immunitaire. La glycoprotéine GP5, quant à elle, possède deux épitopes dans sa région N-terminale dont un joue un rôle majeur puisqu'il est capable de stimuler la production d'anticorps neutralisants nécessaires à la clairance du virus. Enfin FljB, qui est une protéine bien conservée chez les bactéries Gram négatives, a été retenue pour ses propriétés adjuvantes intéressantes de par sa capacité à se lier au récepteur 5 de type *toll* (TLR5) et à induire des réponses immunitaires systémiques et mucosales. Les hypothèses pour cette étude étaient que la production d'une protéine recombinante M::GP5 intégrant trois mutations (M::GP5mut) à des sites stratégiques de celle-ci induirait une meilleure réponse immunitaire que la protéine GP5 sauvage ; que l'administration par voie orale de plante produisant la protéine M::GP5mut induirait une immunité protectrice contre le PRRSV ; que les propriétés adjuvantes de FljB produite chez *Nicotiana benthamiana* devraient être comparables à celles de FljB recombinante produite chez *E. coli*. Pour répondre à ces questions, un système transitoire d'expression chez *N. benthamiana* a été choisi. Il a l'avantage de pouvoir produire des protéines rapidement et à des niveaux élevés. L'immunogénicité de la protéine M::GP5mut, et les propriétés adjuvantes de la flagelline ont été testées dans un système murin. Dans le cas de la flagelline, l'ovalbumine (OVA) a été choisie comme immunogène. Peu de résultats ont été obtenus dans le cadre du projet des protéines du PRRSV du fait de l'absence de production de celles-ci à un niveau détectable bien que la présence des ARNm ait été confirmée. En revanche, pour FljB, il a été montré que l'administration par voie orale de celle-ci induisait une réponse immunitaire contre l'OVA d'une intensité égale à celle produite par l'administration du mélange OVA avec de la FljB recombinante produite par *E. coli* et supérieure à celle de l'OVA administrée seule. De plus FljB recombinante produite dans *N. benthamiana* a permis d'obtenir une réponse plus précoce qu'avec l'utilisation de FljB recombinante produite chez *E. coli*. En conclusion il a pu être montré grâce à FljB que le système de production utilisé était efficace et que FljB est un bon adjuvant qui conserve ses propriétés quand elle est produite chez *N. benthamiana*.

Mots clés : PRRSV ; FljB ; expression transitoire ; adjuvant ; réponse immunitaire ; *Nicotiana benthamiana*

INTRODUCTION

L'utilisation des systèmes végétaux comme bioréacteur pour la production de protéines est une alternative intéressante au système plus conventionnel que sont les bactéries, les cellules animales ou d'insectes et les levures. L'utilisation de plantes procure de nombreux avantages aussi bien économiques que pratiques. La production de plantes ne nécessite pas d'installation particulière contrairement aux autres systèmes. Les plantes permettent la plupart des modifications *post*-traductionnelles produites par les autres systèmes eucaryotes comme le repliement des protéines, les ponts disulfures, les glycosylations (Abranches *et al.*, 2005 ; Daniell *et al.*, 2009 ; Vezina *et al.*, 2009). Les protéines recombinantes exprimées chez les plantes nécessitent peu ou pas d'étape de purification pour une utilisation par voie orale. De plus, le transfert de maladies de l'hôte végétal à l'humain reste peu probable (Daniell *et al.*, 2009). Parmi les protéines recombinantes produites par des plantes, plusieurs sont d'intérêts thérapeutiques ou vaccinaux. Dans cette étude, deux protéines immunogéniques du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (PRRSV) ont été choisies, M et GP5, ainsi qu'une protéine bactérienne du flagelle aux propriétés adjuvantes, la flagelline ou FljB.

Le syndrome reproducteur et respiratoire du porc (PRRS) est une maladie virale responsable de l'une des pertes les plus importantes au niveau économique dans l'industrie porcine mondiale (Dea *et al.*, 2000). Ce syndrome est apparu en Amérique du Nord en 1987 et est depuis endémique. Cette maladie est caractérisée par de nombreux symptômes tels que des problèmes de reproduction chez les porcs (des portées réduites, une augmentation des naissances précoces, des avortements) ou des problèmes respiratoires chez les porcelets (pneumonies, dyspnées, toux) (Bilodeau *et al.*, 1991 ; Kristensen *et al.*, 2004 ; Wensvoort *et al.*, 1992).

L'agent causal de cette maladie, le PRRSV, a été identifié en 1991. Il possède trois protéines de structure majeures, GP5, M et N, codées par les cadres

ouverts de lecture (ORF) 5, 6 et 7, respectivement (Meulenberg *et al.*, 1995, 1995). La protéine N est la seule protéine de la nucléocapside du virus (Wootton et Yoo, 2003) et est très immunogène bien que ne possédant pas d'épitopes neutralisants (Meulenberg *et al.*, 1998). La protéine M est une protéine membranaire qui forme un hétérodimère avec la protéine GP5 (Mardassi *et al.*, 1996). La formation de celui-ci a été démontrée pour augmenter la production d'anticorps neutralisants (Jiang *et al.*, 2006). Enfin, la glycoprotéine GP5 porte deux épitopes dont un est impliqué dans la production d'anticorps neutralisants (Ostrowski *et al.*, 2002), ce qui en fait une protéine de choix pour le développement de vaccin mais c'est aussi la protéine avec la variabilité génétique la plus importante au sein du PRRSV (Andreyev *et al.*, 1997 ; Meng *et al.*, 1995). Il existe deux génotypes connus à ce jour pour ce virus : le génotype européen (EU) (type 1) représenté par la souche Lelystad et le génotype nord américain (NA) (type 2) associé à la souche VR-2332. La variabilité génétique et antigénique au sein du même génotype (Goldberg *et al.*, 2000 ; Kapur *et al.*, 1996 ; Meng, 2000) et la faible réponse immunitaire générée par le PRRSV en font un virus difficile à combattre. Les approches vaccinales expérimentées actuellement permettent difficilement de contenir les épidémies causées par le virus dues aux problèmes posés par l'hétérogénéité du virus entre les différentes souches (Meng, 2000). Au niveau du cheptel, l'efficacité des vaccins à base de virus inactivés n'est pas toujours suffisante du fait de leur faible immunogénicité (Meng, 2000). Les vaccins à base de virus vivants atténués, quant à eux, sont controversés à cause de la possible réversion du virus en un virus virulent (Botner *et al.*, 1997 ; Madsen *et al.*, 1998). Chez le porc, les vaccins à base de plasmides recombinants (Pirzadeh et Dea, 1998) ou de vecteurs viraux comme les adénovirus recombinants de première génération (Gagnon *et al.*, 2003 ; Kheyar *et al.*, 2005) n'induisent encore qu'une réponse en anticorps faible et tardive, particulièrement pour les anticorps neutralisants. Ces différentes approches vaccinales, bien qu'induisant une réponse en anticorps et une immunité à médiation cellulaire (IMC) spécifiques, ne sont pas encore capables de prévenir ou d'enrayer l'infection dans des conditions expérimentales ou de champ.

De plus, lors du développement d'un vaccin, le choix de l'adjuvant est important pour l'optimisation de la réponse immunitaire. Actuellement, les adjuvants à base d'aluminium ainsi que le MF59 (adjuvant de type émulsion huile dans eau) sont les plus utilisés en vaccination systémique humaine (Reed *et al.*, 2009). Pour les adjuvants mucosaux, aucun n'a encore été commercialisé pour la vaccination (Silin *et al.*, 2007). Parmi les adjuvants dérivés de protéines bactériennes les plus étudiés, il peut être cité la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) de *Vibrio cholera*, la protéine thermolabile (LT) d'*Escherichia coli* et la protéine du flagelle, la flagelline.

La flagelline est une protéine bactérienne du flagelle dont les domaines sont bien conservés au sein des bactéries gram négatives et qui est capable d'interagir avec le TLR5 exprimé à la surface des cellules épithéliales et immunitaires (Miao *et al.*, 2007). La flagelline de par sa liaison au TLR5 est capable d'induire une réponse mucoale au niveau des *epithelia* intestinaux et pulmonaires (Gewirtz *et al.*, 2001 ; Rhee *et al.*, 2004). De plus, la flagelline est aussi capable d'induire une réponse immunitaire robuste de type T auxiliaire 1 (Th1) (Pino *et al.*, 2005). Ces différentes caractéristiques font de la flagelline un bon candidat comme adjuvant mucoal.

Les vaccins utilisés pour lutter contre le PRRSV n'étant pas suffisamment efficaces, la présente étude propose comme alternative aux procédures vaccinales utilisées actuellement, l'administration de plantes exprimant les protéines GP5 et M par voie orale dans le but de stimuler l'immunité mucoale. Le virus du PRRSV étant un virus qui rentre par les muqueuses des voies respiratoires, il est pertinent de vouloir protéger l'animal au lieu de l'entrée du virus. De plus, le système immunitaire commun aux muqueuses (SICM) permet d'immuniser une muqueuse (par exemple, l'intestin) et d'en protéger une autre (par exemple, les poumons) (Foss et Murtaugh, 2000 ; Holmgren *et al.*, 2003 ; Ogra, 2000 ; Saif, 1999). Pour maximiser la réponse immunitaire, l'utilisation d'un adjuvant mucoal est nécessaire. La flagelline pourrait permettre en plus de l'induction d'une réponse immunitaire mucoale, l'induction d'une immunité systémique capable de lutter contre la virémie et la persistance virale. Cette combinaison pourrait permettre d'induire une immunité mucoale et systémique

optimale et protectrice pour contrer la souche IAF-Klop du PRRSV choisie pour cette étude.

Les protéines GP5, M et FljB, destinées à stimuler le système immunitaire de l'hôte, ont été exprimées dans un système d'expression transitoire utilisant le vecteur d'expression binaire pCAMBIA et la plante *Nicotiana benthamiana*. Ce système a l'avantage de pouvoir produire rapidement les protéines d'intérêt, généralement sept jours après agroinfiltration. Les protéines produites dans les plantes ont servi ensuite pour des tests d'immunisation chez la souris pour évaluer le potentiel des différentes protéines. Dans une première expérience d'immunisation, l'immunogénicité de la protéine de fusion mutante M::GP5 a été testée par l'administration par voie orale de poudre de tabac lyophilisée contenant la protéine M::GP5mut à des souris. D'autre part, les propriétés adjuvantes de la protéine FljB produite chez les plantes ont été testées chez la souris par administration par voie orale en utilisant comme immunogène l'ovalbumine.

Cette thèse sera articulée autour des résultats obtenus pour les protéines du PRRSV et de la flagelline produites chez *Nicotiana benthamiana*. Elle comporte une revue de littérature ainsi qu'une discussion générale. La discussion générale porte sur les difficultés rencontrées avec les protéines du PRRSV ainsi que des hypothèses permettant de comprendre les résultats obtenus pour cette partie. La deuxième partie de la discussion met en avant les avantages de l'utilisation de la flagelline produite chez les plantes par rapport à la flagelline produite chez *Escherichia coli*. Enfin la discussion se termine sur une conclusion ouvrant sur les perspectives de ces projets.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. Arterivirus

Le genre *Arterivirus* fait partie de la famille des *Arteriviridae* créée en 1996 lors du 10^{ème} congrès international de virologie à Jérusalem. Cette famille ainsi que celles des *Coronaviridae* et des *Roniviridae* font partie de l'ordre des *Nidovirales* (Cavanagh, 1997).

Le genre *Arterivirus* est composé de quatre virus : le virus de l'élévation de la lactate déshydrogénase (LDV), le virus de l'artérite équine (EAV), le virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV) et le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV). L'EAV est le virus prototype de la famille des *Arterivirus*. Il a été isolé pour la première fois près de Bucyrus, Ohio, USA, en 1953 (Bryans *et al.*, 1957 ; Bryans *et al.*, 1957).

L'organisation génomique et la stratégie d'expression des quatre artérovirus sont très conservées comme l'ont montré les différentes études sur leur caractérisation moléculaire [EAV (de Vries *et al.*, 1990 ; de Vries *et al.*, 1992 ; den Boon *et al.*, 1991), LDV (Godeny *et al.*, 1993 ; Godeny *et al.*, 1990 ; Kuo *et al.*, 1992), SHFV (Godeny *et al.*, 1995 ; Zeng *et al.*, 1995) et PRRSV (Conzelmann *et al.*, 1993 ; Meulenberg *et al.*, 1993 ; Meulenberg *et al.*, 1995)]. Ces particularités ont poussé le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) en 1996 à placer la famille des *Arteriviridae* dans le nouvel ordre des *Nidovirales* avec la famille des *Coronaviridae* et des *Roniviridae* (Cavanagh, 1997). Les membres de l'ordre des *Nidovirales* sont des virus enveloppés à acide ribonucléique (ARN) linéaire simple brin d'orientation positive. Leur organisation génomique ainsi que leur stratégie de réplication sont très similaires mais leur complexité génétique et l'architecture de leur

virion sont très différentes. « Nido » vient du latin *nidus* qui signifie nid en référence à l'ensemble des ARN messagers (ARNm) sous-génomiques (sg) imbriqués dans la région 3' co-terminale qui est produit lors de la réplication de ces virus dans leur cellule hôte (Balasuriya et Snijder, 2008) (**Figure 1.1 et 1.2**).

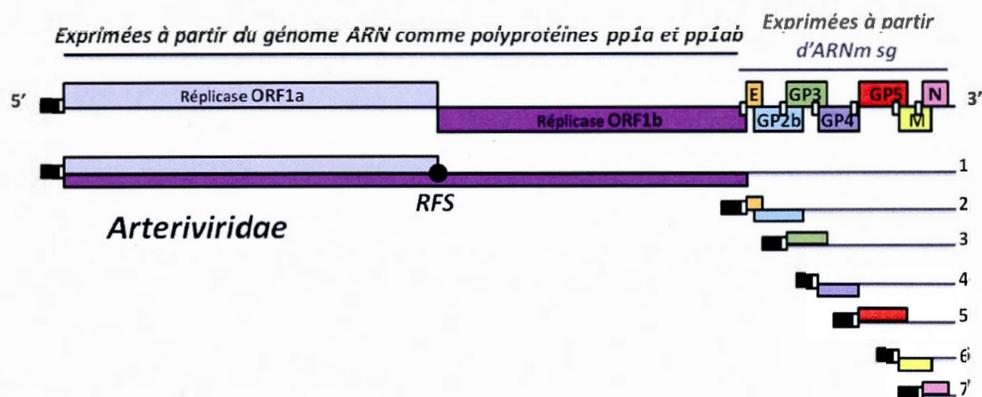


Figure 1.1. Structure génomique des *Arterivirus* sur le modèle de l'EAV. Les chiffres de 1 à 7 identifient les ARNm sg correspondant aux ORF 1 à 7, respectivement. Le nom des gènes est indiqué dans les cadres. La transcription des ARNm sg se fait grâce à la présence de la séquence *leader* (boîte noire) et de la séquence de régulation de la transcription (TRS) (boîte blanche) trouvées dans la région 5' terminale de tous les ARNm de l'EAV. L'élément de saut ribosomal (RFS), indiqué par un point noir, permet la traduction de l'ORF1b. La partie traduite de chaque ARNm correspond aux boîtes colorées (d'après Pasternak *et al.*, 2006).

Le génome des *Arterivirus* est une molécule d'ARN de 12-16 kilobases (kb) (den Boon *et al.*, 1991) contenant de 9 à 12 ORF (**Figure 1.1**). Les trois quart de leur génome sont occupés par deux larges ORF, l'ORF1a et 1b, qui ensemble codent pour les protéines associées aux fonctions enzymatiques virales (généralement regroupées sous le terme de « réplicase ») requises pour la réplication du génome et la production des ARNm sg (Molenkamp *et al.*, 2000). La traduction de l'ORF1a permet l'obtention de la poly-protéine pp1a de 1727 à 2502 acides aminés. L'élément du saut ribosomal (RFS) (efficacité du saut estimée à 15-20%) situé à la fin de l'ORF1a permet la traduction de l'ORF1b qui code pour la polyprotéine pp1ab de 3175 à 3959

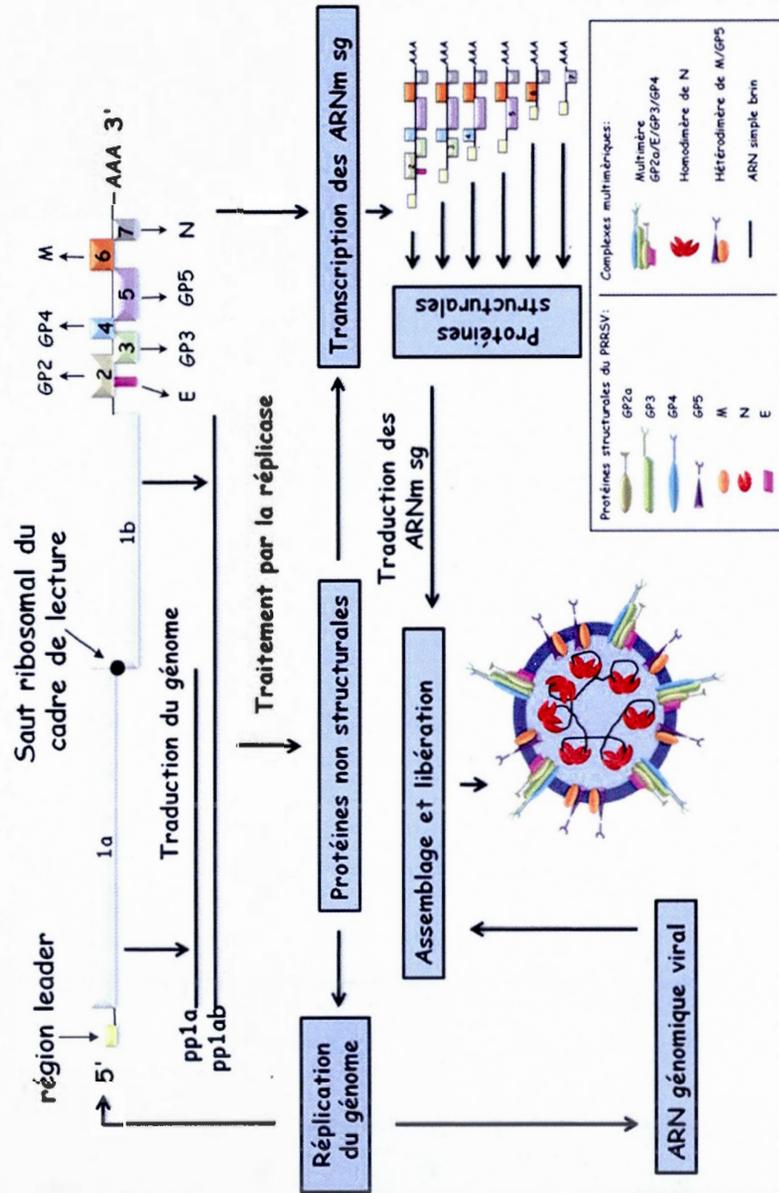


Figure 1.2. Schéma du cycle de réplication du PRRSV. Les polyprotéines 1a et 1ab (pp1a et pp1ab) sont exprimées à partir du génome viral. Les protéines structurales sont exprimées à partir des ARNm sous-génomiques (sg) 2 à 7. Le cadre en 5' de l'ARN représente la région leader et le rond noir indique le saut ribosomal du cadre de lecture responsable de la synthèse de pp1ab (d'après Music et Gagnon, 2010). Le clivage des protéines non structurales est résumé sur le schéma de la Figure 1.7.

acides aminés (den Boon et al., 1991) (**Figure 1.1**). La région chevauchante des ORF1a/1b contient un signal qui provoque un saut du cadre de lecture appelé séquence « glissante » (den Boon *et al.*, 1991). L'actuel site du saut du cadre de lecture ribosomal est une structure présente en amont du pseudo-nœud d'ARN (den Boon *et al.*, 1991). Le processus auto-protéolytique de la réplicase pp1a et pp1ab permet la production de 13 à 14 protéines non-structurales (nsp) et des produits intermédiaires (van Aken *et al.*, 2006 ; Ziebuhr *et al.*, 2000).

L'ARN génomique sert de matrice pour la synthèse des ARNm sg. Deux modèles sont proposés quant aux modes de transcription et de réplication de l'ARN génomique chez les *Nidovirus*. Le modèle de la transcription initiée par le *leader* (**Figure 1.3A**) (Baric *et al.*, 1983 ; Lai *et al.*, 1984 ; Spaan *et al.*, 1983) tend à être remplacé de plus en plus par le deuxième modèle dit de l'extension discontinue du brin d'ARN moins (**Figure 1.3B**) (Sawicki et Sawicki, 1995). Dans ce modèle, la synthèse des ARN sg d'orientation négative est produite de façon discontinue. Une séquence *anti-leader* vient se fixer sur une séquence *anti-TRS* complémentaire de la séquence de régulation de la transcription (TRS) du génome d'ARN pour produire un ARN sg d'orientation négative qui servira de matrice pour la production de l'ARNm sg correspondant [revue par (Pasternak *et al.*, 2006 ; Sawicki *et al.*, 2007)] (**Figure 1.3B**).

Les ARNm sg produits permettent la traduction des protéines structurales majeures virales [G_L (EAV) ou GP5, M et N] et mineures (GP2, GP3, GP4 et E). Les particules d'artérovirus formées de cet assemblage protéique unique de sept protéines ne montrent peu ou pas de ressemblance avec les particules d'autres virus animaux à ARN (Balasuriya et Snijder, 2008). Des analyses récentes de la structure des cristaux du domaine C-terminal de la protéine N du PRRSV (Doan et Dokland, 2003) supportent l'idée que la capsid des artérovirus a une structure unique probablement en forme d'hélice (Spilman *et al.*, 2009). L'enveloppe qui l'entoure contient deux importants oligomères de protéines, un hétérodimère M-GP5 et un hétérotrimère GP2a-GP3-GP4 ou GP2b-GP3-GP4. Des études de génétique inverse chez l'EAV et

le PRRSV ont montré que ces sept protéines de structure sont essentielles pour la production de progénitures infectieuses (Molenkamp *et al.*, 2000 ; Wissink *et al.*, 2005).

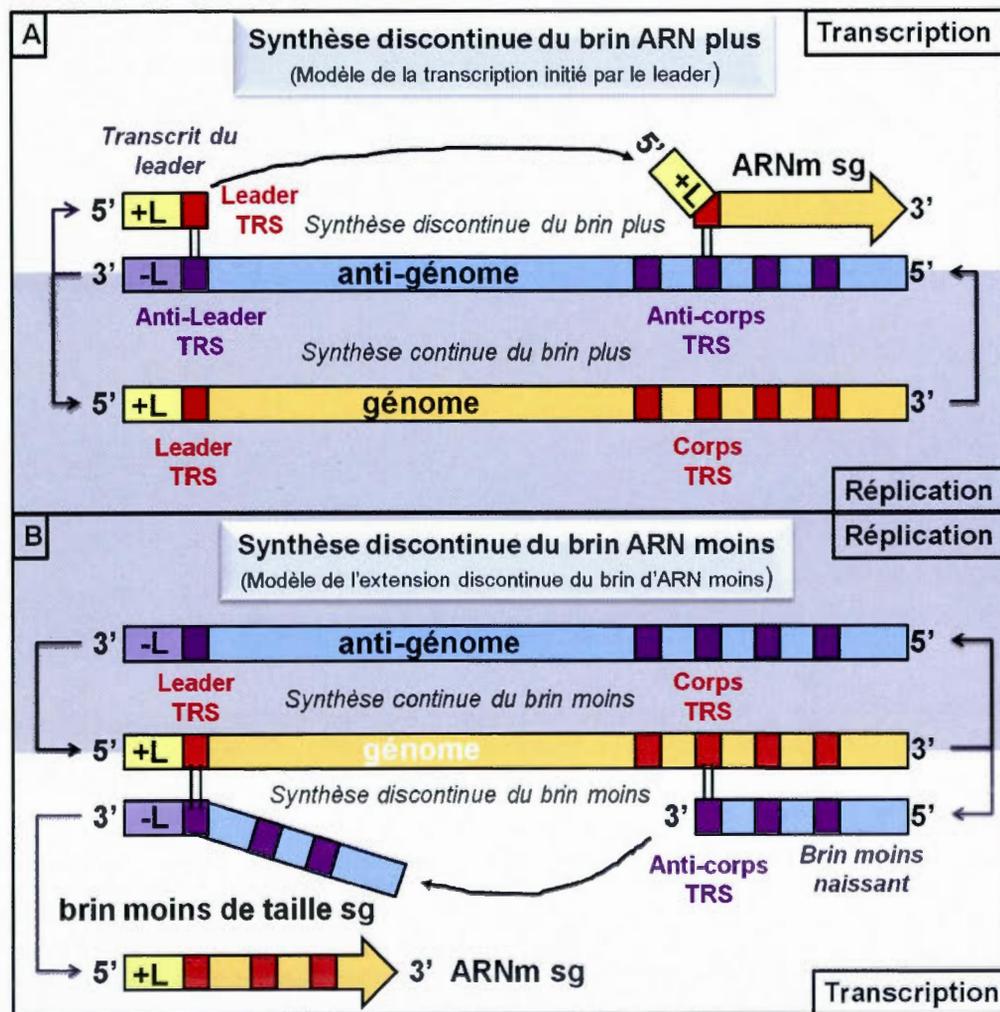


Figure 1.3. Modèles pour la transcription chez les *Arterivirus*. (A) Le modèle de la transcription initiée par le *leader* qui propose que le brin d'ARN positif soit synthétisé à partir de l'anti-génome comme matrice, est à la fois continu (production d'un nouveau génome d'ARN) ou discontinu (synthèse d'ARNm sg). Suivant la transcription de l'amorce *leader* (+L) à partir de l'extrémité 3' de l'anti-génome, le TRS *leader* dans cette amorce va s'apparier avec l'anti-corps TRS dans l'anti-génome TRS et va être allongé pour produire un ARNm sg. (B) Modèle basé sur l'extension discontinue de la synthèse du brin moins d'ARN (Sawicki & Sawicki 1995) lequel

propose que le brin d'ARN moins puisse être à la fois continu (production de l'anti-génome) ou discontinu (synthèse des brins moins de taille sg). Le corps TRS dans le génome agirait comme un signal d'atténuation pour la synthèse des brins moins d'ARN, après quoi le brin moins naissant, qui possède un anti-corps TRS dans la région 3' terminale, serait redirigé vers la région 5' proximale de la matrice, guidé par une interaction d'appariement de base avec le TRS *leader*. Suivant l'addition d'un anti-*leader* (-L) aux brins moins naissants, les brins moins de taille sg serviront de matrice pour la transcription (d'après Pasternak *et al.*, 2006).

Les virus les plus étudiés de cette famille sont l'EAV qui est le virus prototype des *Arterivirus* et le PRRSV pour son impact économique majeur dans l'industrie porcine mondiale.

1.2. Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV)

Le virus du PRRSV, responsable du syndrome reproducteur et respiratoire porcin, a été identifié pour la première fois en 1991 aux États-Unis et aux Pays-Bas (Benfield *et al.*, 1992 ; Wensvoort *et al.*, 1991). C'est un virus endémique qui épargne peu de pays, qui induit une virémie prolongée, soit une infection persistante et qui a une prédilection pour les macrophages alvéolaires (Plagemann et Moennig, 1992). L'infection se manifeste par de nombreux symptômes dont des cyanoses des extrémités, des avortements, des mises bas prématurées, des mort-nés, des momifications fœtales et des troubles respiratoires. L'infection peut être transmise par voie directe : par voie horizontale par contact entre porcs infectés et naïfs ou par semence infectée (Bierk *et al.*, 2001 ; Christopher-Hennings *et al.*, 1995), par voie verticale au milieu et à la fin de la gestation (Christianson *et al.*, 1993 ; Christianson *et al.*, 1992), ou par voie indirecte (par transport d'animaux, de matériels contaminés ou par aérosol) (Dee *et al.*, 2009 ; Kristensen *et al.*, 2004).

1.2.1. Morphologie et survie du virus

La morphologie du virus du PRRSV purifié sur gradient de chlorure de césium apparaît en microscopie électronique à contraste négatif grossièrement sphérique, voire parfois ovale et d'un diamètre d'environ 55 nm. Le virion a aussi été analysé par microscopie cryo-électronique qui permet de faire abstraction des distorsions associées au contraste négatif ainsi que de certains artefacts (Dokland et Lee, 2006). Par cette méthode, le virion apparaît rond ou de forme ovale de 50 à 74 nm de diamètre avec une moyenne de 54 nm. Le virion possède une nucléocapside d'un diamètre moyen de 34 nm, laquelle est séparée de l'enveloppe par un espace de 2 à 3 nm (Spilman *et al.*, 2009).

Un modèle pour le cœur de la nucléocapside des arterivirus avait été proposé dans lequel le domaine C-terminal du dimère de N formait une coquille monocouche alors que le domaine N-terminal de liaison à l'ARN interagissait avec l'ARN à l'intérieur de cette coquille (Deshpande *et al.*, 2007 ; Doan et Dokland, 2003). Les données présentées dans l'article de Spilman *et al* (2009) ont suggéré un modèle alternatif dans lequel le cœur de la nucléocapside possède deux couches de dimère de N qui forment une chaîne liée (**Figure 1.4**). La conformation de l'ARN dans la nucléocapside reste pour le moment inconnue (Spilman *et al.*, 2009). La nucléocapside serait organisée sous forme d'hélice (Spilman *et al.*, 2009).

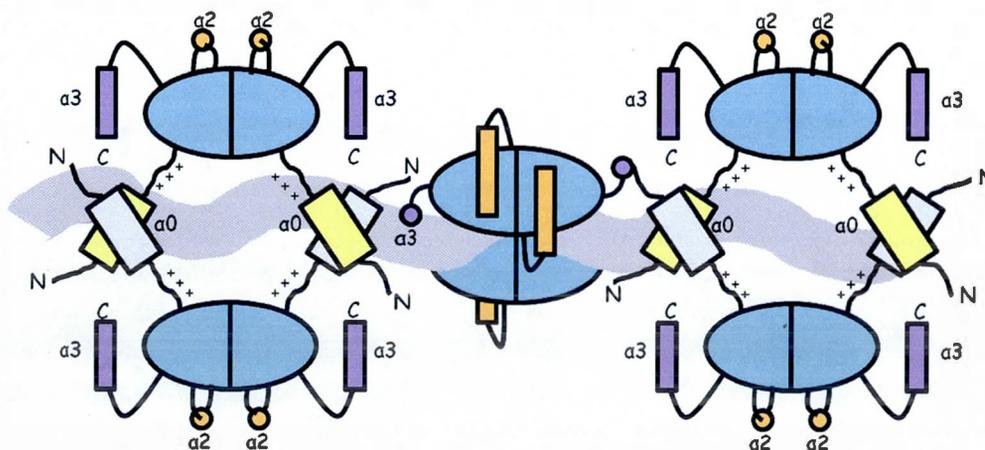


Figure 1.4. Modèle de la structure de la nucléocapside du PRRSV. Le feuillet β du dimère de la protéine N est représenté schématiquement par les formes ovales bleues et est flanqué par deux hélices α , $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (cercles ou rectangles oranges et cercles ou rectangles violets, respectivement). Les domaines N- et C-terminaux sont indiqués et les structures secondaires sont numérotées suivant celle de Doan et Dokland (2003). Les hélices α prédites ($\alpha 0$) dans le domaine de liaison à l'ARN sont montrées par des rectangles gris clairs et jaunes. La forme sinusoïdale grise représente l'ARN viral interagissant avec les charges positives des résidus dans le domaine N-terminal (indiqué par +) (d'après Spilman *et al.*, 2009).

Le virus du PRRSV étant un virus à enveloppe, sa survie à l'extérieur de l'hôte est affectée par plusieurs facteurs dont la température, le pH et l'exposition aux détergents (Music et Gagnon, 2010). L'infectiosité du virus ne change pas après quatre mois à -70 degrés Celsius ($^{\circ}\text{C}$) et un mois à 4°C , mais est inactivée après 48 heures (h) à 37°C et 45 minutes (min) à 56°C (Benfield *et al.*, 1992). Cette équipe rapportait de plus que le PRRSV pouvait survivre à une exposition de 20 min à 56°C , de 24 h à 37°C et de 6 jours (j) à 21°C (Benfield *et al.*, 1992). Ils montraient aussi que le chloroforme, un solvant lipidique, était capable de réduire l'infectiosité du virus en perturbant l'enveloppe virale et en arrêtant l'infectiosité du virion alors que le fluorocarbène, un autre solvant lipidique, n'avait pas d'effet (Benfield *et al.*, 1992). Le pH affecte aussi l'infectiosité du PRRSV. Entre les pH 6,5 et 7,5, elle reste stable mais diminue à un pH < 6,0 ou un pH > 7,65 (Bloemraad *et al.*, 1994). Ceci implique que des conditions favorables (vent, température, humidité) permettent au PRRSV de se disséminer dans la nature comme il a été rapporté par une équipe qui a pu suivre sa dispersion par aérosol jusqu'à 4,7 kilomètres (km) (Dee *et al.*, 2009).

1.2.2. Protéines structurales mineures du PRRSV

Le PRRSV possède trois protéines mineures N-glycosylées au niveau de l'enveloppe, GP2a, GP3 et GP4 qui sont traduites à partir de l'ORF2a, 3 et 4, respectivement (Gonin *et al.*, 1998 ; Meulenberg *et al.*, 1997) et une protéine mineure non glycosylée, la protéine E, traduite à partir de l'ORF2b qui est enchassé dans

l'ORF2a (Wu et al., 2001). Les protéines GP2a, GP3 et GP4 se retrouvent à la surface du virion sous la forme d'un hétérotrimère liées par des ponts disulfures auxquels la protéine E pourrait aussi se lier pour former un complexe multimérique (Wissink et al., 2005) (**Figure 1.5**). Ces complexes pourraient avoir un rôle important pour l'infectiosité du virus (Wissink et al., 2005).

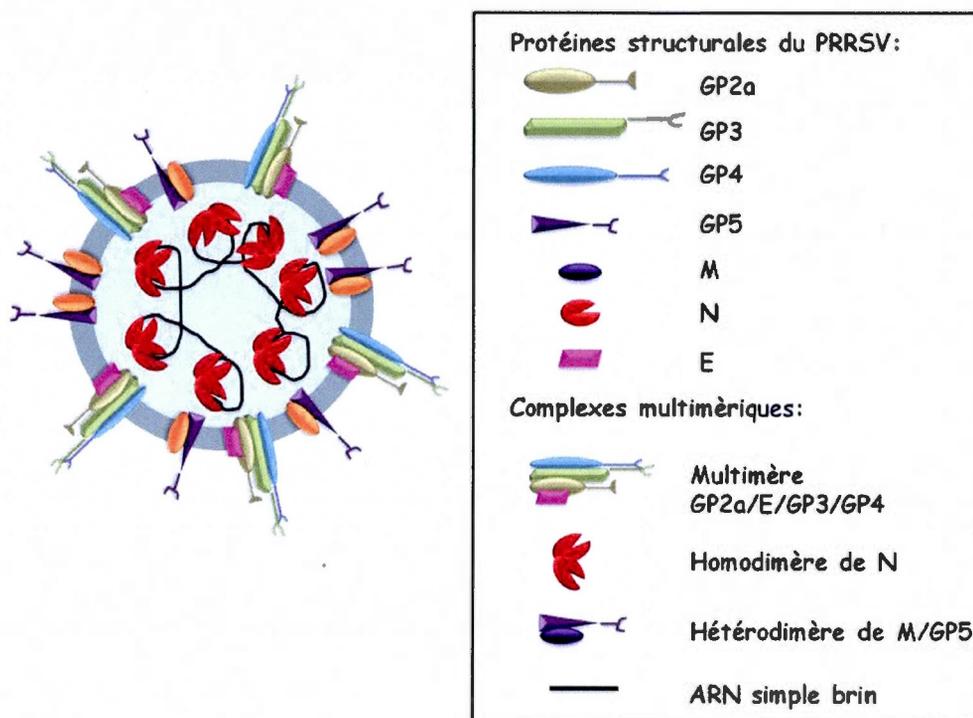


Figure 1.5. Représentation schématique d'une particule de PRRSV. La localisation des protéines de structure : GP2a, E, GP3, GP4, GP5, M et N (codées par les ORF 2 à 7 respectivement) est montrée par les différentes formes. Le génome d'ARN est simple brin et entouré par les protéines de la nucléocapside (N) qui sont les seules composantes de celle-ci et qui forment des homodimères. La glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale (GP5) forme un hétérodimère avec la protéine de la membrane non-glycosylée (M) à la surface du virion. Les protéines mineures structurales (GP2a, E, GP3 et GP4) sont incorporées dans le virion sous forme de complexes multimériques (d'après Music et Gagnon, 2010).

1.2.2.1. La protéine mineure glycosylée de l'enveloppe virale (GP2a)

La protéine GP2a possède 256 ou 249 acides aminés en fonction pour les souches NA et EU respectivement (Meulenberg *et al.*, 1995) (**Tableau 1.1**). C'est une protéine putative intégrale de la membrane de classe I de 29 à 30 kilodaltons (kDa) avec une séquence signal dans sa région N-terminale et un domaine d'ancrage membranaire dans sa région C-terminale (Meulenberg *et al.*, 1995). La protéine GP2a contient deux domaines hydrophobes distincts et partage deux sites de glycosylation N-liée hautement conservés entre les souches NA et EU (Meulenberg *et al.*, 1995, 1995 ; Morozov *et al.*, 1995 ; Wissink *et al.*, 2004). L'analyse de cette protéine chez des virus mutants montre que les glycanes N-liés ne sont pas essentiels pour la formation de particules virales et n'affectent pas particulièrement l'infectiosité du virus (Wissink *et al.*, 2004).

Une étude sur des mutants de délétion de l'isolat P129 de la souche NA du PRRSV a montré que l'élimination de l'ORF2 qui code pour les protéines GP2a et E (ou de l'ORF4, qui code pour la protéine GP4), est non-viable dans les cellules MARC-145 et les macrophages pulmonaires alvéolaires (PAM), indiquant que ces deux gènes sont essentiels pour la réplication du virus (Welch *et al.*, 2004).

En utilisant le *phage display*, trois épitopes faiblement antigéniques de cellules B ont été identifiés dans la protéine GP2a aux positions 36 à 51, 117 à 139 et 120 à 142 en acides aminés (Oleksiewicz *et al.*, 2002). Lima *et al.* (2006) ont, quant à eux, trouvé deux épitopes linéaires réagissant avec neuf des quinze *sera* de porcs utilisés dans leur étude aux positions 41 à 55 et 121 à 135 en acides aminés (de Lima *et al.*, 2006).

Tableau 1.1. Caractéristiques et fonctions des protéines structurales et non structurales du PRRSV (d'après Music et Gagnon, 2010)

Protéines	Gènes	Nombre d'acides aminés		Caractéristiques et fonctions
		Souche EU	Souche NA	
nsp1	ORF1a	385	383	nsp régulatrice multifonctionnelle (maturation, transcription, biogénèse du virion) ; activités protéolytiques ; inhibition de l'IFN nsp, la plus large des protéines répliques du PRRSV; Différence génétique majeure entre les souches EU et NA; activités protéolytiques ; inhibition de l'IFN nsp, activités protéolytiques; nsp4 : inhibition de l'IFN
nsp2	ORF1a	861	980	
nsp3	ORF1a	447	446	
nsp4	ORF1a	203	204	
nsp5	ORF1a	170	170	
nsp6	ORF1a	16	16	
nsp7	ORF1a	269	259	
nsp8	ORF1a	45	45	
nsp9	ORF1b	645	640	
nsp10	ORF1b	442	441	
nsp11	ORF1b	224	223	
nsp12	ORF1b	152	153	
GP2a	ORF2a	249	256	Protéine structurale mineure; contient 2 sites putatifs de N-glycosylation hautement conservés; essentielle pour l'infectiosité du virus; forme un complexe multimérique avec E, GP3et GP4; protéine d'attachement virale.
E	ORF2b	70	73	Protéine structurale mineure non-glycosylée et myristoylée; essentielle pour l'infectiosité du virus; forme un complexe multimérique avec GP2a, GP3et GP4; possède des propriétés de type canal ionique; viroporine potentielle dans l'enveloppe.
GP3	ORF3	265	254	Protéine de structure mineure; l'une des plus variables; hautement glycosylée avec 7 oligosaccharides N-liés potentiels; topologie membranaire dépendante de la souche; hautement antigénique et peut être impliquée dans la neutralisation virale; essentielle pour l'infectiosité virale; forme un complexe multimérique avec E, GP2a et GP4.
GP4	ORF4	183	178	Protéine structurale mineure hautement glycosylée (4 glycosylations N-liées); essentielle pour l'infectiosité virale, rôle clé dans la formation du complexe avec E, GP2a et GP3; connecte l'interaction entre le complexe multiprotéique des glycoprotéines mineures virales et GP5; attachement protéique virale et peut être impliquée dans la neutralisation virale.

GP5	ORF5	200	201	Protéine structurale majeure transmembranaire avec un nombre variable de sites potentiels de N-glycosylation, la plus variable des protéines de structure avec GP3; impliquée dans la neutralisation virale et la protection; association GP5/M cruciale pour l'assemblage du virus; protéine d'attachement viral; impliquée dans l'entrée du virus dans les cellules hôtes et dans le phénomène d'apoptose.
M	ORF6	173	174	Protéine structurale majeure non-glycosylée la plus conservée; rôle clé dans l'assemblage et le bourgeonnement du virus; hétérodimérisation GP5/M cruciale pour l'infectiosité virale.
N	ORF7	128	123	Protéine structurale phosphorylée non-glycosylée; hautement immunogénique; le seul composant de la capsid virale, interagit avec elle-même par des interactions covalentes et non covalentes; capable de se localiser au noyau et au nucléole et d'interagir avec les facteurs de transcription cellulaire.

1.2.2.2. La protéine mineure non glycosylée de l'enveloppe virale (E)

La protéine E est traduite à partir de l'ORF2b grâce à un codon d'initiation présent dans l'ORF2a en position 6 (Snijder et al., 1999) (**Figure 1.1**). Elle possède une masse moléculaire de 10 kDa et est composée de 73 et 70 acides aminés pour les souches NA et EU, respectivement (Wu et al., 2001) (**Tableau 1.1**). Elle est composée d'un domaine central et d'un domaine C-terminal hydrophobes contenant un groupe de résidus basiques et est non glycosylée (Snijder et al., 1999). La protéine E est associée à la membrane et elle serait présente chez tous les artérovirus (Snijder et al., 1999 ; Wu et al., 2001). De plus, la protéine E possède un site potentiel de N-myristoylation dans sa région N-terminale et un site potentiel de phosphorylation caséine kinase II (Snijder et al., 1999). Comme son homologue chez l'EAV, la protéine E du PRRSV est incorporée dans la structure de l'enveloppe du virion sous forme d'un complexe multimérique (Wu et al., 2001) (**Figure 1.5**).

Le rôle de la protéine E, outre sa fonction structurale, est inconnu (Music et Gagnon, 2010). La génétique inverse, utilisant un clone infectieux de l'EAV suggère une implication potentielle dans la production de virions infectieux (Snijder et al.,

1999). Une étude utilisant un isolat EU du PRRSV montrait que la formation du complexe GP2a-GP3-GP4 incorporant ou non la protéine E n'était pas essentielle à la formation de particules virales mais pourrait jouer un rôle critique dans l'infectiosité de celui-ci (Wissink et al., 2005).

1.2.2.3. La protéine mineure glycosylée de l'enveloppe virale (GP3)

La protéine GP3 est codée par le gène de l'ORF3 (**Figure 1.1**) et est composée de 254 et 265 acides aminés pour les isolats NA et EU, pour des masses moléculaires de 45 à 50 kDa, respectivement (Mardassi *et al.*, 1995 ; Meng *et al.*, 1995 ; Meulenberg *et al.*, 1995 ; Murtaugh *et al.*, 1995) (**Tableau 1.1**). C'est l'une des protéines les plus variables du PRRSV, montrant de 54 à 60% d'identité en séquences d'acides aminés entre les génotypes NA et EU (Dea *et al.*, 2000). La protéine GP3 est hautement glycosylée, avec sept oligosaccharides N-liés, et possède un domaine hydrophobe unique dans sa région N-terminale (Meulenberg *et al.*, 1995). Les sites de glycosylation sont hautement conservés au sein des souches NA et EU du PRRSV (Gonin *et al.*, 1998 ; Mardassi *et al.*, 1995 ; Meulenberg *et al.*, 1995 ; Wissink *et al.*, 2004).

La topologie membranaire de GP3 n'a pas été confirmée et semble dépendre de la souche (Hedges *et al.*, 1999 ; Mardassi *et al.*, 1998 ; Wieringa *et al.*, 2002) tout comme la question de son rôle structural ou non-structural dans le virion (**Figure 1.5**). La protéine GP3 du prototype Lelystad (LV) de la souche EU est incorporée dans le virion (Meulenberg *et al.*, 1995 ; van Nieuwstadt *et al.*, 1996) et associée à la membrane en un hétérotrimère avec GP2a et GP4 (Wissink et al., 2005). Pour les souches NA, la situation est un peu moins claire. La protéine GP3 de la souche référence québécoise IAF-Klop est non structurale et est sécrétée à partir de cellules infectées (Gonin *et al.*, 1998 ; Mardassi *et al.*, 1998), alors que la protéine GP3 de la souche FL12 est rapportée être structurale (de Lima *et al.*, 2009).

D'après plusieurs rapports, la protéine GP3 est hautement antigénique (Faaberg et Plagemann, 1997 ; Gonin *et al.*, 1998 ; Hedges *et al.*, 1999 ; Katz *et al.*, 1995). Plusieurs épitopes ont été trouvés pour cette protéine au niveau des régions en acides aminés 60 à 85 et 243 à 250 pour la souche EU (Oleksiewicz *et al.*, 2002 ; Oleksiewicz *et al.*, 2001) et aux positions 73 à 87 et 66 à 81 en acides aminés pour la souche NA (Zhou *et al.*, 2006). Cependant les anticorps anti-GP3, bien que présents à un niveau très faible chez les porcs lors d'une immunisation avec de la protéine GP3 sont capables de procurer une protection relative (Plana Duran *et al.*, 1997). Les anticorps anti-GP3 pourraient aussi être impliqués dans la neutralisation virale (Cancel-Tirado *et al.*, 2004).

1.2.2.4. La protéine mineure glycosylée de l'enveloppe virale (GP4)

La protéine structurale mineure GP4, traduite à partir de l'ORF4 (**Figure 1.1**), est constituée de 178 et 183 acides aminés correspondants à des poids moléculaires de 31 et 35 kDa pour les souches NA et EU, respectivement (Murtaugh *et al.*, 1995) (**Tableau 1.1**). Elle serait une protéine intégrale de la membrane de classe I avec une séquence signal dans la région N-terminale et un domaine d'ancrage membranaire dans sa partie C-terminale (Meulenberg *et al.*, 1995). La protéine GP4 est hautement glycosylée avec quatre sites de glycosylation N-liés putatifs, lesquels sont conservés au sein des souches de PRRSV NA et EU (Meulenberg *et al.*, 1995 ; van Nieuwstadt *et al.*, 1996 ; Wissink *et al.*, 2004). L'analyse de la séquence en acides aminés montre que la protéine GP4 contient une séquence signal putative dans la région N-terminale à la position 1 à 22 en acides aminés et une séquence hydrophobe supplémentaire dans son domaine C-terminal à la position 162 à 178 en acides aminés (Meulenberg *et al.*, 1995). Comme pour la protéine GP5, elle est capable d'induire des anticorps neutralisants mais à un degré moindre (Meulenberg *et al.*, 1997 ; Weiland *et al.*, 1999). La protéine GP4 de la souche LV possède des épitopes non conservés entre les souches NA et EU dont un est capable d'induire des anticorps neutralisants. L'épitope

neutralisant de la GP4 est exposé au niveau de la région hydrophobe adjacente à la région N-terminale à la position 40 à 79 en acides aminés (Meulenberg *et al.*, 1997 ; Weiland *et al.*, 1999). C'est une région qui apparaît hautement variable au sein des différentes souches EU (Meulenberg *et al.*, 1997 ; Weiland *et al.*, 1999).

Welch *et al* (2004) ont utilisé un clone d'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) infectieux, dans lequel l'ORF4 avait été enlevé, pour transfecter des cellules permissives au PRRSV et montrer que ce gène est essentiel à la réplication du virus (Welch *et al.*, 2004). Les expériences menées par Lee *et al* (2004) démontrent que, comme la protéine GP5, la protéine GP4 est capable d'altérer la production des ARNm de la cellule hôte (Lee *et al.*, 2004). Dans les cellules exprimant la protéine GP4, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse et le transport des protéines ainsi que certaines voies biochimiques sont modifiées (Lee *et al.*, 2004). Ces observations impliquent que la protéine GP4 pourrait utiliser ou détourner la machinerie cellulaire de l'hôte pour le transport de composants viraux ou cellulaires à la surface de la cellule (Lee *et al.*, 2004).

1.2.3. Protéines majeures du PRRSV

1.2.3.1. La protéine de la nucléocapside (N)

La protéine non glycosylée de la nucléocapside N est en fait la seule protéine de la capsid interagissant avec elle-même par des liaisons covalentes et non-covalentes (Wootton et Yoo, 2003) (**Figure 1.4 et 1.5**). Elle est traduite à partir de l'ORF7 en une protéine de 15 kDa composée de 123 à 128 acides aminés en fonction du génotype de la souche NA et EU respectivement (Mardassi *et al.*, 1996) (**Figure 1.1**). La protéine N du PRRSV est multifonctionnelle (**Tableau 1.1**), possède un point isoélectrique de 10,4 et est une phosphoprotéine sérine (Wootton *et al.*, 2002).

La protéine N est fortement immunogène chez les porcs (Loemba *et al.*, 1996 ; Meulenberg *et al.*, 1995, 1995) et les souris (Drew *et al.*, 1997 ; Nelson *et al.*, 1993 ;

Rodriguez *et al.*, 1997 ; van Nieuwstadt *et al.*, 1996). Plusieurs études sur la cartographie des épitopes de la protéine N ont permis de mettre en évidence plusieurs domaines antigéniques. Un épitope commun aux souches NA et EU a été identifié à la position 52 à 69 en acides aminés pour la souche PA8 (Canadienne) et à la position 50 à 60 en acides aminés pour les souches Olot/91 (EU) et 807/95 (Québécoise). Cette séquence est très bien conservée entre les différents isolats NA et EU et représente la partie la plus hydrophile de la protéine N (Rodriguez *et al.*, 1997 ; Wootton *et al.*, 1998). Trois autres épitopes ont été identifiés aux positions 30 à 52, 37 à 52 et 69 à 123 en acides aminés pour la souche PA8 (Wootton *et al.*, 1998). Un épitope discontinu présent dans les 78 premiers acides aminés de la protéine N des souches Olot/91 et 804/95 a aussi été trouvé (Rodriguez *et al.*, 1997). Pour la souche LV (EU), trois épitopes linéaires ont été localisés entre les acides aminés 2 à 12, 25 à 30 et 40 à 46 et un épitope conformationnel ou discontinu partiellement composé des acides aminés 51 à 67 et 80 à 90 a été identifié (Meulenberg *et al.*, 1998).

Wootton *et al.* (1998) ont montré que la délétion des onze derniers acides aminés de la région C-terminale perturbe la reconnaissance de l'épitope conformationnel par tous les anticorps monoclonaux qui sont dépendants de la conformation (Wootton *et al.*, 1998).

La réponse immunitaire précoce générée par une infection au PRRSV chez les porcs est dirigée principalement contre la protéine N. Cette réponse peut être détectée à partir d'une semaine *post* infection (PI) (Loemba *et al.*, 1996) et décroît à un rythme beaucoup moins rapide que celle dirigée contre les protéines structurales majeures M et GP5 (Yoon *et al.*, 1995). La protéine N n'est pas associée à la protection immunitaire car elle ne possède pas d'épitopes inducteurs d'anticorps neutralisants (Mardassi *et al.*, 1995).

Le PRRSV, comme de nombreux virus à ARN, se réplique dans le cytoplasme (Benfield *et al.*, 1992 ; Mardassi *et al.*, 1994). Cependant, une partie des protéines N se localise dans le noyau et le nucléole durant l'infection des PAM et des MARC-145 (Rowland *et al.*, 1999).

Enfin, l'expression des gènes de la cellule hôte pourrait être régulée par la protéine N durant l'infection au PRRSV de par la capacité de la capsid virale à interagir avec des facteurs cellulaires de transcription (Song *et al.*, 2009).

1.2.3.2. La protéine de membrane de l'enveloppe (M)

La protéine M de 18 à 19 kDa est traduite à partir de l'ORF6 et est composée de 174 et 173 acides aminés pour les géotypes NA et EU, respectivement (**Figure 1.1** et **Tableau 1.1**). C'est une protéine membranaire de classe III constituée d'un cœur de trois domaines transmembranaires bordés par un ectodomaine en N-terminal de 13 à 18 acides aminés et d'un endodomaine en C-terminal de 81 à 87 acides aminés (de Vries *et al.*, 1992 ; Faaberg et Plagemann, 1995 ; Meulenberg *et al.*, 1995, 1995). La glycoprotéine majeure de la membrane M est la plus conservée des protéines de structure des *Arterivirus* et du PRRSV (Mardassi *et al.*, 1995, 1995 ; Meulenberg *et al.*, 1993).

Une analyse *Pepscan* de concert avec l'utilisation de quinze *sera* de porcs infectés expérimentalement ont permis de mettre en évidence la présence d'épitopes linéaires des cellules B au niveau de la nsp2 et de toutes les protéines de structure d'une souche NA du PRRSV (de Lima *et al.*, 2006). Cependant les plus hauts degrés de conservation et d'immunogénicité ont été observés pour deux épitopes de la région C-terminale de la protéine M aux positions 151 à 174 en acides aminés (de Lima *et al.*, 2006).

Dans le RE des cellules infectées, la protéine M s'assemble avec la protéine GP5 par un pont disulfure pour former un hétérodimère (**Figure 1.5**), lequel est essentiel pour l'infectiosité et l'assemblage du virion de l'EAV et du PRRSV (Delputte *et al.*, 2002 ; Faaberg *et al.*, 1995 ; Mardassi *et al.*, 1996 ; Snijder *et al.*, 2003 ; Verheije *et al.*, 2002). Ce complexe est formé avant ou durant l'assemblage viral (de Vries *et al.*, 1995 ; Dobbe *et al.*, 2001 ; Faaberg *et al.*, 1995 ; Mardassi *et al.*, 1996). Le pont disulfure entre les protéines GP5 et M du PRRSV, isolats EU, apparaît

probablement entre les cystéines des résidus 50 et 8, respectivement. De plus, la mutation de l'un ou l'autre de ces résidus entraîne le blocage complet de la production de particules virales (Verheije *et al.*, 2002). Delputte *et al.* (2002) ont montré que ce complexe est capable d'interagir, par l'intermédiaire de la protéine M, avec un récepteur de type héparine à la surface des PAM. Cette interaction serait impliquée dans l'attachement du virus aux cellules cibles mais ne serait pas nécessaire puisque l'ajout d'héparine dans le milieu ne bloque pas complètement l'entrée du virus (Delputte *et al.*, 2002).

1.2.3.3. La glycoprotéine 5 (GP5)

Le gène de l'ORF5 (**Figure 1.1** et **Tableau 1.1**) code pour une protéine transmembranaire de 25 kDa constituée de 200 et 201 acides aminés pour les souches NA et EU, respectivement (Dea *et al.*, 2000 ; Meulenberg *et al.*, 1995). C'est l'une des régions les plus variables du génome du PRRSV (Andreyev *et al.*, 1997 ; Mardassi *et al.*, 1995 ; Meng *et al.*, 1995). La protéine GP5 est composée d'une séquence signal putative de 30 acides aminés dans la région N-terminale (Mardassi *et al.*, 1995 ; Meng *et al.*, 1995 ; Meulenberg *et al.*, 1995 ; Murtaugh *et al.*, 1995), suivi d'un ectodomaine d'environ 35 résidus avec un nombre variable de sites potentiels de N-glycosylation, une longue région hydrophobe de 60 résidus qui possède de un à trois segments transmembranaires et une région C-terminale hydrophobe de 70 acides aminés approximativement (Meulenberg *et al.*, 1995). Cette glycoprotéine a la variabilité génétique la plus élevée au sein d'un même génotype, de 89 à 94% d'identité parmi les isolats NA et de 87,1 à 99,25% parmi les isolats EU (Andreyev *et al.*, 1997 ; Suarez *et al.*, 1996). Très récemment, une nouvelle protéine structurale codée par un ORF5 alternatif, appelé ORF5a, a été découverte. Cette protéine est présente chez tous les artérovirus et pourrait jouer de ce fait un rôle important dans cette famille, ce qui en fait une nouvelle cible immunologique potentielle pour la lutte contre le PRRSV (Johnson *et al.*, 2011).

La protéine GP5 est l'une des protéines les plus importantes exprimées à la surface du virion (**Tableau 1.1**) et elle contient des épitopes impliqués dans la neutralisation virale et la protection (Ansari *et al.*, 2006 ; Gonin *et al.*, 1999 ; Pirzadeh et Dea, 1997, 1998 ; Wissink *et al.*, 2003). *In vitro*, les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine GP5 sont capables de neutraliser l'infectiosité du virus (Gonin *et al.*, 1999 ; Pirzadeh et Dea, 1997 ; Weiland *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 1998). *In vivo*, la protéine GP5 est la cible de la plupart des anticorps neutralisants présents chez les animaux infectés (Gonin *et al.*, 1999). Les porcs immunisés avec des vaccins génétiquement modifiés à base de protéine GP5 produisent des anticorps neutralisants contre le virus (Jiang *et al.*, 2006 ; Kheyar *et al.*, 2005 ; Pirzadeh et Dea, 1998) et permettent aussi une protection partielle contre la réplication du virus et le développement de lésions suite à une infection par le PRRSV (Pirzadeh et Dea, 1998 ; Qiu *et al.*, 2005 ; Xue *et al.*, 2004).

Le profil d'hydropathie de la protéine GP5 prédit qu'elle possède une séquence signal entre les acides aminés 1 à 32, un ectodomaine entre les acides aminés 33 à 63, une région transmembranaire entre les acides aminés 64 à 134 et un ectodomaine entre les acides aminés 135 à 200 (Mardassi *et al.*, 1996 ; Mardassi *et al.*, 1995 ; Meulenberg *et al.*, 1995). Il existe une différence entre les longueurs prédites des tailles des séquences signal entre les souches NA et EU du PRRSV (Andreyev *et al.*, 1997 ; Dea *et al.*, 2000 ; Meng *et al.*, 1995 ; Meulenberg *et al.*, 1995 ; Stadejek *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 1998) (**Figure 1.6**). La comparaison des séquences nucléotidiques et d'acides aminés de la protéine GP5 d'un grand nombre de souche NA et EU de PRRSV a permis d'identifier une région hypervariable aux acides aminés 32 à 40, deux régions variables aux acides aminés 57 à 70 et 121 à 130, trois régions conservées aux acides aminés 41 à 56, 71 à 120 et 131 à 200 et plusieurs sites potentiels de N-glycosylation (**Figure 1.6**) (Andreyev *et al.*, 1997 ; Faaberg et Plagemann, 1995 ; Key *et al.*, 2001 ; Meng *et al.*, 1995 ; Plagemann, 2004 ; Plagemann, 1996 ; Stadejek *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 1998).

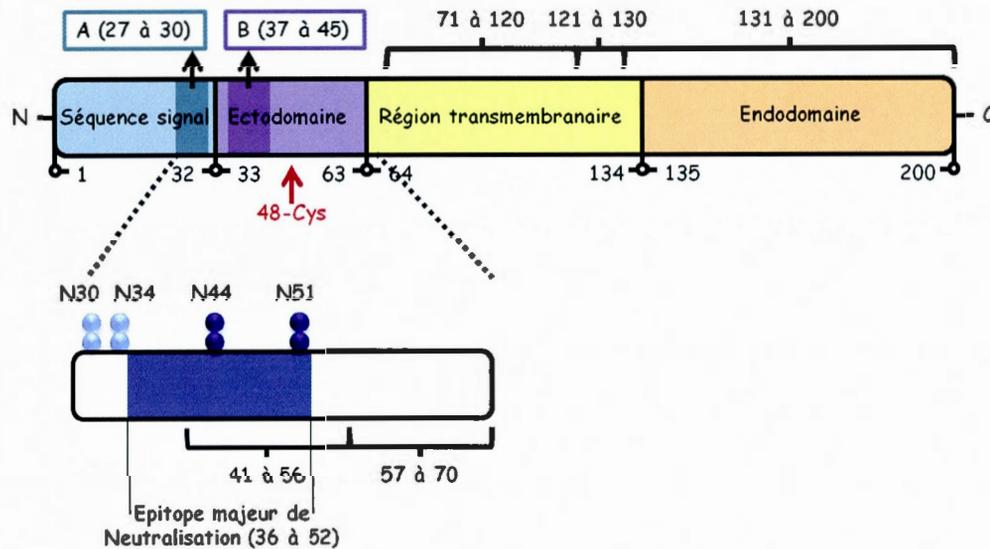


Figure 1.6. Domaines de la protéine GP5 du PRRSV isolat NA. Les chiffres en dessous du schéma de la séquence représentent la position des acides aminés couvrant chaque domaine. Les sites de glycosylation conservés sont indiqués par les ronds bleus foncés, N44 et N51 et les non-conservés par ceux en bleus clairs, N30, N34. La flèche rouge indique l'emplacement de la cystéine 48 impliquée dans le pont disulfure avec la cystéine 6 de la protéine M. Séquence signal: 1–32; ectodomaine: 33–63; région transmembranaire : 64–134; endodomaine: 135–200; épitope neutralisant majeur: 36–52; épitope A immunodominant hypervariable non-neutralisant (épitope leurre): 27–30; épitope B neutralisant et non-immunodominant: 37–45; régions variables 57–70 et 121–130; régions conservées: 41–56, 71–120 et 131–200 (d'après Music et Gagnon, 2010).

L'ectodomaine de la protéine GP5 contient plusieurs sites potentiels de N-glycosylation dont le premier est situé dans la région hypervariable à la position N32, N33 ou N34 et est présent chez la plupart des isolats des souches aussi bien EU que NA. Les deuxième et troisième sites potentiels de N-glycosylation sont hautement conservés au sein des souches de terrain du PRRSV et sont localisés aux positions N44 et N51 pour la souche NA, ou N46 et N53 pour la souche EU. Un quatrième site potentiel de N-glycosylation est présent à la position N30 chez certaines souches NA (ATCC VR-2332 et IAF-Klop) (Dea *et al.*, 2000 ; Key *et al.*, 2001 ; Plagemann, 2004) (Figure 1.6).

La cartographie peptidique a permis de montrer que l'épitope neutralisant majeur de la protéine GP5 était situé dans son ectodomaine (acides aminés 36 à 52) (Plagemann *et al.*, 2002). En utilisant des *sera* polyclonaux de porc et des anticorps monoclonaux de souris, l'épitope non neutralisant (épitope A, A/V²⁷L²⁸V²⁹N³⁰) et l'épitope neutralisant (épitope B, H³⁸ et I⁴³Y⁴⁴N⁴⁵) ont été identifiés dans l'ectodomaine de la protéine GP5 (Ostrowski *et al.*, 2002) (**Figure 1.6**). Lors d'une infection au PRRSV, les anticorps non neutralisants sont dirigés principalement contre l'épitope immunodominant A alors que les anticorps neutralisants dirigés contre l'épitope B apparaissent plus tardivement (Ostrowski *et al.*, 2002). L'épitope A immunodominant et hypervariable pourrait agir comme un épitope leurre et ralentir l'apparition de la réponse en anticorps neutralisants contre l'épitope B qui est, lui, bien conservé au sein des isolats du PRRSV (Ostrowski *et al.*, 2002 ; Plagemann, 2004). En utilisant la mutagenèse dirigée et l'analyse *Pepscan*, Wissink *et al.* (2003) ont montré que la proline présente à la position 24 de la séquence de la protéine GP5 de la souche EU PPV est impliquée dans la reconnaissance par les anticorps neutralisants (Wissink *et al.*, 2003). Les anticorps neutralisants utilisés reconnaissent une séquence à la position 29 à 35 en acides aminés mais ils sont incapables de neutraliser la souche EU LV qui ne diffère de la souche PPV que par quatre acides aminés, laissant supposer que les épitopes visés sont différents (Wissink *et al.*, 2003).

Des études biochimiques de la protéine sauvage et de mutants de la GP5 ont mis en évidence que les trois sites de N-glycosylation (N34, N44 et N51) sont riches en mannose (Ansari *et al.*, 2006) (**Figure 1.6**). Les mutants impliquant la glycosylation N44 entraînent la perte de la production du virus montrant son rôle clé dans l'infectiosité alors que les mutations N34, N51 ou N34/51 n'entraînaient qu'une baisse du titre par rapport au virus sauvage (Ansari *et al.*, 2006). Lors de tests de séroneutralisation, les mutants sont plus sensibles aux anticorps neutralisants spécifiques du PRRSV sauvage, de même que l'immunisation de porcs avec les mutants induit une réponse en anticorps neutralisants plus élevée. Ceci suggère que la perte de N-glycosylations dans l'ectodomaine de la protéine GP5 augmente la

sensibilité du virus à la neutralisation *in vitro* et l'immunogénicité de l'épitope neutralisant (Ansari *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus avec la protéine GP5 de la souche référence EU et démontrent que la glycosylation N46 (N44 de la souche NA) est requise pour la production de particules virales (Wissink *et al.*, 2004). Ils ont aussi montré que la N-glycosylation localisée à la position N53 de la protéine GP5 (N51 de la souche NA) et les N-glycosylations de la protéine GP2a ne sont pas essentielles à la formation de particules virales (Wissink *et al.*, 2004). La perte de la glycosylation N53 de la protéine GP5 (et des N-glycosylations sur la protéine GP2a) n'affecte pas significativement l'infectiosité du virus par rapport au mutant N46 (Wissink *et al.*, 2004).

Les glycosylations de la protéine GP5 jouent un rôle important dans l'évasion ou la diminution de la réponse en anticorps neutralisants contre le virus par un mécanisme connu sous le nom de « bouclier N-glycane » (Johnson *et al.*, 2003 ; Wei *et al.*, 2003). Les glycanes sont reconnus comme du soi par le système immunitaire et masquent ainsi les épitopes des anticorps (Bowden et Fry, 2011). Ce mécanisme est observé chez plusieurs autres virus comme le LDV (Chen *et al.*, 2000), le virus de l'hépatite B (HBV) (Lee *et al.*, 2003), le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (Reitter et Desrosiers, 1998), le virus de l'*influenza* (Skehel *et al.*, 1984) et le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Skehel *et al.*, 1984). Ce mécanisme vient s'ajouter à l'effet leurre potentiel de l'épitope A qui en présente les caractéristiques (Garrity *et al.*, 1997) comme son hyper-variabilité et sa forte immunogénicité en début d'infection. L'effet des épitopes leurres est de diminuer la production d'anticorps neutralisants et de permettre ainsi aux virus de persister (Cleveland *et al.*, 2000).

La protéine GP5, en plus de son épitope leurre et de ses N-glycosylations qui forment le « bouclier N-glycane », semble impliquée dans un phénomène nommé augmentation dépendante des anticorps (ADE), lequel favorise l'infection des macrophages (Cancel-Tirado *et al.*, 2004). L'ADE facilite l'attachement et l'internalisation de plusieurs virus dans les macrophages, les monocytes et les

granulocytes, par l'intermédiaire des récepteurs Fc et/ou des récepteurs du complément grâce aux anticorps spécifiques contre le virus (Cancel-Tirado et Yoon, 2003). Le mécanisme d'ADE du PRRSV n'a pas beaucoup été étudié, mais l'observation de fortes pneumonies interstitielles chez des porcs immunisés avec la protéine GP5-GST exprimée chez *E. coli* puis infectés par le PRRSV suggèrerait un mécanisme d'ADE (Pirzadeh et Dea, 1998) comme il a déjà été rapporté chez des porcs infectés par le PRRSV (Yoon *et al.*, 1996).

Delputte *et al.* (2004) ont postulé dans leur étude que l'attachement de la GP5 à la sialoadhésine porcine était impliqué dans l'entrée du virus dans les PAM (Delputte et Nauwynck, 2004). Depuis, l'attachement du PRRSV par l'intermédiaire de la sialoadhésine a été confirmé mais l'implication de la protéine GP5 dans cette liaison demeure inconnue (van Gorp *et al.*, 2008).

Enfin, la protéine GP5 a été rapportée pour être capable d'induire la mort cellulaire par apoptose chez les cellules (Gagnon *et al.*, 2003 ; Suarez *et al.*, 1996). Durant l'infection de cellules MARC-145 avec un adénovecteur humain exprimant la GP5 de la souche NA, la présence de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN cellulaire ont été observées (Gagnon *et al.*, 2003). La région de la GP5 responsable de l'induction de l'apoptose a été cartographiée dans les 119 premiers acides aminés de la protéine (Fernandez *et al.*, 2002).

1.2.4. Les protéines non-structurales du PRRSV et des arterivirus

La synthèse de l'ARN des nidovirus est basée sur la réplication de l'ARN génomique complet et la synthèse des ARNm sg. Les deux processus impliquent un « complexe de transcription/réplication » (RTC) composé de nsp virales ainsi que des facteurs de l'hôte possiblement (Gorbalenya *et al.*, 2006). L'ORF1a et l'ORF1b codant pour les gènes de la réplicase sont les premiers à s'exprimer suite à l'entrée du virus et à la libération du génome dans le cytoplasme. La protéine pp1a est codée par l'ORF1a et la synthèse de pp1b a lieu suite au saut ribosomal à la jonction de

l'ORF1a-ORF1b (**Figures 1.1 et 1.2**). Ces deux ORF sont localisés dans la région 5' terminale du génome et représentent presque les trois-quarts du génome viral (Brierley, 1995 ; Snijder et Meulenberg, 1998). La protéine ppla est prédite pour être clivée à huit sites différents pour former 9 nsp : nsp1a, nsp1b et nsp2 à nsp8 (Snijder et Meulenberg, 1998 ; van Dinten *et al.*, 1996). Les produits nsp9 à nsp12 sont générés suite à la coupure protéolytique de la polyprotéine pplab (van Dinten *et al.*, 1996). Les activités protéolytiques des produits dérivés de ppla, nsp1, nsp2 et nsp4 sont responsables de la maturation des autres nsp alors que les nsp9 à 12 sont impliquées dans la réplication et la transcription du virus (Snijder et Meulenberg, 1998 ; van Dinten *et al.*, 1996) (**Tableau 1.1**) (**Figure 1.7**).

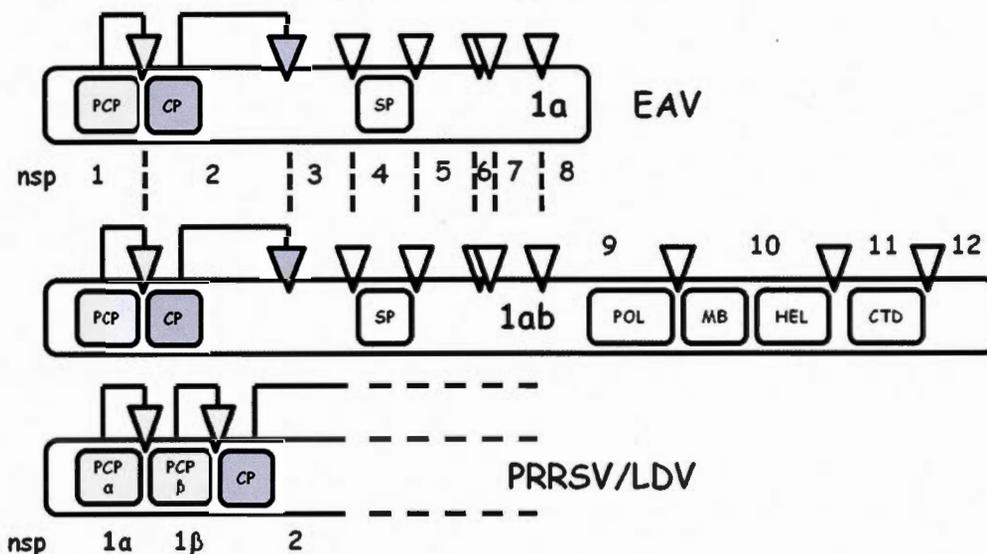


Figure 1.7. Schéma du clivage protéolytique des polyprotéines des artérovirus. Les deux premiers cadres, en haut, représentent le clivage des polyprotéines ppla et pplab chez l'EAV. Les trois domaines des protéases de la polyprotéine ppla de l'EAV sont indiqués comme suit : PCP, nsp1 protéase cystéine de type papaïne ; CP, nsp2 protéase cystéine ; SP, nsp4 protéase sérine. Au niveau de la polyprotéine pplab les quatre domaines majeurs conservés chez les nidovirus sont indiqués comme suit : POL, polymérase ARN dépendante putative ; MB, domaine de liaison aux métaux putatif ; HEL, hélicase ARN putative ; CTD, domaine C-terminal spécifique chez les nidovirus. Le dernier cadre montre la région N-terminale de la polyprotéine ppla du PRRSV et du LDV qui contient deux PCP, PCP α et PCP β (d'après Snijder *et al.*, 2010).

La maturation des protéines ppla et pplab pourrait être réalisée par des protéinases accessoires localisées dans nsp1, nsp2 et nsp4 [qui contient la protéinase sérine principale de type 3C (3CLpro)] (Ziebuhr *et al.*, 2000). Au sein des artérovirus, il y a un bon niveau de conservation du site catalytique de ces enzymes et des sites correspondant aux coupures de la protéine ppla (Ziebuhr *et al.*, 2000). La maturation de ppla débute avec la nsp1 qui contient deux protéases cystéines de type papaïne (PCP), PCP α et PCP β et qui s'autoclive pour se libérer (Kroese *et al.*, 2008) [le domaine PCP α est inactif chez l'EAV (den Boon *et al.*, 1995 ; Snijder *et al.*, 1993)]. Dans sa région N-terminale, la nsp2 des artérovirus contient une protéinase cystéine (PL2pro) qui coupe ppla à la jonction nsp2-nsp3 chez l'EAV (Snijder, 1998 ; Snijder et Meulenberg, 1998 ; Snijder *et al.*, 1995). La 3CLpro est responsable de la maturation du reste de l'ORF1a et de l'ORF1ab en plusieurs sous-produits, soit de nsp3 à nsp12 (van Dinten *et al.*, 1999 ; Ziebuhr *et al.*, 2000).

Les nsp codées par l'ORF1b sont prédites pour avoir des rôles essentiels dans la réplication du virus et l'expression des gènes (Gorbalenya *et al.*, 1989 ; Meulenberg *et al.*, 1993 ; Nelsen *et al.*, 1999 ; van Dinten *et al.*, 1996) (**Tableau 1.1**). L'utilisation d'un clone infectieux de l'EAV a permis de mettre en évidence le rôle de ces protéines chez les artérovirus (van Dinten *et al.*, 1997 ; van Dinten *et al.*, 1999 ; van Dinten *et al.*, 2000 ; van Marle *et al.*, 1999). L'ARN polymérase ARN dépendante putative est associée à nsp9 alors que les motifs de l'hélicase ARN/NTPase le sont à nsp10 qui contient une région en doigt de zinc potentielle, laquelle serait impliquée dans la synthèse des ARNm sg. La fonction de nsp11 est encore inconnue mais elle contient une région conservée chez tous les nidovirus lui suggérant un rôle important dans leur cycle de vie (den Boon *et al.*, 1991 ; Godeny *et al.*, 1993 ; Gorbalenya *et al.*, 1989 ; Meulenberg *et al.*, 1993 ; van Dinten *et al.*, 1996).

La nsp1 est une protéine multifonctionnelle requise pour la transcription des ARNm sg contenant deux domaines protéases cystéine de type papaïne et un motif en doigt de zinc (den Boon *et al.*, 1995 ; Kroese *et al.*, 2008 ; Oleksiewicz *et al.*, 2004 ; Tijms et Snijder, 2003 ; Tijms *et al.*, 2001) (**Tableau 1.1**). La traduction de nsp1 à

partir d'ARN hétéroclites (définis par les auteurs comme des ARN sg déviant de leur forme normale et pouvant avoir des tailles variables) pourrait être la cause d'une concentration intracellulaire de celle-ci plus élevée que pour les autres nsp du virus (Yuan *et al.*, 2000 ; Yuan *et al.*, 2004). La protéine nsp1 se libère de la polyprotéine réplacase grâce à son domaine auto-protéasique de type papaïne et cette coupure est essentielle à la synthèse de l'ARN viral. La protéine nsp1 est impliquée dans au moins trois processus majeurs du cycle de vie de l'EAV : la maturation de la polyprotéine de l'ORF1ab, la transcription du virion et la biogénèse du virion (Tijms *et al.*, 2007).

Les protéines nsp1 α et nsp1 β sont issues de la coupure dans la région N-terminale de nsp1 et contiennent chacune un domaine auto-protéinase de type papaïne, lesquels ont été nommés PCP α et PCP β , respectivement (den Boon *et al.*, 1995). L'inactivation de l'activité PCP α , par mutation, bloque complètement la synthèse des ARNm sg (probablement du fait que nsp1 α , impliquée dans la synthèse des ARN sg, nécessite cette protéase pour être clivée) mais elle n'affecte pas la réplication du génome (Kroese *et al.*, 2008). En revanche, l'inactivation de l'activité PCP β n'est pas viable car les mutants ne montrent pas d'activité de synthèse d'ARN viraux, indiquant que la coupure au site nsp1 β /nsp2 est essentielle pour la réplication du génome du PRRSV (Kroese *et al.*, 2008). Des analyses de micro-séquençage de protéines ont permis d'identifier le site de coupure, entre nsp1 α /nsp1 β à la position 180M/181A, qui est conservé au sein des différentes souches de PRRSV NA (Chen *et al.*, 2010). Le site de coupure entre nsp1 β /nsp2 a, quant à lui, été localisé à la position 383G/384A et est bien conservé aussi bien chez les souches NA que les souches EU du PRRSV (Chen *et al.*, 2010). La protéinase principale nsp4 et les trois protéinases accessoires résidant dans nsp1 α , nsp1 β et nsp2 couperaient potentiellement la polyprotéine réplacase du PRRSV en 13 nsp (van Aken *et al.*, 2006 ; van Aken *et al.*, 2006 ; van Aken *et al.*, 2006 ; Ziebuhr *et al.*, 2000). PCP α est responsable de la libération de la nsp1 α alors que la production de la nsp1 β dépend de l'activité des deux protéinases PCP α et PCP β . La coupure du site nsp2/nsp3 est réalisée par une

troisième protéinase cystéine qui se trouve dans le domaine N-terminal de la nsp2 (den Boon *et al.*, 1995 ; Snijder *et al.*, 1995 ; Snijder, 1998 ; Snijder *et al.*, 1995).

Au sein des nsp, la protéine répliquative du PRRSV la plus large est présente dans le multi-domaine de nsp2 et est prédite pour posséder approximativement 980 acides aminés (Allende *et al.*, 1999 ; Ziebuhr *et al.*, 2000). L'alignement des protéines nsp2 des artérovirus a permis de mettre en évidence trois domaines majeurs : un domaine protéinase en N-terminal (PL2), une région médiane avec une fonctionnalité inconnue, et une région transmembranaire hydrophobe près du domaine C-terminal (Han *et al.*, 2006 ; Ziebuhr *et al.*, 2000). La fin du domaine C-terminal de la nsp2 est capable d'interagir avec la nsp3 pour former un complexe d'échafaudage qui supporte la formation de vésicules à double membrane [DMV, qui dérivent du RE et qui pourraient être impliquées dans la synthèse des ARN viraux (Knoops *et al.*, 2008)] et les complexes de répliquon du virus (Pedersen *et al.*, 1999 ; Snijder et Meulenberg, 1998 ; Snijder *et al.*, 2001 ; Snijder *et al.*, 1994 ; Ziebuhr *et al.*, 2000). La fonction de la nsp2 du PRRSV dans le cycle de vie du virus est peu comprise mais par analogie avec celle de l'EAV qui est mieux connue, elle pourrait être impliquée dans la génération de DMV avec la nsp3 et fonctionnerait comme un cofacteur de la protéase sérine nsp4 pour assurer les autres coupures (Snijder *et al.*, 1995 ; Snijder *et al.*, 1994 ; Snijder *et al.*, 1995 ; Wassenaar *et al.*, 1997). Le gène codant pour la nsp2 du PRRSV montre une variabilité génétique très importante entre les souches NA et EU de PRRSV, partageant moins de 40% de similarité au niveau des acides aminés (Allende *et al.*, 1999 ; Nelsen *et al.*, 1999).

Johnson *et al.* (2007) montraient qu'il existait une réponse croisée significative dirigée contre la nsp1 et la nsp2 chez des porcs immunisés avec nsp1 ou nsp2 qui apparaît équivalente ou plus grande que celle observée contre la protéine N (Johnson *et al.*, 2007). De plus, la reconnaissance de ces protéines semble dépendante de leur repliement suggérant la présence d'épitopes conformationnels. Les protéines ont été reconnues par des *sera* de porcs infectés avec des souches de PRRSV hétérologues, indiquant que plusieurs épitopes sont conservés (Johnson *et al.*, 2007).

Les nsp seraient aussi impliquées dans la répression de la réponse immunitaire en inhibant l'activation du promoteur de l'IFN- β (Beura et al., 2010). Dans cette étude, l'effet inhibiteur a été montré dans un ordre décroissant par la nsp1, la nsp2, la nsp11 et enfin la nsp4 (Beura et al., 2010). De plus, les auteurs montraient que nsp1 α , nsp1 β et nsp11 inhibaient fortement la voie de signalisation des ARN double brin (Beura *et al.*, 2010). Un autre rapport récent sur nsp1 α et nsp1 β démontrait qu'elles étaient capables de réduire drastiquement l'expression de l'IFN- β (Chen *et al.*, 2010). De plus, dans cette étude, Chen *et al.* (2010) indiquaient que la nsp1 β était capable d'inhiber aussi bien la synthèse d'IFN que sa voie de signalisation, alors que seule nsp1 α inhibait fortement la synthèse d'IFN (Chen *et al.*, 2010). Il a aussi été supposé que nsp2 pourrait moduler la production du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Darwich *et al.*, 2011).

L'ORF1b contient, quant à lui, quatre nsp prédites, la nsp9 qui est une ARN polymérase ARN dépendante putative, la protéine nsp10 laquelle contient un domaine de liaison aux métaux (MBD) putatif et un motif hélicase ou de liaison au nucléoside triphosphate (NTP), et deux protéines de fonctions inconnues (nsp11 et nsp12) (Allende *et al.*, 2000 ; Allende *et al.*, 1999 ; Bautista *et al.*, 2002 ; den Boon *et al.*, 1991 ; Godeny *et al.*, 1993 ; Gorbalenya *et al.*, 1989 ; Herold *et al.*, 1996 ; Meulenberg *et al.*, 1993a ; Nelsen *et al.*, 1999 ; Shen *et al.*, 2000 ; Snijder et Meulenberg, 1998 ; van Dinten *et al.*, 1999 ; van Dinten *et al.*, 1996 ; Wootton *et al.*, 2000). Une activité NTPase thermolabile et sensible au pH qui est modulée par des polynucléotides et qui est capable de dérouler l'ARN double brin dans des polarités 5' et 3' a été découverte chez la nsp10 (Bautista *et al.*, 2002). Ces résultats procurent la première évidence des propriétés fonctionnelles de l'hélicase du PRRSV et est un appui supplémentaire au fait que l'hélicase des *Nidovirus* possède des propriétés qui la distinguent des autres hélicases virales (Bautista *et al.*, 2002). Il a été suggéré que la polymérase du PRRSV pourrait subir une coupure protéolytique similaire à celle de l'EAV sur la base des homologues présentes dans le domaine catalytique et dans les

sites de clivage prédits des souches de PRRSV (Snijder et Meulenberg, 1998 ; van Dinten *et al.*, 1999 ; Wassenaar *et al.*, 1997 ; Ziebuhr *et al.*, 2000).

À la lumière de ces dernières études, il devient évident que les nsp jouent un rôle significatif dans la pathogénèse virale comme la répression de la réponse immunitaire. L'habileté des nsp pour inhiber l'IFN indique qu'elles seraient des déterminants virulents importants (Music et Gagnon, 2010).

1.2.5. Tropisme et entrée du virus

In vivo, le virus du PRRSV a un tropisme privilégié pour les cellules différenciées de la lignée monocyte/macrophage, en particulier les PAM, mais aussi les macrophages interstitiels des tissus comme le cœur, le thymus, la rate et les plaques de Peyer, les sinusoides hépatiques, les *interstitia* rénaux médullaires et les glandes surrénales (Beyer *et al.*, 2000 ; Duan *et al.*, 1997 ; Halbur *et al.*, 1995 ; Halbur *et al.*, 1996). Les tissus comme les poumons, les tissus lymphoïdes, les plaques de Peyer et les reins sont aussi des tissus cibles préférentiels du virus (Haynes *et al.*, 1997 ; Sur *et al.*, 1996).

Le mécanisme d'entrée du virus dans les cellules a été rapporté pour la première fois en 1996 (Kreutz et Ackermann, 1996). Depuis, plusieurs récepteurs viraux ont été trouvés, dont l'héparine sulfate pour la liaison (Delputte *et al.*, 2002), la sialoadhésine pour la liaison et l'internalisation (Vanderheijden *et al.*, 2003) et la vimentine, élément du cytosquelette, qui est capable de se lier à la nucléocapside (Kim *et al.*, 2006). Cependant, d'autres facteurs sont nécessaires car l'expression de ces récepteurs par des cellules non permissives permet l'internalisation mais non la décapsidation du virus ni la production d'une infection (Music et Gagnon, 2010).

La susceptibilité des macrophages à l'infection au PRRSV a été précédemment associée à une forte expression de CD163 (Lopez-Fuertes *et al.*, 2000). Le *Cluster of differentiation* (CD) 163, une molécule exprimée exclusivement sur des cellules de la lignée monocyttaire, a récemment été identifié comme un

possible récepteur cellulaire du PRRSV (Calvert *et al.*, 2007 ; Patton *et al.*, 2009 ; van Gorp *et al.*, 2008). De plus, la sialoadhésine a été confirmée comme récepteur d'internalisation au PRRSV alors que le CD163 est impliqué dans l'infection au PRRSV, probablement durant la décapsidation (van Gorp *et al.*, 2008). Des cellules non permissives exprimant à la fois la sialoadhésine et le CD163 sont plus susceptibles à l'infection au PRRSV et produisent de 10 à 100 fois plus de virus que les cellules exprimant uniquement CD163 (van Gorp *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que la protéine GP2a et la protéine GP4 interagissaient avec CD163 et il a été postulé que la protéine GP4 est un médiateur critique pour l'interaction interglycoprotéique (Das *et al.*, 2010). Son association avec la protéine GP2a servirait à l'attachement viral responsable de la médiation des interactions avec CD163 pour l'entrée du virus dans les cellules susceptibles (Das *et al.*, 2010).

Le CD151 est, lui, capable de se lier à la région 3' non traduite de l'ARN du PRRSV mais aucun site de liaison à l'ARN n'a pour le moment été identifié pour cette protéine et son rôle reste inconnu mais CD151 pourrait être associé à l'entrée du virus dans la cellule (Shanmukhappa *et al.*, 2007). Le CD151 est un membre de la super famille des tétraspanines, lesquelles ont plusieurs fonctions cellulaires comme la signalisation cellulaire, l'activation et l'agrégation des plaquettes (Fitter *et al.*, 1999 ; Hasegawa *et al.*, 1998 ; Sincock *et al.*, 1999). Des cellules non susceptibles, BHK-21, transfectées avec CD151 sont rendues susceptibles à l'infection au PRRSV et la transfection de cellules MARC-145 avec des petits ARN interférents (siARN) visant CD151 inhibe l'infection. Ces résultats impliquent donc un rôle potentiel de CD151 dans l'infection *in vitro* par le PRRSV (Shanmukhappa *et al.*, 2007).

Les PAM infectés avec le PRRSV montrent une augmentation significative du taux d'apoptose (22 à 34%) comparativement aux macrophages alvéolaires infectés avec le circovirus porcine 2 (3%) (Chang *et al.*, 2005). À cause du pourcentage de PAM infectés avec le PRRSV, seulement 5 à 10%, les auteurs ont suggéré que la libération du TNF- α et de protéines GP5 par les cellules infectées entraînaient l'apoptose des cellules non infectées (Chang *et al.*, 2005). Quelques études ont

montré que la protéine GP5 était capable d'induire l'apoptose dans les cellules où elles s'expriment (Gagnon *et al.*, 2003 ; Suarez *et al.*, 1996). Un autre rapport montre que la majorité des cellules apoptotiques sont caractérisées par des marqueurs d'apoptose précoces et tardifs et que le PRRSV induit l'apoptose par l'intermédiaire de la voie mitochondriale (Lee et Kleiboeker, 2007). Lors d'une infection *in vitro* des macrophages par le PRRSV, deux phénomènes s'opposant sont activés. Tout d'abord, durant l'infection précoce, une réaction anti-apoptotique se met en place. Par la suite, celle-ci est remplacée par une réaction pro-apoptotique induisant la mort des macrophages infectés durant l'infection tardive (Costers *et al.*, 2008). Les réactions anti- et pro-apoptotiques sont observées aussi bien chez les macrophages que les cellules MARC-145 infectés par le PRRSV (Costers *et al.*, 2008).

1.2.6. Réponse immunitaire adaptative

1.2.6.1. Immunité humorale

Nelson *et al.* (1994) ont étudié la cinétique de la réponse humorale des porcs contre une souche NA du PRRSV. Les anticorps les plus précoces sont dirigés contre la protéine N, suivi de la protéine M et de la protéine GP5 (Nelson *et al.*, 1994). D'autres études ont montré que la protéine nsp2 contient un ensemble d'épitopes non neutralisants et est probablement une protéine immunodominante du PRRSV (de Lima *et al.*, 2006 ; Oleksiewicz *et al.*, 2001).

Les anticorps circulant contre le PRRSV sont détectables dans certains porcs après 5 à 7 jours PI et tous les animaux ont seroconverti au 14^{ème} jour PI (Yoon *et al.*, 1992 ; Yoon *et al.*, 1995). Les immunoglobulines (Ig) M spécifiques du PRRSV atteignent un pic au 14^{ème} jour PI et déclinent pour devenir indétectables entre 21 à 49 jours PI (Loemba *et al.*, 1996 ; Vezina *et al.*, 1996). Cependant, ces anticorps IgM et IgG ne sont pas neutralisants (Yoon *et al.*, 1994).

Les premiers anticorps détectés contre la protéine N apparaissent autour de la première semaine PI et persistent pendant plusieurs mois mais ils ne correspondent pas à une immunité protectrice. Les anticorps neutralisants ne sont pas détectés par des tests conventionnels de neutralisation virale (TNV) avant les trois à quatre premières semaines PI (Loemba *et al.*, 1996). L'addition de complément frais et une incubation prolongée avec le mélange virus-*serum* augmente la sensibilité du TNV et permet la détection d'anticorps neutralisants plus précocement, 9 à 12 jours PI (Jusa *et al.*, 1996). D'autres auteurs ont montré que l'ajout de complément frais lors du TNV pouvait augmenter le titre en anticorps neutralisants d'une dilution (Diaz *et al.*, 2005, 2006). Cependant, même avec ce TNV modifié, le titre en anticorps neutralisants reste relativement faible (1/32 et 1/64) au 42^{ème} jour PI. Les anticorps neutralisants sont constamment détectés au 28^{ème} jour PI ou plus tard aussi bien pour les souches NA que EU (Diaz *et al.*, 2005 ; Meier *et al.*, 2003 ; Yoon *et al.*, 1994). Ces anticorps neutralisants sont principalement dirigés contre la protéine GP5 laquelle contient un épitope neutralisant (épitope B) (Gonin *et al.*, 1999 ; Nelson *et al.*, 1994 ; Pirzadeh et Dea, 1997, 1998). D'après certaines études, les protéines GP4 et M contiendraient aussi des épitopes neutralisants (Cancel-Tirado *et al.*, 2004 ; Gonin *et al.*, 1999 ; Meulenberg *et al.*, 1997 ; Weiland *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2000) et un rapport suggère que la protéine GP3 posséderait aussi un épitope neutralisant (Cancel-Tirado *et al.*, 2004).

Le développement précoce d'anticorps non neutralisants pourrait avoir un effet significatif sur le développement du PRRS. Les anticorps non neutralisants augmentent la réplication virale dans les macrophages alvéolaires probablement par le phénomène de l'ADE (Yoon *et al.*, 1996 ; Yoon *et al.*, 1997). Les cibles de ces anticorps sont les protéines GP5 et N (Cancel-Tirado *et al.*, 2004 ; Yoon *et al.*, 1996).

Les anticorps neutralisants sont capables de bloquer l'infectiosité du PRRSV pour des PAM *in vitro* en réduisant l'attachement viral et l'internalisation du virus (Delputte *et al.*, 2004). De plus, le transfert d'anticorps neutralisants à des truies gestantes (titre en anticorps neutralisants de 1/16) protège les porcs contre les

anomalies de reproduction et bloque l'infection transplacentaire (Osorio *et al.*, 2002). En utilisant les mêmes systèmes de transfert d'anticorps qu'Osorio *et al.* (2002), Lopez *et al.* (2007) ont montré qu'un titre en anticorps neutralisants de 1/8 ou plus élevé protégeait les porcelets contre le développement de la virémie et que l'immunité stérilisante est obtenue à un titre en anticorps neutralisants de 1/32 (Lopez *et al.*, 2007).

1.2.6.2. Immunité à médiation cellulaire

Des études ont montré que des porcs convalescents suite à une infection expérimentale au PRRSV avaient une réponse proliférative forte en lymphocytes détectable à partir de la 4^{ème} semaine PI et parallèlement à la réponse en anticorps neutralisants (Bautista et Molitor, 1997 ; Lopez Fuertes *et al.*, 1999). Les réponses en cytokines sont principalement de type IFN- γ et dans une moindre mesure en interleukine (IL)-2 (Lopez Fuertes *et al.*, 1999).

Après vaccination avec un vaccin vivant modifié utilisant une souche NA du PRRSV, des cellules spécifiques sécrétant l'INF- γ apparaissent en premier à la 3^{ème} semaine *post-vaccination*, fluctuant de façon erratique de 50 à 100 par million de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) pour les dix semaines qui suivent, et augmentent alors à 400-500 par million de PBMC à 48 semaines *post-vaccination* (Meier *et al.*, 2003). Les cellules sécrétant l'IFN- γ sont principalement CD4⁺CD8⁺ avec une faible proportion de cellules T cytotoxiques CD4⁻/CD8 $\alpha\beta$ ⁺. Un développement retardé de cellules sécrétant de l'IFN- γ spécifiques au PRRSV a été évident après une infection ou une vaccination avec une souche EU du PRRSV (Diaz *et al.*, 2005, 2006). En comparaison, 200-300 cellules sécrétant l'IFN- γ par million de PBMC ont été détectées trois semaines après la vaccination contre le virus de la maladie d'Aujeszky (herpesvirose causé par un herpesvirus porcin de type 1) (Meier *et al.*, 2003).

1.2.7. Modulation de la réponse immunitaire par le PRRSV

1.2.7.1. Interférons

Des études montrent que le PRRSV est hautement sensible à l'action des interférons de type I et suggèrent que le virus est capable d'inhiber la réponse en IFN- γ . Les cytokines sont d'ailleurs indétectables dans les poumons des porcs chez lesquels le PRRSV est activement en répllication (Albina *et al.*, 1998 ; Van Reeth *et al.*, 1999). Le niveau d'IFN- α dans les poumons des porcs infectés avec le PRRSV est notamment plus faible que dans ceux des porcs infectés avec un coronavirus porcin ou un virus de l'*influenza* porcin (Van Reeth *et al.*, 1999). Les fréquences des cellules spécifiques du virus sécrétant l'IFN- γ ont été corrélées avec les fréquences des cellules sécrétant l'IFN- α chez les porcs infectés (Royae *et al.*, 2004). Bien que le mécanisme exact par lequel le PRRSV inhibe l'IFN- α soit inconnu, il n'implique pas l'inhibition de la voie du facteur nucléaire NF- κ B (Lee et Kleiboeker, 2005). Différents isolats du PRRSV et différents clones de plaque de la même souche ont différentes habiletés à induire ou inhiber l'IFN- α (Suradhat et Thanawongnuwech, 2003).

1.2.7.2. Cytokines

L'IL-10 pourrait avoir un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire du PRRSV. Cette cytokine est produite par les cellules B, T et les macrophages et possède des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives (Moore *et al.*, 1990). Après infection avec l'une ou l'autre des souches EU ou NA du PRRSV, le niveau d'ARNm d'IL-10 est augmenté dans les PBMC porcins (Suradhat et Thanawongnuwech, 2003 ; Suradhat *et al.*, 2003) et la concentration d'IL-10 augmente dans les fluides des lavages broncho-alvéolaires (Thanawongnuwech *et al.*, 2004). Quelques souches EU du PRRSV induisent une réponse forte en IL-10 dans les PBMC de porcs naïfs, suggérant que ce n'est pas une caractéristique mémorielle

(Diaz *et al.*, 2006). Les porcs vaccinés avec des souches de PRRSV induisant la production d'IL-10 ont un nombre de cellules sécrétant l'IFN- γ spécifiques du PRRSV plus bas que les animaux vaccinés avec une des souches n'induisant pas l'IL-10 (Diaz *et al.*, 2006). Les monocytes sont la source majeure d'IL-10 lors des infections au PRRSV (Chareerntantanakul *et al.*, 2006). Il est à noter que le PRRSV induit aussi l'IL-6 (Asai *et al.*, 1999 ; Sipos *et al.*, 2003) et le facteur transformant de croissance- β (TGF- β) mais le rôle de ce dernier dans les infections par le PRRSV reste incertain (Royace *et al.*, 2004).

1.2.7.3. Présentation d'antigène

Le PRRSV réprime l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-I dans les cellules dendritiques, ce qui conduirait à une réponse immunitaire adaptative peu efficace (Loving *et al.*, 2007). De plus, l'infection des cellules dendritiques dérivées des monocytes par le PRRSV compromet la présentation des antigènes et résulte en l'induction de l'apoptose de ces cellules, une baisse de l'expression du CMH-I, CMH-II, de CD11b/c et de CD14 ainsi que l'induction d'une réponse Th 1 minimale (Wang *et al.*, 2007).

1.2.7.4. La réponse humorale

L'épitope leurre (épitope A) pourrait interférer avec la réponse immunitaire contre l'épitope neutralisant (épitope B) de la protéine GP5. En effet, l'insertion d'une séquence de l'épitope Pan DR des cellules T auxiliaires (PADRE) entre l'épitope A et B augmente l'immunogénicité de l'épitope B chez la souris, suggérant que la proximité des épitopes A et B est importante dans le retard de la réponse en anticorps neutralisants (Fang *et al.*, 2006).

L'épitope leurre n'est pas le seul moyen par lequel le PRRSV peut échapper à la réponse humorale. La protéine GP5, cible principale des anticorps neutralisants, contient jusqu'à quatre sites de glycosylation localisés dans ou proche de l'épitope B

(Ansari *et al.*, 2006). Les souches de terrain NA du PRRSV dont ils manquent quelques sites de glycosylation en amont de la région hypervariable induisent des anticorps neutralisants plus rapidement et plus fortement chez des porcs infectés que les souches manquant le site de glycosylation en aval de la position N44, même si les souches sont toutes également sensibles aux anticorps neutralisants (Faaberg *et al.*, 2006). Les souches espagnoles du PRRSV récupérées lors d'épidémies ont évolué entre 1991 à 2005, ayant une tendance à perdre le site de glycosylation en position N46 (équivalent de la N44 des souches NA), correspondant à la sélection de souche induisant une réponse en anticorps neutralisants plus faible (Mateu *et al.*, 2006). En plus de l'épitope leurre et des glycosylations, la diversité génétique du PRRSV est un problème important dans la lutte contre le PRRS.

1.2.8. La diversité génétique du PRRSV

Le PRRSV est divisé en deux génotypes, le type I (EU) et le type II (NA) en se basant sur l'analyse des séquences des souches LV et VR-2332, respectivement. De plus, quatre sous-types ont été identifiés pour le génotype EU (Stadejek *et al.*, 2006). La diversité à l'intérieur d'un génotype ou d'un sous-type peut être importante (Forsberg *et al.*, 2002 ; Larochelle *et al.*, 2003 ; Mateu *et al.*, 2003 ; Stadejek *et al.*, 2006 ; Stadejek *et al.*, 2002). Le PRRSV montre aussi un phénomène de génération de quasi-espèces caractéristique des virus à ARN (Goldberg *et al.*, 2003 ; Rowland *et al.*, 1999) augmentant encore sa diversité génétique. La diversité génétique du PRRSV pose problème pour l'efficacité des vaccins, particulièrement avec les infections par le génotype EU (Mateu et Diaz, 2008).

Des truies gestantes infectées avec la souche NA NADC-8 et réinfectées avec l'isolat EU du LV à la fin de la gestation n'ont montré qu'une protection partielle, malgré un taux de protection élevée (le virus passe le placenta chez 1/7 des truies), contre les infections transplacentaires, alors que toutes les truies infectées avec le virus homologue furent entièrement protégées (Lager *et al.*, 1999).

En outre, les anticorps monoclonaux contre l'épitope du virus apparenté, le LDV, sont capables de neutraliser aussi bien la souche VR-2332 que la souche LV, indiquant que l'épitope neutralisant dans la protéine GP5 est partagé dans une certaine mesure avec d'autres artérovirus (Plagemann *et al.*, 2002).

Des porcelets vaccinés avec une version atténuée de la souche américaine NADC-8, 9 ou 14 furent infectés 21 jours *post* vaccination avec un mélange des versions virulentes de ces mêmes souches (Mengeling *et al.*, 2003). Une souche virulente donnée n'est pas détectée après une infection si les porcelets ont préalablement reçu une version atténuée de cette même souche. En revanche, les porcelets ne sont pas protégés contre l'infection avec les deux autres souches virulentes, indiquant ainsi que l'immunité contre le PRRSV pourrait être reliée à la souche (Mengeling *et al.*, 2003). Après une vaccination avec un vaccin vivant modifié de type EU, les porcs étaient presque tous négatifs pour la présence du virus dans le *serum* ou dans les fluides broncho-alvéolaires après un défi avec le LV (Labarque *et al.*, 2004). En comparaison, les porcs non vaccinés développent une virémie après 15 jours et sont positifs au niveau des fluides broncho-alvéolaires quand ils sont infectés avec une souche variante italienne qui a 84% de similarité avec la protéine GP5 de la souche du vaccin (Labarque *et al.*, 2004).

L'immunisation de porcs ayant reçu deux vaccins différents EU (V1) et (V3) a donné des résultats différents après un défi avec une souche espagnole [VP21, ayant une similarité génétique d'au moins 90% avec le vaccin le plus différent génétiquement, soit (V3)] (Diaz *et al.*, 2006). Étonnement le vaccin (V3) « hétérologue » offre une immunité stérilisante alors que le vaccin (V1) homologue ne le fait pas. Le vaccin (V3) induit un nombre plus élevé de cellules sécrétant de l'IFN- γ alors que le vaccin (V1) induit la sécrétion de l'IL-10 par les PBMC. Ces résultats ont montré que l'habilité d'une souche à induire une réponse IMC forte [cas du vaccin (V3)] était plus importante que la protection que pouvait induire la similarité génétique [cas du vaccin (V1)] (Diaz *et al.*, 2006).

Malgré les avancés au niveau des connaissances sur la réponse immunitaire contre le PRRSV et ses mécanismes d'évasion, aucun vaccin n'est encore suffisamment efficace pour contenir les épidémies de PRRS, ouvrant ainsi la porte à la recherche de méthodes de vaccinations moins conventionnelles.

1.2.9. Les vaccins contre le PRRSV

1.2.9.1. Généralité sur les vaccins

Les vaccins ont pour but d'induire une immunité à long terme qui est conférée par le maintien des effecteurs immunitaires spécifiques de l'antigène et/ou par l'induction de cellules immunitaires mémoires capables de réagir rapidement et de façon efficace à une réexposition à un pathogène (Siegrist, 2008) (**Figure 1.8**).

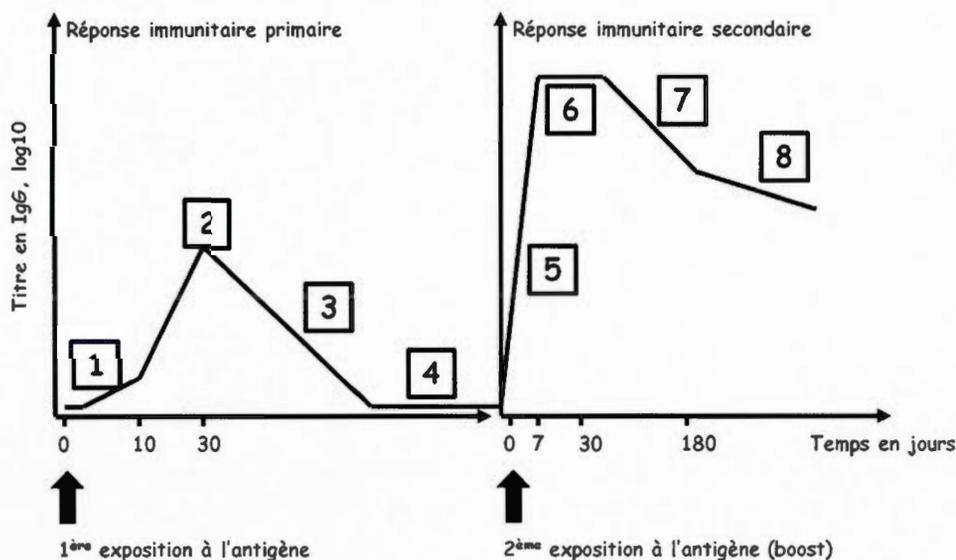


Figure 1.8. Diagramme de cinétique des anticorps suite à une vaccination. Après une première exposition à un antigène, la réponse extrafolliculaire va être initiée (1), ce qui va induire une réponse rapide mais faible en IgG. Pendant que les cellules B prolifèrent et se différencient en cellules plasmatiques, le titre en IgG va augmenter pour atteindre un pic (2) souvent atteint après la quatrième semaine qui suit l'exposition. La faible durée de vie des cellules plasmatiques va rapidement entraîner une baisse du titre en IgG (3), qui peut même revenir à son niveau basal (4). Lors de

la deuxième exposition (ou boost), l'antigène active la mémoire immunitaire résultant en une augmentation rapide du titre en IgG (<7jours) (5). Les cellules plasmiques à courte durée de vie vont maintenir le titre en IgG à un pic (6) pendant quelques semaines, après quoi le titre en anticorps sérique diminue avec la même cinétique que lors de la première exposition (7). Les cellules plasmiques à longue durée de vie présentes dans la moelle osseuse vont alors permettre la production d'anticorps spécifiques de l'antigène qui vont diminuer avec une cinétique plus lente (8). Note : ce diagramme général peut ne pas s'appliquer aux vaccins vivants qui déclenchent des IgG à long terme (Siegrist, 2008).

La première étape pour induire une réponse suite à une vaccination est de produire un signal de danger suffisant, par l'intermédiaire de l'antigène et/ou de l'adjuvant, pour induire une réponse inflammatoire qui est relayée par les cellules du système immunitaire inné (cellules dendritiques, monocytes et neutrophiles) (Hoebe *et al.*, 2004 ; Siegrist, 2008). Si le signal est suffisamment fort, les monocytes et les cellules dendritiques vont changer leur récepteur de surface et migrer vers les ganglions lymphatiques où l'activation des cellules B et T a lieu (Siegrist, 2008). Les effecteurs immunitaires principalement induits par un vaccin sont les anticorps produits par les lymphocytes B qui sont capables de se lier à une toxine ou un pathogène (Cooper et Nemerow, 1984 ; Siegrist, 2008) (**Tableau 1.2**). De plus, les lymphocytes cytotoxiques CD8⁺ limitent la propagation de l'infection en s'attaquant aux cellules infectées et en libérant des cytokines antivirales spécifiques (**Tableau 1.2**). La génération et le maintien de la réponse en cellules B et T CD8⁺ sont soutenus par des facteurs de croissance et des signaux venant des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (**Tableau 1.2**). Ces effecteurs sont contrôlés par les cellules T régulatrices qui sont impliquées dans le maintien de la tolérance (Bacchetta *et al.*, 2005 ; Siegrist, 2008). La plupart des vaccins activent aussi bien les cellules B (immunité humorale) que les cellules T (immunité cellulaire). De plus, les cellules T CD4⁺ sont requises pour la majorité des réponses en anticorps qui eux-mêmes ont une influence sur la réponse des cellules T lors de l'infection par des pathogènes intracellulaires (Igiertseme *et al.*, 2004 ; Siegrist, 2008).

Tableau 1.2. Effecteurs induits par la vaccination (d'après Siegrist, 2008)

<p>▪ Les anticorps préviennent ou réduisent les infections des agents extra- et intracellulaires et éliminent les pathogènes extracellulaires par:</p> <ul style="list-style-type: none"> - une liaison aux sites actifs de la toxine ou en empêchant leur diffusion. - la neutralisation de la réplication virale - promouvant l'opsonophagocytose des bactéries extracellulaires - activant la cascade du complément
<p>▪ Les cellules T CD8⁺ ne préviennent pas mais réduisent, contrôlent et éliminent les pathogènes intracellulaires en:</p> <ul style="list-style-type: none"> - tuant directement les cellules infectées - en tuant indirectement les cellules infectées par la libération de cytokines antibactériennes
<p>▪ Les cellules CD4⁺ ne préviennent pas mais participent à la réduction, au contrôle et à l'élimination des pathogènes extra- et intracellulaires en:</p> <ul style="list-style-type: none"> - produisant de l'IFN-γ, TNF-α/β, IL-2 et IL-3 et en supportant l'activation et la différenciation des cellules B et des macrophages (rôle des cellules Th1) - produisant de l'IL-4, IL-5, IL-13, IL-6 et IL-10 et en supportant l'activation et la différenciation des cellules B (rôle des cellules Th2)

1.2.9.2 Différentes stratégies de vaccination contre le PRRSV

Deux types de vaccins contre le PRRSV sont actuellement présents sur le marché : les vaccins vivants atténués modifiés (MLV) et les vaccins inactivés (Kimman *et al.*, 2009). Le premier MLV date de 1994. Bien que généralement efficace contre des souches homologues du virus, ces types de vaccins restent peu efficaces voire inefficaces contre les souches hétérologues (Labarque *et al.*, 2004). Les vaccins commerciaux à base de virus inactivés sont quant à eux limités dans leur utilisation du fait de la grande variabilité génétique des souches de terrains du PRRSV (Huang et Meng, 2010).

Dans les dernières années, plusieurs vaccins expérimentaux ont été évalués pour améliorer la lutte contre le PRRSV. En 1997, une équipe a cloné dans un système baculovirus les ORF 2 à 7 de l'isolat espagnol Olot/91 du PRRSV (Plana

Duran *et al.*, 1997). Les auteurs immunisèrent des truies gestantes avec les produits des gènes des ORF 3, 5 ou 7 choisis suite à une étude préliminaire chez la souris. En observant le nombre de porcelets nés vivants et en bonne santé au temps du sevrage, les auteurs montrèrent que les produits des gènes de l'ORF3 et de l'ORF5 conféraient une protection de 68,4% et 50% aux porcelets, respectivement. De plus, ces porcelets étaient séronégatifs pour le PRRSV (Plana Duran *et al.*, 1997). En 1998, un plasmide ADN exprimant la protéine GP5 était testé et était capable d'induire des anticorps neutralisants chez des souris BALB/c et des porcs ainsi qu'une réponse cellulaire spécifique (Pirzadeh et Dea, 1998). De plus, les porcs vaccinés étaient capables de survivre à un défi contre la souche virulente IAF-klop du PRRSV (Pirzadeh et Dea, 1998). En 2003, le premier rapport utilisant des adénovecteurs exprimant la protéine GP5 était publié (Gagnon *et al.*, 2003). Dans cette étude, les porcs ont été immunisés deux fois par voie intradermique et un défi avec la souche virulente homologue a ensuite été réalisé. Les auteurs ont démontré que les premiers anticorps contre la protéine GP5 apparaissaient 10 jours après le défi. Parmi les six porcs immunisés, deux porcs avaient un titre en anticorps neutralisant compris entre 128-256 et un autre a atteint un titre de 16 (Gagnon *et al.*, 2003). En 2004, un vaccin de type Bacillus Calmette-Guérin (BCG) recombinant exprimant la protéine GP5 tronquée (sans les trente premiers acides aminés en position N-terminale) (rBCGGP5) et la protéine M (rBCGM) du PRRSV a été utilisé pour immuniser des porcs (Bastos *et al.*, 2004). Les porcs immunisés avec rBCGGP5 et rBCGM ont développé une réponse humorale spécifique contre ces protéines au jour 30 PI. Au jour 60 PI, trois porcs sur cinq développaient des anticorps neutralisants avec un titre variant de 1:4 à 1:8. Un défi avec une souche pathogène du PRRSV (16244B) ne montrait qu'une protection partielle chez ces porcs (Bastos *et al.*, 2004). En 2005, le remplacement des codons sauvages de l'ORF5 par des codons optimisés pour des gènes de mammifère (synORF5) permettait d'obtenir une réponse immunitaire plus précoce et plus forte suite à l'immunisation avec la protéine GP5 codée par le synORF5 en comparaison avec la protéine GP5 codée par l'ORF5 sauvage (wtORF5) (Kheyar *et al.*, 2005).

Ainsi, des porcs immunisés avec des adénovecteurs exprimant synORF5 puis soumis à un défi avec une souche pathogène du PRRSV développèrent un titre en anticorps neutralisants, compris entre 128 et 256, plus rapidement que des porcs inoculés avec des adénovecteurs exprimant wtORF5 dont le titre en anticorps neutralisants était compris entre 8 et 16 (Kheyar *et al.*, 2005). En 2006, une équipe co-exprimait sous le contrôle de deux promoteurs différents, les protéines M et GP5 dans un vecteur ADN (pCI-ORF5/ORF6) (Jiang *et al.*, 2006). L'immunisation de porcs avec cette construction leur a permis d'obtenir une réponse en anticorps neutralisants huit semaines après la première immunisation à un titre de 1:8 pour quatre porcs sur 5 alors que la construction n'exprimant que l'ORF5 (pCI-ORF5) ne permettait pas la détection d'anticorps neutralisants, même après dix semaines (Jiang *et al.*, 2006). En 2007, la protéine M et une protéine GP5 modifiée [GP5m, dans laquelle la séquence PADRE a été insérée entre les acides aminés 32 et 33 (Fang *et al.*, 2006)] étaient exprimées en tandem en utilisant comme vecteur vaccinal le virus pseudorabies atténué (PRV) (Jiang *et al.*, 2007). Cette construction, rPRV-GP5m-M, a été utilisée pour immuniser des porcs et a montré une réponse immunitaire en anticorps neutralisants et une réponse lymphoproliférative plus forte que celle obtenue avec un vaccin commercial à base de PRRSV inactivés. De plus, suite à un défi chez le porc avec une souche virulente du PRRSV, le rPRV-GP5m-M a généré une meilleure protection que le vaccin (Jiang *et al.*, 2007). La même année, une autre équipe utilisait le virus ankara atténué de la vaccine (MVA) comme vecteur pour exprimer les protéines M et GP5. Elles furent exprimées dans un même virus recombinant (rMVA) mais sous deux promoteurs différents (rMVA-GP5/M), sous un même promoteur (rMVA-GP5-M) ou séparément (rMVA-GP5 et rMVA-M) (Zheng *et al.*, 2007). Les constructions ont été évaluées chez la souris. La construction rMVA-GP5/M a permis d'obtenir la meilleure réponse cellulaire contre le PRRSV et une réponse humorale anti-PRRSV (Zheng *et al.*, 2007). En 2008, les fusions des protéines GP3-GP5, GP4-GP5 ou GP3-GP4-GP5 exprimées par des adénovecteurs recombinants non répliatifs ainsi que des constructions exprimant GP3, GP4 ou GP5

seule furent testées chez la souris par voie sous-cutanée (Jiang *et al.*, 2008). Les résultats montrèrent que les protéines de fusion induisaient un titre en anticorps neutralisants plus élevé et une réponse lymphocytaire proliférative plus forte que les constructions simples. De plus, les fusions GP3-GP5 et GP3-GP4-GP5 induisaient une réponse cytotoxique significativement plus forte que les autres constructions (Jiang *et al.*, 2008). Les adénovecteurs furent également utilisés pour tester la fusion GP3-GP5-GM-CSF (GM-CSF, facteur stimulant des colonies de granulocytes et de macrophages) chez des souris et des porcs (Wang *et al.*, 2009). Cette fusion a permis d'obtenir une meilleure réponse en anticorps neutralisants que les constructions exprimant seulement GM-CSF-GP3 ou GM-CSF-GP5. De plus, elle augmenta significativement la sécrétion IFN- γ et d'IL-4 (Wang *et al.*, 2009). En 2010, une équipe rapportait pour la première fois l'expression d'une protéine du PRRSV, la GP5, chez les plantes (Chia *et al.*, 2010). L'immunogénicité de la protéine fut testée chez des porcs par voie orale. Il fut rapporté que la protéine GP5 exprimée chez *Nicotiana benthamiana* était capable d'induire un titre en anticorps neutralisants compris entre 1:4 et 1:8 48 jours après la première vaccination, une réponse mucoale spécifique ainsi qu'une réponse humorale systémique et cellulaire (Chia *et al.*, 2010).

1.3. Les vaccins à base de plante

1.3.1. Statut actuel et défi

Les protéines à fonction thérapeutique produites dans les plantes font référence à des protéines servant à des applications cliniques humaines ou vétérinaires et générées dans des systèmes recombinants de plantes. Ils peuvent être grossièrement divisés en fonction de la technologie utilisée, à savoir, la transgénèse nucléaire, la transplastomique chloroplastique ou les technologies virales pour les plantes (Daniell *et al.*, 2009). L'avantage majeur des systèmes d'expression dans les plantes sur les autres systèmes de production de vaccins est le coût réduit de

production. En revanche, leur principal désavantage est le risque de dissémination dans la nature des transgènes. Pour remédier à ce problème, différentes méthodes peuvent être utilisées comme l'hérédité maternelle, la stérilité mâle, l'expression dans les tissus végétatifs avec une récolte avant l'apparition de structure reproductive, des serres de confinement ou encore l'utilisation de plantes ayant une expression transitoire du transgène. Dans le cas des vaccins oraux ou de molécules thérapeutiques produits dans les plantes, le traitement en aval coûte aussi moins cher du fait de l'absence de nécessité de stérilité, de transport ou d'entreposage particulier et de purification des protéines jusqu'à 99% (Daniell *et al.*, 2009 ; Davoodi-Semiromi *et al.*, 2009).

Comme pour les autres systèmes eucaryotiques, les plantes permettent l'introduction des modifications *post*-traductionnelles, le bon repliement des protéines et la formation des ponts disulfures qui se font aussi bien au niveau des chloroplastes (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2009) que du RE (Moravec *et al.*, 2007). Les modifications lipidiques nécessaires à certains antigènes vaccinaux ont aussi été observées au niveau des chloroplastes (Glenz *et al.*, 2006). En revanche, les protéines ne sont pas glycosylées dans les chloroplastes mais le sont quand elles sont ciblées au RE, bien que le patron de glycosylation ne soit pas exactement identique aux systèmes mammaliens (Daniell *et al.*, 2009). Même si plusieurs protéines thérapeutiques ont été exprimées dans des cellules végétales, plusieurs défis restent dont l'inhibition des transgènes dans le noyau des plantes transgéniques par ARN interférence (ARNi). Et comme pour les autres systèmes d'expression, les niveaux de production dépendent des protéines (Daniell *et al.*, 2009). Mais dans le cas des plantes, l'expression peut aussi varier en fonction du stade de développement de la plante, du moment de la journée et des séquences de localisation cellulaire utilisées. Cependant le défi le plus important sera d'arriver à atteindre un niveau d'expression constant du transgène, indépendamment des lots de plantes testés (Daniell *et al.*, 2009). Enfin, l'élimination des agrobactéries après l'infiltration est encore un autre problème à résoudre dans le cas de l'expression transitoire (Daniell *et al.*, 2009).

Au cours des 20 dernières années, les antigènes pour des vaccins exprimés *via* le génome nucléaire des plantes ont induit des réponses en immunoglobulines appropriées et ont conféré des protections suite à des administrations par voie orale (Arntzen, 2008 ; Yusibov et Rabindran, 2008) mais aucun vaccin à base de plantes transgéniques n'est passé pour le moment au-delà de la phase clinique I (Yusibov et Rabindran, 2008).

La compagnie Protalix a cependant eu l'autorisation par la *Food and Drug Administration* (FDA) de tester en phase clinique III la production de l'enzyme glucocérébrosidase exprimée chez les plantes, enzyme qui sert de traitement contre la maladie de Gaucher (Aviezer *et al.*, 2009). De son côté, la compagnie Biolex teste le Locteron®, un traitement contre l'hépatite C en phase clinique II à base d'INF α produite à l'aide de leur système LEXSM basé sur l'utilisation d'une plante aquatique flottante du genre *Lemna*. Les résultats sur Locteron® furent présentés à la conférence de l'*European Association for the Study of the Liver* (EASL) à Berlin en Allemagne fin mars 2011. Une diminution des symptômes de type grippaux et une baisse de la dépression chez les patients furent observées en comparaison avec les patients traités avec le *pegylated IFNa2b* (PEG-Intron®, Merck, White House Station, New Jersey, USA). Une étude en phase clinique III a été approuvée pour 2011 (<http://www.biolex.com>).

1.3.2. La stabilité des transgènes nucléaires intégrés

La première étude utilisant l'expression recombinante d'antigènes vaccinaux chez les plantes a été faite en utilisant une transformation stable du génome nucléaire du tabac (*Nicotiana tabacum*) (Mason *et al.*, 1992). Les avantages de cette technique est de pouvoir récupérer des graines, permettant ainsi l'exploitation à grande échelle des protéines d'intérêt. La possibilité d'exprimer les protéines dans les fruits ou dans les autres organes comestibles de la plante est un autre avantage intéressant pour leur utilisation par voie orale car elles ne nécessiteraient pas d'étape de purification. En

revanche, la stabilité nucléaire du transgène ne permet généralement qu'un faible niveau d'expression (<1% des protéines solubles totales) qui varie souvent d'une plante à une autre et de génération en génération, probablement dû à l'ARN interférence ou à un effet de position dû à l'insertion au hasard dans le génome de la plante de celui-ci (Voinnet *et al.*, 2003). De plus, cette technique de transgénèse pose le problème de la dissémination du transgène dans la nature.

Plusieurs antigènes vaccinaux ont été produits dans différentes espèces végétales, incluant le tabac et des plantes comestibles comme *Solanum tuberosum* (la pomme de terre), *Solanum lycopersicum* (la tomate), *Zea mays* (le maïs), *Daucus carota* (la carotte) et *Glycine max* (le soya). L'administration de plusieurs antigènes dérivés de plantes ont induit des anticorps spécifiques chez la souris et chez l'humain (dans quelques essais cliniques) (Arakawa *et al.*, 1998 ; Tacket *et al.*, 1998). Les antigènes vaccinaux dérivés de pathogènes entériques comme la protéine de la capsid du virus de Norwalk (NVCP) (Zhang *et al.*, 2006), la protéine de capsid du rotavirus, la sous-unité B de la toxine du choléra de la protéine bactérienne de liaison au ganglioside (CTB) (Jiang *et al.*, 2007 ; Nochi *et al.*, 2007) et la toxine B thermolabile d'*Escherichia coli* (LTB) (Moravec *et al.*, 2007 ; Rosales-Mendoza *et al.*, 2008) ont été largement évaluées dans les plantes à transgène nucléaire. Des souris immunisées avec de la LTB dérivée de carotte ont permis une protection contre l'administration de la toxine cholérique (CT) (Rosales-Mendoza *et al.*, 2008). De même, la CTB dérivée du riz administrée par voie orale a permis la production d'IgG et d'IgA neutralisants spécifiques de la CTB (Nochi *et al.*, 2007). Plusieurs autres antigènes de pathogènes non entériques comme la protéine F du virus respiratoire syncytial (Sandhu *et al.*, 2000) et l'antigène de surface de l'hépatite B (Richter *et al.*, 2000 ; Thanavala *et al.*, 2005) induisent la production d'anticorps spécifiques contre les antigènes lors d'administration par voie orale. Souvent l'utilisation d'adjuvants est requise pour cette stimulation. Par exemple, dans le cas de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) donné aux souris dans des tubercules de pommes de terre transgéniques (Kong *et al.*, 2001), il a été nécessaire d'utiliser la CT, un adjuvant

mucosal potentiel pour stimuler la production d'un niveau significatif d'anticorps anti-HBsAg. Cependant, les mêmes pommes de terre exprimant HBsAg ont été données à des humains sans adjuvant et ont produit un *serum* contenant des anti-HBsAg chez la plupart des volontaires.

Les organes de plantes (excepté les graines) ont une durée de conservation limitée à l'état frais. Or, il est nécessaire de pouvoir pratiquer des tests sur les échantillons de plantes, comme le contrôle du niveau d'expression des protéines recombinantes, avant leur formulation en vaccins. De ce fait, il est improbable que le matériel de plante frais puisse être utilisé directement sans étapes préalables de conservation. Certains traitements, comme la dessiccation par congélation des fruits ou d'autres organes, peuvent être utilisés pour produire des échantillons qui pourront être validés pour leur stabilité et leur potentialité (Daniell *et al.*, 2009). Par exemple, il a été démontré pour le NVCP qu'une administration orale de tomates transgéniques ayant subi une dessiccation par air ou par gel était aussi immunogène que les fruits frais (Zhang *et al.*, 2006). En revanche, les résultats d'immunisation avec des pommes de terre exprimant NVCP ayant subi une dessiccation par le gel montraient une baisse d'immunogénicité en comparaison avec des pommes de terre fraîches (Zhang *et al.*, 2006), probablement dû à l'oxydation des composés phénoliques présents dans les pommes de terre déshydratées. Les vaccins à base de graines sont particulièrement attrayants pour le développement de produits vétérinaires grâce à leur facilité de stockage et d'administration et ont montré des résultats prometteurs dans des études sur des animaux d'élevage (Lamphear *et al.*, 2002).

1.3.3. Expression transitoire avec des vecteurs viraux

Le développement de système de vecteurs viraux pour l'expression transitoire a permis une expression rapide de protéines recombinantes à un niveau plus élevé que les plantes transgéniques ayant des transgènes stables intégrés dans le noyau. Le virus de la mosaïque du tabac (TMV), bien qu'étant un virus à ARN qui se réplique dans le

cytosol, peut être administré sous la forme d'une construction ADN ainsi transcrite dans le noyau pour produire de l'ARN viral. La technologie magnICON® a été utilisée pour exprimer l'antigène du « cœur » de l'hépatite B (HBcAg) (Huang *et al.*, 2006), HBsAg (Huang *et al.*, 2008), NVCP (Santi *et al.*, 2008) ou l'antigène de la peste F1 et V à des niveaux allant jusqu'à 1 à 2 mg/g de masse de feuilles fraîches dans *Nicotiana benthamiana*. La technologie MagnICON® (Marillonnet *et al.*, 2004) consiste en trois éléments : les modules 5' et 3' de pro-vecteurs viraux et un module contenant une cassette d'expression pour une intégrase (**Figure 1.9**).

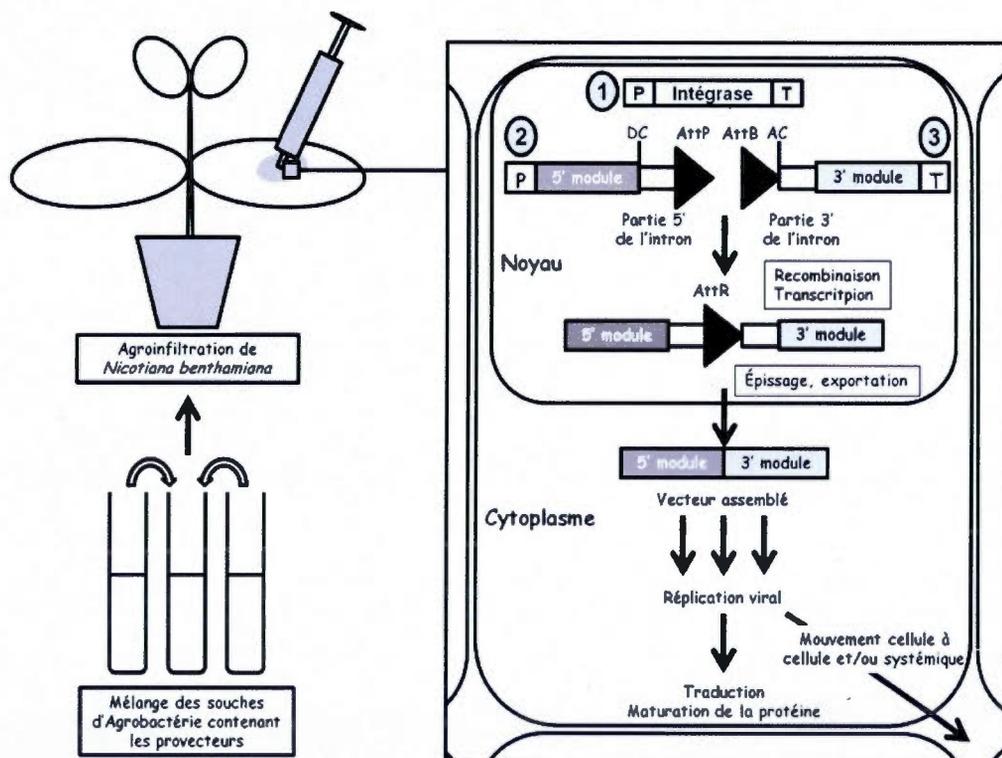


Figure 1.9. Schéma du système d'expression MagnICON®. (1) représente le module contenant l'intégrase. (2) représente le module 5' du pro-vecteur. (3) représente le module 3' du pro-vecteur. P : promoteur ; T : terminateur ; DC : donneur de coupure ; AC : accepteur de coupure ; AttB et AttP : sites de recombinaison spécifiques ; AttR : site résultant de la recombinaison AttB + AttP (d'après Marillonnet *et al.*, 2004).

Ces trois éléments sont introduits chez *Nicotiana benthamiana* par agroinfiltration. Dans une technologie similaire de « vecteur navette », un éventail de candidats a été exprimé dans *Nicotiana benthamiana* tels que l'antigène protecteur de *Bacillus anthracis* (Chichester et al., 2007), les antigènes F1 et LcrV de *Yersinia pestis* (Mett et al., 2007) et l'hémagglutinine (HA) de l'*Influenza* de la souche H3N2 (Shoji et al., 2008). Étant donné que le tabac et ses proches parents, comme *N. benthamiana*, sont des plantes modèles pour ces systèmes, ils sont souvent privilégiés. Les vecteurs sont généralement introduits par infiltration d'agrobactéries par le vide, ce qui implique que le produit doit être purifié pour une administration de type vaccinal (Daniell et al., 2009). Cependant, parce qu'une étape de purification est nécessaire, les antigènes solubles pourraient perdre de leur immunogénicité orale de par la perte de l'effet d'encapsulation fournie par les plantes qui pourraient aider à les protéger des conditions extrêmes de l'estomac (Daniell et al., 2009). Néanmoins, la NVCP partiellement purifiée des feuilles de tabac a permis l'induction d'IgG sériques et d'IgA mucosaux après une administration orale à des souris (Santi et al., 2008). Une approche qui pourrait circonvenir à ces limitations est l'expression d'antigènes vaccinaux comme particules de type viral (VLP). Ceci a été suivi pour un système d'expression transitoire non viral avec des résultats d'immunogénicité prometteurs à la suite d'une injection d'antigène purifié d'*influenza* (D'Aoust et al., 2008).

Un autre système de réplicon d'ADN a été développé en utilisant un *Geminivirus*, le virus du pois jaune nain (BeYDV) (Huang et al., 2009). La construction est amenée par agroinfiltration et est similaire au système magnICON® ou au système « vecteur navette ». Le système de « vecteur navette » (Musiychuk et al., 2007) peut être utilisé comme un vecteur unique, alors que le système magnICON® nécessite trois vecteurs séparés (Santi et al., 2008 ; Santi et al., 2006). Avec le système BeYDV, la production de HBcAg et de NVCP varie entre 0,5 et 0,8 mg/g de masse de feuilles fraîches (Huang et al., 2006), laquelle est similaire à celle obtenue avec le système magnICON® (Santi et al., 2008). Le système magnICON® a aussi été adapté pour l'expression d'IgG mais requiert la combinaison du réplicon

du TMV avec un réplicon du virus de la pomme de terre X (Giritch *et al.*, 2006) et cinq différents vecteurs d'agrobactéries. Le réplicon du BeYDV a aussi été incorporé de façon stable dans le génome nucléaire avec un promoteur inductible conduisant le gène viral Rep à contrôler l'amplification des gènes (Zhang et Mason, 2006). Une augmentation de dix fois l'expression de NVCP dans la culture de cellules de tabac a été obtenue (Zhang et Mason, 2006).

1.3.4. Protéines pharmaceutiques dérivées du noyau

La stratégie des plantes transgéniques nucléaires a été utilisée dans plusieurs études pour démontrer la production de protéines humaines de valeur thérapeutique, incluant les facteurs de croissance épidermique, l'albumine sérique, l'interféron, des interleukines, les lysozymes, la lactoferrine et l'acide β -glucosidase (Daniell *et al.*, 2009). Cependant, comme avec les antigènes vaccinaux, le niveau d'expression est souvent faible. Des tests spécifiques démontrent une activité des protéines *in vitro*, mais aucune étude détaillée n'a encore été publiée chez les animaux. Ainsi, les cellules de plantes peuvent synthétiser et ajouter les modifications *post*-traductionnelles aux protéines de mammifères. Dans certains cas, les glycosylations spécifiques du RE des plantes ou des protéines ciblées à la surface de la cellule pourraient produire des réactions immunogéniques indésirables contre la protéine recombinante et ainsi diminuer sa demi-vie et de ce fait son utilité (Daniell *et al.*, 2009). Cependant, la production de la β -glucosidase dans des graines de tabac a démontré une absence de résidus xylose et fructose qui peuvent être immunogéniques (Reggi *et al.*, 2005). Si l'expression basée sur les graines des autres protéines du RE ou ciblée à la surface des cellules produit des résultats similaires, alors l'adressage des protéines recombinantes aux vacuoles de stockage des graines pourrait être intéressant. La rétention au RE des protéines par l'introduction d'une séquence KDEL ou similaire dans la région C-terminale (Jani *et al.*, 2004) sert à limiter la glycosylation des protéines recombinantes en comparaison aux protéines ciblées à la

surface. Ainsi, les avancées récentes dans l'ingénierie des glycanes de plantes permettraient une large application à la production de glycoprotéines pharmaceutiques chez les plantes (Strasser *et al.*, 2008).

1.3.5. Les antigènes vaccinaux et thérapeutiques dérivant de chloroplastes

Avec les technologies chloroplastiques d'expression stable, les gènes étrangers sont intégrés dans le génome du chloroplaste par des recombinaisons homologues (Verma et Daniell, 2007), éliminant la variabilité d'expression au sein des lignées transgéniques indépendantes. De plus, l'ARN interférence n'a pas encore été rapporté dans les lignées transgéniques chloroplastiques (transplastomiques). Des hauts niveaux d'expression d'antigènes vaccinaux sont facilités par la présence d'un nombre de copies de transgènes supérieurs à 10 000 dans chaque cellule de plantes transformées. L'expression chloroplastique minimise le risque de transfert de gènes étrangers *via* le pollen de cultures modifiées génétiquement à d'autres cultures apparentées ou aux herbes en raison de l'héritage maternel des transgènes (Daniell, 2002, 2007). De plus, l'expression de protéines thérapeutiques dans les feuilles facilite leur récolte avant le développement de toute structure reproductive et offre des opportunités supplémentaires pour le stockage. Plusieurs antigènes vaccinaux dérivant de chloroplastes et plusieurs protéines biopharmaceutiques ont été produits dans des plantes en conditions de champ et au moins une étude de ce type a été publiée, montrant la production de l'IFN- α 2b à un niveau élevé dans les feuilles de tabac (3 mg/g de masse fraîche de feuilles) (Arlen *et al.*, 2007). À ce jour, vingt trois antigènes vaccinaux contre seize différentes maladies et onze protéines biopharmaceutiques ont été exprimés dans les chloroplastes. La présence des chaperonnes et des enzymes de modifications *post*-traductionnelles dans le chloroplaste permet le traitement et l'assemblage des cibles avec les modifications *post*-traductionnelles appropriées [assemblage en multimère, ponts disulfure, modifications lipidiques (palmitoylation, myristoylation et prenylation), etc.]. De plus,

les événements de N-glycosylations ne sont pas connus pour se produire dans le chloroplaste (Daniell *et al.*, 2009). Le système d'expression chloroplastique a été utilisé pour produire plusieurs antigènes vaccinaux entièrement fonctionnels contre des pathogènes bactériens [la sous-unité CTB (Daniell *et al.*, 2001)], viraux [l'antigène 2L21 du parvovirus canin (CPV) fusionné à la CTB (Molina *et al.*, 2004)] et protozoaires [un antigène d'*Entamoeba histolytica*, Lec A (Chebolu et Daniell, 2007)]. Des protéines difficilement exprimées dans d'autres systèmes, comme certaines protéines antimicrobiennes ont aussi été exprimées dans les chloroplastes (DeGray *et al.*, 2001 ; Oey *et al.*, 2009). En plus des plantes, les chloroplastes des *Chlamydomonas* ont été utilisés pour l'expression de protéines thérapeutiques, bien que l'obtention d'un niveau élevé d'expression était un défi majeur jusqu'à la récente amélioration de ces systèmes (Surzycki *et al.*, 2009).

L'une des limitations majeures dans ce domaine est que plusieurs antigènes vaccinaux et protéines thérapeutiques ont été exprimés seulement dans le tabac. Le tabac n'est pas comestible et l'addiction à la nicotine en fait aussi un système d'administration par voie orale inadapté pour des protéines thérapeutiques. Comme alternative, le système de transformation de plante de carotte a été développé pour l'expression de gène dans les tissus comestibles pour faciliter l'administration orale (Kumar *et al.*, 2004). Cependant, la régénération de la carotte est lente et n'est pas adaptée pour la production rapide de protéines thérapeutiques. L'expression de l'antigène p24 du HIV a été observée dans les feuilles de tomates alors que celle-ci est réduite à plus de 90% au niveau des fruits verts et qu'aucune expression n'est détectable dans les fruits mûrs (Zhou *et al.*, 2008). La transformation des chloroplastes de *Lactuca sativa L.* a aussi été développée (Kanamoto *et al.*, 2006 ; Lelivelt *et al.*, 2005 ; Ruhlman *et al.*, 2007) alors que la pro-insuline a été exprimée avec succès dans les chloroplastes de laitue (Ruhlman *et al.*, 2007).

Un autre défi pour l'administration orale des protéines dérivées des chloroplastes est d'avoir une dose adéquate pour conférer une immunité ou induire une tolérance dans le cas des auto-antigènes. Dans ce contexte, il a été démontré que

les protéines thérapeutiques dérivées de chloroplaste et administrées oralement *via* des cellules végétales sont protégées de la dégradation dans l'estomac, probablement grâce à la bio-encapsulation des antigènes par la paroi cellulaire des plantes (Daniell *et al.*, 2009). Pour faciliter la translocation des antigènes vaccinaux ou thérapeutiques du *lumen* de l'intestin vers le système circulatoire, les protéines d'intérêt ont été fusionnées à la protéine de transport trans-mucosal CTB, laquelle peut se lier au récepteur de l'*epithelium* GM1 (Limaye *et al.*, 2006). Cette approche a été largement utilisée pour des antigènes à administration orale aussi bien pour des transgènes nucléaires stables que pour des approches transplastomiques (Daniell *et al.*, 2009).

Le premier antigène viral capable d'induire une réponse immunitaire protectrice exprimé dans les chloroplastes a été un antigène provenant de CPV (Molina *et al.*, 2004 ; Molina *et al.*, 2005). Les souris immunisées par voie intrapéritonéale avec l'épitope 2L21 de la protéine VP2 du CPV fusionné à la protéine CTB exprimée dans les chloroplastes ont induit des anticorps anti-2L21. En outre, les anticorps induits chez le lapin par un extrait de plante enrichi en CTB-2L21 neutralisaient l'infection des cellules épithéliales félines (CRFK) par CPV (Molina *et al.*, 2005). La protéine structurale E2, un antigène neutralisant du virus de la fièvre porcine classique (CSFV), a été exprimée dans des chloroplastes de tabac et l'immunisation sous-cutanée de souris a induit une réaction en anticorps sérique contre le CSFV. Cependant, aucune réponse immunitaire n'a été détectée par voie orale (Shao *et al.*, 2008), au contraire des études décrites pour l'épitope F1-V du bacille de la peste (Arlen *et al.*, 2008 ; Santi *et al.*, 2006).

Il a été montré que les vaccins sous-unitaires dérivés de chloroplastes contre le peptide pE2 codé par l'ORF2 du virus de l'hépatite E induisent des anticorps spécifiques contre pE2 chez des souris immunisées par voie sous-cutanée (Skidmore, 2002 ; Zhou *et al.*, 2006). Un autre exemple, a été l'expression par le génome chloroplastique du tabac de la protéine structurale majeure de la capsid de papillomavirus humain 16 (HPV-16), L1. La protéine L1 du HPV dérivée du chloroplaste est capable de former un épitope conformationnel spécifique et de

s'assembler en VLP visible par microscopie électronique à transmission (Fernández-San Millán *et al.*, 2008 ; Lenzi *et al.*, 2008). De plus, une extraction protéique de feuille exprimant la protéine L1 dérivée du chloroplaste est immunogène et peut induire la production d'anticorps quand elle est injectée chez des souris infectées par voie intra-péritonéale (Fernández-San Millán *et al.*, 2008).

L'utilisation de plantes exprimant des protéines immunogéniques pour la vaccination par voie orale, qu'elles soient exprimées par transformation nucléaire, par des vecteurs viraux ou par la transplastomique chloroplastique, nécessitera l'utilisation d'adjuvant pour optimiser la réponse immunitaire comme c'est déjà le cas pour la plupart des autres types de vaccins.

1.4. Adjuvants

Le mot adjuvant vient du latin *adiuvare* qui signifie aider. Ramon, en 1924, fut le premier à décrire les adjuvants comme « une substance utilisée en combinaison avec un antigène spécifique qui produit une meilleure immunité que l'antigène seul » (Ramon, 1924).

Les adjuvants sont utilisés pour leur capacité à renforcer la réponse immunitaire d'antigène à faible pouvoir immunogénique, à accélérer ou prolonger la réponse immunitaire contre un antigène ou encore à moduler la production en cytokines pour orienter la réponse immunitaire en faveur d'une réponse de type Th1 ou Th2 (Verthelyi, 2006). Le mécanisme d'action des adjuvants a longtemps été une énigme. Janeway en parlait comme « *the dirty little secret of immunologists* » (Janeway Jr, 1989). Cependant, il est maintenant clair que plusieurs des adjuvants utilisés stimulent le système immunitaire par l'intermédiaire des cellules dendritiques (De Becker *et al.*, 2000 ; Fujii *et al.*, 2003 ; Shah *et al.*, 2003). Les cellules dendritiques pourraient donc être considérées comme des adjuvants naturels de part leur nature à fournir les molécules essentielles à la co-stimulation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves (Banchereau et Steinman, 1998). Les cellules dendritiques servent de

« médiateur » entre l'immunité innée et adaptative en faisant le lien entre la reconnaissance des antigènes et leur présentation aux cellules T naïves (Bendelac et Medzhitov, 2002).

Les adjuvants peuvent être divisés en deux classes sur la base de leur mécanisme d'action dominant, les systèmes d'administration et les potentiateurs immunitaires (Pashine *et al.*, 2005). Les potentiateurs immunitaires activent l'immunité innée directement (par exemple, les cytokines) ou au travers des récepteurs de reconnaissance de patron moléculaire (PRR) (comme les composants bactériens). Les systèmes d'administration concentrent et distribuent les antigènes en patron répétitif, délivrent les antigènes vaccinaux cibles aux cellules présentatrices d'antigènes (APC) ou aident à la co-localisation des antigènes et des potentiateurs immunitaires (O'Hagan, 2004). Ainsi, aussi bien les potentiateurs immunitaires que les systèmes d'administration peuvent servir à augmenter la réponse immunitaire spécifique *in vivo*.

L'emphase historique sur la réponse immunitaire humorale a conduit au développement d'adjuvants ayant les habilités d'induire une réponse en anticorps. Par conséquent, la plupart des adjuvants utilisés communément sont efficaces pour augmenter le titre en anticorps sérique mais non pour obtenir une réponse Th1 ou en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) adéquate (Lindblad, 2004). L'habileté d'un adjuvant à affecter qualitativement le résultat de la réponse immunitaire est une considération importante, de part la nécessité de développer des vaccins contre les infections chroniques [par exemple, le HIV, le virus de l'hépatite C (HCV), la tuberculose, le virus de l'herpes simplex (HSV)] et les cancers (Pashine *et al.*, 2005). Les priorités sont maintenant focalisées sur la génération d'une réponse immunitaire cellulaire et d'adjuvant spécialement orientés vers l'obtention de cet effet. Nos connaissances étendues de l'immunologie des récepteurs de TLR, des PRR, des cellules immuno-régulatrices et dendritiques et de l'importance des réponses cellulaires spécifiques T auxiliaires (Th1 contre Th2) dans la résolution de maladies

particulières fournissent une armature pour leur optimisation continue (Pashine *et al.*, 2005).

1.4.1. Exemples d'adjuvant

Les adjuvants à base d'aluminium, communément appelé « alun », restent à ce jour les plus utilisés chez l'homme (Lambrecht *et al.*, 2009). Cependant, leur mécanisme d'action ne fait pas l'unanimité et trois mécanismes existent pour expliquer leur effet. Le premier mécanisme impliquerait la formation d'un dépôt qui relâcherait lentement l'antigène, ce qui stimulerait la production d'anticorps (HogenEsch, 2002 ; Mannhalter *et al.*, 1985). Le deuxième mécanisme consisterait en l'induction d'une inflammation ainsi que le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigène (Kool *et al.*, 2008 ; Mannhalter *et al.*, 1985). Enfin, le dernier mécanisme proposé est que l'antigène soluble soit transformé en une forme particulière qui pourrait être phagocytée par les APC (Jordan *et al.*, 2004 ; Wang et Weller, 2008).

Les émulsions de type huile dans l'eau, comme le MF59, sont considérées comme des candidats prometteurs pour la vaccination humaine. Même si leur mécanisme reste incertain, il est connu que le MF59 est pris en charge par les cellules dendritiques, ce qui conduit à leur activation (Dupuis *et al.*, 1998). Dans les cellules musculaires, MF59 est un meilleur activateur des gènes impliqués dans l'immunité que l'alun ou les CpG [qui sont des séquences d'oligodésoxynucléotides contenant des CpG non méthylés reconnus par les TLR (Strandskog *et al.*, 2007)] et permet un recrutement plus rapide des cellules du sang exprimant CD11b⁺ (Mosca *et al.*, 2008). La molécule CD11b⁺ (aussi connu comme Mac-1) fait partie de la famille des intégrines β_2 et est exprimée à la surface des monocytes, des neutrophiles, des cellules B-1 péritonéales, des cellules dendritiques CD8⁺, des cellules *Natural Killer* et des sous-populations de cellules T CD8⁺ (Kantor *et al.*, 1992 ; Kay et Horwitz,

1980 ; McFarland *et al.*, 1992 ; Nielsen *et al.*, 1994 ; Springer *et al.*, 1979 ; Vremec *et al.*, 1992).

Les adjuvants de la compagnie Glaxo-Smith-Kline de la série *adjuvant system* (AS), sont à base de lipides A monophosphorylés (MLP) (AS04), de squalène (AS03) ou de saponine (AS02) en suspension dans des émulsions d'huile dans l'eau. Le système AS02 est connu pour induire la maturation des cellules dendritiques, probablement par sa capacité à activer les TLR4 des cellules dendritiques (Vandepapelière *et al.*, 2008).

Le **tableau 1.3** présente quelques exemples d'adjuvants et leurs effets. Pour les vaccins sous-unitaires, il est probable que la combinaison de système d'administration, de potentiateurs immunitaires et d'antigènes isolés vont être requis pour obtenir une réponse immunitaire optimale (Pashine *et al.*, 2005).

Tableau 1.3. Types d'adjuvants et systèmes de livraison (Pashine *et al.*, 2005)

Catégorie d'adjuvant	Exemples représentatifs	Description brève
Sels minéraux	Sels d'aluminium et de calcium	Licence pour l'utilisation humaine. Beaucoup d'antigènes viraux et bactériens ont été adsorbés sur l'alun et les sels de calcium
Formulation à base de surfactants et d'émulsions	MF59, AS02, montanide ISA-51 et ISA.720, QS21	Emulsions stabilisées avec des détergents micro-fluidifiés Surfactants dérivés de sources naturelles
Véhicules de libération de particules	Microparticules, complexes immunostimulants, liposomes, virosomes, particules de type viral	Adjuvants et antigènes peuvent être piégés ou enrobés à la surface des particules
Dérivés microbiens	Lipide A mono-phosphorylé, CpG, toxine cholérique, LT d' <i>E. coli</i> , lipoprotéines	Produits bactériens ou synthétiques qui sont des stimulants potentiels du système immunitaire inné. La plupart de ces agents utilisent la voie des TLR
Cellules et cytokines	Cellules dendritiques, IL-12 et GM-CSF	Les cytokines stimulent les cellules de l'immunité innée. Les cellules dendritiques autologues sont stimulées avec des dérivés de peptides de tumeur et présentent efficacement les épitopes antigéniques

Malgré de nombreuses recherches dans ce domaine, très peu d'adjuvants sont autorisés pour la vaccination humaine. Jusqu'à très récemment, la FDA aux États-Unis ne permettait que l'utilisation des sels d'aluminium comme adjuvants pour les vaccins [Hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium, alun (Sulfate potassium aluminium), ou des mélanges de sels d'aluminium]. En octobre 2009, la FDA a autorisé l'utilisation de l'AS04 pour le vaccin Cervarix. Cet adjuvant est un mélange d'hydroxyde d'aluminium et de MPL (le MPL est une substance purifiée dérivée de l'endotoxine « détoxifiée » de la souche Re595 de *Salmonella minnesota*). Ceci montre l'importance de la recherche de nouveaux adjuvants efficaces et sécuritaires pour la santé.

1.4.2. Découverte de potentiateurs immunitaires

La plupart des activités de développement de vaccin jusqu'à quelques années se sont évertuées à trouver de nouveaux antigènes protecteurs et des voies pour les administrer plutôt que d'optimiser la réponse immunitaire contre ceux existant. En conséquence, seule une petite quantité de nouveaux systèmes d'administration [par exemple, les sels d'aluminium et les huiles en émulsions aqueuses MF59 (Lindblad, 2004, 2004 ; Ott, 2001) (**Tableau 1.3**)] a été approuvée pour l'utilisation humaine dans des vaccins prophylactiques. Ainsi, pour augmenter la liste de potentiateurs immunitaires utilisables avec de nouveaux vaccins sous-unitaires et adaptés à des attentes spécifiques à chaque vaccin en particulier, une approche systémique pour la découverte de nouveaux adjuvants est nécessaire. L'identification de drogues similaires à la famille des imidazoquinolines, comme les potentiateurs immunitaires TLR7- et TLR8-dépendant suggèrent que les outils utilisés pour la découverte de drogues modernes peuvent être appliqués au développement d'adjuvants vaccinaux (Hemmi *et al.*, 2002). Pour que cette approche soit applicable à la découverte d'adjuvant, il y a deux exigences nécessaires : des bibliothèques chimiques diverses qui contiennent des composants capables d'initier les réponses immunitaires innées et des

essais *in vitro* qui sont prédictifs de l'activité *in vivo* (Pashine *et al.*, 2005). L'intensité et la qualité de la réponse immunitaire peuvent être évaluées par la détection d'anticorps fonctionnels, l'analyse de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques et la protection contre un pathogène infectieux (Pashine *et al.*, 2005).

1.4.3. La protéine flagelline d'origine bactérienne

Le filament du flagelle est une structure tubulaire d'une quinzaine de micromètres de long pouvant contenir jusqu'à 30 000 sous-unités de flagelline (aussi appelé FliC ou FljB) (Macnab, 1996). La flagelline est constituée de 4 domaines, soit D0, D1, D2 et D3 (**Figure 1.10**). Les domaines D0 et D1 forment le bras vertical en superhélice et représentent le cœur du filament alors que les domaines D2 et D3, formés principalement de feuillet β , composent le bras horizontal (Yonekura *et al.*, 2003) (**Figure 1.10**). La flagelline est à la fois un exemple de conservation et de diversité génétique. En effet, les domaines D0 et D1 sont très conservés entre les différentes bactéries. Un alignement de 202 séquences complètes de flagelline (présentées dans les données supplémentaires de l'article de Beatson *et al.*, 2006) a permis de montrer qu'hormis les boucles entre les régions ND1a et ND1b et une séquence en épingle à cheveux β , presque toutes les séquences s'alignent sur au moins 230 acides aminés sans interruption pour les domaines D0 et D1 (Beatson *et al.*, 2006). En revanche, les domaines D2 et D3 sont très variables en séquence et en taille, pouvant être quasi absents chez *Bacillus cereus* (Q63D83_BACCZ) ou atteindre presque une taille de 1 000 acides aminés chez *Desulfotalea psychrophila* (Q6AMN5_DESPS) (Beatson *et al.*, 2006).

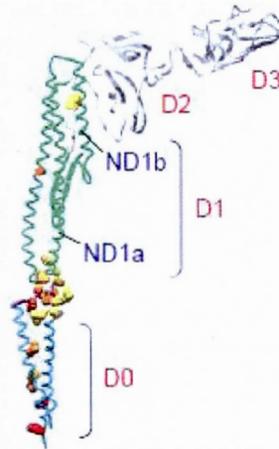


Figure 1.10. Structure tertiaire d'un monomère de flagelline. Les domaines de la flagelline sont notés D0, D1 (avec les sous-domaines ND1a et ND1b), D2 et D3 (D'après Beatson *et al.*, 2006).

En 1998, Ciacci-Woolwine *et al.* ont rapporté que la protéine de structure majeure du flagelle des bactéries Gram négatives, la flagelline, était un inducteur potentiel de la production de cytokines chez une lignée cellulaire promonocytaire humaine, avec une activité maximale obtenue à des concentrations très faibles de l'ordre du nanomolaire (Ciacci-Woolwine *et al.*, 1998). Une autre étude établissait que la flagelline induisait rapidement une activation de la kinase 1 associée à l'IL-1R, une découverte qui suggérait que la flagelline se liait à un membre de la famille des TLR (Moors *et al.*, 2001). Plusieurs études qui suivirent ont montré que le TLR5 est le récepteur de la flagelline extracellulaire (Gewirtz *et al.*, 2001 ; Hayashi *et al.*, 2001 ; Mizel et Snipes, 2002). De plus, la flagelline des bactéries Gram négatives, qui se réplique dans le cytosol, est capable d'induire une réponse indépendante du TLR5. Le signal est transmis par Ipaf (connu aussi comme NLRC4), un membre de la famille des récepteurs NACHT. Il contient des domaines répétés riches en leucine (NLR) capables d'activer la caspase-1 [impliquée dans la réponse inflammatoire (Ghayur *et al.*, 1997)] et la sécrétion d'IL-1 β (Franchi *et al.*, 2006 ; Miao *et al.*, 2006). Ipaf est aussi capable de former un hétéro-oligomère avec la protéine 5 NLR

inhibitrice de l'apoptose (Naip5) (Lightfield *et al.*, 2008). Les domaines conservés dans les régions C-terminale et N-terminale de la flagelline sont requis pour la liaison au TLR5 (Donnelly et Steiner, 2002 ; Eaves-Pyles *et al.*, 2001 ; Murthy *et al.*, 2004). La liaison à Naip5 implique quant à elle les 35 acides aminés de la région C-terminale de la flagelline (Lightfield *et al.*, 2008).

Les premières études décrivant les activités adjuvantes de la flagelline ont été menées par Ruth Arnon et ses collègues entre 1992 et 1999. McEwen *et al.* (1992), ont testé l'épitope 91 à 109 de l'HA du virus *Influenza* exprimé dans *Salmonella typhimurium*. Levi et Arnon (1996) ont étudié trois épitopes différents du virus *Influenza* [HA91-108, nucléoprotéine (NP) 55-69 et NP147-158] insérés dans le gène de la flagelline d'une souche de vaccin de *Salmonella*. Ben Yedidia *et al.* (1998) montrèrent que l'administration d'une construction exprimant la flagelline et trois épitopes du virus *Influenza* chez des souris adultes conférait une protection contre une infection. La même année, Ben Yedidia et Arnon ont démontré que la pré-immunisation avec la flagelline seule ou la bactérie de la salmonelle intacte ne compromettait pas son effet protecteur lors d'immunisation subséquente avec les constructions portant les épitopes (Ben-Yedidia et Arnon, 1998). De plus, des souris chimériques ayant reçu une greffe de cellules mononucléaires humaines du sang périphérique et immunisées avec le flagelle purifié de *Salmonella dublin* souche SL5928 exprimant des épitopes du virus de l'*Influenza* sont capables de l'éliminer après une infection et de résister à une injection létale de celui-ci (Ben-Yedidia *et al.*, 1999). Une autre étude démontre que des souris immunisées par voie intra-nasale avec la flagelline recombinante et le peptide 9B de *Schistosoma mansoni* ont développé une réponse humorale significative et une certaine protection contre un défi avec le parasite (Ben-Yedidia *et al.*, 1999). Ces études ont démontré clairement que des séquences peptidiques hétérologues pouvaient être insérées dans le gène de la flagelline pour créer des vaccins efficaces afin d'induire une immunité humorale en l'absence d'un adjuvant. Un point intéressant de ces différents vaccins est que, malgré la réponse immunitaire contre la flagelline, leur habilité à mettre en place une

réponse robuste contre l'antigène n'est pas compromise (Honko *et al.*, 2006). Ceci a été confirmé par Honko *et al.* (2006) lors d'une expérience d'immunisation de souris avec l'antigène F1 de *Yersinia pestis* en association avec la flagelline (Honko *et al.*, 2006). Il est probable que cette propriété de la flagelline est due à sa forte affinité pour le TLR5 (McDermott *et al.*, 2000 ; Mizel *et al.*, 2003) et le faible nombre de récepteurs requis pour induire une activation cellulaire maximale (Mizel *et al.*, 2003). Durant la dernière décennie, plusieurs études ont décrit les propriétés adjuvantes de la flagelline dans des contextes de vaccins recombinants différents (Tableau 1.4). Dans certains cas, la flagelline et les antigènes sont utilisés séparément alors que pour d'autres cas, ils sont utilisés sous forme fusionnée. La flagelline peut évidemment servir comme son propre adjuvant dans le cas d'une réponse dirigée contre un ou plusieurs de ces épitopes (McSorley *et al.*, 2000).

Tableau 1.4. Vaccins expérimentaux à bases de flagelline (Mizel *et al.*, 2010)

Vaccins recombinants	Espèces	Voies*	Réponses	Références
Flagelline-Épitope hémagglutinine du virus <i>Influenza</i>	Souris	s.c i.n.	Production d'anticorps Neutralisation du virus <i>in vitro</i> Protection contre un défi <i>in vivo</i>	1, 2-6, 7
Flagelline-Domaine de la tête globulaire de l'hémagglutinine du virus <i>Influenza</i>	Souris	s.c.	Production d'anticorps Protection contre un défi <i>in vivo</i>	8
Flagelline-Ectodomaine M2e du virus <i>Influenza</i>	Souris	s.c.	Production d'anticorps Protection contre un défi <i>in vivo</i>	9
Flagelline-Épitope <i>Schistosoma mansoni</i>	Souris	i.n.	Production d'anticorps Protection contre un défi <i>in vivo</i>	10
Flagelline-Protéine de liaison au maltose de <i>Campylobacter coli</i>	Souris	i.n.	Production d'anticorps Protection contre un défi <i>in vivo</i>	11
Flagelline-Épitope du facteur de colonisation 1 d' <i>E. coli</i>	Souris	i.p.	Production d'anticorps	12
Flagelline	Souris	s.c.	Protection contre un défi <i>in vivo</i>	13
		Orale	Production d'anticorps Réduction de la charge bactérienne	14
Flagelline-LT d' <i>E. coli</i>	Souris	Orale	Production anticorps	15

Flagelline-GFP <i>enhanced</i>	Souris	s.c. <i>in vitro</i>	Cytotoxicité <i>in vitro</i> cellules T CD8 ⁺ Prolifération <i>in vitro</i> cellules CD4 ⁺	16
Flagelline-région d'adhésion Ag/II de liaison à la salive de <i>Streptococcus mutans</i>	Souris	i.n.	Production d'anticorps Prolifération <i>in vitro</i> des cellules CD4 ⁺	17
Flagelline-antigène F1 de <i>Yersinia pestis</i> ou la fusion F1/V	Souris	i.n.	Production d'anticorps	18
	Primate non humain	i.n.	Protection contre un défi <i>in vivo</i> Production d'anticorps	
Flagelline-Fusion F1-V	Souris	i.m.	Production d'anticorps	19
	Primate non humain	i.m.	Protection contre un défi <i>in vivo</i> Production d'anticorps	
Flagelline-Toxoïde du tétanos	Souris	i.n.	Production d'anticorps Protection contre un défi <i>in vivo</i>	20
Flagelline-OVA	Souris	s.c.	Production d'anticorps	21
		i.m.	Activation des cellules T CD8 ⁺ Prolifération CD4 ⁺ et production de cytokines	22
Flagelline-Protéine de l'enveloppe du virus West Nile	Souris	s.c.	Production d'anticorps	23
		i.p.	Protection contre un défi <i>in vivo</i>	
Flagelline + OVA	Souris	i.n.	Réponse hypersensible des voies respiratoires Inflammation/éosinophiles Production de cytokine Th2	24
Flagelline-Protéine de surface I de <i>Plasmodium</i>	Souris	s.c.	Production d'anticorps	25, 26
Flagelline-épitope de la protéine circumsporozoïte de <i>Plasmodium</i>	Souris	i.n. s.c.	Activation des cellules T CD8 ⁺ <i>in vivo</i>	27
Épitope 8 OprF <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Opr1-Flagelline de type A et B	Souris	i.m.	Production d'anticorps	28
	Primate non humain	i.m.	Protection contre un défi <i>in vivo</i> Production d'anticorps	
Virus de la vaccine L1R-Flagelline et flagelline B5R	Souris	i.m.	Production d'anticorps Protection contre un défi <i>in vivo</i>	29

* s.c. : sous cutanée; i.n. : intra-nasale; i.p. : intra-péritonéale; i.m. : intra-musculaire
 Références du tableau : 1 : (Ben-Yedidia et Arnon, 1998); 2-6 : (Ben-Yedidia *et al.*, 1998 ; Ben-Yedidia *et al.*, 1999 ; Jeon *et al.*, 2002 ; Levi et Arnon, 1996 ; McEwen *et al.*, 1992); 7 : (Adar *et al.*, 2009); 8 : (Song *et al.*, 2009); 9 : (Huleatt *et al.*, 2008); 10 : (Ben-Yedidia *et al.*, 1999); 11 : (Lee *et al.*, 1999); 12 : (das Gracias Luna *et al.*, 2000); 13 : (McSorley *et al.*, 2000); 14 : (Strindelius *et al.*, 2004); 15 : (Pereira *et al.*, 2001); 16 : (Cuadros *et al.*, 2004); 17 : (Pino *et al.*, 2005); 18 : (Honko *et al.*, 2006);

19 : (Mizel *et al.*, 2009); 20 : (Lee *et al.*, 2006); 21 : (Huleatt *et al.*, 2007); 22 : (Bates *et al.*, 2009); 23 : (McDonald *et al.*, 2007); 24 : (Lee *et al.*, 2008); 25 : (Bargieri *et al.*, 2010); 26 : (Bargieri *et al.*, 2008); 27 : (Braga *et al.*, 2010); 28 : (Weimer *et al.*, 2009); 29 : (Delaney *et al.*, 2010).

1.4.3.1. Les mécanismes sous-jacents aux effets adjuvants de la flagelline

Des études chez la souris ont révélé que la dose de flagelline requise pour promouvoir une réponse immunitaire humorale optimale contre un antigène spécifique maximum était dix fois moins forte que la dose requise pour induire une réponse innée maximale (Honko et Mizel, 2004 ; Honko *et al.*, 2006). L'amplitude de la réponse innée et adaptative est probablement due à l'habilité de la flagelline à promouvoir un nombre de processus reliés à l'immunité innée qui sont critiques pour le développement d'une réponse humorale, ce qui pourrait inclure l'induction de la production de chémokines et de cytokines pro-inflammatoires par les cellules lymphocytaires et non lymphocytaires, le recrutement généralisé des lymphocytes T et B aux sites lymphoïdes secondaires, les cellules dendritiques activées et l'activation directe des lymphocytes T (Mizel et Bates, 2010) (**Figure 1.11**).

Il est assez bien accepté que la plupart des adjuvants, spécialement les agonistes des TLR, agissent en partie par l'induction de la maturation et de l'activation des cellules dendritiques et de leur migration vers les sites lymphocytaires secondaires (Benko *et al.*, 2008). Pour ce qui est de la flagelline, les informations trouvées dans la littérature sont assez contradictoires sur l'effet de celle-ci sur les cellules dendritiques et leurs précurseurs. Quelques études ont montré que la stimulation avec la flagelline résulte en une activation substantielle des cellules dendritiques de la moelle osseuse chez la souris (Datta *et al.*, 2003 ; Didierlaurent *et al.*, 2004 ; Tsujimoto *et al.*, 2005 ; Vicente-Suarez *et al.*, 2009) alors qu'une autre étude rapporte un effet d'activation chez les humains qui n'est pas observé chez les souris (Means *et al.*, 2003). La flagelline a un effet très faible mais significatif sur

l'expression de CD80, co-stimulateur nécessaire à l'activation des lymphocytes T, et sur la production d'IL-6, cytokine clef dans la régulation de l'inflammation (Means *et al.*, 2003). De plus, l'effet stimulateur de la flagelline recombinante sur les cellules dendritiques dérivées des cellules myéloïdes humaines a été confirmé dans plusieurs études (Agrawal *et al.*, 2003 ; Arimilli *et al.*, 2008).

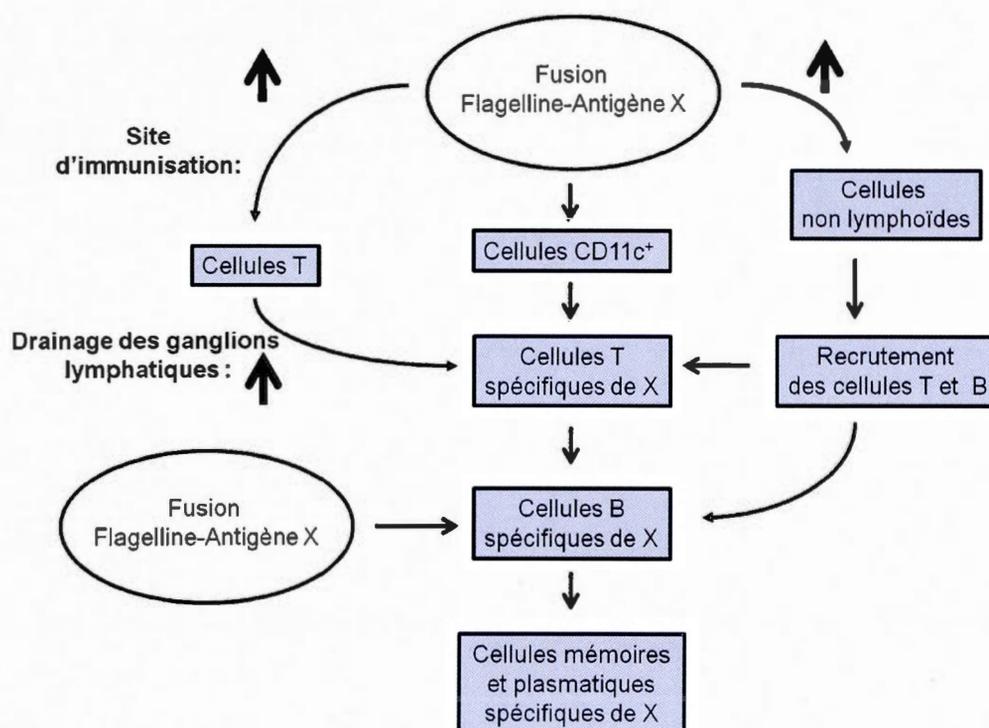


Figure 1.11. Activation du système immunitaire par la flagelline. Les flèches noires en gras représentent des événements d'activation. La flagelline cible l'activation de différents types cellulaires comme les cellules T, les cellules CD11c⁺ et les cellules non lymphoïdes. Ces cellules vont à leur tour activer les cellules T et B spécifiques de l'antigène X fusionné à la flagelline et les cellules B spécifiques de l'antigène X vont induire la production de cellules mémoires et plasmatisques spécifiques de X (d'après Mizel *et al.*, 2010).

Bien que la plupart des données confirment un effet immunostimulateur de la flagelline sur les lymphocytes T, la flagelline pourrait aussi activer les composants régulateurs de la réponse immunitaire. Crellin *et al* (2005) ont trouvé que les cellules

T régulatrices expriment des niveaux plus élevés d'ARNm de TLR5 que les cellules T CD25⁻ et que le traitement de ces cellules T régulatrices avec la flagelline augmente l'activité régulatrice de celles-ci (Crellin *et al.*, 2005). Il semble que la flagelline aide à stimuler les cellules T régulatrices et effectrices. Cependant, la flagelline pourrait aussi inhiber simultanément l'activation des cellules T par les récepteurs des cellules T (TCR) par l'intermédiaire d'un mécanisme dépendant du suppresseur de la signalisation des cytokines -1 (SOCS-1) (Okugawa *et al.*, 2006).

La flagelline ne semble pas agir directement sur les cellules B. En revanche, son effet stimulateur sur les cellules dendritiques et probablement sur les cellules T promeut une augmentation drastique des cellules productrices d'anticorps (Adar *et al.*, 2009 ; Bargieri *et al.*, 2010 ; Cuadros *et al.*, 2004 ; Honko *et al.*, 2006 ; Huleatt *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2006 ; McDonald *et al.*, 2007 ; Pereira *et al.*, 2001 ; Song *et al.*, 2009b ; Strindelius *et al.*, 2004 ; Weimer *et al.*, 2009a ; Weimer *et al.*, 2009b) dépendante des cellules T (Honko *et al.*, 2006 ; Sanders *et al.*, 2006). La réponse humorale est généralement caractérisée par un titre élevé en IgG1 et IgG2 qui procure une protection complète contre un pathogène cible (Mizel et Bates, 2010).

S'il y a un consensus quant au fait que la flagelline induit une réponse dépendante des cellules T CD4⁺, la situation pour les cellules T CD8⁺ n'est pas aussi claire. Deux études n'ont pas vu d'effet significatif de la flagelline sur l'activation des lymphocytes T CD8⁺ (Didierlaurent *et al.*, 2004 ; Schwarz *et al.*, 2003) alors que trois rapports ont documenté un effet significatif de la flagelline sur l'activation de ces cellules (Braga *et al.*, 2010 ; Cuadros *et al.*, 2004 ; Huleatt *et al.*, 2007). La différence principale entre ces deux groupes d'étude est l'utilisation de la flagelline fusionnée aux protéines dans les études démontrant un effet positif de la flagelline. Dans le cas de la réponse humorale dépendante des cellules T CD4⁺, la fusion entre la flagelline et la protéine d'intérêt n'est pas une nécessité (Honko *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2006).

1.4.3.2. Avantages des vaccins à base de flagelline

La flagelline a de nombreux avantages qui en font un candidat intéressant pour les vaccins humains. Elle est efficace à des doses très faibles [1 à 10 µg chez des primates non humains (Weimer *et al.*, 2009)] et elle ne provoque pas de réponse en IgE (Honko *et al.*, 2006). La réponse immunitaire contre la flagelline ne compromet pas non plus son activité adjuvante (Ben-Yedidia et Arnon, 1998 ; Honko *et al.*, 2006). La séquence de l'antigène peut être insérée dans la région N- ou C-terminale ou dans la région hypervariable de la protéine sans perte de signalisation *via* le TLR5 (Adar *et al.*, 2009 ; Bargieri *et al.*, 2010 ; Ben-Yedidia *et al.*, 1999 ; Ben-Yedidia *et al.*, 1999 ; Chauhan *et al.*, 2005 ; das Gracas Luna *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 1999 ; Levi et Arnon, 1996 ; McDonald *et al.*, 2007 ; McEwen *et al.*, 1992 ; Mizel *et al.*, 2009 ; Pereira *et al.*, 2001 ; Song *et al.*, 2009).

Même si la flagelline montre une plasticité importante quant à sa fusion avec différents antigènes, certaines restrictions liées à ces mêmes antigènes sont à prendre en considération comme l'accessibilité de l'épitope ou le repliement de la protéine dans le cas des épitopes conformationnels. Song *et al.* (2009) ont montré que le remplacement de la sous-unité D3 de la flagelline par la tête globulaire de l'hémagglutinine de la grippe aviaire VN04 permettait l'obtention d'un vaccin capable de protéger les souris de la maladie et d'un défi avec une dose létale du virus (Song *et al.*, 2009). De même, les épitopes F1 et V de *Yersinia pestis* ont été insérés dans la zone hypervariable de la flagelline pour créer la protéine de fusion Flagelline-F1-V (Mizel *et al.*, 2009). Cette protéine donnée à des souris permet une protection contre l'administration par voie intra-nasale de la souche CO92 de *Yersinia pestis*. Chez les souris immunisées, la clairance du virus se fait dans les trois jours après le défi (Mizel *et al.*, 2009). Vassilieva *et al.* (2011) incorporaient la flagelline dans un vaccin à base de VLP contre le HIV et obtenaient une augmentation de la réponse systémique aussi bien suite à une vaccination par voie systémique que par voie mucosale. De plus, la vaccination par voie mucosale permet aussi une réponse

immunitaire locale et mucoale (Vassilieva *et al.*, 2011). L'utilisation de la flagelline a globalement augmenté la qualité de la réponse immunitaire par une meilleure production en anticorps spécifique anti-HIV et en anticorps neutralisants. Dans cette même étude, les auteurs ont aussi montré que la flagelline incorporée dans les VLP permettait une meilleure réponse systémique alors que les VLP incorporant une flagelline avec une région variable tronquée induisaient une meilleure réponse mucoale en IgA (Vassilieva *et al.*, 2011). La flagelline a aussi été utilisée dans un système d'administration utilisant des nanoparticules en sulfure de polypropylène (PPS) conjuguées à un antigène et à un adjuvant thiolés (OVA et flagelline dans cette expérience, respectivement) par un pont disulfure réversible (Stano *et al.*, 2011). Les auteurs ont montré qu'une administration intra-nasale chez des souris induisait une réponse spécifique en lymphocytes cytotoxiques T au niveau des tissus pulmonaires et de la rate ainsi qu'une réponse humorale au niveau des voies aériennes mucoales, des compartiments mucoaux vaginaux et rectaux et une réponse immunitaire cellulaire axée Th1 (Stano *et al.*, 2011).

1.5. Hypothèses et Objectifs

Le PRRSV est l'une des causes principales de pertes économiques dans l'industrie porcine mondiale. En 2006, la Chine était touchée par une épidémie majeure qui touchait plus de 2 millions de porcs (Tian *et al.*, 2007). Malgré une recherche active pour lutter contre le PRRSV, il n'existe toujours pas de moyen efficace pour contrôler ce virus. Le développement de nouvelles stratégies vaccinales reste donc une priorité.

L'utilisation d'adjuvant lors de vaccination est souvent une nécessité. Or, peu de nouveaux adjuvants sont utilisés en vaccination humaine. La FljB, qui est une protéine bactérienne bien conservée (domaine D0 et D1) au sein des bactéries Gram négatives, possède des propriétés adjuvantes qui en font un candidat intéressant comme potentiateur immunitaire pour le développement de vaccins oraux.

Au cours de ce travail, les quatre hypothèses suivantes ont été examinées :

- La mutation des sites de glycosylation N30 et N51 et l'insertion de la séquence PADRE dans la construction d'une protéine GP5 triple mutante fusionnée à la protéine M pourrait permettre de produire une meilleure réponse immunitaire que la protéine GP5 sauvage du PRRSV.
- L'administration orale de protéines exprimées chez les plantes pourrait induire une réponse immunitaire contre les protéines d'intérêt.
- Les propriétés adjuvantes de FljB produite chez les plantes seraient conservées.
- La production de FljB chez les plantes devrait permettre une aussi bonne induction de la réponse immunitaire que celle produite chez *Escherichia coli*.

L'objectif général de ce projet est d'exprimer des protéines recombinantes chez les plantes tout en permettant de conserver leur propriétés immunogéniques et de promouvoir une protection face à une infection de la souche IAF-Klop du PRRSV (cas des protéines M et GP5) ou ayant des propriétés adjuvantes (cas de la flagelline). Les objectifs spécifiques de ce projet sont :

1. Exprimer de façon transitoire, chez *Nicotiana benthamiana*, la protéine GP5 sauvage ou mutante en fusion ou non avec la protéine M et de concert ou non avec un adjuvant immunitaire [voir les différentes constructions envisagées, (Tableau 1.1) ainsi que la flagelline].
2. Évaluer l'immunogénicité de ces différentes protéines du PRRSV chez la souris.
3. Tester les propriétés adjuvantes de FljB produite chez les plantes chez la souris :
 - Utiliser l'ovalbumine comme immunogène modèle dans des essais de vaccination orale
 - Comparer l'effet adjuvant de la FljB produite dans les plantes à celle produite par *Escherichia coli*
4. Caractériser la réponse immunitaire contre l'adjuvant FljB produit dans les plantes ou *Escherichia coli*.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériels consommables

L'ovalbumine (OVA, Grade III), la concanavaline A (Con A), la polymyxine B, le 3, 3', 5, 5' -Tetramethyl-benzidine (TMB), et l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, CA). L'albumine bovine sérique (BSA), l'isoflurane, l'ampicilline, la kanamycine et le β -mercaptoéthanol provenaient de chez Fisher Scientific (Ville St-Laurent, QC, CA). Les anticorps anti-lapin IgG, et anti-souris IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgA conjugués de la peroxydase du raifort (HRP) ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Le milieu de culture cellulaire RPMI 1640 et les solutions de pénicilline et de streptomycine provenaient de chez Invitrogen (Carlsbad, ON, CA). Le *serum* foetal bovin (FBS) a été acheté chez PAA Laboratories Inc., (Etobicoke, ON, CA). Le mélange complet d'inhibiteur de protéase a été acheté chez Roche (Laval, QC, CA). Les enzymes de restriction ont été achetés chez New England Biolabs [(NEB), Ipswich, MA, USA].

2.2. Constructions des gènes d'intérêt pour l'expression chez les plantes

Les gènes codant pour les protéines GP5 (numéro d'accension AAC41206) et M (numéro d'accension AAC41204) de la souche référence Québécoise IAF-Klop ont été optimisés pour l'usage des codons pour une meilleure expression chez les plantes dicotylédones (GeneArt, Regensburg Germany) (Kheyar *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2004). La séquence CTB a été rajoutée à la fin de la séquence de la protéine GP5 à l'aide de quatre acides aminés de liaison Glycine-Proline-Glycine-Proline, qui

doivent permettre une meilleure flexibilité entre les deux protéines (Matoba *et al.*, 2004), identifiés en gras au niveau des séquences en nucléotides et en acides aminés présentés à l'**appendice A** (GeneArt, Regensburg Germany).

Les différentes constructions, M, GP5, M::GP5, M::GP5::CTB, M::GP5 mutantes (M::GP5mut) et M::GP5::CTB mutantes (M::GP5::CTBmut) (**Tableau 2.1 et appendice A** pour les séquences nucléotidiques et peptidiques) ont été réalisées par réaction de polymérase en chaîne (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) à l'aide des amorces retrouvées dans l'**appendice B**. Les amorces spécifiques de chaque construction ont permis de rajouter la séquence SEKDEL avant le codon stop de celle-ci en 3'. Trois mutations ont été insérées dans la séquence de la GP5 par PCR. La séquence SGSG qui a remplacé la séquence A²⁷L²⁸V²⁹N³⁰ correspondant à l'épitope A de la GP5 (Ansari *et al.*, 2006), la séquence AKFVAAWTLKAAA (PADRE) a été insérée entre les nucléotides 32 et 33 (Fang *et al.*, 2006) et le site de glycosylation N51 a été remplacé par une alanine (Ansari *et al.*, 2006). Les différentes séquences ont été clonées dans le vecteur pRTL2 (Restrepo *et al.*, 1990), dans la cassette d'expression contenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) en tandem deux fois, la séquence *leader* non-traduite du virus de la gravure du tabac (TEV) et le terminateur du promoteur 35S du CaMV, en utilisant les sites de restriction NcoI et XbaI. Le gène de la β -Glucuronidase (GUS) a été remplacé par les différents gènes d'intérêt. La cassette a été ensuite digérée par PstI et clonée dans le vecteur binaire pCAMBIA1380 (numéro d'accèsion AF234301) au site PstI pour donner le vecteur pCAMBIAmo (Figure 2.1). De plus, une construction contenant le gène de la *gfp* dans le vecteur pCAMBIA1380mod, fourni par Louis-Philippe Bergeron-Sandoval, a été utilisée comme témoin (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010). Chaque construction a été vérifiée par séquençage avant d'être utilisée.

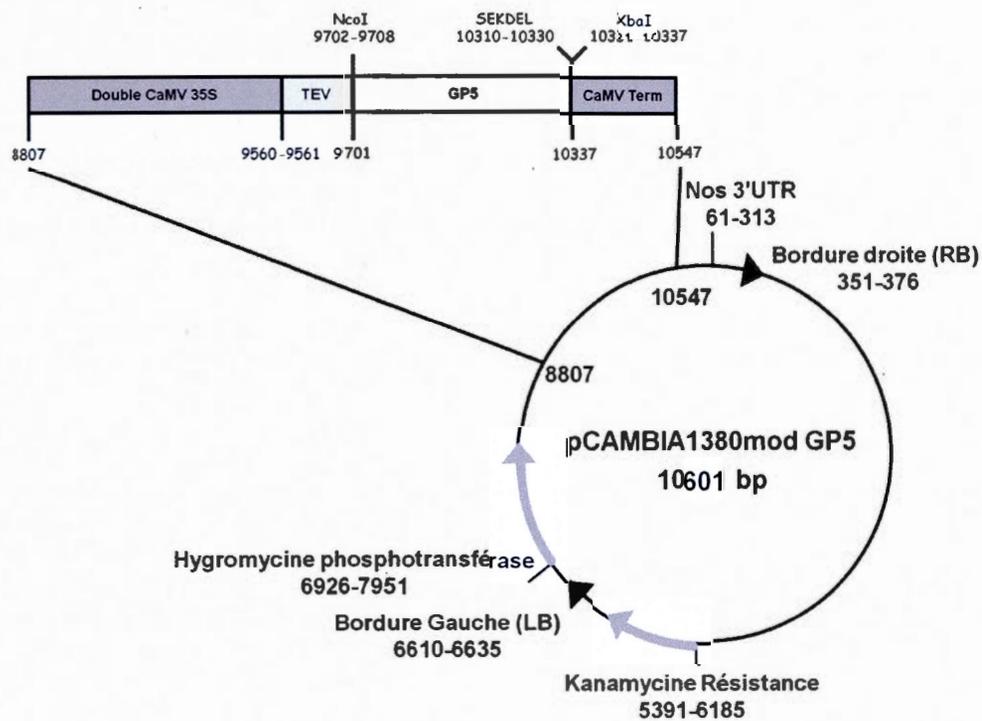
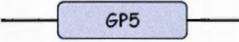
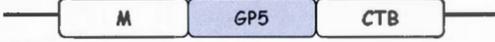
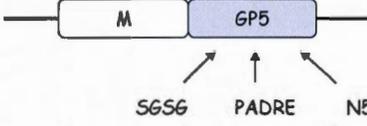
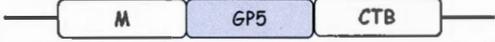


Figure 2.1. Schéma du vecteur pCAMBIA1380mod, exemple du gène *gp5*. Le vecteur possède deux gènes de résistance, un à la kanamycine pour la sélection dans les bactéries et un à l'hygromycine pour la sélection dans les plantes. La cassette d'expression est bordée par les bordures droite (RB) et gauche (LB) qui servent au transfert de l'ADN. Elle comprend un double promoteur 35S du CaMV, la séquence *leader* non-traduite du TEV ainsi que la séquence terminatrice 35S du CaMV (CaMV Term). Les gènes d'intérêt sont situés entre les sites de restriction NcoI et XbaI. La séquence de rétention au RE, SEKDEL, est présente avec le codon stop de chaque gène d'intérêt.

Tableau 2.1. Constructions et tailles des gènes d'intérêts

Protéines*	Constructions	Taille
M ^a		549 pb
GP5 ^a		627 pb
M::GP5 ^b		1158 pb
M::GP5::CTB ^b		1542 pb
M::GP5 mut ^b		1197 pb
M::GP5::CTB mut ^b		1581 pb

*protéines : M, GP5, M::GP5, M::GP5::CTB, M::GP5 triples mutantes et M::GP5::CTB triples mutantes. (^a) : protéines seules, (^b) : protéines de fusion.

2.3. PCR – Réaction de polymérase en chaîne

Les PCR (Saiki *et al.*, 1988) ont été réalisées sur les gènes synthétiques de GP5::CTB ou M en utilisant comme polymérase la Sure-Pol™ DNA Polymerase (Denville Scientific, Inc., Metuchen, NJ, USA) et les amorces de l'**appendice B**. Le mélange PCR contenait le tampon de réaction de la compagnie ramené à 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,75, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mg/ml de BSA), des amorces spécifiques (10 μM chaque), l'ADN, les dNTP (ATP, CTP, GTP, TTP à 10 mM chacun), la polymérase (2,5 unités) et de l'eau nanopure en quantité suffisante pour le volume réactionnel qui pouvait être 50 μl ou 100 μl. Les conditions PCR utilisées ont été les suivantes : dénaturation à 95°C pendant 5 minutes (min), cycle PCR : dénaturation de 60 secondes (s) à 95°C,

hybridation de 60 s à 50°C, élongation de 90 s à 70°C, répété 30 fois puis élongation de 10 min à 70°C pour finir la réaction.

2.4. Clonage

Les produits PCR obtenus ont été digérés pendant 1 heure avec les enzymes de restriction NcoI et XbaI en utilisant le tampon de réaction NEB 2 à 1X (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1m M de dithiothréitol (DTT), pH 7,9). Le vecteur pCAMBIAmod a été digéré par les enzymes NcoI et XbaI pendant une heure dans le tampon NEB 2 puis déphosphorylé par l'*Antartic Phosphatase* (5 unités) (NEB) pendant 60 min à 37°C avec son tampon de réaction 1X (50 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, pH 6,0). La réaction a été inactivée pendant 5 min à 65°C avant la ligation. Le *ratio* vecteur/insert a été choisi en utilisant la formule suivante : quantité d'insert (ng) = quantité de vecteur (ng) x le *ratio* molaire (insert/vecteur) x taille de l'insert en kb/taille du vecteur en kb. La ligation a été faite à température de la pièce pendant 1 heure avec la *T4 DNA ligase* (1 unité) (NEB) dans son tampon de réaction 1X (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,5). Les produits de ligation ont été utilisés pour transformer *Escherichia coli* souche DH5α par choc thermique. Un volume de 10 µl de produit de ligation a été mélangé avec un volume de 80 µl de bactéries. Le tout a été laissé sur glace pendant 10 min avant de subir un choc thermique de 90 s à 42°C. Un volume de 1 ml de Luria Broth (LB) (5 g/l de NaCl, 10 g/l de tryptone, 10 g/l d'extrait de levure, pH 7,0) a ensuite été ajouté au mélange et laissé sur glace pendant 10 min avant d'être incubé à 37°C avec agitation (200 x g) pendant 1 heure. Le mélange a ensuite été étalé sur boîtes de pétri en milieu LB solide avec kanamycine (100 µg/ml finale) et incubé toute la nuit à 37°C. Les colonies sur boîtes ont été piquées pour être mises en culture en milieu LB liquide avec kanamycine (100 µg/ml finale) à 37°C avec agitation toute la nuit. Les cultures clonales ont ensuite été utilisées pour faire des mini-préparations d'ADN plasmidique.

2.5. *Escherichia coli* chimio-compétentes

Les solutions de $MgCl_2$ (100 mM) stérile, de $CaCl_2$ (100 mM) 15% glycérol stérile, des tubes de 1,5 ml stériles et les bouteilles de centrifugation ont été placées à 4°C et le rotor a été pré-refroidi à 4°C. Une pré-culture de 5 ml de bactéries a été mise à croître toute la nuit à 37°C sous agitation (200 x g). Cette pré-culture a été diluée au 1/100 et mise à agiter à 37°C jusqu'à une densité optique à 600 nanomètres ($D.O_{600nm}$) de 0,5 à 0,6. La culture a été transférée dans les bouteilles de centrifugation et centrifugée à 5 000 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et les cellules ont été mises sur glace. Le culot de bactéries a été resuspendu dans 100 ml de $MgCl_2$ froid et incubé sur glace pendant 20 à 30 min. Les cellules ont été centrifugées à 4 000 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et les bactéries ont été mises sur glace. Les cellules ont été resuspendues dans 10 ml de $CaCl_2$ -15% glycérol froid. La solution a été aliquotée en tube de 170 μ l de suspension bactérienne et mis à -80°C jusqu'à leur utilisation (la congélation rapide n'étant pas nécessaire).

2.6. Mini-préparation d'ADN plasmidique sur terre de diatomée

Ce protocole a été adapté du protocole de Machesky (Machesky, 1996). La terre de diatomée est préparée comme suit. Deux grammes de terre de diatomée ont été suspendus dans un volume de 40 ml d'eau dans un tube conique de 50 ml puis agités fortement au vortex. La suspension a été laissée à sédimenter précisément pendant 2 heures à 4°C. Le surnageant contenant les fines particules a été jeté et un volume de 40 ml d'eau a été ajouté. Le tube a été agité au vortex fortement et laissé à reposer 2 heures précisément à 4°C. Le surnageant a été jeté et un volume de 40 ml d'eau a été ajouté. La préparation de terre de diatomée a été conservée au réfrigérateur à 4°C pendant plusieurs mois.

Les colonnes ont été préparées de la manière suivante. Des micro-tubes de 0,5 ml (pas de tubes PCR) dont le fond a été coupé ont été utilisés (le trou doit rester plus petit que la taille d'une petite bille en verre de 3 mm). Une bille en verre a été placée au fond de la « colonne » et la colonne a été mise dans un tube collecteur de 2 ml, un volume de 400 µl de terre de diatomée préalablement resuspendue a été ajouté dans la colonne.

Pendant que les colonnes ont été laissées à sédimenter, un volume de 1,5 ml de bactéries a été centrifugé pendant 1 min puis le surnageant a été jeté. Un volume de 100 µl de tampon P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNase A) a été ajouté. Les tubes ont été agités au vortex pour resuspendre le culot de bactéries. Un volume de 100 µl de solution P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) a été ajouté puis mélangé par inversion avec la suspension bactérienne. Le mélange a été laissé 5 min maximum à la température de la pièce ou jusqu'à ce que la suspension soit devenue translucide. La suspension a été neutralisée en ajoutant 100 µl de tampon P3 (3 M d'acétate de potassium, 2 M d'acide acétique glacial) et agitée 3 s. Le mélange a été incubé 10 min sur glace puis centrifugé 10 min à 14 000 x g. Pendant ce temps, les colonnes ont été centrifugées pendant 1 min à 5 000 x g pour enlever l'eau. Un volume de 300 µl de solution PB (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM EDTA pH 8,0, 6 M guanidine-HCl) a été ajouté dans des tubes de 1,5 ml. Le surnageant des tubes centrifugés a été prélevé, ajouté au PB, mélangé et transféré dans la colonne. Les colonnes ont ensuite été centrifugées 1 min à 5 000 x g. Le liquide récupéré dans le tube collecteur a été jeté et un lavage avec le tampon de lavage (8,3 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,1 mM EDTA pH 8,0, 83,3 mM NaCl, éthanol 58,3%) a été réalisé. Les tubes ont été centrifugés 1 min à 5 000 x g et la solution de lavage a été jetée avant de centrifuger de nouveau 1 min pour éliminer le tampon de lavage résiduel dans la colonne. Le contenu des tubes 0,5 ml a été transféré de la colonne vers des tubes de 1,5 ml. Les colonnes ont été éluées avec 50 µl de tampon d'éluion (10 mM Tris HCl pH 8, 1mM Na₂EDTA) pour récupérer l'ADN plasmidique. Les colonnes ont été

laissées 1 min à la température de la pièce avant d'être centrifugées 1 min à 5 000 x g pour récupérer toute la préparation d'ADN de la colonne. Les constructions ont été vérifiées par séquençage (Plateforme de séquençage, Centre d'innovation génome Québec et université McGill, Montréal, CANADA).

2.7. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La préparation des *Agrobacterium tumefaciens* souche AGL-1 compétentes a été faite comme suit et le matériel utilisé après la mise en culture a été préalablement refroidi à 4°C. Une pré-culture de 5 ml de bactéries dans du LB avec ampicilline (50 µg/ml finale) a été faite à 30°C sous agitation (200 x g) toute la nuit. Le volume de 5 ml de pré-culture a été utilisé pour inoculer un volume de 500 ml de LB avec ampicilline (50 µg/ml). Les bactéries ont été mises en culture jusqu'à atteindre une D.O._{600nm} de 0,6 à 0,7. La culture a été centrifugée à 5 000 x g à 4°C, le surnageant a été jeté et un lavage avec une solution aqueuse froide de glycérol 10% a été réalisé. Cette étape a été répétée deux fois. Après la dernière centrifugation, le culot a été resuspendu dans un volume de 5 ml de solution froide de glycérol 10% froide. Des aliquots de 40 µl dans des tubes froids ont été préparés et une congélation rapide dans l'azote liquide a été réalisée avant de mettre les tubes au congélateur à -80°C.

Pour la transformation des agrobactéries, les tubes ont été décongelés sur glace, quelques nanogrammes de plasmide ont été ajoutés aux bactéries et laissés sur glace 5 min. Le mélange de transformation a été transféré dans une cuvette à électroporation (Gene Pulser/Micropulser Cuvettes, 0,1cm gap, Bio-Rad) et électroporé (Programme Agr (2,2 kV), MicroPulser™ Electroporator, Bio-Rad). Un volume de 1 ml de LB a été ajouté dans la cuvette puis a été transféré dans un tube conique stérile de 15 ml qui a été incubé pendant 4 heures à 30°C (200 x g). Les bactéries ont été étalées sur des boîtes de pétri contenant du LB solide avec ampicilline (50 µg/ml finale) et kanamycine (100 µg/ml finale). Les bactéries ont alors été placées à 30°C dans un incubateur sans agitation pendant 1 à 2 jours. Des

colonies ont été piquées et mises en culture dans un volume de 2 ml de LB avec ampicilline (50 µg/ml finale) et kanamycine (100 µg/ml finale) pendant toute la nuit à 30°C sous agitation (200 x g). Une mini-préparation d'ADN plasmidique a été réalisée et la présence des inserts a été vérifiée par PCR.

2.8. Agroinfiltration de *Nicotiana benthamiana*

Les graines de *Nicotiana benthamiana* ont été ensemencées dans des chambres de croissance à une température diurne de 25°C et nocturne de 21°C avec une photopériode de 16 heures dans un mélange 1:1:1 de terre noire, Promix (Premier) et de vermiculite. Après deux semaines, les plantules ont été séparées dans des pots individuels et laissées deux semaines supplémentaires à pousser.

Pour l'agroinfiltration (English *et al.*, 1997), les bactéries ont été mises en pré-culture dans du LB avec kanamycine (100 µg/ml finale) et ampicilline (50 µg/ml finale) à 30°C avec agitation (200 x g) toute la nuit. La pré-culture a servi à inoculer une solution de LB qui a été incubée jusqu'à une D.O._{600nm} de 0,8. La culture a été centrifugée à 5 000 x g pendant 10 min et resuspendue dans la solution d'infiltration [mélange de sels de bases Murashige et Skog (MS) : 4,3 g/l, 10 mM d'acide 2(N-morpholino) éthanesulfonique (MES), sucrose 20 g/l, 200 µM d'acétosyringone, pH 6,5]. Chaque suspension a été mélangée en proportion 1:1 avec une solution d'agrobactéries contenant un vecteur exprimant la protéine p19, suppresseur de gène interférence, qui permet d'éviter la dégradation du vecteur par les systèmes de défense de la plante dans les cellules végétales. L'agroinfiltration a été faite sous la feuille à l'aide d'une seringue de 1 cm³ sans aiguille. Le volume infiltré dépend de la surface de la feuille. Les plantes ont été récoltées sept jours après inoculation pour les différents tests d'expression ou ont été lyophilisées (Benchtop SLC; VirTis, Stone Ridge, NY, USA) après avoir été broyées dans l'azote liquide pour une utilisation ultérieure.

2.9. Extraction d'ARN et RT-PCR

Le TriReagent a été utilisé selon les recommandations du fournisseur avec quelques modifications. Les tissus végétaux ont été broyés dans du TriReagent (Sigma) (1 ml pour 50 à 100 mg de tissu) dans des tubes de 1,5 ml. Le broyat a été laissé à température de la pièce 5 min et centrifugé 15 min à 4 °C à 12 000 x g. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 1,5 ml. Un volume de 0,2 ml de chloroforme par ml de TriReagent (Sigma) a été ajouté et le tube a été vigoureusement agité pendant 15 s. Le tube a été laissé à la température de la pièce 15 min et centrifugé à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse incolore (supérieure) a été récupérée et transférée dans un nouveau tube. L'ARN a été précipité en ajoutant 0,25 ml d'isopropanol et 0,25 ml de citrate de sodium (1,2 M NaCl, 0,8 M de citrate de sodium) par ml de TriReagent (Sigma) utilisé pour l'homogénéisation de départ. Le mélange a été laissé à la température de la pièce pendant 15 min puis centrifugé pendant 8 min à 12 000 x g à 4°C. L'ARN a été précipité. Le surnageant a été jeté et le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol 75% en utilisant le vortex puis centrifugé 5 min à 12 000 x g à 4°C. L'éthanol a été enlevé et le culot a été séché à l'air sec 3 à 5 min. Le culot n'a pas été séché complètement pour éviter des problèmes de resolubilisation. Le culot a été repris dans un volume de 50 µl d'eau nanopure exempt de RNase.

L'ARN, pour la réaction de transcription inverse suivie d'une PCR (RT-PCR), a été préparé comme suit et d'après le protocole de la compagnie. Dans un volume final de 10 µl d'eau exempt de RNase, une quantité pouvant aller jusqu'à 1 à 2 µg d'ARN a été traitée à la DNase I (1 unité) (Invitrogen) en présence du tampon de réaction 10X de l'enzyme (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂) ramené à 1X. Le mélange a été incubé 15 min à la température de la pièce puis 1 µl d'EDTA 25 mM a été ajouté. Le mélange a été de nouveau incubé durant 15 min à 65°C pour inactiver l'enzyme puis mis immédiatement sur glace. Le tube a été

centrifugé pour collecter la solution qui a pu être utilisée directement pour la réaction de transcription inverse.

Le *Kit SuperScript™ first strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen) a été utilisé. Jusqu'à 5 µg d'ARN total ont été utilisés. Un volume de 1 µl de dNTP 10 mM et de 1 µl d'oligo-(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) ont été ajoutés à l'ARN total et le volume a été complété avec de l'eau exempte de RNase pour un volume final de 10 µl. Un tube témoin positif avec le témoin ARNm du kit (50 ng/µl) a été préparé ainsi qu'un tube témoin négatif. Chaque échantillon a été incubé à 65°C pendant 5 min et placé sur glace pendant au moins 1 min. Le mélange suivant a été préparé en respectant l'ordre d'ajout : 2 µl du tampon de RT (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de DTT (0,1 M) et 1 µl de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (40 unités). Un volume de 9 µl de ce mélange a été ajouté à l'ARN puis mélangé doucement et enfin centrifugé brièvement. Une incubation de 2 min à 42°C a été faite puis un volume de 1 µl de SuperScript™ II RT (50 unités) a été ajouté dans chaque tube hormis le tube témoin négatif. Le mélange a été incubé pendant 50 min à 42°C. La réaction a été terminée en laissant le mélange pendant 15 min à 70°C. La réaction a été collectée par une centrifugation rapide, puis un volume de 1 µl de RNase H (2 unités) a été ajouté dans chaque tube et a été incubé 20 min à 37°C avant l'amplification PCR de l'ADNc. L'étape de PCR a été réalisée dans les mêmes conditions que celles précédemment utilisées.

2.10. Extraction protéique et immunobuvardage de type western

Pour l'extraction des protéines totales solubles, les feuilles ont été récoltées et broyées en une fine poudre à l'aide d'un mortier-pilon dans l'azote liquide. La poudre obtenue a été stockée au congélateur à -80°C pour une utilisation future ou utilisée directement pour une extraction de protéines totales solubles dans du tampon de Laemmli (1X; 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% sodium dodécylsulfate (SDS), 10%

glycérol, 5% β -mercaptoéthanol, trace de bleu de bromophénol) afin de réaliser un immunobuvardage de type western (Laemmli, 1970 ; Lentz *et al.*, 2011).

Les gels d'électrophorèse utilisés ont été des gels d'acrylamide 12% réalisés de la manière suivante. Le gel de séparation de 0,75 mm a été constitué de 3,35 ml d'eau, 2,5 ml de tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 100 μ l de SDS 10% (dans l'eau), 4 ml d'acrylamide (29,2% acrylamide, 0,8% bisméthylène acrylamide), 10 μ l de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et 50 μ l d'ammonium persulfate (APS, 10%). Le gel de concentration composé de 3,05 ml d'eau, 1,25 ml de tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 50 μ l de SDS 10%, 650 μ l d'acrylamide (29,2% acrylamide, 0,8% bisméthylène acrylamide), 10 μ l de TEMED, 50 μ l d'APS a été ajouté au dessus du gel de séparation. Le peigne a été rajouté et le tout a été laissé à polymériser. Les échantillons ont migré de 100 à 200 V dans une cuve Bio-Rad Protean3 remplie de tampon de migration (25 mM de tris base, 192 mM glycine, 0,1% SDS). Le standard de poids moléculaire utilisé était le *Broad Range SDS-PAGE standards* (Bio-Rad). Pour la coloration au bleu de Coomassie, la solution contenait 40% de méthanol, 10% d'acide acétique et 0,1% de *Coomassie Brilliant Blue R250* et la solution de décoloration était composée de 30% de méthanol et de 7% d'acide acétique. Pour l'immunobuvardage, le transfert a été réalisé à 100 V dans du tampon de transfert froid (25 mM Tris, 192 mM glycine, 15% méthanol) dans les cuves Bio-Rad Protean3 sur membrane de polyfluorure de vinyldène (PVDF) (qui doit être chargée dans du méthanol 100% avant utilisation). Le gel a premièrement été équilibré 15 min dans le tampon de transfert. Il a été déposé sur deux couches de papier filtre Whatman (la taille du gel) suivies de la membrane et enfin deux nouvelles couches de papier Whatman. Ce montage a été mis dans le système sandwich avec deux éponges de part et d'autre. À la fin du transfert, la membrane a été placée dans une solution de blocage (lait écrémé en poudre 5%) toute la nuit après 15 min d'agitation. Le jour suivant, la solution de blocage a été remplacée par une solution de blocage contenant l'anticorps primaire et la membrane a été mise à agiter pendant 1 heure. Après l'incubation de l'anticorps primaire, la membrane a été lavée 3 fois pendant 10 min

dans une solution de lavage (solution saline tamponnée en phosphate (PBS) 1X, Tween-20 0,2%). À la fin des lavages, la membrane a été incubée en présence de l'anticorps secondaire dans la solution de blocage pour 1 heure avec agitation et ensuite de nouveau lavée trois fois avant la détection. La détection a été réalisée avec la solution ECL du kit Amersham soit avec des films X-Ray et ou l'appareil de détection Fusion Fx7, logiciel Fusion version 15.11 pour Windows (MBI Lab Equipment, Montréal, QC, CANADA).

2.11. Immunisation des souris avec la protéine M::GP5 mutante

Le protocole d'utilisation des animaux a été approuvé et appliqué en accord avec le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) de l'Université de Québec à Montréal (UQÀM) et en accord avec les lois et règlements du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

Des souris femelles BALB/c âgées de six semaines ont été achetées chez Charles River labs (St-Constant, QC, CA) et séparées en trois groupes de six souris. Les souris ont été immunisées aux jours 0 et 1, 10 et 11, 20 et 21, 28 et 29, 35 et 36 et 42 et 43. Avant chaque immunisation, les souris ont été laissées à jeûner pendant 6 heures en présence d'eau. L'acidité gastrique a été neutralisée pendant une heure avant les gavages avec 100 µl de carbonate de calcium 4% donné aussi par gavage en utilisant une aiguille de gavage (Rigano *et al.*, 2006).

Chaque groupe a reçu oralement par gavage un des traitements suivants : (1) PBS (150 µl), (2) poudre de plante lyophilisée contenant M::GP5mut (150 mg) + 20 µg de FljB recombinante purifiée produite chez *E. coli* (volume ajusté à 150 µl avec du PBS), (3) poudre de plante lyophilisée (150 mg) + 20 µg de FljB recombinante purifiée produite chez *E. coli* (volume est ajusté à 150 µl avec du PBS) (témoin) (**Figure 2.2**). Après le gavage, les souris ont été laissées à jeûner pendant 1 heure avec un accès libre à l'eau.

Les fèces ont été collectées et les échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine mandibulaire avant le gavage aux jours 0, 10, 20, 28, 35 et 42 et regroupés pour chaque groupe de souris. Au jour 51, le sang a été prélevé pour chaque souris suite à une exsanguination par ponction cardiaque sous anesthésie à l'isofluorane (Figure 2.2). Après coagulation, les échantillons ont été centrifugés à $600 \times g$ à température de la pièce pendant 10 min. Les *sera* ont été ensuite stockés à -20°C jusqu'aux analyses. Le petit intestin a été prélevé et lavé avec 4 ml de tampon de lavage froid (PBS, 25 mM EDTA, 1% de BSA et un comprimé de cocktail complet d'inhibiteurs de protéase) (Rigano *et al.*, 2006). Le contenu intestinal a été centrifugé à 4°C pendant 15 min à $3\,500\text{ g}$ et le surnageant a été stocké à -80°C . Le lavage intestinal équivalait une dilution de 1:4 du volume de contenus intestinaux.

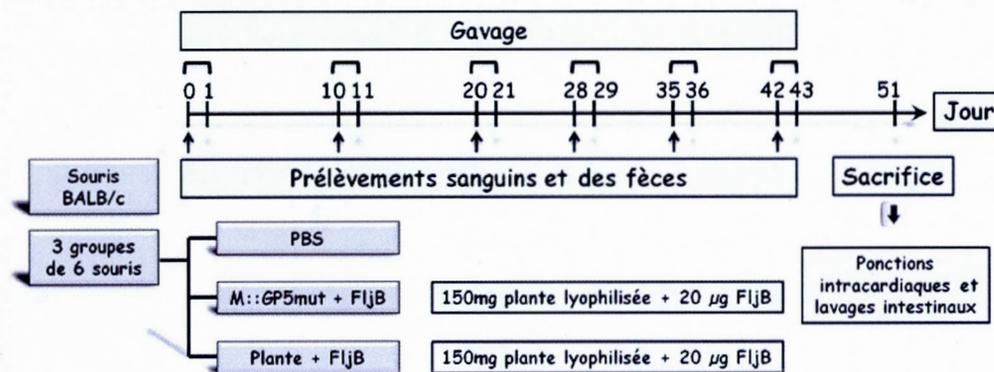


Figure 2.2. Cédula d'immunisation pour la protéine M::GP5mut. La flèche horizontale représente le temps en jours et les flèches noires verticales pointent les jours de prélèvements du sang et des fèces. Les accolades au dessus des jours signifient que le gavage a eu lieu deux jours consécutifs. Le 51^{ème} jour correspond au sacrifice des souris pour lequel les lavages intestinaux ont été réalisés ainsi que les ponctions intracardiaques individuelles. Trois groupes de six souris BALB/c âgées de six semaines ont été utilisés pour le gavage. Le groupe 1 a reçu du PBS, le groupe 2 a reçu de la poudre de plante lyophilisée contenant la M::GP5mut avec $20\ \mu\text{g}$ de FljB et le groupe 3 a reçu de la poudre de plante lyophilisée avec $20\ \mu\text{g}$ de FljB.

2.12. Test de dosage d'immunoabsorption par enzyme lié (ELISA) pour le PRRSV

Au 1^{er} jour, les puits ont été couverts avec la GP5-GST (0,1 µg/puits) dans du tampon de carbonate de sodium pH 9,6 (50 mM) et laissés pendant toute la nuit à 4°C. Le 2^{ème} jour, quatre lavages au PBS-Tween 20 (0,01%) ont été faits puis les plaques ont été bloquées toute la nuit à 4°C avec du PBS-Tween 20 (0,01%) contenant 1% de BSA. Le 3^{ème} jour, un volume de 100 µl de *serum* de souris dilué à 1:100 a été ajouté dans les puits et laissé pendant deux heures à 37°C avec agitation (200 x g). Quatre lavages au PBS-Tween 20 (0,01%) ont été faits et l'anticorps secondaire anti-souris de chèvre (1:10 000) a été ajouté pour 1 heure d'incubation à 37°C. Les plaques ont été lavées (4 lavages) et le signal HRP a été détecté en ajoutant un volume de 100 µl de TMB par puits. La réaction a été arrêtée après 30 min à température de la pièce en ajoutant un volume de 50 µl d'acide sulfurique (H₂SO₄) 1 M dans chaque puits et les plaques ont été lues à une D.O._{450nm} en utilisant le lecteur Tecan Infinite M1000 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suisse).

2.13. Expression de la flagelline

La production et la purification de la protéine FljB de *E. coli* ont été réalisées comme il a été décrit par Bergeron-Sandoval *et al.* (2010). Brièvement, le gène FljB de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* souche SL1344 a été cloné dans le vecteur d'expression pTrcHisB (Invitrogen) et la protéine a été purifiée sur une résine Ni-NTA-His-Bind® (Novagen, Madison, WI, USA) sous des conditions dénaturantes en suivant les directives du manuel de la compagnie et comme décrit ailleurs (McDermott *et al.*, 2000). Les protéines ont été dialysées contre du PBS pH 7,3 et évaluées qualitativement par SDS-PAGE (Gel d'électrophorèse en polyacrylamide) et immunobuvardage de type western en utilisant un anticorps de chèvre couplé HRP anti-His (1:20 000) (Qiagen, Mississauga, ON, CA). La protéine FljB a été purifiée et

quantifiée par un test protéique de type Lowry (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA) et stockée dans un congélateur à -80°C jusqu'à son utilisation.

2.14. Expression de la flagelline chez *Nicotiana benthamiana*

La construction permettant l'expression de la flagelline dans les plantes (fournie par Mr. Bergeron-Sanderval) possède la séquence de rétention au RE (SEKDEL) et est clonée dans le vecteur pCAMBIA1380mod (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010). Pour les analyses par immunobuvardage, aussi bien la flagelline exprimée chez les plantes que la flagelline exprimée chez les bactéries ont été soumises à un gel SDS-PAGE de 12% et transférées sur membrane PVDF. Les membranes ont été saturées dans une solution de PBS-Tween 20 0,05% contenant 5% de lait écrémé en poudre avec un anticorps anti-FljB de lapin à une dilution 1:20 000 à température de la pièce pendant 1 heure. La détection des protéines a été effectuée en utilisant un anticorps de chèvre anti-lapin couplé HRP (1:10 000) et le kit de détection chimiluminescent anticorps HRP HyGLO (Denville Scientific Inc., Metuchen, NJ, USA). Le niveau de protéines exprimées chez les plantes agroinfiltrées a été évalué comme décrit précédemment (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010). Brièvement, des immunobuvardages avec des dilutions d'échantillons de différentes plantes et d'une quantité connue de protéines purifiées FljB ayant une étiquette 6x Histidine exprimées chez *E. coli* ont été analysées par dosage densitométrique des films X-ray avec le logiciel Quantity One (Bio-Rad).

Pour quantifier la stabilité de la protéine FljB chez les plantes, un gel SDS-PAGE a été réalisé sur les aliquots préparés sur un lot unique de poudre lyophilisée après la récolte et sept mois plus tard. L'extraction protéique a été réalisée directement dans du tampon Laemmli (10 mg de poudre de plante lyophilisée dans 300 µl de tampon), chauffée pendant 3 min à 90°C et chargée sur un gel d'acrylamide de 12%. Les gels ont été réalisés en duplicata, le premier pour réaliser une coloration au bleu de Coomassie et le second pour effectuer un immunobuvardage de type

western. La coloration au bleu de Coomassie a été utilisée pour estimer la charge des protéines en utilisant la protéine RubisCo comme référence. Les protéines extraites dans le tampon de Laemmli après la première extraction ont été conservées dans un congélateur à -20°C pour comparer avec la seconde extraction après sept mois d'entreposage. Les immunobuvardages ont été faits comme décrits à la section 10.

2.15. Immunisation des souris avec la flagelline

Le protocole d'utilisation des animaux a été approuvé et appliqué en accord avec le CIPA de l'UQÀM en accord avec les lois et règlements du CCPA.

Des souris femelles BALB/c âgées de six semaines ont été achetées chez Charles River labs (St-Constant, QC, CA) et séparées en cinq groupes de 8 souris. Les souris ont été immunisées aux jours 0, 10, 20, 27, 34 et 41. Avant chaque immunisation, les souris ont été laissées à jeûner pendant 6 heures en présence d'eau. L'acidité gastrique a été neutralisée pendant une heure avant les gavages avec 100 μl de carbonate de calcium 4% donné aussi par gavage en utilisant une aiguille de gavage (Rigano *et al.*, 2006). Chaque groupe a reçu oralement par gavage un des traitements suivants : (1) PBS (100 μl), (2) OVA [100 μg dans 100 μl de PBS (Salman *et al.*, 2009)], (3) OVA (100 μg dans 100 μl de PBS) avec la flagelline purifiée de *Escherichia coli* (20 μg), (4) OVA (100 μg) avec 6,1 mg de poudre lyophilisée de plante exprimant la flagelline (20 μg) dans un volume final de 100 μl de PBS, (5) OVA (100 μg) avec 6,1 mg de poudre lyophilisée de plante (Témoin) dans un volume final de 100 μl de PBS (**Figure 2.3**). Après le gavage, les souris ont été laissées à jeûner pendant 1 heure avec un accès libre à l'eau.

Les échantillons de sang ont été recoltés au niveau de la veine mandibulaire avant le gavage aux jours 0, 10, 20, 27, 34 et 41 et regroupés pour chaque groupe de souris. Au jour 48, le sang a été obtenu pour chaque souris suite à une exsanguination par ponction cardiaque sous anesthésie à l'isofluorane. Après coagulation, les échantillons ont été centrifugés à 600 x g à la température de la pièce pendant 10 min.

Les *sera* ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'aux analyses. Les rates ont été récupérées aseptiquement après le sacrifice des souris au 48^{ème} jour, piquées avec une aiguille de calibre 21, et écrasées avec le piston d'une seringue stérile de 5 ml pour séparer les cellules de la rate. Le petit intestin a été enlevé et lavé avec 5 ml de tampon de lavage froid [PBS, 25 mM d'EDTA, 1% de BSA et un comprimé de cocktail complet d'inhibiteurs de protéase (Roche, Laval, QC, Canada)] (Rigano *et al.*, 2006). Le contenu intestinal a été centrifugé à 4°C pendant 15 min à $3\,500 \times g$ et le surnageant a été stocké à -80°C . Le lavage intestinal équivalait à une dilution au 1:5 du volume du contenu intestinal.

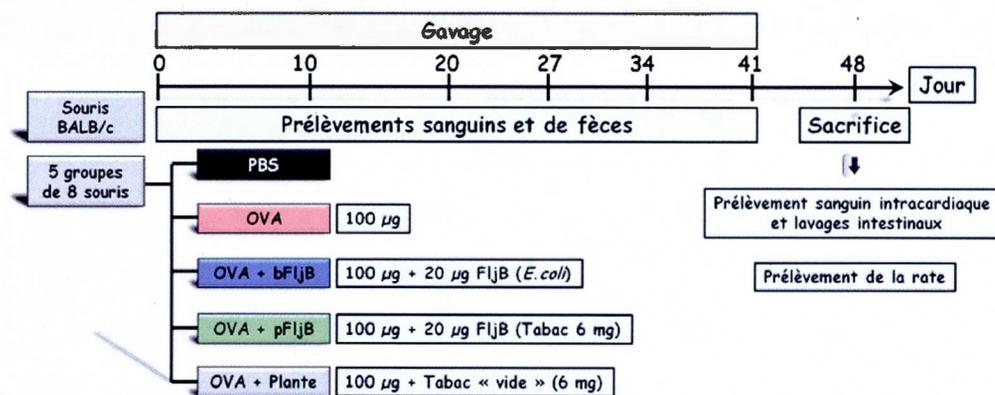


Figure 2.3. Cédule d'immunisation pour la flagelline. La flèche horizontale représente le temps en jours et les barres noires verticales, les prélèvements de sang, de fèces et les gavages. Le 48^{ème} jour correspond au sacrifice des souris pour lesquelles les lavages intestinaux ainsi que les prélèvements sanguins individuels et l'isolation de la rate ont été réalisés. Cinq groupes de huit souris BALB/c âgées de six semaines ont été utilisés pour le gavage. Le groupe 1 a reçu le PBS, le groupe 2 a reçu $100\ \mu\text{g}$ d'OVA, le groupe 3 a reçu $100\ \mu\text{g}$ d'OVA avec $20\ \mu\text{g}$ de FljB exprimée chez les bactéries, le groupe 4 a reçu $100\ \mu\text{g}$ d'OVA avec de la poudre de plante lyophilisée contenant $20\ \mu\text{g}$ de FljB et le groupe 5 a reçu $100\ \mu\text{g}$ d'OVA avec de la poudre de plante lyophilisée.

2.16. Tests ELISA indirects

2.16.1. Anticorps sériques anti-OVA ou anti-FljB

La présence d'anticorps spécifiques de l'OVA ou de la flagelline a été évaluée dans les *sera* par un test ELISA indirect. Les plaques Costar de 96 puits (Fisher Scientific) ont été recouvertes avec 10 µg d'OVA par puits (quantité qui donnait les meilleurs résultats des trois testées : 1 µg, 5 µg et 10 µg d'OVA par puits) ou avec 1 µg de FljB recombinante purifiée d'*E. coli* (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010) diluée dans un tampon carbonate-bicarbonate 0,05 M (pH 9,6) dans un volume final de 100 µl. Les plaques ont été incubées toute la nuit à 4°C, lavées quatre fois avec du PBS 0,05% Tween 20 (PBS-T) et bloquées avec 150 µl par puits de PBS-T, 1% BSA pour 1 heure à 37°C. Pour le test de titration des IgG anti-OVA, des dilutions en série (par multiple de deux) dans du PBS-T 1% BSA en commençant avec une dilution de 1:8 ont été ajoutées dans les puits (deux puits par dilution) et incubées pendant 3 heures à 37°C. Pour l'isotypage des IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgA, les *sera* ont été dilués à 1:100 et un volume de 100 µl de chaque dilution a été déposé par puits et incubé pendant 3 heures à 37°C. Pour la détection des IgG sériques spécifiques de FljB, les *sera* ont été dilués à 1:8 et un volume de 100 µl a été déposé par puits et incubés pendant 3 heures à 37°C. Les plaques ont été lavées comme ci-dessus et incubées pendant 1 heure à 37°C avec les anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplés HRP (HRP-IgG) dilués à 1:20 000 dans du PBS 1% BSA ou avec des anticorps de chèvre anti-IgG1 (1:10 000), -IgG2a (1:5 000), -IgG2b (1:5 000), -IgG3 (1:1 000) ou -IgA (1:5 000) de souris couplés HRP. Les plaques ont été lavées et le signal HRP a été détecté en ajoutant un volume de 100 µl de TMB par puits. La réaction a été arrêtée après 30 min à la température de la pièce en ajoutant un volume de 50 µl d'H₂SO₄ 1 M dans chaque puits et la lecture des plaques a été faite à 450 nm en utilisant le lecteur Tecan Infinite M1000 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suisse).

Le titre limite de chaque *serum* a été déterminé à la dernière dilution de l'échantillon donnant une D.O. moyenne supérieure au double de la D.O. moyenne du *serum* de souris négatif.

Pour le test d'isotypage, les résultats ont été exprimés comme la moyenne des D.O. de trois tests indépendants pour chaque groupe de souris. Les D.O. étaient considérées significatives lorsqu'elles étaient égales ou supérieures au double des D.O. du groupe témoin négatif.

2.16.2. Anticorps intestinaux anti-OVA ou FljB spécifiques

La présence d'IgG et d'IgA spécifiques de l'OVA ou de la flagelline dans les lavages intestinaux a été vérifiée par ELISA indirect. Tous les échantillons ont été traités en duplicata. Le « *coating* », les lavages et le blocage ont été réalisés comme il a été décrit à la section 12. Une dilution de 1:2 des lavages intestinaux (100 μ l) a été utilisée et incubée pendant 3 heures à 37°C. Les plaques ont été lavées et les anticorps de chèvre couplés HRP anti-IgG (1:20 000) ou anti-IgA (1:1 000) de souris ont été ajoutés pendant 1 heure à 37°C dans un incubateur. Le test a été répété 3 fois. Pour chaque échantillon, le contrôle négatif a été réalisé avec les mêmes conditions dans la même plaque en remplaçant l'OVA ou la flagelline par du tampon. Les résultats ont été exprimés comme des valeurs moyennes de D.O. corrigées en soustrayant la valeur du contrôle négatif.

2.17. Test de lymphoprolifération

Les cellules de la rate de chaque souris ont été mises en suspension dans du milieu de culture cellulaire RPMI supplémenté en pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100 μ g/ml), 10% FBS, 0,05 mM de β -mercaptoéthanol et 10 mM d'HEPES et déposées dans des plaques 96 puits à raison de 4×10^5 cellules par puits. Les cellules ont été incubées en quadruplicata, soit avec de l'OVA (10 μ g/ml) ou la flagelline recombinante FljB exprimée chez *E.coli* (5 μ g/ml) ou la concanavaline A

(1,5 µg/ml) (utilisée comme un témoin positif d'activité lymphocytaire) ou le milieu de culture cellulaire (témoin négatif) pendant 4 jours à 37°C. Toutes les cultures ont été mises en présence de 0,5 µCi de thymidine tritiée (activité spécifique de 6,7 Ci/mmol) pour 24 h avant récolte des cellules sur une membrane de silice. La radioactivité liée a été mesurée avec le compteur à scintillation Wallac Microbeta 1450 Trilux (Perkin Elmer). La réponse cellulaire blastogénique a été exprimée par le calcul de l'index de stimulation (IS), lequel représente le rapport de la moyenne des coups par minute (CPM) suite à l'exposition de l'antigène ou du mitogène divisée par la moyenne de CPM par le témoin.

2.18. Analyses statistiques

La moyenne de l'index de stimulation, les D.O. des anticorps ou les titres en IgG pour chaque groupe de souris ont été comparés par une analyse de la variance à une voie (ANOVA) et un test de comparaison multiple de Tukey en utilisant le programme GraphPad Prism 5.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Le but de cette étude était d'une part la production chez les plantes des protéines M et GP5 du PRRSV et de leurs dérivés (Tableau 2.1) dans le but d'évaluer leur potentiel immunogénique. Les protéines du PRRSV ont été choisies à cause des pertes économiques majeures que ce virus engendre dans le monde et du défi que représente la lutte contre ce virus. D'autre part, il a été choisi de produire la protéine bactérienne du flagelle chez les plantes afin de tester son pouvoir adjuvant mucosal chez la souris.

3.1. Expression des protéines virales M et GP5 chez *Nicotiana benthamiana*

3.1.1. Clonages et transformations avec les constructions obtenues

Les séquences PCR des différentes constructions d'intérêt ont été clonées dans le vecteur pRTL2 en utilisant comme sites de restriction NcoI et XbaI. La cassette contenant le double 35S du CaMV, la séquence *leader* non-traduite du TEV, le gène d'intérêt et le terminateur du promoteur 35S du CaMV ont été transférés dans le vecteur binaire pCAMBIA1380 pour donner le pCAMBIAMod contenant les différents gènes d'intérêt en utilisant le site de restriction PstI pour l'insertion de la cassette. La validité des constructions a été testée sur gel d'agarose 1% suite à la digestion du vecteur pCAMBIAMod par NcoI et XbaI et par séquençage. Les constructions ont été utilisées pour transformer *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 dans le but d'agroinfiltrer *Nicotiana benthamiana*. Les feuilles infectées ont été récoltées après sept jours mais leur morphologie a été préalablement observée pour

vérifier toute toxicité des protéines exogènes. La **figure 3.1** montre qu'il n'y a pas d'effet de toxicité apparente des protéines au niveau des zones d'infiltration. Aucune nécrose, retard de développement ou malformation n'ont été observés au niveau des feuilles agroinfiltrées pour les différentes constructions utilisées mises à part les constructions en fusion avec la protéine CTB, M::GP5::CTB et M::GP5::CTBmut (résultats non montrés). L'expression de la protéine de fluorescence verte (GFP) au niveau des feuilles servait de témoin positif et a permis de démontrer que le système pCAMBIamod était fonctionnel. Les ARNm et les protéines qui ont été extraits des feuilles récoltées ont ensuite été testés par RT-PCR et immunobuvardage de type western pour vérifier la présence des transcrits et des protéines d'intérêt, respectivement.

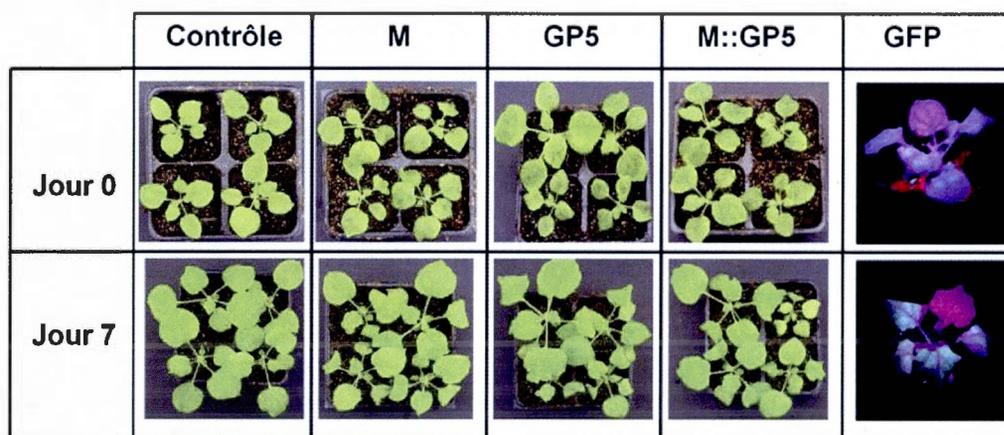


Figure 3.1. Morphologie des feuilles de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrées. Les *Agrobacterium tumefaciens* souche AGL1 portant respectivement les séquences *m*, *gp5*, *m::gp5* ou *gfp* ont été utilisées pour infiltrer les feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Le témoin négatif était des plantes non-infiltrées. Les feuilles ont été observées au jour de l'inoculation et sept jours après infiltration. Aucun dommage dû à l'expression des protéines n'a été observé au niveau des feuilles agroinfiltrées pour ces constructions.

3.1.2. Détection des ARNm et des protéines d'intérêt

Après la récolte des feuilles, des extractions d'ARN totaux ont été réalisées pour vérifier la présence des ARNm des gènes d'intérêt par RT-PCR. Les ARNr 18S ont été utilisés comme témoin de charge pour les différents gènes testés. Il est possible de voir que la quantité d'ADNc dans les différents puits est sensiblement la même (**Figure 3.2**). Les amplifications PCR des ADNc avec les différentes amorces (amorces amplifiant *gp5* ou les amorces spécifiques de chaque gène) ont montré la présence des différents transcrits dans les cellules de plantes pour les constructions M, GP5, M::GP5 et M::GP5mut. L'expression des deux constructions fusionnées à la protéine CTB n'a pas été détectée avec les amorces utilisées. De plus, les amorces GP5 ont amplifié la même portion dans les cinq constructions contenant la séquence GP5 permettant ainsi de comparer succinctement les niveaux de transcrits entre ces constructions qui restaient sensiblement égales (**Figure 3.2**). Le témoin négatif (-) a permis de montrer que l'amplification observée n'était pas due à une trace de plasmide résiduel de l'agroinfiltration sur les feuilles mais bien à la présence des ARNm dans les feuilles (**Figure 3.2**). Le témoin GFP quant à lui a permis de montrer que les amorces GP5 étaient spécifiques de la portion du gène amplifié.

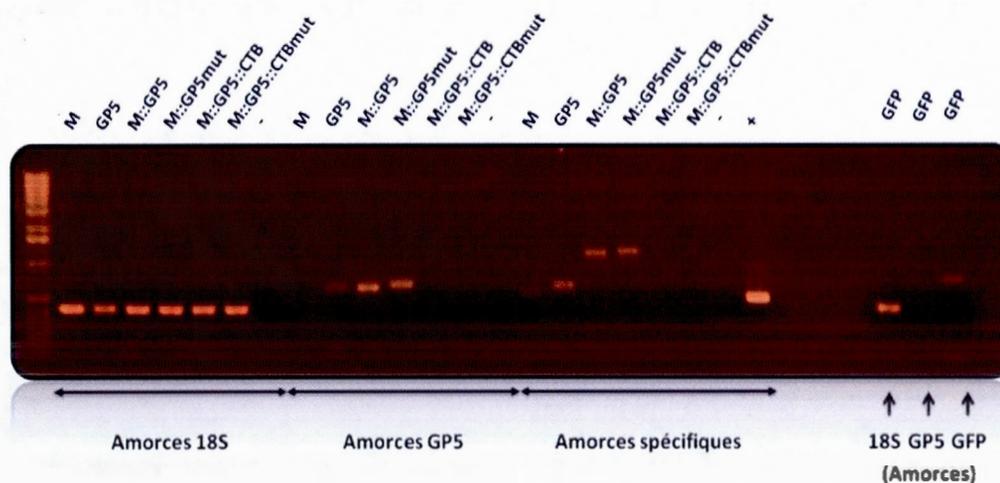


Figure 3.2. Expression des transcrits dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* par RT-PCR. Les tests PCR ont été réalisés sur les ADNc avec les amorces résumées dans le tableau de l'annexe B. Le signe (-) correspond à la construction GP5 pour laquelle la SuperScript™ II RT n'a pas été ajoutée dans le mélange et a servi de témoin négatif. Le signe (+) identifie le témoin positif du kit. Les amorces spécifiques correspondaient aux amorces capables d'amplifier la taille totale de la séquence et les amorces GP5 amplifiaient le gène *gp5*. Les amorces 18S servaient à amplifier les ADNc des ARN ribosomal 18S qui ont été utilisés comme témoin de charge.

La présence des protéines d'intérêt a été vérifiée par immunobuvardage de type western après un gel SDS-PAGE. La protéine GFP sert de témoin négatif. Le bleu de Coomassie a servi de témoin de charge en se basant sur la bande majoritaire de la RubisCo comme référence [Figure 3.3, panneau (A)]. Suite à la révélation sur film X-Ray, il a été possible de voir que les protéines M; GP5 et M::GP5 ont été produites au niveau des feuilles agroinfiltrées confirmant les résultats obtenus pour les transcrits. Le panneau (B) de la Figure 3.3 montre la présence des protéines M et M::GP5 avec l'anticorps anti-M et la spécificité de cet anticorps pour la protéine M par l'absence de détection de la protéine GP5. De plus, la présence d'une bande de plus de 40 kDa dans la piste M a été observée. L'identité de cette bande n'a pas été investiguée mais elle pourrait correspondre à un doublet de M qui ne serait pas dénaturé en gel SDS-PAGE. La détection des protéines GP5 et M::GP5 du panneau (C) de la Figure 3.3 avec l'anticorps anti-GP5 et l'absence de détection de la protéine M avec cet anticorps a montré la spécificité de cet anticorps. Cependant, ces résultats n'ont pu être reproduits que trois fois avant que le signal des différentes protéines disparaisse complètement des immunobuvardages. De plus, d'autres anticorps, *sera* de porcs vaccinés ou convalescents, anticorps produits à partir des gènes synthétiques de GENART et anticorps produits par l'immunisation d'un lapin avec de la GST::GP5, ont été testés mais aucun signal n'a été observé et ce malgré la confirmation répétée de la présence des transcrits dans les poudres de plantes récoltées à différents temps.

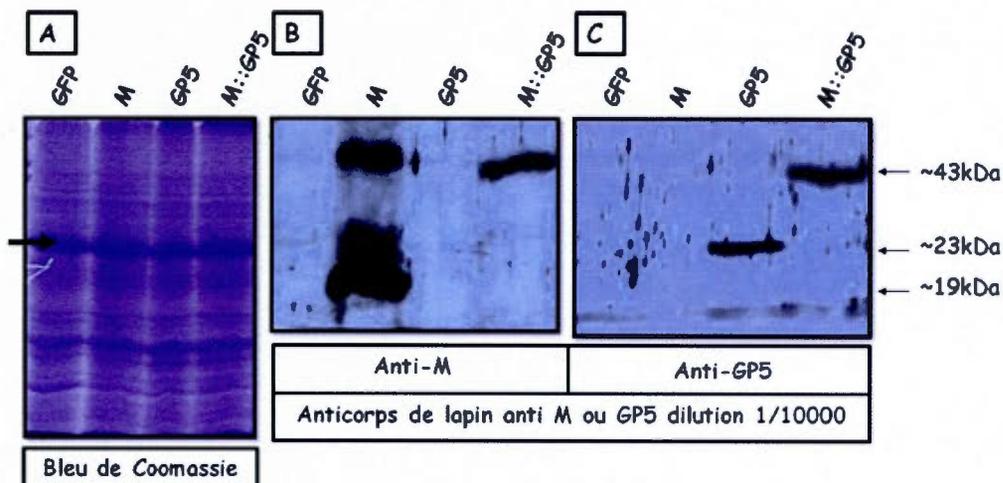


Figure 3.3. Expression des protéines recombinantes GFP, M, GP5 et M::GP5 chez *Nicotiana benthamiana*. (A): Coloration au bleu de Coomassie du gel SDS-PAGE utilisé comme témoin de charge. La flèche noire indique la RubisCo; (B): Les protéines M et M::GP5 ont été détectées en utilisant un anticorps spécifique anti-M; (C): Les protéines GP5 et M::GP5 ont été détectées en utilisant des anticorps spécifiques anti-GP5. La protéine GFP a été utilisée comme témoin négatif.

En se basant sur les résultats de RT-PCR et les données obtenues sur l'expression des protéines, une expérience d'immunisation chez les souris a été menée.

3.1.3. Anticorps sériques spécifiques de la GP5

Toutes les souris étaient séronégatives pour la GP5 au début de l'expérience. La cinétique de réponse en anticorps contre la GP5 a été déterminée par ELISA indirect pour les trois groupes de souris (Figure 3.4). Le groupe immunisé avec de la M::GP5mut exprimée chez les plantes mélangées avec la FljB recombinante exprimée chez *E. coli* (groupe M5*) a montré une légère réponse en IgG sérique anti-GP5 au 42^{ème} jour PI en comparaison avec le groupe PBS et le groupe plante seule (vide). Cette réponse a été ponctuelle et est revenue à un niveau basal au jour du sacrifice (jour 51). De plus, la réponse a été faible soit à peine le double de la D.O.

des deux groupes négatifs. Le groupe de plante seule avec FljB a permis de montrer que la réponse observée n'était pas due à la présence des plantes dans le mélange d'immunisation.

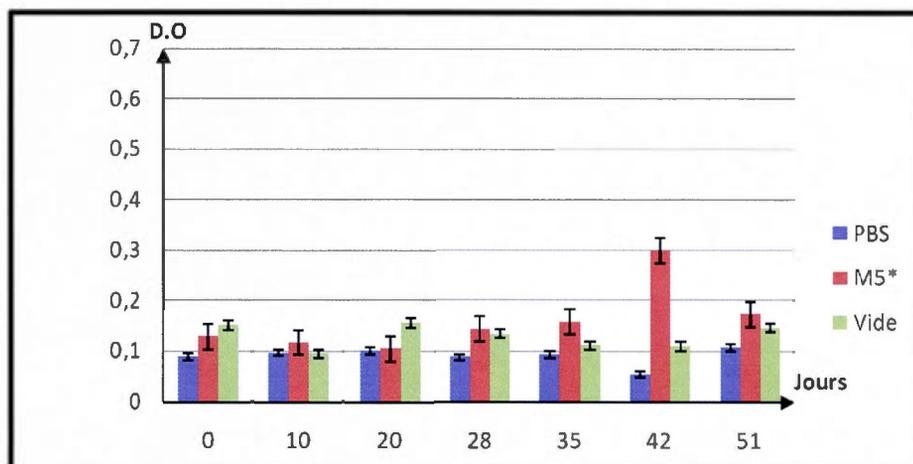


Figure 3.4. Cinétique des IgG sériques des groupes de souris. La présence d'IgG a été déterminée par ELISA indirect en utilisant la GST::GP5 recombinante comme antigène et le pool des *sera* des souris BALB/c de chaque groupe aux différents temps de collecte. PBS: correspond au groupe témoin négatif; M5*: correspond au groupe ayant reçu la construction M::GP5mut avec 20 μ g de flagelline recombinante de *E. coli*; Vide: représente le groupe ayant reçu la poudre de plante contenant la protéine GFP avec 20 μ g de flagelline recombinante de *E. coli*. L'ELISA a été réalisé en triplicata indépendant et les résultats sont présentés comme la moyenne des D.O. +/- l'écart-type.

Un ELISA indirect a été réalisé sur les *sera* des souris individuelles au 51^{ème} jour PI (**Figure 3.5**) pour vérifier la présence des IgG sériques spécifiques de la GP5 et l'uniformité de la réponse. Tout d'abord, il a été constaté qu'une seule souris répond encore au 51^{ème} jour PI (souris 5 du groupe M5*), ce qui a montré que la réponse contre la GP5 n'était pas uniforme. De plus, ces résultats ont montré que la réponse immunitaire a diminué sur une période d'une semaine.

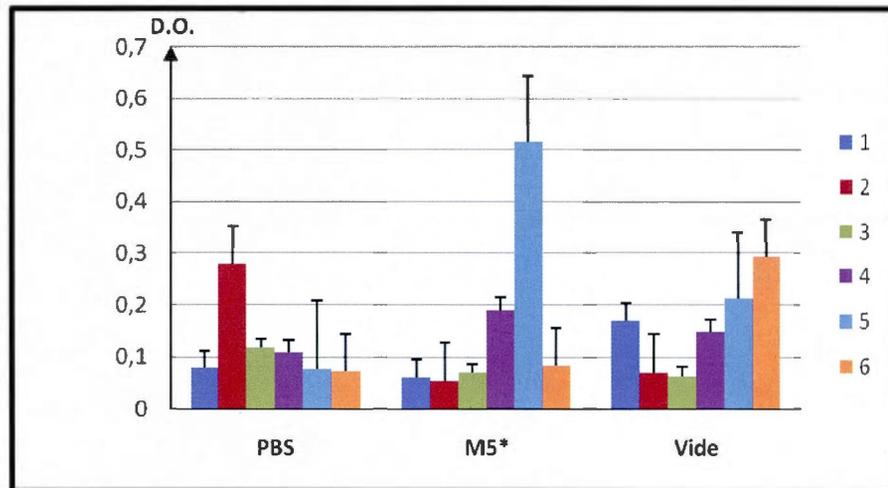


Figure 3.5. IgG sériques anti-GP5 au 51^{ème} jour chez les souris individuelles. La présence d'IgG a été déterminée par ELISA indirect en utilisant la GST::GP5 recombinante comme antigène et le *serum* individuel des souris BALB/c après sacrifice par exsanguination par ponction cardiaque. PBS: correspond au groupe témoin négatif; M5*: correspond au groupe ayant reçu la construction M::GP5mut avec 20 µg de flagelline recombinante de *E. coli*; Vide: représente le groupe ayant reçu la poudre de plante contenant la protéine GFP avec 20 µg de flagelline recombinante de *E. coli*. Les numéros 1 à 6 correspondent aux six souris composant les trois groupes. Les tests ELISA ont été réalisés en triplicata indépendants et les résultats ont été présentés comme la moyenne des D.O. +/- l'écart-type.

Lors de cette immunisation, la flagelline a été utilisée comme adjuvant mucosal suite à l'obtention de résultats prometteurs de cette protéine en tant qu'adjuvant mucosal par voie orale. Les résultats de cette étude sont présentés à la suite et ont été réalisés en collaboration avec Aurélie GIRARD, étudiante en doctorat du laboratoire du Docteur Denis ARCHAMBAULT.

3.2. FljB recombinante exprimée chez *Nicotiana benthamiana* comme adjuvant mucosal par administration orale

3.2.1. Expression de la FljB recombinante chez les plantes

Nicotiana benthamiana a été agroinfiltrée avec la construction pCAMBIAmod FljB au niveau des feuilles pour la production de la protéine recombinante. Aucuns dommages ou nécroses n'ont été observés au niveau des zones d'infiltration, comme il avait déjà été rapporté par Bergeron-Sandoval *et al.* (2010). Les feuilles agroinfiltrées ont été congelées dans de l'azote liquide, broyées en fine poudre et lyophilisées pour l'entreposage. Le niveau d'expression de FljB dans les feuilles transformées a été estimé à 3,3 µg/mg de poudre de plante lyophilisée à l'aide du programme Quantity One (Biorad) suite à un immunobuvardage de type western en utilisant une dilution en série d'une quantité connue de FljB purifiée exprimée chez *E. coli* comme référence. Dans cette étude, l'expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana* est un système efficace de production de la protéine FljB avec un niveau évalué à 280 mg/kg de poids frais de feuilles agroinfiltrées. La stabilité de la protéine dans les feuilles lyophilisées a été déterminée après sept mois d'entreposage. Comme montré à la **Figure 3.6**, la quantité de protéine (déterminé par le bleu de Coomassie sur gel SDS-PAGE) et l'antigénicité (déterminée par immunobuvardage de type western) ont été similaires entre le temps de récolte (piste 2) et après sept mois de conservation (piste 3), montrant la stabilité de la protéine exprimée chez les plantes après lyophilisation.

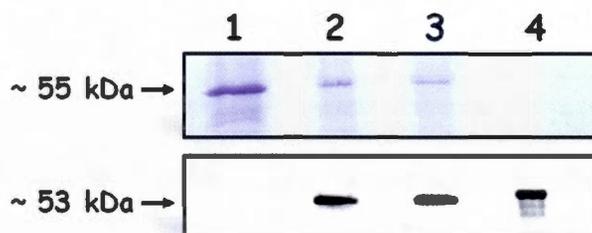


Figure 3.6. Expression de la protéine FljB. La piste 1 a été chargée avec les protéines totales extraites de la poudre lyophilisée agroinfiltrée avec la construction GFP. La piste 2 a été chargée avec la première extraction de protéines solubles totales de la poudre lyophilisée agroinfiltrée avec la construction FljB. La piste 3 a été chargée avec une extraction réalisée sur la même poudre après sept mois de conservation. La piste 4 a été chargée avec 250 ng de la protéine étiquetée His-FljB (53 kDa) recombinante purifiée exprimée chez *E. coli*. L'immunobuvardage de type western (cadre du bas) a été réalisé en utilisant un *serum* hyper immun de lapin anti-FljB comme anticorps primaire (1:20 000) et un anticorps secondaire de chèvre couplé HRP anti-IgG de lapin (1:10 000). Le gel de Coomassie (cadre du haut) est un réplique de la membrane de l'immunobuvardage de type western servant à estimer la charge à l'aide de la protéine RubisCo (55 kDa)

3.2.2. Réponse humorale contre l'OVA

Toutes les souris étaient séronégatives pour l'ovalbumine et la protéine FljB au début de l'expérience. La cinétique de réponse en anticorps contre l'OVA a été déterminée par un test ELISA (**Figure 3.7**) pour tous les groupes de souris. Les groupes immunisés avec de l'OVA mélangée à de la FljB aussi bien exprimée chez les plantes (OVA-pFljB) que chez *E. coli* après purification (OVA-bFljB) ont montré une réponse élevée en anticorps à la fin de l'expérience (48^{ème} jour PI). Le titre en anticorps dans les deux groupes de souris était similaire après 48 jours PI et était environ trente fois plus élevé que les groupes immunisés uniquement avec l'OVA ou l'OVA avec la poudre de plante non agroinfiltrée (OVA-Plante). Les IgG sériques anti-OVA ont été détectés précocement au 20^{ème} jour PI pour le groupe OVA-pFljB alors que les premiers anticorps anti-OVA ont été détectés au 34^{ème} jour PI pour le groupe OVA-bFljB et OVA-Plante et au 41^{ème} jour PI pour les groupes OVA. Des résultats similaires furent obtenus au jour 48 PI avec les *sera* des souris individuelles avec une différence significative ($P \leq 0,001$) entre les titres des deux groupe ayant reçu de la FljB (OVA-bFljB et OVA-pFljB) et ceux n'ayant pas reçu de FljB (OVA et OVA-Plante) (**Figure 3.8**).

Ces résultats ont indiqué que l'utilisation de la FljB accélérât la réponse immunitaire spécifique contre l'OVA.

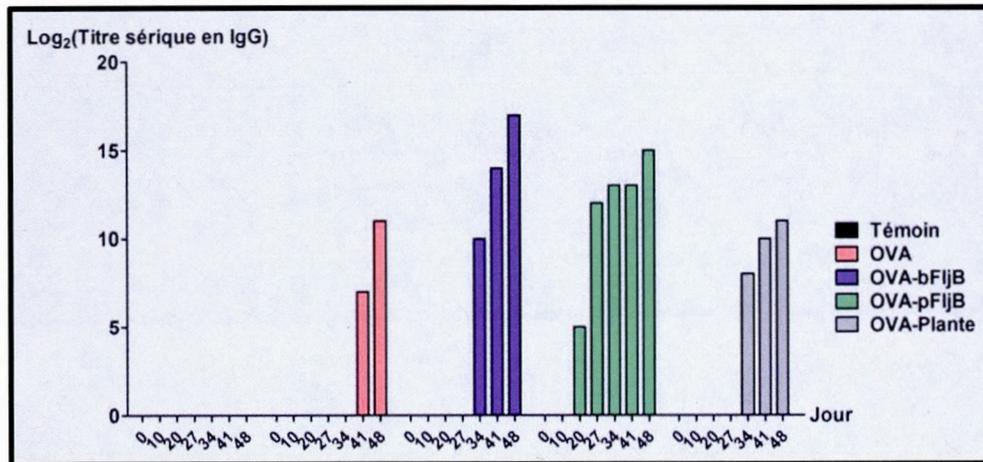


Figure 3.7. Cinétique de la réponse en IgG sérique anti-OVA. Les titres en IgG sérique ont été déterminés par ELISA indirect en utilisant l'OVA comme antigène et le pool des *sera* de chaque groupe aux différents temps de collecte qui sont : Témoïn, OVA, OVA-bFljB, OVA-pFljB et OVA-Plante. Le *serum* de chaque échantillon a été utilisé dans des dilutions sériques en multiple de deux dans du PBS-Tween 1% BSA en commençant à une dilution de 1:8 de la dilution initiale. Les D.O. ont été considérées significatives si elles étaient égales ou supérieures à deux fois la D.O. du témoin.

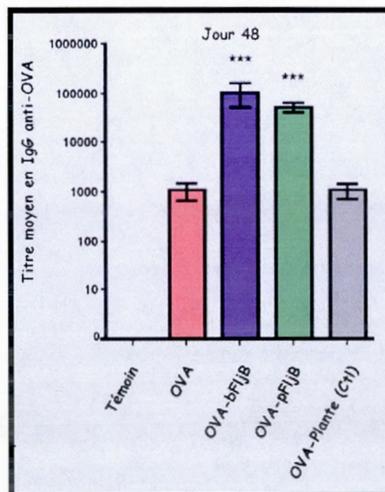


Figure 3.8. Titre en IgG au jour 48 des *sera* des souris individuelles dans chaque groupe. Les titres en IgG sérique individuels ont été déterminés par ELISA indirect en utilisant l'OVA comme antigène pour les différents groupes : Témoin, OVA, OVA-bFljB, OVA-pFljB et OVA-Plante. Pour chaque groupe de souris (n=8), la colonne représente la valeur moyenne du titre en IgG (\pm l'écart type). La valeur des groupes OVA-bFljB et OVA-pFljB est significativement différente de celle du groupe OVA à $P \leq 0.001$ (***) en utilisant le test ANOVA.

En plus d'une étude cinétique, une analyse de la réponse humorale isotypique et des sous-classes d'IgG dans les *sera* collectés au 48^{ème} jour PI a été réalisée (**Figure 3.9**). Des niveaux similaires d'IgG1 anti-OVA, typique de la réponse immunitaire de type Th2, ont été détectés dans les quatre groupes d'animaux immunisés avec l'OVA parmi lesquels les groupes OVA-pFljB et OVA-bFljB ont montré les niveaux les plus élevés (**Figure 3.9**). De même, ces deux groupes ont montré un niveau significativement plus élevé d'IgA anti-OVA que les groupes OVA et OVA-Plante (**Figure 3.9**). De plus, un niveau significatif d'IgG2a et d'IgG2b anti-OVA (typique d'une réponse de type Th1) a aussi été détecté dans les deux groupes OVA-bFljB et OVA-pFljB. Cette réponse immunitaire de type Th1 n'a pas été observée dans les groupes n'ayant reçu que l'OVA ou l'OVA-Plante. Ces résultats ont montré que l'immunisation orale avec l'OVA mélangée avec la protéine FljB exprimée chez les plantes ou chez les bactéries a résulté aussi bien en une réponse immunitaire de type Th1 que de type et Th2.

Comme montré à la **Figure 3.10**, les plus hauts niveaux d'IgA (**Figure 3.10.A**) et d'IgG (**Figure 3.10.B**) spécifiques à l'OVA dans les lavages intestinaux ont été observés chez les souris qui ont reçu l'OVA avec la protéine FljB exprimée chez les plantes ou chez *E. coli*. Ces résultats ont montré clairement que la protéine FljB exprimée chez les plantes était un puissant adjuvant pour induire une réponse humorale lorsqu'administrée oralement.

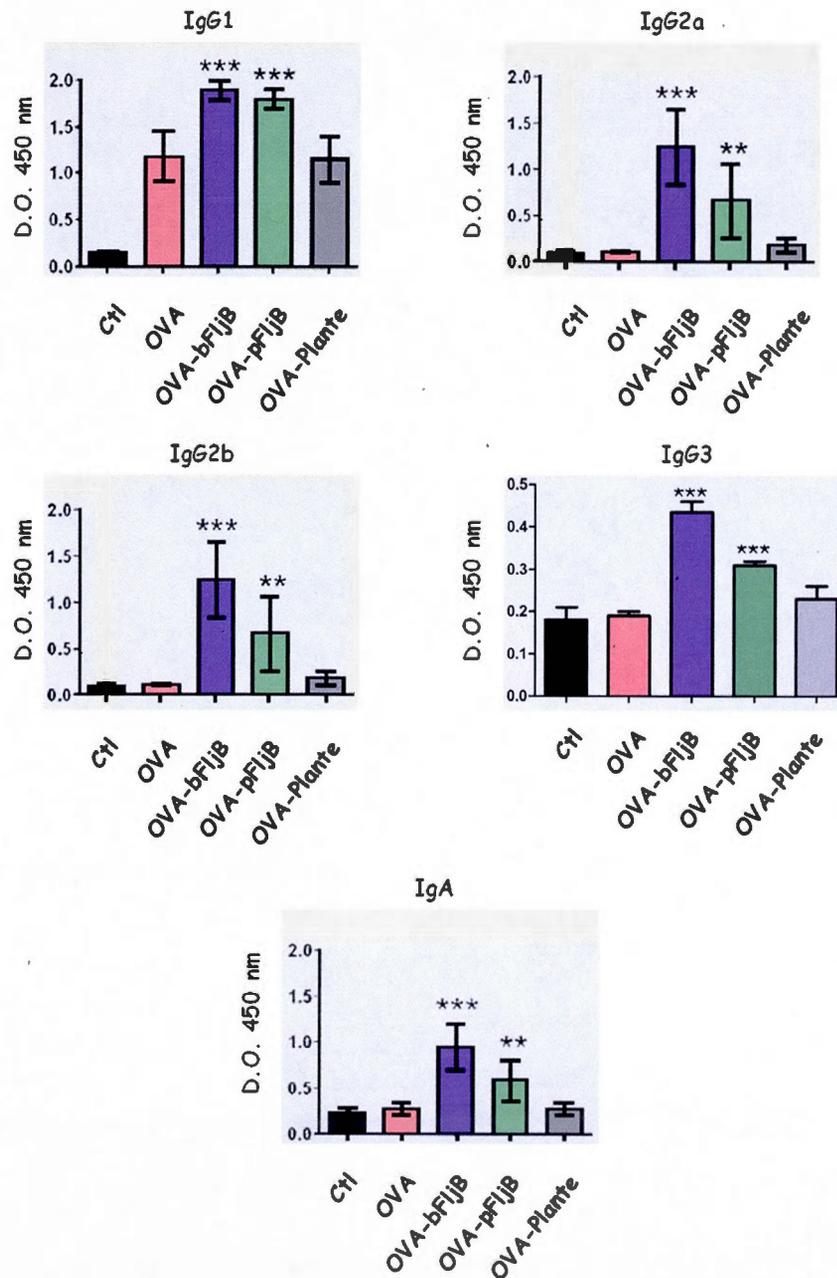
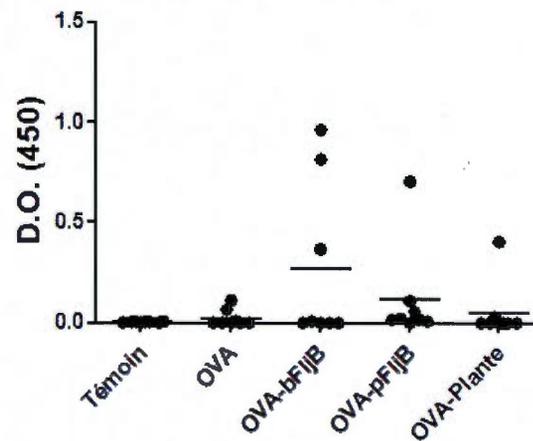


Figure 3.9. Détection des sous-types d'IgG et des IgA sériques spécifiques de l'OVA. Les tests ELISA ont été faits en utilisant l'OVA comme antigène. Les sous-types (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) des anticorps spécifiques de l'OVA et les IgA sériques spécifiques de l'OVA ont été détectés dans les *sera* collectés au 48^{ème} jour pour

chaque groupe. Les résultats ont été présentés comme la moyenne des D.O. +/- l'écart type de trois tests indépendants pour chaque groupe de souris. Les différences significatives entre le groupe OVA et les groupes OVA-bFljB, OVA-pFljB et OVA-Plante sont indiquées par des astérisques : * pour $P \leq 0.05$, ** pour $P \leq 0.01$ et *** pour $P \leq 0.001$ en utilisant un test ANOVA.

A Lavages intestinaux - IgA anti-OVA



B Lavages intestinaux - IgG anti-OVA

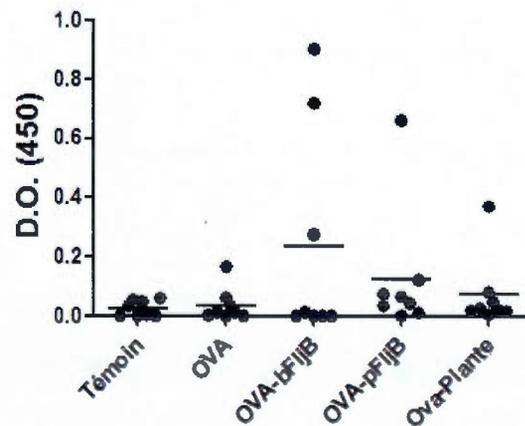


Figure 3.10. Anticorps spécifiques de l'OVA dans les lavages intestinaux. Les tests ELISA indirects ont été réalisés en utilisant l'OVA comme antigène et les lavages intestinaux au 48^{ème} jour PI des souris individuelles. Chaque groupe contenait 8 souris ayant reçu: Témoin : PBS; OVA: 100 µg OVA; OVA-bFljB: OVA (100 µg) + FljB de bactérie (20 µg); OVA-pFljB : OVA (100 µg) + FljB de plante (20 µg); OVA-Plante: OVA (100 µg) + plante vide. **(A)**. Réponse en IgA contre l'OVA dans les lavages intestinaux. **(B)** Réponse en IgG contre l'OVA dans les lavages intestinaux. Les tests ont été réalisés en triplicata indépendant pour chaque souris. La barre indique la moyenne pour chaque groupe.

3.2.3. FljB induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'OVA

La réponse immunitaire à médiation cellulaire contre l'OVA a été évaluée en collectant les cellules de la rate à la fin de l'expérience (au 48^{ème} jour PI) en utilisant un test de lymphoprolifération spécifique (**Figure 3.11**). Les groupes de souris traités avec OVA-pFljB ou OVA-bFljB ont montré une réponse lymphoproliférative positive suite à une stimulation avec de l'OVA ($IS \geq 2,00$) avec des valeurs moyennes de l'IS de 2,56 (+/- 0,75) et 2,10 (+/- 0,42), respectivement. La différence entre ces deux groupes n'a pas été significative. Les groupes ayant reçu le PBS, l'OVA seule ou de l'OVA-plante n'ont pas montré d'activité lymphoproliférative spécifique de l'OVA ($IS < 2,00$). Tous les groupes de souris ont montré une activation positive des lymphocytes de la rate polyclonaux suite à une stimulation à la ConA avec une valeur IS moyenne allant de 46,8 à 87,7, indiquant une activité fonctionnelle des lymphocytes (résultats non montrés).

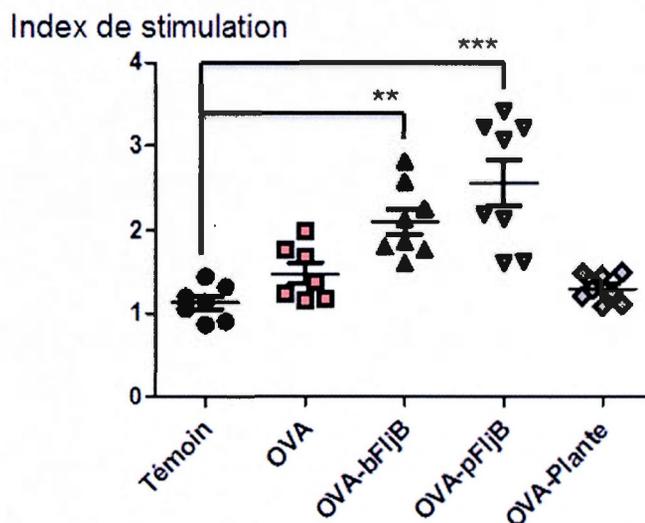


Figure 3.11. Lymphoprolifération spécifique de l'OVA. Des cultures en quadruplicata de cellules de la rate ont été stimulées avec 10 µg/ml d'OVA pendant 96 heures. Les cellules ont été marquées à la radioactivité avec la H^3 -thymidine incorporée dans l'ADN 22 heures avant la récolte des cellules. Les résultats ont été exprimés avec l'index de stimulation (IS) qui représente le *ratio* de la moyenne des CPM des cellules stimulées avec un antigène par la moyenne des CPM des cellules sans antigène. Pour chaque groupe de souris (n=8) : Témoin (rond noir), OVA (carré rouge), OVA-bFljB (triangle bleu), OVA-pFljB (triangle vert) et OVA-plante (losange gris). La barre représente la valeur moyenne de la stimulation +/- l'écart type. Les différences significatives entre le groupe OVA avec les deux groupes OVA-bFljB ou OVA-pFljB sont indiquées par des astérisques : ** représente $P \leq 0.01$ et *** for $P \leq 0.001$ en utilisant le test ANOVA.

3.2.4. Réponse immunitaire contre la FljB

Pour déterminer s'il y a eu une réponse indésirable contre l'adjuvant, les réponses immunitaires humorale et cellulaire spécifiques de la FljB ont été évaluées. Comme montré sur la **Figure 3.12**, aucune IS significative ($SI < 2,00$) n'a été observée pour les groupes de souris immunisées avec la protéine FljB (aussi bien les groupes OVA-pFljB que OVA-bFljB). De plus, il n'y a pas d'anticorps anti-FljB

détectés dans le *serum* (Figure 3.13.A) ou les lavages intestinaux de ces groupes de souris (Figure 3.13.B et 3.13.C).

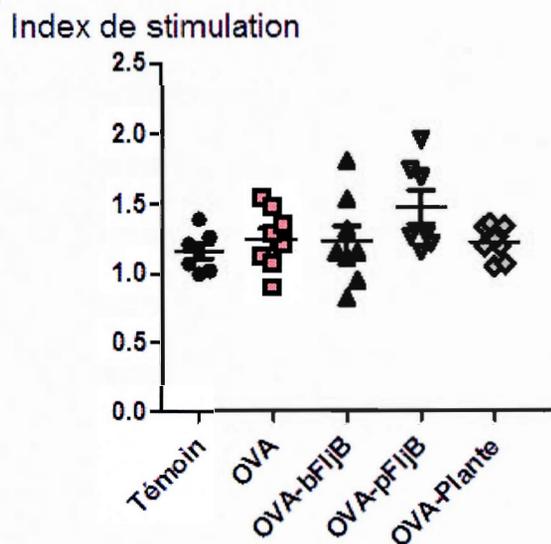


Figure 3.12. Lymphoprolifération spécifique de la protéine FljB. Des cultures, en quadruplicata, de cellules blanches de la rate ont été stimulées avec 5 $\mu\text{g/ml}$ de la protéine FljB pendant 96 heures. Les cellules ont été marquées à la radioactivité avec de la H^3 -thymidine incorporée dans l'ADN 22 heures avant la récolte des cellules. Les résultats ont été exprimés avec l'index de stimulation (IS) qui représente le *ratio* de la moyenne des CPM des cellules stimulées avec un antigène par la moyenne des CPM des cellules sans antigène. Pour chaque groupe de souris ($n=8$) : Témoin (rond noir), OVA (carré rouge), OVA-bFljB (triangle bleu), OVA-pFljB (triangle vert) et OVA-plante (losange gris), la barre représente la valeur moyenne de la stimulation \pm l'écart type.

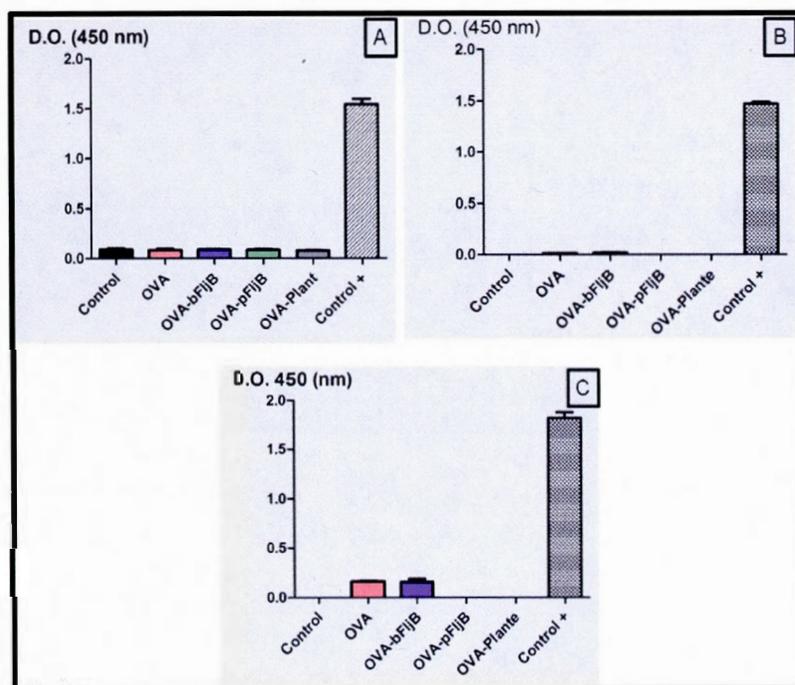


Figure 3.13. Production d'anticorps contre la protéine FljB. Les IgG sériques (A), les IgG dans les lavages intestinaux (B) et les IgA dans les lavages intestinaux (C) spécifiques de la protéine FljB ont été déterminées par ELISA indirecte en utilisant la protéine FljB recombinante purifiée comme antigène. L'analyse a été faite sur les échantillons au 48^{ème} jour pour chaque groupe : Témoin, OVA, OVA-bFljB, OVA-pFljB et OVA-plante. Les résultats ont été présentés comme les moyennes des D.O. des trois tests indépendants. Les moyennes des D.O. ont été considérées significatives si elles étaient égales ou supérieures à deux fois la moyenne des D.O. du Témoin +/- l'écart type. Un *serum* de souris immunisées par voie sous-cutanée avec la protéine FljB recombinante purifiée exprimée dans les plantes (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010) a été utilisé comme témoin positif.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1. Expression chez les plantes des protéines M et GP5 du PRRSV

Les résultats obtenus et les difficultés rencontrées pour la production des protéines du PRRSV, GP5 et M permettent de tirer certaines conclusions quant à leur production dans les plantes.

Tout d'abord, les mutations dans la séquence de la GP5 avaient été choisies pour leur capacité à augmenter la réponse immunitaire comme il avait été rapporté dans la littérature. La séquence SGSG a remplacé la séquence A²⁷L²⁸V²⁹N³⁰ correspondant à l'épitope A de la GP5 (Ostrowski *et al.*, 2002) qui est glycosylée en position N30. Il a été rapporté que la mutation de ce site de glycosylation augmentait la réponse immunitaire contre la GP5 (Ansari *et al.*, 2006). La séquence AKFVAAWTLKAAA (PADRE) a été insérée entre les acides aminés 32 et 33 pour permettre une meilleure réponse en anticorps neutralisants, soit par un effet d'espacement dû à l'insertion de cette séquence entre l'épitope leurre (épitope A) et l'épitope induisant les anticorps neutralisants (épitope B) ou directement par l'effet adjuvant de la séquence PADRE (Fang *et al.*, 2006). Le site de glycosylation N51 a été remplacé par une alanine pour augmenter la réponse immunitaire contre la GP5 (Ansari *et al.*, 2006). Bien que cette étude n'ait pas permis de mettre en évidence l'efficacité de la construction M::GP5mut pour augmenter la réponse immunitaire contre la protéine GP5 du PRRSV, une étude en 2009, montrait l'efficacité d'une construction semblable. Les auteurs ont construit une protéine GP5 mutée aux sites de glycosylation N30, N34, N35 et N51 et possédant l'insertion de la séquence PADRE entre l'épitope A et B (Li *et al.*, 2009). Cette construction, intégrée dans un vaccin ADN, leur a permis d'avoir une meilleure réponse en anticorps spécifique de

la protéine GP5 ainsi qu'une meilleure production d'anticorps neutralisants, une production IFN- γ et une réponse lymphoproliférative aussi bien chez la souris que chez des porcelets en comparaison avec le vaccin ADN possédant la GP5 sauvage (Li *et al.*, 2009).

Ensuite, la présence de transcrit au niveau des feuilles agroinfiltrées permet de conclure que le système utilisé, le pCAMBIAmoD, est fonctionnel et peut être utilisé comme vecteur binaire de transformation chez les plantes. Le gel d'agarose montrant les résultats de RT-PCR (**Figure 3.2**) présente un niveau d'expression entre les transcrits amplifiés sensiblement équivalent. Ceci tend à montrer que la taille des constructions simples ou de fusions n'a pas été un problème au niveau transcriptionnel pour la plante à transcrire. En revanche, l'absence de transcrit pour les constructions de fusion avec la protéine CTB pose la question de savoir pourquoi les transcrits n'ont pas été détectés. Les codons d'usage ayant été optimisés pour l'utilisation chez les plantes, l'hypothèse de la présence de codons rares pour la plante peut être raisonnablement écartée. La taille du transcrit ou la stabilité du transcrit pourrait être une autre cause limitant la production des ARNm des protéines en fusion avec la protéine CTB. Le système pCAMBIA a déjà été utilisé pour la production de transcrits de cette taille chez le tabac et ceci ne semble pas avoir été un facteur limitant ou un problème pour les groupes de recherche qui ont utilisé ce système (Li *et al.*, 2003 ; Rodríguez-Narciso *et al.*, 2011). Cependant, il est difficile d'extrapoler ce genre de résultats aux transcrits de nos protéines puisque l'expression dans les plantes peut varier grandement d'une protéine à l'autre comme le montre les deux exemples qui suivent. Dans un premier cas, l'expression transitoire chez des feuilles de tabac des antigènes F1 et LcrV de *Yersinia pestis* a résulté en des niveaux de production de 380 et 120 $\mu\text{g/g}$, respectivement (Mett *et al.*, 2007), alors qu'un autre antigène de *Yersinia pestis*, la fusion F1::V, a été produit à 1 à 2 mg/g au niveau des feuilles de tabac (Santi *et al.*, 2006). Bien qu'il n'y ait pas de corrélation entre le niveau de transcrit et la quantité de protéines produites, ces deux exemples montrent bien la différence d'expression des protéines dans un système équivalent. L'instabilité

des ARNm ou l'ARN interférence pourrait être une autre explication de l'absence de détection. Bien que des progrès aient été réalisés dans la compréhension de l'instabilité des transgènes dans les dernières années, ces mécanismes sont encore mal connus. Il semblerait que des facteurs environnementaux puissent jouer sur la stabilité des transcrits des séquences exogènes. Il a été rapporté récemment que l'interférence au gène *post*-traductionnel des ARN sens (S-PTGS) chez le tabac pouvait être influencé par la lumière (Kotakis *et al.*, 2010). Cette équipe montrait aussi que la photo-adaptation à une intensité de lumière faible ou élevée affectait différemment le niveau d'ARNm des gènes majeurs impliqués dans ces mécanismes (Kotakis *et al.*, 2010). Parmi les autres facteurs connus pour induire le S-PTGS, il peut être cité le nombre de copies intégrées dans le génome (Schubert *et al.*, 2004), une mauvaise polyadénylation de l'ARNm (Luo et Chen, 2007 ; Wang et Waterhouse, 2000) ou encore les stress de température (Meza *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2008) qui pourraient influencer la production des transcrits ou leur dégradation. L'absence des ARNm des protéines en fusion avec la protéine CTB pourrait aussi résulter d'un mécanisme de contrôle de la plante qui serait capable de reconnaître un motif induisant un mécanisme de dégradation des transcrits chez la plante bien que ceci n'ait pas été rapporté dans la littérature pour la protéine CTB. Cependant de telles séquences existent chez les plantes comme la séquence du *DownStream Element* (DTS) (McClure *et al.*, 1989 ; Newman *et al.*, 1993) présente dans la région 3' non-traduite (UTR) des gènes SAUR (*small auxin up RNAs*) (McClure et Guilfoyle, 1989). Un des éléments les mieux connus chez les eucaryotes supérieurs pour déstabiliser les ARNm est l'élément de déstabilisation riche en bases AU (ARE) présent dans le 3'UTR (Caput *et al.*, 1986 ; Chen et Shyu, 1995 ; Treisman, 1985). Cet élément fonctionne chez les plantes et en particulier chez le tabac (Ohme-Takagi *et al.*, 1993) et peut aussi être la cause de la dégradation d'ARNm chez les bactéries (De Rocher *et al.*, 1998). Une autre possibilité serait un temps de demi-vie très court de ces transcrits qui ferait en sorte que l'ARNm au moment du test n'était déjà plus présent. Les transcrits stables ont des demi-vies de plusieurs heures alors que les transcrits

instables ne possèdent des demi-vies que de quelques minutes (Peltz *et al.*, 1991). Il est à noter que les feuilles agroinfiltrées avec les constructions possédant la protéine CTB en fusion montraient des signes de nécrose, ce qui peut expliquer l'absence de détection de transcrit dans les feuilles agroinfiltrées du fait de la mort des cellules végétales. Une fois encore, il n'a pas été rapporté dans la littérature que l'expression de la protéine CTB seule ou en fusion induisait une réaction de nécrose chez la plante (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2010 ; Nochi *et al.*, 2007 ; Ruhlman *et al.*, 2007), mais ceci pourrait varier d'un système d'expression à un autre ou en fonction de la protéine de fusion.

Le problème majeur rencontré lors de ces expériences a été la détection des protéines M et GP5. Bien que la présence de certains ARNm ait été confirmée, ceci n'assure en rien la présence des protéines. La **Figure 3.3** montre des résultats de production des protéines, M, GP5 et M::GP5 lors des premiers tests d'expression transitoire avec le vecteur pCAMBIAmod au niveau des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Cependant, la perte des signaux par immunobuvardage de type western après quelques tests a posé de nombreux problèmes pour la suite des travaux. Tout d'abord, cela a empêché l'estimation de la production de ces protéines dans les plantes pour les expériences d'immunisation, ne permettant pas de connaître la quantité de protéine donnée aux souris. De plus, la présence ou non des protéines dans les feuilles n'a pu être confirmée. Bien que des expériences de RT-PCR répétées sur les différents lots de protéines produites aient démontré la présence des transcrits, aucune preuve de leur production n'a pu être apportée hormis les premiers tests d'immunobuvardage de type western. La première hypothèse pouvant être avancée est l'absence effective de production de ces protéines qui expliquerait logiquement leur absence par immunobuvardage. La deuxième hypothèse pouvant être émise est un taux de production trop faible qui ne serait pas détectable par cette technique. Une étude récente a rapporté la production de la protéine GP5 dans un système d'expression stable chez le tabac (Chia *et al.*, 2010). Cette équipe a atteint un niveau d'expression de 110 ng/g de masse fraîche de feuilles, représentant 0,011% du total

des protéines solubles (Chia *et al.*, 2010). Ceci représente un faible niveau de production de protéine sachant qu'un niveau d'expression moyen est de 100 à 400 µg de protéine recombinante /g de masse fraîche (Daniell *et al.*, 2009) [pouvant osciller entre 1 ng/g de masse fraîche (Zhou *et al.*, 2006) à 0,8 mg/g de masse fraîche (Huang *et al.*, 2009)]. Le problème de détection de la protéine GP5 dans les plantes semble avoir été un problème pour ce groupe de recherche aussi puisqu'ils mentionnent que la faible concentration de GP5 produite et le bruit de fond important ne leur a pas permis d'avoir des résultats d'immunobuvardage de qualité et qu'ils ont dû utiliser des tests ELISA pour doser leur protéine (Chia *et al.*, 2010). De plus, la même équipe publiait début 2011, un autre article montrant la production de la protéine GP5 fusionnée à la protéine LTB (Chia *et al.*, 2011). Le dosage de la protéine était de nouveau fait par ELISA et aucun immunobuvardage n'était montré. Il a donc aussi été essayé de remédier au présent problème de détection en utilisant un test ELISA mais le bruit de fond dû aux protéines de plantes présentes était trop important pour pouvoir tirer des conclusions sur les résultats observés. Malheureusement la production obtenue par Chia *et al.* (2010) ne peut être comparée avec d'autres systèmes d'expression de la GP5 chez les eucaryotes puisque généralement, les groupes de recherche dans ce domaine ne dosent pas la protéine mais inoculent en unité formant des plaques (PFU), avec 50% de la dose infectieuse des tissus en culture (TCID₅₀) ou encore en microgramme de plasmide comme le montrent les exemples qui suivent. L'équipe de Qiu *et al.* (2005), qui a développé un système basé sur l'utilisation du virus *Pseudorabies* comme vecteur, inoculait leur groupe de porcs avec 10^{7,0} PFU (Qiu *et al.*, 2005), alors que le groupe de Wang *et al.* (2007), qui a utilisé un vecteur *Baculovirus* co-exprimant la protéine GP5 et M comme système de livraison de gène dans les cellules de mammifères, utilisait une dose variant de 10⁸ à 10¹⁰ PFU/souris (Wang *et al.*, 2007). Une autre étude menée par Zheng *et al.* (2007) a rapporté l'utilisation d'un virus modifié de la vaccine Ankara pour exprimer les protéines M et GP5 sous différents promoteurs dans le même virus, sous un seul promoteur et en fusion, ou séparément dans deux virus différents (Zheng *et al.*, 2007).

Cette équipe exprimait la dose inoculée en TCID₅₀ par souris, soit 5×10^5 TCID₅₀ par souris (Zheng *et al.*, 2007). Un vaccin à base de plasmide ADN co-exprimant GP5 et l'ubiquitine du porc a aussi été utilisé pour immuniser des porcs par voie intra-nasale avec 2 ml d'une solution à 10^5 TCID₅₀/ml (Hou *et al.*, 2008). Une autre équipe, quant à elle, immunisait des souris ou des porcelets par voie intramusculaire avec un vaccin à base d'ADN co-exprimant GP5 et M en utilisant 100 µg de plasmide (Jiang *et al.*, 2006). Une autre étude, encore, utilisait des adénovecteurs co-exprimant GP5 et M injectés à des souris par voie sous-cutanée à une dose de 10^{12} TCID₅₀/ml (Jiang *et al.*, 2006). Tous ces exemples présentaient différents systèmes d'expression de la protéine GP5 ou M pour différentes stratégies de vaccinations montrant qu'il est difficile d'avoir une idée de la production des protéines et de comparer ces systèmes entre eux pour savoir lequel est le plus performant quant à la production des protéines GP5 et M.

Un autre facteur est la qualité des anticorps utilisés qui fournissent généralement un bruit de fond important avec les extraits de protéines solubles totales des plantes utilisés dans cette étude. Bien que différents anticorps aient été testés, il ne peut pas être écarté que les anticorps ne soient pas suffisamment sensibles pour détecter les protéines d'intérêt parmi les protéines de plantes ou que ces protéines soient masquées par d'autres protéines de même poids moléculaire qui réagiraient de manière non spécifique avec les différents anticorps testés.

En regard de la réponse immunitaire chez la souris, les résultats d'ELISA montrent une réponse faible et tardive au 42^{ème} jour PI (**Figure 3.4**) pour le groupe immunisé avec la protéine M::GP5mut. Au 51^{ème} jour (**Figure 3.5**), la réponse anti-GP5 était retombée au niveau de celle du témoin, excepté pour une souris du groupe M5* ayant reçu la protéine M::GP5mut avec la flagelline. Ceci pourrait montrer que la réponse serait ponctuelle et qu'il aurait été intéressant de pouvoir faire un test ELISA sur les souris individuelles au 42^{ème} jour pour connaître le nombre de souris qui avait répondu à la stimulation immunogénique. Étant donné les problèmes de détection de la protéine et l'absence de dosage de cette protéine dans les poudres

administrées, il est difficile de tirer des conclusions de cette expérience. La réponse observée est-elle due à une quantité trop faible de protéine ? La voie choisie est-elle inappropriée pour ce type de protéine ? Bien que la protéine FljB ait été exprimée à un niveau plus qu'acceptable avec le système d'expression pCAMBIAmod, ce système est-il adapté à la production de la protéine GP5 ? Cependant, la présence d'une réponse, aussi faible soit-elle, suggère que la protéine GP5 peut être exprimée transitoirement chez le tabac mais aussi de façon stable chez le tabac comme l'a montré l'équipe de Chia *et al* (2010 et 2011).

4.2. Effet adjuvant de la protéine FljB recombinante produite chez *Nicotiana benthamiana*

L'étude sur la flagelline démontre pour la première fois que la protéine FljB exprimée chez les plantes et administrée par voie orale avec un antigène test, l'OVA, induit une réponse humorale et cellulaire spécifiques systémiques et locales (mucosale). Ceci s'est traduit par une réponse en anticorps et/ou une réponse immunitaire à médiation cellulaire en termes de production d'anticorps et/ou de stimulation blastogénique spécifique des lymphocytes de la rate.

L'utilisation de l'OVA se justifie par sa large utilisation depuis des années en tant qu'immunogène modèle dans des études d'immunisation pour évaluer la réponse en anticorps et la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Huleatt *et al.*, 2007 ; Oliveira *et al.*, 1998 ; Plebanski *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2010 ; Tincer *et al.*, 2011). Récemment, l'activité adjuvante de la flagelline et de nanoparticules de poly-anhydride enrobées de mannosamine (Salman *et al.*, 2009), de l'anatoxine tétanique dans des nanoparticules de gliadine (Kajal et Misra, 2011), de la sous-unité B de la calcinerine (Li *et al.*, 2011) ou encore de nanoparticules de poly(D,L-lactide-co-glycolide) contenant des lipides A monophosphorylés furent testées par voie orale en utilisant comme immunogène modèle l'OVA. Dans la plupart de ces études, la réponse en anticorps spécifique à l'OVA a été mesurée par ELISA indirect. Or cette technique

semble ne détecter que l'épitope linéaire de l'OVA (Varshney *et al.*, 1991). Il est donc possible que la réponse en anticorps contre l'OVA ait été sous-estimée pour cette présente étude et pour d'autres études (Salman *et al.*, 2009 ; Sarti *et al.*, 2011).

Les réponses systémiques humorale et cellulaire ont été observées au 48^{ème} jour PI chez les souris qui ont reçu l'OVA et la protéine FljB exprimée chez *Escherichia coli*. Les anticorps spécifiques contre l'OVA ont été détectés seulement au 34^{ème} jour PI dans le *serum* de ces souris alors que les anticorps spécifiques contre l'OVA des souris ayant été exposées à l'OVA et la protéine FljB exprimée chez les plantes apparaissaient au 20^{ème} jour PI. La différence de cinétique de la réponse entre ces groupes pourrait être attribuée à l'effet immuno-modulateur des autres composants présents dans les extraits de feuilles comme les lectines de plantes, aussi connues pour avoir des propriétés adjuvantes (Granell *et al.*, 2010). Ceci est supporté par le fait que la réponse immunitaire humorale systémique spécifique apparaît plus précocement chez les souris qui ont reçu l'OVA mélangée avec la poudre de plante (à partir du 34^{ème} jour PI) en comparaison avec le groupe qui n'a eu que l'OVA seule (à partir du 41^{ème} jour) (**Figure 3.7**). Il est aussi possible que les substances présentes dans la poudre sèche et gelée de cellules de plantes protègent l'OVA et la protéine FljB de la dégradation par les enzymes de l'intestin. Les protéines seraient alors libérées lentement et constamment dans celui-ci, après la digestion de la paroi des cellules végétales par les bactéries commensales, permettant ainsi l'accès de la protéine FljB et de l'OVA au système immunitaire pour une réponse optimale (Arlen *et al.*, 2008 ; Limaye *et al.*, 2006). Une autre possibilité pourrait être que, lors du mélange de la poudre de plante avec l'OVA, une interaction chimique aurait pu se former avec les protéines de plantes qui aurait pu protéger l'OVA de la dégradation. Enfin, tous ces mécanismes pourraient avoir contribué à l'augmentation de la réponse immunitaire. Il pourrait être intéressant de tester un mélange de protéines FljB recombinantes produites chez *Escherichia coli* avec de la poudre de plante pour voir si la vitesse de la réponse immunitaire contre l'immunogène pourrait être ainsi augmentée par rapport à un groupe ne recevant que la protéine FljB recombinante

produite par *Escherichia coli*. Ceci pourrait constituer une nouvelle application facile et efficace de l'utilisation des plantes comme « bio-encapsulateur » ayant des propriétés adjuvantes en vaccination. En se basant sur les données obtenues, il est possible de conclure que la flagelline exerce un effet adjuvant et que l'effet immunomodulateur optimal est obtenu avec l'utilisation de la protéine recombinante FljB exprimée chez les plantes.

Une réponse immunitaire précoce et élevée est observée dans cette étude chez les souris du groupe OVA-pFljB en comparaison au groupe OVA ou OVA-Plante. Cependant, en plus de la réponse Th2 observée chez les souris ayant reçu l'OVA seule, les groupes ayant reçu la protéine recombinante FljB exprimée chez les plantes ou chez *Escherichia coli* ont montré aussi bien une réponse immunitaire de type Th1 que de type Th2 comme le laisse supposer la présence des anticorps IgG2a et IgG2b anti-OVA, respectivement (**Figure 3.9**). Une modulation isotypique des IgG similaire a déjà été rapportée dans plusieurs études où la protéine FljB recombinante exprimée chez les bactéries a été utilisée pour des immunisations mucosales (Pino *et al.*, 2005 ; Salman *et al.*, 2009 ; Vicente-Suarez *et al.*, 2009). La liaison au TLR conduit généralement à la maturation des cellules dendritiques qui résulte en l'activation de la réponse immunitaire robuste et l'induction de cellules T effectrices (Means *et al.*, 2003). Pino *et al.* ont démontré *in vitro* et *in vivo* que la protéine FljB augmente l'expression de la molécule co-stimulatrice B7 des cellules dendritiques qui joue un rôle clef dans l'activation des cellules T CD4⁺ naïves. La protéine FljB, en induisant l'expression de la molécule B7, va permettre l'augmentation de la réponse immunitaire aussi bien de type Th1 que de type Th2 (Pino *et al.*, 2005). La contribution des deux types de réponses dans la protection contre certains pathogènes, comme les *Rotavirus* (Franco *et al.*, 2006) et le virus *Influenza* (Denis *et al.*, 2008), est essentielle (Plotkin, 2010). De plus, une réponse Th2 spécifique a été observée chez les souris ayant reçu l'OVA seule ou la poudre de plante lyophilisée. Ceci est en accord avec une autre étude où une réponse immunitaire Th2 similaire a été observée

quand l'OVA fut donnée seule ou en mélange avec des nanoparticules mannosylées (Salman *et al.*, 2009).

Il a pu être observé que la protéine FljB administrée sous forme de poudre de plante lyophilisée n'induisait pas une réponse immunitaire indésirable contre celle-ci. Cette observation est un avantage pour l'utilisation de cet adjuvant, produit dans les plantes, dans des vaccins oraux. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux de Cuadros *et al.* (2004) et démontrent une absence d'une réponse immunitaire contre la protéine FljB suite à une administration orale répétée de celle-ci (**Figure 3.13**) (Cuadros *et al.*, 2004). Toutefois, certaines études ont suggéré qu'une immunité préexistante contre la flagelline pourrait interférer avec son effet adjuvant (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010 ; Didierlaurent *et al.*, 2004 ; Huleatt *et al.*, 2007). Dans toutes ces études, la flagelline a été utilisée dans un contexte d'immunisation parentérale. Ces données immunogéniques contradictoires pourraient être expliquées par la stratégie vaccinale utilisée incluant la dose de la protéine FljB, la voie et la fréquence d'administration de la protéine FljB. D'autre part, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'un effet de tolérance vis-à-vis de la protéine recombinante FljB pourrait s'être développé au cours de cette étude contrairement à une infection naturelle à *Salmonella typhimurium* où une réponse en anticorps spécifique contre la protéine FljB et une réponse immunitaire à médiation cellulaire prennent place (Alaniz *et al.*, 2006 ; Merrell et Falkow, 2004 ; Miao *et al.*, 2007).

Au vue des informations ci-dessus, un état immunitaire préexistant spécifique contre la protéine FljB pourrait exister chez des individus avant l'immunisation. Cependant, cette immunité préexistante à la flagelline ne semble pas interférer dans sa fonction adjuvante quand elle est utilisée avec des antigènes provenant du virus de l'influenza (Ben-Yedidia et Arnon, 1998), de *Yersinia pestis* (Honko *et al.*, 2006) ou de l'OVA (Huleatt *et al.*, 2007). Il est probable que cette immunité préexistante n'interférerait pas avec la reconnaissance de la protéine FljB par le TLR5 puisque l'effet adjuvant de la protéine est présent.

Cette étude suggère que l'expression de la protéine FljB recombinante dans les plantes ne modifie pas ses propriétés adjuvantes en comparaison avec son expression dans *Escherichia coli*. Le passage d'un système procaryote à un système eucaryote aurait pu altérer la structure de la protéine et modifier ses capacités immunomodulatrices. En effet, contrairement à *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium*, les plantes permettent les modifications *post*-traductionnelles telles que les processus de N- et O-glycosylations (Gomord et Faye, 2004). Une analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés de la protéine FljB recombinante exprimée chez les plantes a permis de prédire son profil de glycosylation. Aucun site de N-glycosylation n'a été trouvé en utilisant NetNGlyc 1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Hansen *et al.*, 1998 ; Ishiguro *et al.*, 2010 ; Mutti *et al.*, 2008). Quelques sites d'O-glycosylation ont été prédits avec NetOGlyc 3.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) (Ishiguro *et al.*, 2010 ; Mutti *et al.*, 2008), mais tous étaient en dessous du seuil d'acceptabilité. Cependant, des stratégies existent pour limiter ces événements de glycosylation chez les cellules végétales. Par exemple, l'insertion d'une séquence de rétention au réticulum endoplasmique limite ces phénomènes de glycosylation. La séquence SEKDEL présente dans la construction de cette étude (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010) a permis de limiter les glycosylations qui ont lieu au niveau de l'appareil de Golgi, surtout les O-glycosylations, en accumulant la protéine au niveau du RE (Gomord et Faye, 2004). Cependant, les glycosylations potentielles qui auraient pu avoir lieu n'ont pas affecté les propriétés de la protéine FljB dans nos travaux. Ces observations sont supportées par une étude récente réalisée par De Zoete *et al.* sur *Campylobacter jejuni* (de Zoete *et al.*, 2010). Cette bactérie Gram négative possède une flagelline glycosylée (Szymanski *et al.*, 2003) et il paraît clair maintenant qu'aussi bien les N-glycosylations que les O-glycosylations, qui ont longtemps été une « exclusivité » des eucaryotes, ont lieu chez les bactéries et les archéobactéries (Abu-Qarn *et al.*, 2008). De Zoete *et al.* démontraient que les O-glycosylations de la

flagelline de *Campylobacter jejuni* n'interféraient pas avec l'activation du TLR5 (de Zoete *et al.*, 2010).

Il a été montré dans cette étude que la poudre de plantes lyophilisée contenant la protéine FljB peut être utilisée directement comme adjuvant par voie orale. Ce système basé sur les plantes offre la possibilité de produire une grande quantité de protéines à un coût abordable en évitant des étapes de purification coûteuse et le maintien d'une chaîne du froid grâce à la possible administration par voie orale de poudre lyophilisée de plante. Les vaccins à base de plantes sont en développement depuis plusieurs années et les adjuvants utilisés sont souvent en fusion avec les protéines, comme dans le cas du rotavirus où la protéine VP7 fusionnée à la protéine CTB a été exprimée dans des pommes de terre (Choi *et al.*, 2005) ou la fusion de la protéine CTB avec la glycoprotéine de l'enveloppe du virus de la Dengue exprimée chez le tabac (Kim *et al.*, 2010). Daniell *et al.* (2009) ont produit une liste de plusieurs études dans lesquelles des plantes exprimant les protéines CTB ou LT seules ont été utilisées comme vaccin telles que les tubercules de pommes de terre, les grains de maïs, les carottes, les graines de soja, la laitue et les tomates. Dans la présente étude, la protéine FljB a été exprimée séparément chez les plantes pour une co-administration par voie orale avec l'immunogène (OVA) et son effet adjuvant a été évalué. Si les résultats obtenus dans cette étude pilote pouvaient être confirmés avec d'autres immunogènes, cette stratégie aurait l'avantage de pouvoir être appliquée rapidement à des antigènes déjà produits sans avoir à exprimer de nouvelles protéines de fusion.

Lors de cette étude, *Nicotiana benthamiana* a été utilisé comme système d'expression rapide de protéines recombinantes en comparaison avec les plantes transgéniques stables. Les systèmes transitoires d'expression sont maintenant reconnus pour leur capacité à produire les protéines recombinantes à grande échelle (Daniell *et al.*, 2009 ; Joensuu *et al.*, 2010). Le système transitoire utilisé dans la présente étude a été efficace pour la production de la protéine FljB avec une production estimée à 280 µg/g de masse fraîche de feuilles agroinfiltrées de *Nicotiana*

benthamiana. Étant donné que la moyenne de production est de 100 à 400 µg/g de masse fraîche, tous systèmes confondus (Daniell *et al.*, 2009 ; Vezina *et al.*, 2009), ce système, le pCAMBIA1380mod, fait preuve d'une bonne efficacité. Le niveau d'expression varie beaucoup en fonction du système utilisé, soit 8,5 µg/g de masse fraîche pour l'antigène de surface du HBV exprimé chez la pomme de terre (Thanavala *et al.*, 2005) à 1 mg/g de masse fraîche pour l'antigène F1-V de *Yersinia pestis* (Santi *et al.*, 2006) ou pour la protéine d'algue rouge griffithsin, inhibitrice de l'entrée du HIV (O'Keefe *et al.*, 2009).

La protéine FljB peut induire une réponse immunitaire chez la plante (Haweker *et al.*, 2010 ; Takai *et al.*, 2008), mais il n'a pas été observé d'effet toxique sur les tissus de la plante avec ce système d'expression, comme il a déjà été rapporté dans une étude précédente (Bergeron-Sandoval *et al.*, 2010). Cependant, dans une autre étude portant sur du riz transgénique exprimant la protéine FljB, des points de décoloration étaient apparents sur les feuilles (Takakura *et al.*, 2008). Ceci est probablement dû à l'utilisation d'un système d'expression stable qui produit la protéine en continu tout au long du cycle de vie de la plante alors que les systèmes transitoires se font sur une courte période de temps (7 jours en général), ce qui pourrait permettre à la plante de mieux tolérer les protéines toxiques puisque l'expression est localisée et à un temps déterminé dans son cycle de vie.

En conclusion, cette étude a démontré que la poudre brute lyophilisée de feuille exprimant FljB exerce une forte activité adjuvante par simple mélange avec l'immunogène choisi administré par voie orale. La simplicité du protocole a un intérêt particulier en soi. Cela permet de produire de grandes quantités de protéines, comme l'adjuvant FljB, à des prix abordables et en éliminant les étapes de purification. De plus, le système d'expression transitoire utilisé dans cette étude permet une production rapide et importante de protéines recombinantes.

4.3. Conclusions

À la suite des résultats et des difficultés rencontrés pour l'expression des protéines GP5 et M du PRRSV, il pourrait être intéressant d'essayer de produire la protéine M::GP5mut dans un autre système. L'utilisation de vecteurs de type magnIcon ou de vecteurs navettes pourrait résoudre le problème d'expression dans le système transitoire. La génération de plantes transgéniques stables de type transplastomique chloroplastique pourrait aussi être une autre alternative à la production de ces protéines chez les plantes. Même si, dans le cas présent, la production des protéines GP5 et M n'a pas été concluante, ce principe d'immunisation reste intéressant comme le montre le nombre d'études de plus en plus important qui utilisent les plantes comme système de production et/ou d'administration des immunogènes. De plus, ces protéines, si elles étaient produites à un niveau raisonnable, pourraient être administrées en mélange avec la protéine FljB produite dans les plantes pour des immunisations par voie orale.

Quant à la protéine FljB produite chez les plantes, il pourrait être intéressant d'étudier la protection fournie par les protéines de plantes lors du passage dans le tractus gastro-intestinal en l'absence d'une neutralisation de l'acidité gastrique.

Bien que l'intérêt de la co-administration de la protéine FljB en mélange avec un immunogène ait été discuté, il pourrait aussi être utile dans certains cas de pouvoir produire chez les plantes des protéines de fusion utilisant FljB comme adjuvant mucosal pour des administrations orales.

Un dosage des cytokines pour confirmer la réponse Th1 et Th2 suite à l'utilisation de la FljB comme adjuvant pourrait aussi être mené.

De plus, suite à un rapport faisant mention de propriétés protectrices de la flagelline contre un pathogène du riz quand elle est exprimée chez cette plante dans une lignée transgénique stable (Takakura *et al.*, 2008), il pourrait donc être intéressant de conduire une étude chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour vérifier et

compléter cette étude en testant d'autres pathogènes (**Appendice C** présente la transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la FljB).

Il pourrait aussi être intéressant de produire la protéine GP5 ou un de ses dérivés modifiés et/ou fusionnés dans une plante comestible, comme la luzerne, dans une lignée transgénique stable (**Appendice D** présente la mise au point d'un protocole de transformation de la luzerne).

Évidemment, il pourrait aussi être intéressant d'améliorer l'expression de la protéine FljB en passant par un système viral d'expression, comme il a été mentionné précédemment et qui a été exposé dans la section 3 de la revue de littérature, les vaccins à base de plante.

Enfin, la suite logique à cette étude serait de tester un mélange de la protéine FljB produite chez les plantes avec un immunogène d'intérêt, comme des antigènes viraux ou bactériens, pour évaluer la véritable portée de l'utilisation de la flagelline produite chez les plantes en tant qu'adjuvant mucosal.

APPENDICE A

SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES OPTIMISÉES POUR L'EXPRESSION DANS LES PLANTES

Séquence nucléotidique optimisée par GENE ART pour M

ATGGTTTCTTCTCTGATGATTTCTGTAACGATTCTACTGCTCCTCAAAGGTTTTGCTTGCTTTCTC
TATTACTTACACTCCTGTTATGATTTACGCTCTTAAGGTTTCAAGGGGAAGGCTTCTTGACTTCTTC
ACCTTCTTATTTTCTTAACCTGTGCTTTCACTTTGCGTTACATGACTTTGCTCACTTCCAATCTACT
ACAAGGTTGCACTTACTATGGGTGCTGTTGTTGCTCTTCTTTGGGGAGTTACTCTGCTATTGAGAC
TTGGAAGTTTACTTCTAGGTGCTGCTTTTGTCTTTTGGGTCGTAAGTACATTCTTGCTCCAGCTC
ATCATGTTGAATCTGCTGCTGGTTTCCATCCTATTGCTGCTTACAGATAACCACGCTTTGCTGTTAGA
AGGCTGGTTCTACTACTGTTAACGGTACTCTTGTTCCTGGTCTTAAGTCTCTTGTCTTGGTGGTAG
AAAGGCTGTTAAGAGGGGTGTTGTTAACCTTGTTAAGTACGCTAAGTAG

Séquence protéique de M

MVSLDDFCNDSTAPQKVLAFSITYTPVMYALKVSRGRLGLLHLLIFLNCAFTFGYMTFAHFQST
NKVALTMGAVVALLWGVSAIETWKFITSRCRLCLLGRKYILAPAHHVESAAGFHPAASDNHAFVVR
RPGSTTVNGTLVPLKSLVLGGRKAVKRGVVNLVKYAK

Séquence nucléotidique optimisée par GENE ART pour GP5::CTB

ATGCTTGAAAGTGTCTTACTGCTGGTTGTTGTTCTCAACTTCTTTCTTTGGTGTATCGTTCC
TTTCTGTTTCGCTGCTCTTGTAAACGCTTCTTCTTCTTCACTTCAATCTATTTACA
ACCTTACTATTTGTGAGCTTAACGGTACTGATTGGCTTAACAAGAACTTCGATTGGGCTGTTGAG
ACTTTCGTTATTTTCCCTGTTCTTACTCACATCGTTTCTTACGGTGTCTTACTACTTCTCACTT
CCTTGATGCTGTTGGTCTTATTACTGTTTCTACTGCTGGTTACTACCACGGTCTTACGTTCTTT
CTTCTGTTTACGCTGTTTGTGCTCTTGTGCTCTTATTTGTTTCGTTATTAGGCTTACTAAGAAC
TGTATGCTTGGAGGTACTCTTGTACTAGGTACTACTAACTTCTTTTGGATTCTAAGGGAAAGCT
TTACAGGTGGAGGTCTCCTGTTATTATTGAGAAGGGTGGAAAGGTTGAAGTTGATGGTCACCTTA
TTGATCTTAAGCGTGTGTTCTTGATGGTTCGCTGCTACTCCTGTTACTAAGGTTTCAGCAGAG
CAATGGTGTGCTCCTGGTCTGCTATGATTAAGCTTAAGTTCGGTGTCTTCTTCACTGTTCT
TTTGTCTGCTTACGCTCATGGTACTCCTCAAACATTACTGATCTTTGTGCTGAGTACCACA
ACACTCAAATTCACACTCTTAACGATAAGATTTCTCTTACTGAGTCTCTTGCTGGAAAGCGT
GAAATGGCTATTATTACTTTCAAGAACGGTGTACTTTCCAAGTTGAGGTTCCAGGTTCTCAACA
CATTGATTCTCAAAAAAGGCTATTGAGAGGATGAAGGATACTCTTAGGATTGCTTACCTTACTG
AGGCTAAGGTTGAGAAGCTTTGTGTTTGGAAACAACAAGACTCCTCACGCTATTGCTGCTATTTCT
ATGGCTAACTAG

Séquence protéique de GP5::CTB

MLGKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFAALVNASSSSSSQLQSIYNLTICELNGTDWLNKNFDWAVE
TFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDAVGLITVSTAGYYHGRYVLSVYAVCALAALICFVIRLTKN
CMSWRYSCTRYTNFLLDKSKGLYRWRSPVIEKGGKVEVDGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAE
QWCRPQGGPMIKLKFVFFTVLLSSAYAHGTPQNIIDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKR
EMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAIS
MAN

Légende :

- Les sites de restrictions NcoI (*ccatgg*) et XbaI (*tctaga*) sont indiqués en italique et en minuscule.
- Les séquences et peptides de fusion entre M et GP5 (**GGTACCACC** et **GTT**) et GP5 et CTB (**GGTCCTGGTCCT** et **GPGP**) sont identifiés en gras, respectivement.
- La séquence nucléotidique (**TCTGAGAAAGATGAACTT**) et peptidiques (**SEKDEL**) de la séquence de rétention au RE, SEKDEL, sont indiquées en souligné.
- Les trois mutations introduites dans la protéine GP5 sont indiquées par un cadre grisé dans l'ordre **TCTGGATCTGGA** (SG\$G), **GCCAAGTTCGTGGCTGCCTGGA** CCCTGAAGGCTGCCGCT (AKFVAAWTLKAAA) pour la séquence PADRE et GCC pour la permutation de N→A.

Séquence nucléotidique de M dans le vecteur pCAMBIA1380mod

*ccatgg*GGATGGTTTCTTCTCTTGATGATTTCTGTAACGATTCTACTGCTCCTCAAAGGTTTTG
 CTTGCTTTCTCTATTACTTACACTCCTGTTATGATTTACGCTCTTAAGGTTTCAAGGGGAAGGCT
 TCTTGGACTTCTTACCTTCTTATTTTCTTAACTGTGCTTCACTTTTCGGTTACATGACTTTCG
 CTCACTTCCAATCTACTAACAAGGTTGCACTTACTATGGGTGCTGTTGTTGCTCTTCTTTGGGGA
 GTTACTCTGCTATTGAGACTTGAAGTTCATTACTTCTAGGTGCTGCTTTTGTCTTTTGGGTCG
 TAAGTACATTCTTGCTCCAGCTCATCATGTTGAATCTGCTGCTGGTTCCATCCTATTGCTGCTT
 CAGATAACCACGCTTTTCGTTGTTAGAAGGCCTGGTCTACTACTGTTAACGGTACTCTTGTTCCT
 GGTCTTAAGTCTCTTGTCTTGGTGGTAGAAAGGCTGTTAAGAGGGGTGTTGTTAACCTTGTAA
 GTACGCTAAGTCTGAGAAAGATGAACTTTAG*tctaga*

Séquence protéique de M dans le vecteur pCAMBIA1380mod

MGMVSSLDDDFCNDSTAPQKVLAFSITYTPVMIYALKVSRGRLGLLHLLIFLNCAFTFGYMTFA
 HFQSTNKVALTMGAVVALLWGVYSAIETWKFITSRCLLGRKYILAPAHVESAAGFHPPIAAS
 DNHAFVVRPSTTVNGTLVPLKSLVLLGGRKAVKRGVNVLVKYAKSEKDEL

Séquence nucléotidique de GP5 dans le vecteur pCAMBIA1380mod

*ccatgg*GGATGCTTGAAAGTGTCTTACTGCTGGTTGTTGTTCTCAACTTCCTTTCCCTTTGGTGT
 ATCGTTCCTTTCTGTTTCGCTGCTCTTGTTAACGCTTCTTCTTCTTCATCTTCTCAACTTCAATC
 TATTTACAACCTTACTATTTGTGAGCTTAACGGTACTGATTGGCTTAACAAGAAGTTCGATTGGG
 CTGTTGAGACTTTCGTTATTTCCCTGTTTACTCACATCGTTTCTTACGGTGCTCTTACTACT
 TCTCACTTCCTTGATGCTGTTGGTCTTATTACTGTTTCTACTGCTGGTACTACCACGGTCGTTA
 CGTTCCTTTCTTCTGTTTACGCTGTTTGTGCTCTTGTGCTCTTATTGTTTCTGTTATTAGGCTTA
 CTAAGAAGTGTATGCTTGGAGTACTCTTGTACTAGGTACTACTCAACTTCCTTTTGGATTCTAAG
 GAAAGCTTTACAGGTGGAGTCTCCTGTTATTATTGAGAAGGTGGAAAGGTTGAAGTTGATGG
 TCACCTTATTGATCTTAAGCGTGTGTTCTTGATGGTCTGCTGCTACTCCTGTTACTAAGGTTT
 CAGCAGAGCAATGGTGTCTCCTTCTGAGAAAGATGAACTTTAG*tctaga*

Séquence protéique de GP5 dans le vecteur pCAMBIA1380mod

MGMGLKCLTAGCCSQLPFLWCIVPFCFAALVNASSSSSSQLQSIYNLTICELNGTDWLNKNFDWA
 VETFVIFPVLTHIVSYGALTTSHFLDAVGLITVSTAGYYHGRVYVLSVYAVCALAALICFVIRLT

KNCMSWRYSCRYTNFLLDSKGLYRWRSPIIEKGGKVEVDGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVS
AEQWCRPSEKDEL

Séquence nucléotidique de M::GP5 dans le vecteur pCAMBIA1380mod

*ccatgg*GGATGGTTTCTTCTCTTGATGATTTCTGTAACGATTCTACTGCTCCTCAAAGGTTTTG
CTTGCTTTCTCTATTACTTACACTCCTGTTATGATTTACGCTCTTAAGGTTTCAAGGGGAAGGCT
TCTTGACTTCTTACCTTCTTATTTCCCTAACTGTGCTTTCCTTTCGGTTACATGACTTTTCG
CTCACTTCCAATCTACTAACAAGGTTGCACTTACTATGGGTGCTGTTGTTGCTCTTCTTTGGGGA
GTTTACTCTGCTATTGAGACTTGAAGTTCATTACTTCTAGGTGTCGTCTTTGCTCTTTGGGTCG
TAAGTACATTTGCTCCAGCTCATCATGTTGAATCTGCTGCTGGTTTCCATCTATTGCTGCTT
CAGATAACCACGCTTTCGTTGTTAGAAGCCTGGTTCTACTACTGTTAACGGTACTCTTGTTCCT
GGTCTTAAGTCTCTTGTCTTGGTGGTAGAAAGGCTGTTAAGAGGGGTGTTGTTAACCTTGTTAA
GTACGCTAAGGGTACCACCATGCTTGGAAAGTGTCTTACTGCTGGTTGTTGTTCTCAACTTCCTT
TCCTTTGGTGTATCGTTCCTTCTGTTTCGCTGCTCTTGTAAACGCTTCTTCTTCTCATCTTCT
CAACTTCAATCTATTTACAACCTTACTATTTGTGAGCTTAAACGGTACTGATTGGCTTAAACAAGAA
CTTCGATTGGGCTGTTGAGACTTTCGTTATTTCCCTGTTCTTACTCACATCGTTCTTACGGTG
CTTACTACTTCTCACTTCCCTGATGCTGTTGGTCTTATTACTGTTTCTACTGCTGGTTACTAC
CACGGTCGTTACGTTCTTCTTCTGTTTACGCTGTTTGTGCTCTTGCTGCTCTTATTTGTTTCGT
TATTAGGCTTACTAAGAAGTGTATGCTTGGAGGACTCTTGTACTAGGTACACTAACTTCCTTT
TGGATTCTAAGGGAAAGCTTTACAGGTGGAGGCTCCTGTTATTATTGAGAAGGGTGGAAAGGTT
GAAGTTGATGGTCACCTTATTGATCTTAAAGCGTGTGTTCTTGTATGGTCTGCTGCTACTCCTGT
TACTAAGGTTTACAGCAGAGCAATGGTGTCTGCTCTTCTGAGAAAGATGAACCTTAGTctaga

Séquence protéique de M::GP5 dans le vecteur pCAMBIA1380mod

MGMVSSLDDFCNDSTAPQKVLAFSITYTPVMIYALKVSRGRLGLLHLLIFLNCAFTFGYMTFA
HFQSTNKVALTMGAVVALLWGVYSÄIETWKFITSRCRLCLLGRKYILAPAHHVESAAGFHPPIAAS
DNHAFVVRPSTTVNGTLVPLKSLVLGGRKAVKRGVNVLVKYAKGTTMLGKCLTAGCCSQLPF
LWCIVPFCFAALVNASSSSSSQLQSIYNLTICELNGTDWLNKNFDWAVETFVIFPVLTHIVSYGA
LTTSHFLDAVGLITVSTAGYYHGRYVLSVYAVCALAALICFVIRLTKNCMSWRYSCRYTNFLL
DSKGLYRWRSPIIEKGGKVEVDGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAEQWCRPSEKDEL

Séquence nucléotidique de M::GP5mut dans le vecteur pCAMBIA1380mod

*ccatgg*GGATGGTTTCTTCTCTTGATGATTTCTGTAACGATTCTACTGCTCCTCAAAGGTTTTG
CTTGCTTTCTCTATTACTTACACTCCTGTTATGATTTACGCTCTTAAGGTTTCAAGGGGAAGGCT
TCTTGACTTCTTACCTTCTTATTTCCCTAACTGTGCTTTCCTTTCGGTTACATGACTTTTCG
CTCACTTCCAATCTACTAACAAGGTTGCACTTACTATGGGTGCTGTTGTTGCTCTTCTTTGGGGA
GTTTACTCTGCTATTGAGACTTGAAGTTCATTACTTCTAGGTGTCGTCTTTGCTTTTGGGTCG
TAAGTACATTTGCTCCAGCTCATCATGTTGAATCTGCTGCTGGTTTCCATCTATTGCTGCTT
CAGATAACCACGCTTTCGTTGTTAGAAGCCTGGTTCTACTACTGTTAACGGTACTCTTGTTCCT
GGTCTTAAGTCTCTTGTCTTGGTGGTAGAAAGGCTGTTAAGAGGGGTGTTGTTAACCTTGTTAA
GTACGCTAAGGGTACCACCATGCTTGGAAAGTGTCTTACTGCTGGTTGTTGTTCTCAACTTCCTT
TCCTTTGGTGTATCGTTCCTTCTGTTTCGCTTCTGGATCTGGAGCTTCTGCCAAGTTCGTTGGCT
GCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTTCTTCTCATCTTCTCAACTTCAATCTATTTACAACCTTAC
TATTTGTGAGCTTGCCTGACTGATTGGCTTAAACAAGAAGTTCGATTGGGCTGTTGAGACTTTTCG
TTATTTTCCCTGTTCTTACTCACATCGTTTCTTACGGTGTCTTACTACTTCTCACTTCCCTTGAT
GCTGTTGGTCTTATTACTGTTTCTACTGCTGGTTACTACCACGGTCGTTACGTTCTTCTTCTGT
TTACGCTGTTTGTGCTCTTGCTGCTCTTATTTGTTTCGTTATTAGGCTTACTAAGAAGTGTATGT
CTTGAGGACTCTTGTACTAGGTACACTAACTTCTTTGGATTCTAAGGGAAAGCTTTACAGG
TGGAGGTCTCCTGTTATTATTGAGAAGGGTGGAAAGGTTGAAGTTGATGGTACCTTATTGATCT

TAAGCGTGTGTCTTCTGATGGTTCTGCTGCTACTCCTGTTACTAAGGTTTCAGCAGAGCAATGGT
GTCGTCCTTCTGAGAAAGATGAACCTTAGtctaga

Séquence protéique de M::GP5mut dans le vecteur pCAMBIA1380mod

MGMVSSLDLDFCNDSTAPQKVLLAFSITYTPVMIYALKVSRGRLGLLHLLIFLNCAFTFGYMTFA
HFQSTNKVALTMGAVVALLWGVYSAIETWKFITSRCRLCLLGRKYILAPAHHVESAAGFHPAAS
DNHAFVRRPGSTTVNGTLVPLKSLVLGGRKAVKRGVVNLVKYAKGTTMLGKCLTAGCCSQLPF
LWCIVPFCFASGSGASAKFVAAWTLKAAASSSSSQLQSIYNLTICELAGTDWLNKNFDWAVETFV
IFPVLTHIVSYGALTTSHFLDAVGLITVSTAGYYHGRYVLSVVYAVCALAALICFVIRLTKNCMS
WRYSCTRYTNFLLSKGLYRWRSPVIEKGGKVEVDGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAEQWC
RPSEKDEL

Séquence nucléotidique de M::GP5::CTB dans le vecteur pCAMBIA1380mod

ccatggGGATGGTTTCTTCTCTTCTGATGATTTCTGTAACGATTCTACTGCTCCTCAAAGGTTTGT
CTTGCTTTCTCTATTACTTACACTCCTGTTATGATTTACGCTCTTAAGGTTTCAAGGGGAAGGCT
TCTTGGACTTCTTACCTTCTATTTTCTTAACGTGCTTCACTTTCCGTTACATGACTTTCCG
CTCACTTCCAATCTACTAACAAGGTTGCACTTACTATGGGTGCTGTTGTTGCTCTTCTTTGGGGA
GTTTACTCTGCTATTGAGACTTGGAAAGTTCATTACTTCTAGGTGCTGCTTTGTCTTTGGGTGCG
TAAGTACATTCTTGCTCCAGCTCATCATGTTGAATCTGCTGCTGGTTCCATCCTATTGCTGCTT
CAGATAACCACGCTTTCGTTGTTAGAAGGCCTGGTCTACTACTGTTAACGGTACTCTTGTTCCT
GGTCTTAAGTCTCTTGTCTTGGTGGTAGAAAGGCTGTTAAGAGGGGTGTTGTTAACCTTGTTAA
GTACGCTAAGGGTACCACCAATGCTTGGAAAGTGTCTTACTGCTGGTTGTTGTTCTCAACTTCTT
TCCTTTGGTGTATCGTTCCTTTCTGTTTCGCTGCTCTTGTAAACGCTTCTTCTTCTCATCTTCT
CAACTTCAATCTATTTACAACCTTACTATTTGTGAGCTTAACGGTACTGATTGGCTTAACAAGAA
CTTCGATTGGGCTGTTGAGACTTTCGTTATTTTCCCTGTTCTTACTCACATCGTTTCTTACGGTG
CTCTTACTACTTCTCACTTCCTTATGCTGTTGGTCTTATTACTGTTTCTACTGCTGGTTACTAC
CACGGTCTTACGTTCTTCTTCTGTTTACGCTGTTTGTGCTCTTGTGCTCTTATTTGTTTCGT
TATTAGGCTTACTAAGAACTGTATGTCTTGGAGGTACTCTTGTACTAGGTACACTAATTCCTTT
TGGATTCTAAGGAAAGCTTTACAGGTGGAGGTCTCCTGTTATTATTGAGAAGGGTGGAAAGGTT
GAAGTTGATGGTCACCTTATTGATCTTAAGCGTGTGTTCTTGTGATGGTTCTGCTGCTACTCCTGT
TACTAAGGTTTCAGCAGAGCAATGGTGTGCTCCTGGTCTGCTATGATTAAGCTTAAGTTCG
GTGTTTCTTCACTGTCTTTTGTCTATCTGCTTACGCTCATGGTACTCCTCAAACATTACTGAT
CTTCTTGTGCTGAGTACCACAACACTCAAATTCACACTCTTAACGATAAGATTTTCTTACACTGA
GTCTCTTGTGTAAGGCTGAAATGGCTATTATTACTTCAAGAACGGTACTTTTCCAAGTTG
AGGTTCCAGGTTCTCAACACATTGATTCTCAAAAAAGGCTATTGAGAGGATGAAGGATACTCTT
AGGATTGCTTACCTTACTGAGGCTAAGGTTGAGAAGCTTTGTGTTGGAACAACAAGACTCCTCA
CGCTATTGCTGCTATTCTATGGCTAACTCTGAGAAAGATGAACCTTAGtctaga

Séquence protéique de M::GP5::CTB dans le vecteur pCAMBIA1380mod

MGMVSSLDLDFCNDSTAPQKVLLAFSITYTPVMIYALKVSRGRLGLLHLLIFLNCAFTFGYMTFA
HFQSTNKVALTMGAVVALLWGVYSAIETWKFITSRCRLCLLGRKYILAPAHHVESAAGFHPAAS
DNHAFVRRPGSTTVNGTLVPLKSLVLGGRKAVKRGVVNLVKYAKGTTMLGKCLTAGCCSQLPF
LWCIVPFCFAALVNASSSSSSSQLQSIYNLTICELNGTDWLNKNFDWAVETFVIFPVLTHIVSYGA
LTTSHFLDAVGLITVSTAGYYHGRYVLSVVYAVCALAALICFVIRLTKNCMSWRYSCTRYTNFL
DSKGLYRWRSPVIEKGGKVEVDGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAEQWCRPGPGPMIKLKF
VFFTVLLSSAYAHGTPQNIIDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVE
VPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAI AAI SMANSEKDEL

Séquence nucléotidique de M::GP5::CTBmut dans le vecteur pCAMBIA1380mod

*ccatgg*GGATGGTTTTCTTCTCTTGATGATTTCTGTAACGATTCTACTGCTCCTCAAAGGTTTTG
 CTTGCTTTCTCTATTACTTACACTCCTGTTATGATTTACGCTCTTAAGGTTTCAAGGGGAAGGCT
 TCTTGACTTCTTACCTTCTTATTTTCCCTAACTGTGCTTTCACCTTCGGTTACATGACTTTTCG
 CTCACTTCCAATCTACTAACAAGGTTGCACTTACTATGGGTGCTGTTGTTGCTCTTCTTTGGGGA
 GTTACTCTGCTATTGAGACTTGGAAAGTTCATTACTTCTAGGTGTCGTCTTTGCTCTTTGGGTGCG
 TAAGTACATTCTTGCTCCAGCTCATCATGTTGAATCTGCTGCTGGTTTCCATCCTATTGCTGCTT
 CAGATAACCACGCTTTCGTTGTTAGAAGGCTGGTCTACTACTGTTAACGGTACTCTTGTTCCT
 GGCTTAAGTCTCTTGTCTTGGTGGTAGAAAGGCTGTTAAGAGGGTGTGTTAACCTTGTTAA
 GTACGCTAAGGGTACCACCATGCTTGGAAAGTCTTACTGCTGGTTGTTGTTCTCAACTTCCTT
 TCCTTTGGTGTATCGTTCCTTTCTGTTTCGCTTCTGGATCTGGAGCTTCTGCCAAGTTCGTGGCT
 GCCTGGACCCTGAAGGCTGCCGCTTCTTCTCATCTTCTCAACTTCAATCTATTTACAACCTTAC
 TATTTGTGAGCTTGGCGTACTGATTGGCTTAAACAAGAACTTCGATTGGGCTGTTGAGACTTTTCG
 TTATTTTCCCTGTTCTTACTCACATCGTTTCTTACGGTGTCTTACTACTTCTCACTTCCTTGAT
 GCTGTTGGTCTTATTACTGTTTCTACTGCTGGTACTACCACGGTCGTTACGTTCTTCTTCTGT
 TTACGCTGTTTGTGCTCTTGCTGCTCTTATTGTTTCGTTATTAGGCTTACTAAGAACTGTATGT
 CTTGGAGGTACTCTTGTACTAGGTACACTAACTTCTTTTGGATTCTAAGGGAAAGCTTTACAGG
 TGGAGGTCCTGTTATTATTGAGAAGGGTGGAAAGGTTGAAGTTGATGGTCACCTTATTGATCT
 TAAGCGTGTGTTCTTGTATGGTTCGCTGCTACTCCTGTTACTAAGGTTTTCAGCAGAGCAATGGT
 GTCGTCCTGGTCTGGTCTATGATTAAGCTTAAGTTCGGTGTGTTTCTTCACTGTTCTTTGTCA
 TCTGCTTACGCTCATGGTACTCCTCAAACATTACTGATCTTTGTGCTGAGTACCACAACACTCA
 AATCACACTCTTAACGATAAGATTTTCTTACTGAGTCTCTTGCTGGAAAGCGTGAAATGG
 CTATTATTACTTTCAAGAACGGTGCTACTTTCCAAGTTGAGGTTCCAGGTTCTCAACACATTGAT
 TCTCAAAAAAAGGCTATTGAGAGGATGAAGGATACTCTTAGGATTGCTTACCTTACTGAGGCTAA
 GGTTGAGAAGCTTTGTGTTTGAACAACAAGACTCCTCACGCTATTGCTGCTATTTCTATGGCTA
 ACTCTGAGAAAGATGAACCTTTAGtctaga

Séquence protéique de M::GP5::CTBmut dans le vecteur pCAMBIA1380mod

MGMVSSLDDFCNDSTAPQKVLLAFSITYTPVMYALKVSRGRLLGLLHLLIFLNCAFTFGYMTFA
 HFQSTNKVALTMGAVVALLWGVSAIETWKFITSRCRLCLLGRKYILAPAHVHVESAAAGFHPIAAS
 DNHAFVVRPSTTVNGTLVPLGLKSLVLGGRKAVKRGVVNLVKYAKGTTMLGKCLTAGCCSQLPF
 LWCIVPFCFASGSGASAKFVAAWTLKAAAASSSSSQLQSIYNLTICELAGTDWLNKNFDWAVETFV
 IFPVLTHIVSYGALTTSHFLDAVGLITVSTAGYYHGRYVLSVYAVCALAALICFVIRLTKNCMS
 WRYSTRYTNFLLDKSKGLYRWRSPVIEKGGKVEVDGHLIDLKRVVLDGSAATPVTKVSAEQWC
 RPPGPMIKLKFVFFTVLLSSAYAHGTPQNIIDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMA
 IITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN
 SEKDEL

APPENDICE B TABLEAU DES AMORCES

Nom	Amorces 5' → 3'
M	
NcoI-M-F	TCC CAT GGG GAT GGT TTC TTC TCT TGA TGA T
XbaI-M-R	TCT CTA GAC TAA AGT TCA TCT TTC TCA GAC TTA GCG TAC TTA ACA AG
GP5	
NcoI-GP5-F	TCC CAT GGG GAT GCT TGG AAA GTG TCT
XbaI-GP5-R	TAA GTT TCT AGA CTA AAG TTC ATC TTT CTC AGA AGG ACG ACA CCA TTG CTC TG
M::GP5	
NcoI-M-F	TCC CAT GGG GAT GGT TTC TTC TCT TGA TGA T
Linker-M-R	AAG CAT GGT GGT ACC CTT AGC GAT CTT AAC AAG
Linker-GP5-F	GCT AAG GGT ACC ACC ATG CTT GGA AAG TGT CT
XbaI-GP5-R	TAA GTT TCT AGA CTA AAG TTC ATC TTT CTC AGA AGG ACG ACA CCA TTG CTC TG
M::GP5::CTB	
NcoI-M-F	TCC CAT GGG GAT GGT TTC TTC TCT TGA TGA T
Linker-M-R	AAG CAT GGT GGT ACC CTT AGC GAT CTT AAC AAG
Linker-GP5-F	GCT AAG GGT ACC ACC ATG CTT GGA AAG TGT CT
XbaI-CTB-R	TCT CTA GAC TAA AGT TCA TCT TTC TCA GAG TTA GCC ATA GAA ATA GCA GC
M::GP5 mut	
NcoI-M-F	TCC CAT GGG GAT GGT TTC TTC TCT TGA TGA T
Linker-M-R	AAG CAT GGT GGT ACC CTT AGC GAT CTT AAC AAG
Linker-GP5-F	GCT AAG GGT ACC ACC ATG CTT GGA AAG TGT CT
SGSG-F	TCT GGA TCT GGA GCT TCT GCC AAG TTC GTG
SGSG-R	TCC AGA TCC AGA AGC GAA ACA GAA AGG AAC
PADRE-F	GTG GCT GCC TGG ACC CTG AAG GCT GCC GCT TCT TCT TCA TCT TCT CAA
PADRE-R	CTT CAG GGT CCA GGC AGC CAC GAA CTT GGC AGA AGC GTT AAC AAG AGC
N51-F	TTT GTG AGC TTG CCG GTA CTG ATT G
N-51-R	CAA TCA GTA CCG GCA AGC TCA CAA A
XbaI-GP5-R	TAA GTT TCT AGA CTA AAG TTC ATC TTT CTC AGA AGG ACG ACA CCA TTG CTC TG
M::GP5::CTB mut	
NcoI-M-F	TCC CAT GGG GAT GGT TTC TTC TCT TGA TGA T
Linker-M-R	AAG CAT GGT GGT ACC CTT AGC GAT CTT AAC AAG
Linker-GP5-F	GCT AAG GGT ACC ACC ATG CTT GGA AAG TGT CT
SGSG-F	TCT GGA TCT GGA GCT TCT GCC AAG TTC GTG
SGSG-R	TCC AGA TCC AGA AGC GAA ACA GAA AGG AAC
PADRE-F	GTG GCT GCC TGG ACC CTG AAG GCT GCC GCT TCT TCT TCA TCT TCT CAA
PADRE-R	CTT CAG GGT CCA GGC AGC CAC GAA CTT GGC AGA AGC GTT AAC AAG AGC
N51-F	TTT GTG AGC TTG CCG GTA CTG ATT G
N-51-R	CAA TCA GTA CCG GCA AGC TCA CAA A
XbaI-CTB-R	TCT CTA GAC TAA AGT TCA TCT TTC TCA GAG TTA GCC ATA GAA ATA GCA GC

APPENDICE C

EXPRESSION DE LA PROTEINE FLJB CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Suite à la production de la FljB dans *Nicotiana benthamiana*, il a été proposé de produire des plantes transgéniques stables chez *Arabidopsis thaliana*. Le but était de conduire une étude quant à ses propriétés dans la plante et si le temps l'avait permis, de vérifier si la flagelline exprimée chez la plante lui conférait une résistance accrue à certains pathogènes de plante. En effet, une étude a rapporté que du riz transgénique exprimant la flagelline de façon stable était plus résistant à *Magnaporthe grisea*, champignon responsable de nécrose chez le riz (Takakura *et al.*, 2008).

Matériel et Méthodes : Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana a été transformée en suivant le protocole de *floral dip* (Weigel, 2002). Brièvement, les inflorescences ont été trempées dans la solution d'inoculation contenant les agrobactéries transformées avec les constructions d'intérêts. Les graines ont été récoltées après que les plantes aient été laissées à sécher. Elles ont été stérilisées avant d'être ensemencées sur milieu de sélection avec hygromycine (15 mg/l) et transférées dans des pots avec le même mélange de terre que pour *Nicotiana benthamiana* pour leur permettre de finir leur croissance. Les feuilles ou des siliques ont été prélevées pour des analyses d'immunobuvardage de type western et les graines de ces plantes transgéniques ont été récoltées pour constituer la génération T1. Les graines ont été emmenées jusqu'en génération T4 en suivant la même démarche qu'énoncée ci-dessus.

Résultats

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformés par *floral dip* avec les agrobactéries portant le vecteur pCAMBIAmoF FljB. Les inflorescences ont été transformées avant que les fleurs ne soient ouvertes et les graines ont été récoltées après avoir laissé les plantes à sécher. Les graines, représentant la génération T1 de plantes transgéniques, ont été mises à germer sur milieu de sélection avec hygromycine et des graines non transformées ont été utilisées comme témoin négatif de germination. Aucune graine non transformée ne germe à la concentration d'hygromycine utilisée. Les plantules qui ont survécu à la sélection ont ensuite été transplantées dans la terre dans des pots individuels. Après plusieurs jours de croissance, des feuilles ont été prélevées pour déterminer la présence de la flagelline par immunobuvardage de type western. L'immunobuvardage a montré que, sur les dix plantes analysées, 7 à 8 plantes exprimaient la FljB à différents niveaux (Figure 5.1).

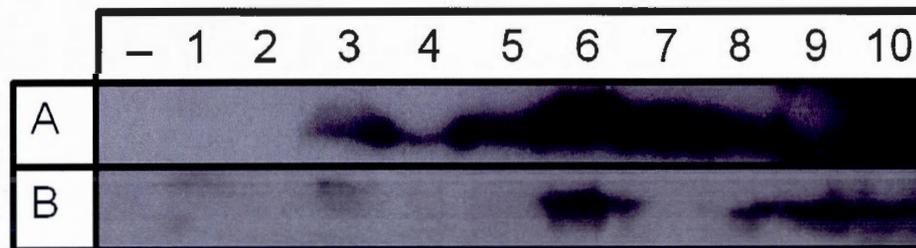


Figure 5.1. Expression de la protéine FljB. Parmi les plantes sélectionnées qui ont poussé, dix ont été choisies pour faire un test d'immunobuvardage de type western. L'anticorps anti-FljB de lapin a été utilisé à une dilution 1:10 000. (A) et (B) représentent deux expositions différentes. Le signe (-) représente les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* non-transformées, témoin négatif.

Parmi ces plantes, quatre ont été sélectionnées pour continuer l'analyse : le clone 1, pour son absence d'expression, le clone 3, pour son niveau modéré d'expression et les clones 6 et 10, pour leur fort niveau d'expression. Les graines de ces plantes ont été récoltées et ont donné la génération T2 de graines transgéniques.

Les graines ont de nouveau été sélectionnées sur milieu de germination avec hygromycine (**Figure 5.2**). Au niveau de cette génération, une différence de croissance et de morphologie a été observée entre les différentes plantes (**Figure 5.2**). Il a été possible de voir que les plantes des clones 6 et 10 avaient des racines plus longues que les plantes des clones 1 et 3. Ceci peut indiquer des insertions au niveau de gènes plus ou moins essentiels pour la plante ou des insertions multiples pouvant affecter la croissance des plantes (Bhat et Srinivasan, 2002).

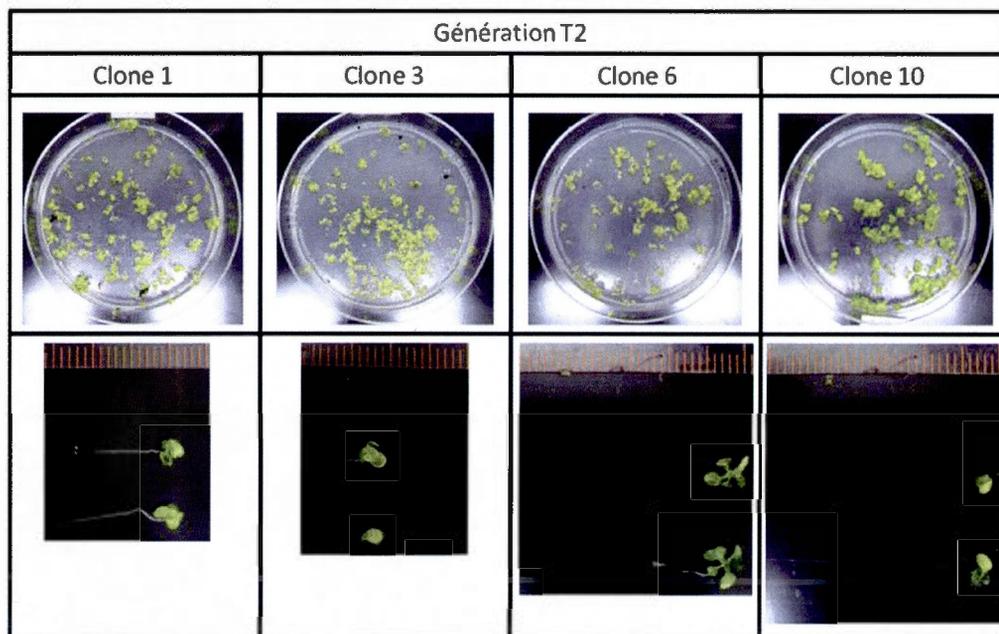


Figure 5.2. Croissance des différents clones sélectionnés sur milieu de sélection. Les graines stérilisées des clones 1, 3, 6 et 10 ont été sélectionnées grâce à l'hygromycine. La règle graduée permet de comparer la croissance des racines des différents clones.

Dix plantules par clone ont été transplantées dans la terre et analysées par immunobuvardage pour leur expression de FljB. Les résultats des immunobuvardages ont montré que les clones 1 et 10 n'exprimaient pas la flagelline à un niveau détectable. L'expression de la flagelline dans le clone 3 a été détectée pour quatre plantes alors que pour le clone 6, une seule plante semblait exprimer faiblement la flagelline (**Figure 5.3**). Ces résultats ont montré une perte de l'expression à la

génération T2 des clones qui exprimaient le plus fortement la protéine FljB à la génération T1. La perte d'expression a été observée malgré la sélection avec l'hygromycine qui ne permet pas la germination des graines non transformées (résultats non montrés).

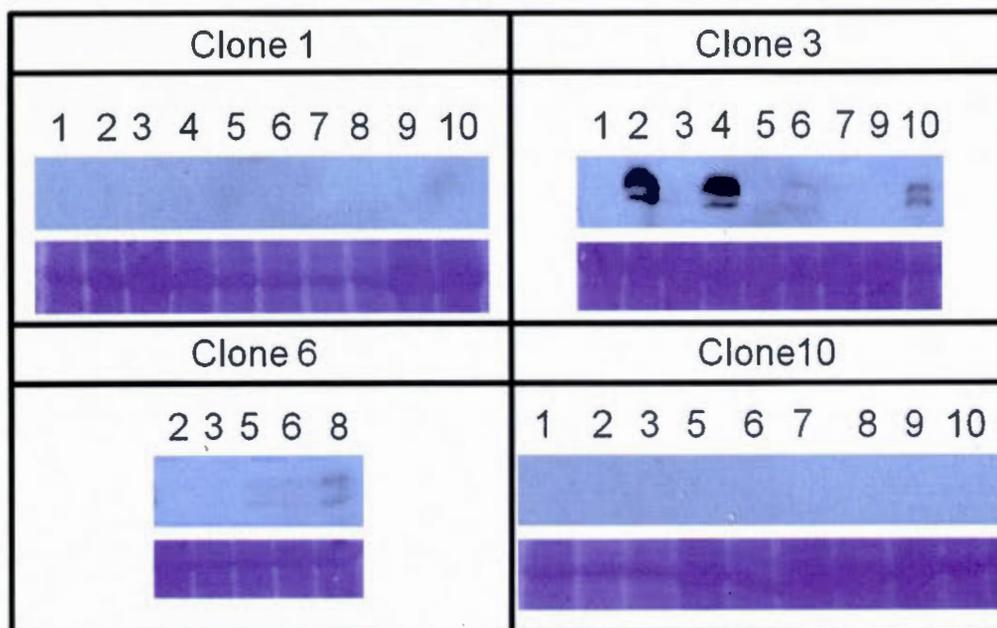


Figure 5.3. Expression de la protéine FljB à la génération T2. Dix plantules par clone ont été choisies pour continuer les tests. Les feuilles prélevées ont été analysées par immunobuvardage de type western. Une coloration au bleu de Coomassie a permis d'estimer la charge de protéine. L'immunobuvardage a été réalisé avec l'anticorps anti-FljB de lapin à une dilution de 1:10 000.

Les graines ont été récoltées après quelques semaines pour constituer la génération T3. Les graines ont été de nouveau sélectionnées avec hygromycine. Le taux de germination des différents sous-clones sélectionnés était proche de 100% en comparaison avec les graines sauvages qui ne germaient pas sur milieu de sélection [comparaison sous-clone 1-7 du clone 1 avec les plantules sauvages (Wt), **Figure 5.4**]. Il a été aussi possible de remarquer que certaines graines commençaient à germer et avortaient, ce qui était majoritairement le cas du sous-clone 1-7 du clone 1 (**Figure 5.4**). Les plantules ont été transférées dans la terre pour pouvoir mener l'analyse

d'expression des différents clones par immunobuvardage (**Figure 5.5**). Une fois de plus, le nombre de plantules exprimant la flagelline a diminué malgré la sélection. Il a aussi été observé que seules quelques plantules du sous-clone 3-10 exprimaient la protéine FljB, sous-clone qui démontrait la meilleure croissance sur milieu de sélection (**Figures 5.4 et 5.5**).

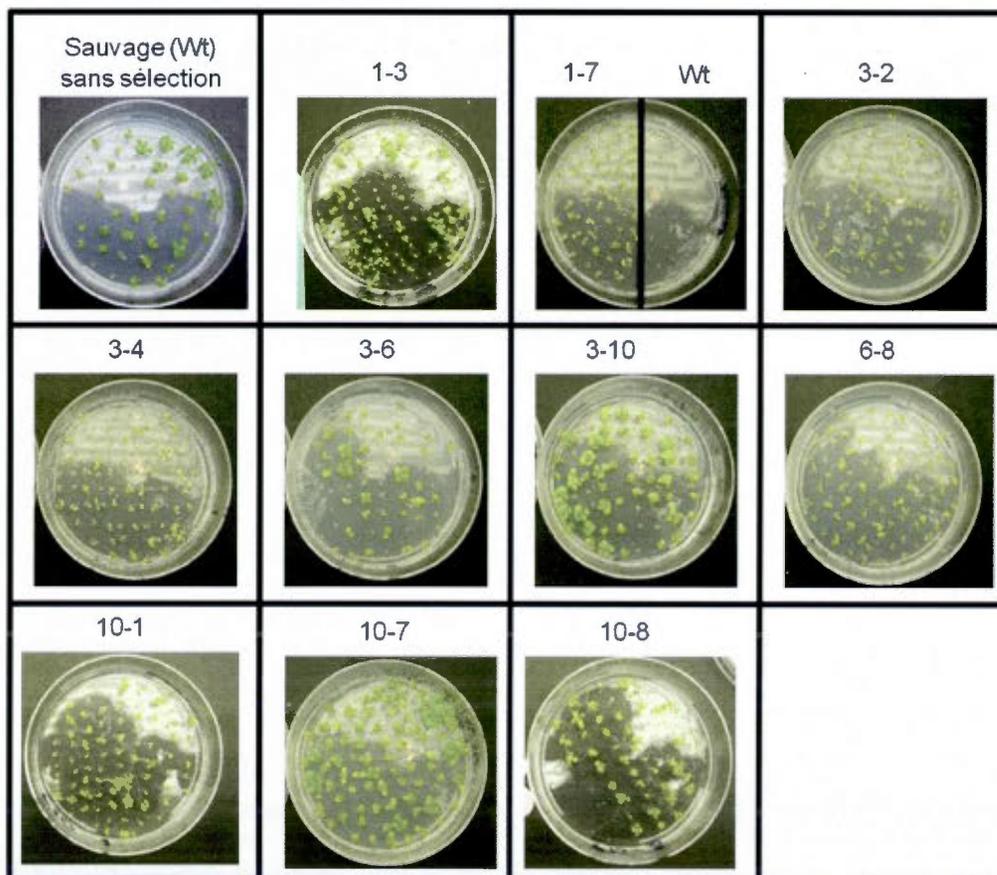


Figure 5.4. Germination des différents sous-clones de la génération T3. La sélection a été réalisée sur milieu de germination avec hygromycine. Les graines sauvages (Wt) poussant sur milieu sans sélection servaient de témoin pour le milieu de germination. Le cadre 1-7/Wt sert à montrer la différence du taux de germination entre des graines transformées et non transformées. Les autres cadres montrent le choix des sous-clones qui ont été retenus.

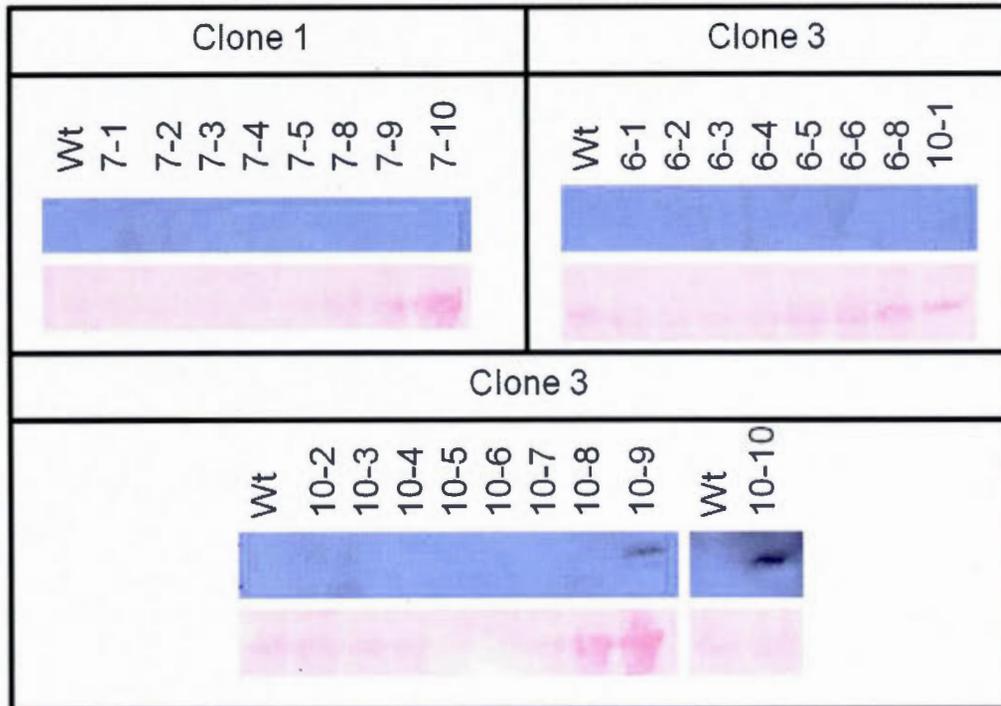


Figure 5.5. Expression de la protéine FljB à la génération T3. Les membranes correspondant au film X-ray ont été colorées au rouge Ponceau pour donner une estimation de la charge de protéine présente. Les anticorps anti-FljB de lapin à une dilution de 1:10 000 ont été utilisés pour les immunobuvardages.

Les résultats obtenus pour cette expérience ont montré une perte d'expression de la protéine FljB au cours des générations ainsi que des problèmes de croissance des différents clones sélectionnés qui ont diminué en nombre au cours des générations. Ces résultats pourraient être dus à un nombre d'insertions trop important dans le génome de la plante qui perturberait le développement de la plante. Une autre hypothèse serait que la protéine FljB induirait une réponse de défense chez la plante qui serait proportionnelle à sa production et qui provoquerait des arrêts de croissance prématurée comme observés à la **Figure 5.4**.

APPENDICE D

PROTOCOLE DE RÉGÉNÉRATION DE *MEDICAGO SATIVA*

Dans le but de produire des plantes transgéniques stables exprimant la protéine GP5 pour une étude de vaccination par voie orale chez les porcs, une plante comestible avait été choisie, la luzerne.

Matériel et Méthodes : Transformation de *Medicago sativa*

Ce protocole a été adapté d'un protocole non publié par le Dr Lining Tian, juillet 2001 et modifié en août 2005 par l'équipe du Dr D.C.W Brown (Southern Crop Protection and Food Research Center, Agriculture et Agrifood Canada). Les graines de luzerne (*Medicago sativa*) de la variété STEALTH ont été semées dans les mêmes conditions que celles des plants de tabac. Après trois à quatre semaines, les feuilles ont été coupées afin d'être stérilisées. Les feuilles ont été trempées dans une solution d'éthanol 70% pendant 30 s puis rincées dans de l'eau stérile. Elles ont été ensuite mises dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% avec 3 à 4 gouttes de Tween 20 pendant 20 min, rincées et mises dans une nouvelle solution d'hypochlorite de sodium pendant 5 min. Les feuilles ont été rincées trois fois avec de l'eau stérile. Les feuilles ont été coupées en explants carrés de 1 cm², laissées à sécher sur papier absorbant stérile puis déposées sur le milieu de régénération SH2 [Mélange de sels Schenk and Hildebrandt (SH) (Sigma) 3,2 g/l, K₂SO₄ 4,32 g/l, proline 288 mg/l, thioproline 53 mg/l, myo-inositol 200 mg/l, vitamines SH 1X, sucrose 30 g/l, phytigel 4 g/l, après autoclavage 1 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (Sigma) et 0,2 mg/l de kinetine (Sigma) ont été ajoutés ainsi que 30 ml/l d'acides aminés (solution d'acides aminés filtrée avec un filtre 0,22 µm et stockée à 4°C, 26,6 g/l de glutamine, 3,32 g/l de sérine, 0,016 g/l d'adénine, 0,332 g/l de L-glutathionne dans de l'eau nanopure)]. Après deux jours de régénération sur milieu solide SH2, les explants ont été transformés avec les agrobactéries contenant le vecteur

pCAMBIAmoD portant l'un des gènes d'intérêt. La D.O._{600 nm} des bactéries a été amenée à 0,4-0,5. Les bactéries ont été centrifugées pendant 20 min à 6 000 x g et resuspendues dans le milieu d'inoculation Schenk and Hildebrandt 0 (SH0) (pour 11; le mélange de sels SH 3,2 g/l, 1 ml 1 000X de vitamines SH0 (Sigma), 30 g/l de sucrose, 0,5 g/l de MES ont été dissous avec de l'eau nanopure stérile et le pH a été amené à 5,7 avec le KOH 1N) (Samac et Austin-Phillips, 2006). Les explants ont été lavés pour enlever le surplus de bactéries et séchés rapidement sur papier absorbant stérile. Les explants ont ensuite été déposés sur milieu solide SH2 contenant de la carbénicilline (250 mg/l) (SH2C) pour éliminer les agrobactéries. Après 5 jours, les explants ont été lavés si nécessaire par des bains successifs dans de l'eau nanopure stérile et transférés sur milieu solide SH2C additionné d'hygromycine (40 mg/l) (SH2CH), marqueur de sélection des explants transformés. Les milieux solides SH2, SH2C et SH2CH étaient les milieux d'induction des cals qui étaient renouvelés toutes les semaines. Quand les cals ont atteint une taille suffisante et une couleur brunâtre, ils ont été transférés sur le milieu solide d'induction des embryons SH3 qui était le milieu SH2CH dans lequel la kinétine et le 2,4-D ont été remplacés par le 6-benzylaminopurine (BAP) (1 mg/l) et le thidiazuron (TDZ) (1 mg/l). Les embryons ont ensuite été transférés sur le milieu solide de germination et d'élongation des embryons ½ MS0 (mélange de sels MS 2,16 g/l, vitamines MS modifiées 1/2X, sucrose 20 g/l, phytigel 4 g/l). Les plantules ont ensuite été transférées sur le milieu solide MS0 dans des boîtes magenta (Mélange de sels MS 4,32 g/l, vitamines MS modifiées 1X, sucrose 20 g/l, phytigel 4 g/l). Les plantes régénérées ont été transférées pour quelques jours dans de la vermiculite et couvertes pour garder un taux d'humidité suffisant avant d'être transplantées dans un mélange de terre 1:1:1 de terre noire, Promix (Premier) et de vermiculite.

Résultats

La **Figure 5.6** montre les différentes étapes de régénération du protocole mis au point pour régénérer *Medicago sativa*. Ce protocole a été optimisé pour la variété STEALTH. Les plantules qui ont été régénérées ont été transférées dans la terre pour qu'elles puissent compléter leur croissance.

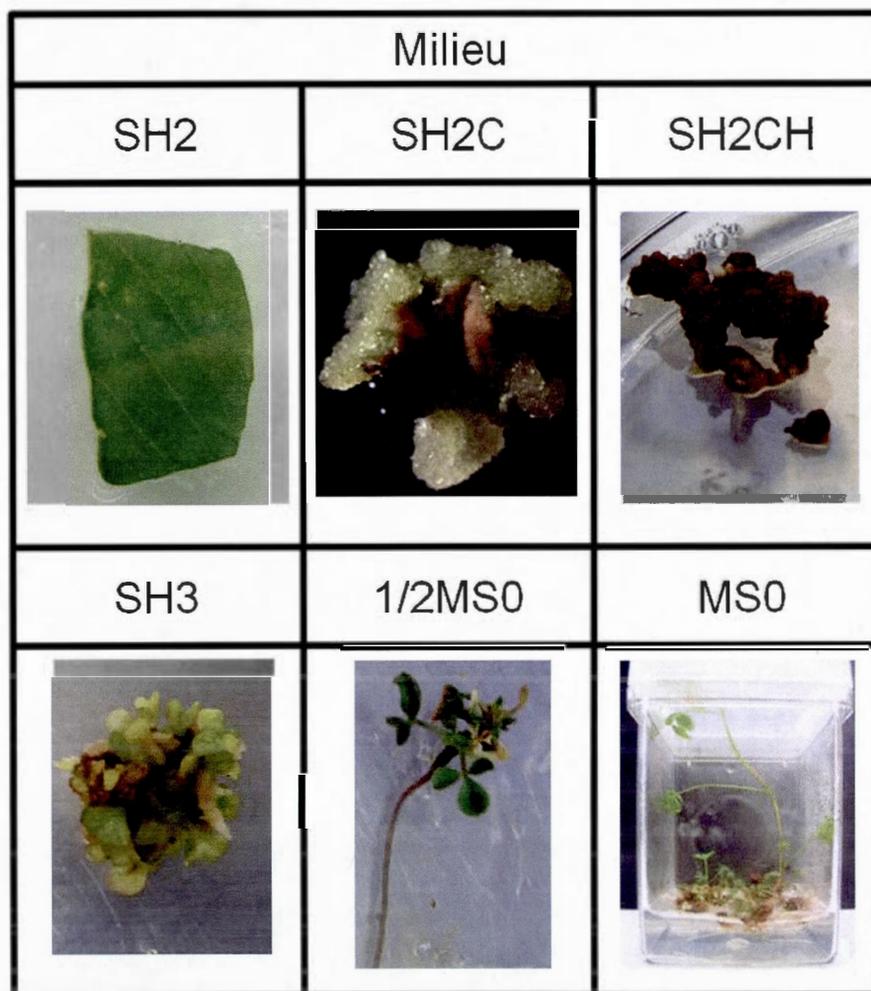


Figure 5.6. Régénération de *Medicago sativa*. Les photos montrent les différentes étapes réalisées pour régénérer *Medicago sativa* à partir d'un explant de feuille stérilisée. L'explant a tout d'abord été déposé sur le milieu SH2 qui sert à induire la formation des cals sans sélection. Le transfert sur le milieu SH2C permet de continuer l'induction des cals tout en éliminant les agrobactéries. Le passage sur milieu SH2CH

permet de sélectionner les explants transformés grâce au gène de sélection de résistance à l'hygromycine. Les cals ont ensuite été placés sur le milieu SH3 qui servait à l'induction des embryons. Les embryons ont été transférés sur le milieu 1/2MS0 pour stimuler la formation des racines. Enfin, les plantes en formation ont été transférées sur milieu MS0 pour induire l'élongation de la tige.

Ce protocole pourrait être utilisé dans le cadre de production de protéines d'intérêt pour des immunisations par voie orale. La luzerne a l'avantage d'être comestible, elle a une grande capacité de régénération, elle peut se propager par simple bouturage et son cycle de vie est court (Abranches *et al.*, 2005).

RÉFÉRENCES

- Abranches, R., S. Marcel, E. Arcalis, F. Altmann, P. Fevereiro et E. Stoger. 2005. «Plants as bioreactors: a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system». *J Biotechnol.* vol. 120, no 1, p. 121-134.
- Abu-Qarn, M., J. Eichler et N. Sharon. 2008. «Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea». *Curr Opin Struct Biol.* vol. 18, no 5, p. 544-550.
- Adar, Y., Y. Singer, R. Levi, E. Tzehoval, S. Perk, C. Banet-Noach, S. Nagar, R. Arnon et T. Ben-Yedidia. 2009. «A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy against H5N1». *Vaccine.* vol. 27, no 15, p. 2099-2107.
- Agrawal, S., A. Agrawal, B. Doughty, A. Gerwitz, J. Blenis, T. Van Dyke et B. Pulendran. 2003. «Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos». *J Immunol.* vol. 171, no 10, p. 4984-4989.
- Alaniz, R. C., L. A. Cummings, M. A. Bergman, S. L. Rassouljian-Barrett et B. T. Cookson. 2006. «Salmonella typhimurium coordinately regulates FliC location and reduces dendritic cell activation and antigen presentation to CD4+ T cells». *J Immunol.* vol. 177, no 6, p. 3983-3993.
- Albina, E., C. Carrat et B. Charley. 1998. «Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Interferon Cytokine Res.* vol. 18, no 7, p. 485-490.
- Allende, R., T. L. Lewis, Z. Lu, D. L. Rock, G. F. Kutish, A. Ali, A. R. Doster et F. A. Osorio. 1999. «North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions». *J Gen Virol.* vol. 80 (Pt 2), p. 307-315.
- Andreyev, V. G., R. D. Wesley, W. L. Mengeling, A. C. Vorwald et K. M. Lager. 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.* vol. 142, no 5, p. 993-1001.

- Ansari, I. H., B. Kwon, F. A. Osorio et A. K. Pattnaik. 2006. «Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies». *J Virol.* vol. 80, no 8, p. 3994-4004.
- Arakawa, T., D. K. Chong et W. H. Langridge. 1998. «Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine». *Nat Biotechnol.* vol. 16, no 3, p. 292-297.
- Arimilli, S., J. B. Johnson, K. M. Clark, A. H. Graff, M. A. Alexander-Miller, S. B. Mizel et G. D. Parks. 2008. «Engineered expression of the TLR5 ligand flagellin enhances paramyxovirus activation of human dendritic cell function». *J Virol.* vol. 82, no 22, p. 10975-10985.
- Arlen, P. A., R. Falconer, S. Cherukumilli, A. Cole, A. M. Cole, K. K. Oishi et H. Daniell. 2007. «Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b». *Plant Biotechnol J.* vol. 5, no 4, p. 511-525.
- Arlen, P. A., M. Singleton, J. J. Adamovicz, Y. Ding, A. Davoodi-Semiromi et H. Daniell. 2008. «Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts». *Infect Immun.* vol. 76, no 8, p. 3640-3650.
- Arntzen, C. J. 2008. «Plant science. Using tobacco to treat cancer». *Science.* vol. 321, no 5892, p. 1052-1053.
- Asai, T., M. Mori, M. Okada, K. Uruno, S. Yazawa et I. Shibata. 1999. «Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 70, no 1-2, p. 143-148.
- Aviezer, D., E. Brill-Almon, Y. Shaaltiel, S. Hashmueli, D. Bartfeld, S. Mizrachi, Y. Liberman, A. Freeman, A. Zimran et E. Galun. 2009. «A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation». *PLoS One.* vol. 4, no 3, p. e4792.
- Bacchetta, R., S. Gregori et M. G. Roncarolo. 2005. «CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function». *Autoimmun Rev.* vol. 4, no 8, p. 491-496.

- Balasuriya, U. B., et E. J. Snijder. 2008. «Arterivirus». In *ANIMAL VIRUSES Molecular Biology*, T. C. Mettenleiter et F. Sobrino, p. 97-148. Norfolk: Caister Academic Press.
- Banchereau, J., et R. M. Steinman. 1998. «Dendritic cells and the control of immunity». *Nature*. vol. 392, no 6673, p. 245-252.
- Bargieri, D. Y., J. A. Leite, S. C. Lopes, M. E. Sbrogio-Almeida, C. J. Braga, L. C. Ferreira, I. S. Soares, F. T. Costa et M. M. Rodrigues. 2010. «Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella typhimurium». *Vaccine*. vol. 28, no 16, p. 2818-2826.
- Bargieri, D. Y., D. S. Rosa, C. J. Braga, B. O. Carvalho, F. T. Costa, N. M. Espindola, A. J. Vaz, I. S. Soares, L. C. Ferreira et M. M. Rodrigues. 2008. «New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin». *Vaccine*. vol. 26, no 48, p. 6132-6142.
- Baric, R. S., S. A. Stohlman et M. M. Lai. 1983. «Characterization of replicative intermediate RNA of mouse hepatitis virus: presence of leader RNA sequences on nascent chains». *J Virol*. vol. 48, no 3, p. 633-640.
- Bastos, R. G., O. A. Dellagostin, R. G. Barletta, A. R. Doster, E. Nelson, F. Zuckermann et F. A. Osorio. 2004. «Immune response of pigs inoculated with Mycobacterium bovis BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vaccine*. vol. 22, no 3-4, p. 467-474.
- Bates, J. T., S. Uematsu, S. Akira et S. B. Mizel. 2009. «Direct stimulation of tlr5+/- CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin». *J Immunol*. vol. 182, no 12, p. 7539-7547.
- Bautista, E. M., K. S. Faaberg, D. Mickelson et E. D. McGruder. 2002. «Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Virology*. vol. 298, no 2, p. 258-270.
- Bautista, E. M., et T. W. Molitor. 1997. «Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine». *Viral Immunol*. vol. 10, no 2, p. 83-94.

- Beatson, S. A., T. Minamino et M. J. Pallen. 2006. «Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure». *Trends Microbiol.* vol. 14, no 4, p. 151-155.
- Ben-Yedidia, T., L. Abel, R. Arnon et A. Globerson. 1998. «Efficacy of anti-influenza peptide vaccine in aged mice». *Mech Ageing Dev.* vol. 104, no 1, p. 11-23.
- Ben-Yedidia, T., et R. Arnon. 1998. «Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine». *Immunol Lett.* vol. 64, no 1, p. 9-15.
- Ben-Yedidia, T., H. Marcus, Y. Reisner et R. Arnon. 1999. «Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection». *Int Immunol.* vol. 11, no 7, p. 1043-1051.
- Ben-Yedidia, T., R. Tarrab-Hazdai, D. Schechtman et R. Arnon. 1999. «Intranasal administration of synthetic recombinant peptide-based vaccine protects mice from infection by *Schistosoma mansoni*». *Infect Immun.* vol. 67, no 9, p. 4360-4366.
- Bendelac, A., et R. Medzhitov. 2002. «Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity». *J Exp Med.* vol. 195, no 5, p. F19-23.
- Benfield, D. A., E. Nelson, J. E. Collins, L. Harris, S. M. Goyal, D. Robison, W. T. Christianson, R. B. Morrison, D. Gorcyca et D. Chladek. 1992. «Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332)». *J Vet Diagn Invest.* vol. 4, no 2, p. 127-133.
- Benko, S., Z. Magyarics, A. Szabo et E. Rajnavolgyi. 2008. «Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors». *Biol Chem.* vol. 389, no 5, p. 469-485.
- Bergeron-Sandoval, L. P., A. Girard, F. Ouellet, D. Archambault et F. Sarhan. 2010. «Production of Human Rotavirus and Salmonella Antigens in Plants and Elicitation of fljB-Specific Humoral Responses in Mice». *Mol Biotechnol.* vol. 47, no 2, p. 157-168.
- Beura, L. K., S. N. Sarkar, B. Kwon, S. Subramaniam, C. Jones, A. K. Pattnaik et F. A. Osorio. 2010. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation». *J Virol.* vol. 84, no 3, p. 1574-1584.

- Beyer, J., D. Fichtner, H. Schirrmeier, U. Polster, E. Weiland et H. Wege. 2000. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung». *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. vol. 47, no 1, p. 9-25.
- Bhat, S. R., et S. Srinivasan. 2002. «Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches». *Plant Science*. vol. 163, no 4, p. 673-681.
- Bierk, M. D., S. A. Dee, K. D. Rossow, S. Otake, J. E. Collins et T. W. Molitor. 2001. «Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls». *Can J Vet Res*. vol. 65, no 4, p. 261-266.
- Bilodeau, R., S. Dea, R. A. Sauvageau et G. P. Martineau. 1991. «'Porcine reproductive and respiratory syndrome' in Quebec». *Vet Rec*. vol. 129, no 5, p. 102-103.
- Bloemraad, M., E. P. de Kluijver, A. Petersen, G. E. Burkhardt et G. Wensvoort. 1994. «Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs». *Vet Microbiol*. vol. 42, no 4, p. 361-371.
- Botner, A., B. Strandbygaard, K. J. Sorensen, P. Have, K. G. Madsen, E. S. Madsen et S. Alexandersen. 1997. «Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine». *Vet Rec*. vol. 141, no 19, p. 497-499.
- Bowden, T.A., et E.E. Fry. 2011. «Role of Glycoproteins in Virus-Human Cell Interactions». In *Functional and Structural Proteomics of Glycoproteins*, R.J. Owens et J.E. Nettleship, p. 174. New York: Springer.
- Braga, C. J., L. M. Massis, M. E. Sbrogio-Almeida, B. C. Alencar, D. Y. Bargieri, S. B. Boscardin, M. M. Rodrigues et L. C. Ferreira. 2010. «CD8+ T cell adjuvant effects of Salmonella FliC_d flagellin in live vaccine vectors or as purified protein». *Vaccine*. vol. 28, no 5, p. 1373-1382.
- Brierley, I. 1995. «Ribosomal frameshifting viral RNAs». *J Gen Virol*. vol. 76 (Pt 8), p. 1885-1892.
- Bryans, J. T., M. E. Crowe, E. R. Doll et W. H. McCollum. 1957. «Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares; its

- differentiation from the equine abortion (influenza) virus». *Cornell Vet.* vol. 47, no 1, p. 3-41.
- Bryans, J. T., E. R. Doll et R. E. Knappenberger. 1957. «An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus». *Cornell Vet.* vol. 47, no 1, p. 69-75.
- Calvert, J. G., D. E. Slade, S. L. Shields, R. Jolie, R. M. Mannan, R. G. Ankenbauer et S. K. Welch. 2007. «CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses». *J Virol.* vol. 81, no 14, p. 7371-7379.
- Cancel-Tirado, S. M., R. B. Evans et K. J. Yoon. 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.* vol. 102, no 3, p. 249-262.
- Cancel-Tirado, S. M., et K. J. Yoon. 2003. «Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease». *Viral Immunol.* vol. 16, no 1, p. 69-86.
- Caput, D., B. Beutler, K. Hartog, R. Thayer, S. Brown-Shimer et A. Cerami. 1986. «Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators». *Proc Natl Acad Sci USA.* vol. 83, no 6, p. 1670-1674.
- Cavanagh, D. 1997. «Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae». *Arch Virol.* vol. 142, no 3, p. 629-633.
- Chang, H. W., C. R. Jeng, J. J. Liu, T. L. Lin, C. C. Chang, M. Y. Chia, Y. C. Tsai et V. F. Pang. 2005. «Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha». *Vet Microbiol.* vol. 108, no 3-4, p. 167-177.
- Charemtantanakul, W., R. Platt et J. A. Roth. 2006. «Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production». *Viral Immunol.* vol. 19, no 4, p. 646-661.
- Chauhan, N., R. Kumar, J. Badhai, A. Preet et P. K. Yadava. 2005. «Immunogenicity of cholera toxin B epitope inserted in Salmonella flagellin expressed on bacteria and administered as DNA vaccine». *Mol Cell Biochem.* vol. 276, no 1-2, p. 1-6.

- Chebolu, S., et H. Daniell. 2007. «Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis». *Plant Biotechnol J.* vol. 5, no 2, p. 230-239.
- Chen, C. Y., et A. B. Shyu. 1995. «AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation». *Trends Biochem Sci.* vol. 20, no 11, p. 465-470.
- Chen, Z., S. Lawson, Z. Sun, X. Zhou, X. Guan, J. Christopher-Hennings, E. A. Nelson et Y. Fang. 2010. «Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist». *Virology.* vol. 398, no 1, p. 87-97.
- Chen, Z., K. Li et P. G. Plagemann. 2000. «Neuropathogenicity and sensitivity to antibody neutralization of lactate dehydrogenase-elevating virus are determined by polylactosaminoglycan chains on the primary envelope glycoprotein». *Virology.* vol. 266, no 1, p. 88-98.
- Chia, M. Y., S. H. Hsiao, H. T. Chan, Y. Y. Do, P. L. Huang, H. W. Chang, Y. C. Tsai, C. M. Lin, V. F. Pang et C. R. Jeng. 2010. «Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 135, no 3-4, p. 234-242.
- Chia, M. Y., S. H. Hsiao, H. T. Chan, Y. Y. Do, P. L. Huang, H. W. Chang, Y. C. Tsai, C. M. Lin, V. F. Pang et C. R. Jeng. 2011. «Evaluation of the immunogenicity of a transgenic tobacco plant expressing the recombinant fusion protein of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in pigs». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 140, no 3-4, p. 215-225.
- Chichester, J. A., K. Musiyuchuk, P. de la Rosa, A. Horsey, N. Stevenson, N. Ugulava, S. Rabindran, G. A. Palmer, V. Mett et V. Yusibov. 2007. «Immunogenicity of a subunit vaccine against *Bacillus anthracis*». *Vaccine.* vol. 25, no 16, p. 3111-3114.
- Choi, N. W., M. K. Estes et W. H. Langridge. 2005. «Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit-rotavirus VP7 fusion protein in transgenic potato». *Mol Biotechnol.* vol. 31, no 3, p. 193-202.

- Christianson, W. T., C. S. Choi, J. E. Collins, T. W. Molitor, R. B. Morrison et H. S. Joo. 1993. «Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses». *Can J Vet Res.* vol. 57, no 4, p. 262-268.
- Christianson, W. T., J. E. Collins, D. A. Benfield, L. Harris, D. E. Gorcyca, D. W. Chladek, R. B. Morrison et H. S. Joo. 1992. «Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows». *Am J Vet Res.* vol. 53, no 4, p. 485-488.
- Christopher-Hennings, J., E. A. Nelson, R. J. Hines, J. K. Nelson, S. L. Swenson, J. J. Zimmerman, C. L. Chase, M. J. Yaeger et D. A. Benfield. 1995. «Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars». *J Vet Diagn Invest.* vol. 7, no 4, p. 456-464.
- Ciacchi-Woolwine, F., I. C. Blomfield, S. H. Richardson et S. B. Mizel. 1998. «Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line». *Infect Immun.* vol. 66, no 3, p. 1127-1134.
- Cleveland, S. M., E. Buratti, T. D. Jones, P. North, F. Baralle, L. McLain, T. McInerney, Z. Durrani et N. J. Dimmock. 2000. «Immunogenic and antigenic dominance of a nonneutralizing epitope over a highly conserved neutralizing epitope in the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: its deletion leads to a strong neutralizing response». *Virology.* vol. 266, no 1, p. 66-78.
- Conzelmann, K. K., N. Visser, P. Van Woensel et H. J. Thiel. 1993. «Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group». *Virology.* vol. 193, no 1, p. 329-339.
- Cooper, N. R., et G. R. Nemerow. 1984. «The role of antibody and complement in the control of viral infections». *J Invest Dermatol.* vol. 83, no 1 Suppl, p. 121s-127s.
- Costers, S., D. J. Lefebvre, P. L. Delputte et H. J. Nauwynck. 2008. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages». *Arch Virol.* vol. 153, no 8, p. 1453-1465.
- Crellin, N. K., R. V. Garcia, O. Hadisfar, S. E. Allan, T. S. Steiner et M. K. Levings. 2005. «Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances

- the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells». *J Immunol.* vol. 175, no 12, p. 8051-8059.
- Cuadros, C., F. J. Lopez-Hernandez, A. L. Dominguez, M. McClelland et J. Lustgarten. 2004. «Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses». *Infect Immun.* vol. 72, no 5, p. 2810-2816.
- D'Aoust, M. A., P. O. Lavoie, M. M. Couture, S. Trepanier, J. M. Guay, M. Dargis, S. Mongrand, N. Landry, B. J. Ward et L. P. Vezina. 2008. «Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice». *Plant Biotechnol J.* vol. 6, no 9, p. 930-940.
- Daniell, H. 2002. «Molecular strategies for gene containment in transgenic crops». *Nat Biotechnol.* vol. 20, no 6, p. 581-586.
- Daniell, H. 2007. «Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive?». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 104, no 17, p. 6879-6880.
- Daniell, H., S. B. Lee, T. Panchal et P. O. Wiebe. 2001. «Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts». *J Mol Biol.* vol. 311, no 5, p. 1001-1009.
- Daniell, H., N. D. Singh, H. Mason et S. J. Streatfield. 2009. «Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals». *Trends Plant Sci.* vol. 14, no 12, p. 669-679.
- Darwich, L., M. Gimeno, M. Sibila, I. Diaz, E. de la Torre, S. Dotti, L. Kuzemtseva, M. Martin, J. Pujols et E. Mateu. 2011. «Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains». *Vet Microbiol.* vol. 150, no 1-2, p. 49-62.
- das Gracias Luna, M., F. F. Sardella et L. C. Ferreira. 2000. «Salmonella flagellin fused with a linear epitope of colonization factor antigen I (CFA/I) can prime antibody responses against homologous and heterologous fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*». *Res Microbiol.* vol. 151, no 7, p. 575-582.
- Das, P. B., P. X. Dinh, I. H. Ansari, M. de Lima, F. A. Osorio et A. K. Pattnaik. 2010. «The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163». *J Virol.* vol. 84, no 4, p. 1731-1740.

- Datta, S. K., V. Redecke, K. R. Prilliman, K. Takabayashi, M. Corr, T. Tallant, J. DiDonato, R. Dziarski, S. Akira, S. P. Schoenberger et E. Raz. 2003. «A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells». *J Immunol.* vol. 170, no 8, p. 4102-4110.
- Davoodi-Semiromi, A., N. Samson et H. Daniell. 2009. «The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases». *Hum Vaccin.* vol. 5, no 7, p. 488-493.
- Davoodi-Semiromi, A., M. Schreiber, S. Nalapalli, D. Verma, N. D. Singh, R. K. Banks, D. Chakrabarti et H. Daniell. 2010. «Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery». *Plant Biotechnol J.* vol. 8, no 2, p. 223-242.
- De Becker, G., V. Moulin, B. Pajak, C. Bruck, M. Francotte, C. Thiriart, J. Urbain et M. Moser. 2000. «The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells». *Int Immunol.* vol. 12, no 6, p. 807-815.
- de Lima, M., I. H. Ansari, P. B. Das, B. J. Ku, F. J. Martinez-Lobo, A. K. Pattnaik et F. A. Osorio. 2009. «GP3 is a structural component of the PRRSV type II (US) virion». *Virology.* vol. 390, no 1, p. 31-36.
- de Lima, M., A. K. Pattnaik, E. F. Flores et F. A. Osorio. 2006. «Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Virology.* vol. 353, no 2, p. 410-421.
- De Rocher, E. J., T. C. Vargo-Gogola, S. H. Diehn et P. J. Green. 1998. «Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants». *Plant Physiol.* vol. 117, no 4, p. 1445-1461.
- de Vries, A. A., E. D. Chirnside, P. J. Bredenbeek, L. A. Gravestien, M. C. Horzinek et W. J. Spaan. 1990. «All subgenomic mRNAs of equine arteritis virus contain a common leader sequence». *Nucleic Acids Res.* vol. 18, no 11, p. 3241-3247.
- de Vries, A. A., E. D. Chirnside, M. C. Horzinek et P. J. Rottier. 1992. «Structural proteins of equine arteritis virus». *J Virol.* vol. 66, no 11, p. 6294-6303.

- de Vries, A. A., S. M. Post, M. J. Raamsman, M. C. Horzinek et P. J. Rottier. 1995. «The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers». *J Virol.* vol. 69, no 8, p. 4668-4674.
- de Zoete, M. R., A. M. Kestra, J. A. Wagenaar et J. P. van Putten. 2010. «Reconstitution of a functional Toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin». *J Biol Chem.* vol. 285, no 16, p. 12149-12158.
- Dea, S., C. A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh et D. Rogan. 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.* vol. 145, no 4, p. 659-688.
- Dee, S., S. Otake, S. Oliveira et J. Deen. 2009. «Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*». *Vet Res.* vol. 40, no 4, p. 39.
- DeGray, G., K. Rajasekaran, F. Smith, J. Sanford et H. Daniell. 2001. «Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi». *Plant Physiol.* vol. 127, no 3, p. 852-862.
- Delaney, K. N., J. P. Phipps, J. B. Johnson et S. B. Mizel. 2010. «A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice». *Viral Immunol.* vol. 23, no 2, p. 201-210.
- Delputte, P. L., P. Meerts, S. Costers et H. J. Nauwynck. 2004. «Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 102, no 3, p. 179-188.
- Delputte, P. L., et H. J. Nauwynck. 2004. «Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus». *J Virol.* vol. 78, no 15, p. 8094-8101.
- Delputte, P. L., N. Vanderheijden, H. J. Nauwynck et M. B. Pensaert. 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.* vol. 76, no 9, p. 4312-4320.

- den Boon, J. A., K. S. Faaberg, J. J. Meulenberg, A. L. Wassenaar, P. G. Plagemann, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 1995. «Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases». *J Virol.* vol. 69, no 7, p. 4500-4505.
- den Boon, J. A., E. J. Snijder, E. D. Chirnside, A. A. de Vries, M. C. Horzinek et W. J. Spaan. 1991. «Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily». *J Virol.* vol. 65, no 6, p. 2910-2920.
- Denis, J., E. Acosta-Ramirez, Y. Zhao, M. E. Hamelin, I. Koukavica, M. Baz, Y. Abed, C. Savard, C. Pare, C. Lopez Macias, G. Boivin et D. Leclerc. 2008. «Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform». *Vaccine.* vol. 26, no 27-28, p. 3395-3403.
- Deshpande, A., S. Wang, M. A. Walsh et T. Dokland. 2007. «Structure of the equine arteritis virus nucleocapsid protein reveals a dimer-dimer arrangement». *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* vol. 63, no Pt 5, p. 581-586.
- Diaz, I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols et E. Mateu. 2005. «Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol.* vol. 86, no Pt 7, p. 1943-1951.
- Diaz, I., L. Darwich, G. Pappaterra, J. Pujols et E. Mateu. 2006. «Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs». *Virology.* vol. 351, no 2, p. 249-259.
- Didierlaurent, A., I. Ferrero, L. A. Otten, B. Dubois, M. Reinhardt, H. Carlsen, R. Blomhoff, S. Akira, J. P. Kraehenbuhl et J. C. Sirard. 2004. «Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response». *J Immunol.* vol. 172, no 11, p. 6922-6930.
- Doan, D. N., et T. Dokland. 2003. «Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Structure.* vol. 11, no 11, p. 1445-1451.
- Dobbe, J. C., Y. van der Meer, W. J. Spaan et E. J. Snijder. 2001. «Construction of chimeric arteriviruses reveals that the ectodomain of the major glycoprotein is not the main determinant of equine arteritis virus tropism in cell culture». *Virology.* vol. 288, no 2, p. 283-294.

- Dokland, T., et M. N. M. Lee. 2006. «Transmission electron microscopy of biological specimens». In *In Techniques in Microscopy for Biomedical Applications*, T. Dokland, D. W. Hutmacher, M. L. Ng et J.-T. Schantz, p. 153–212. Singapore: World Scientific Press.
- Donnelly, M. A., et T. S. Steiner. 2002. «Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5». *J Biol Chem.* vol. 277, no 43, p. 40456-40461.
- Drew, T. W., J. P. Lowings et F. Yapp. 1997. «Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK». *Vet Microbiol.* vol. 55, no 1-4, p. 209-221.
- Duan, X., H. J. Nauwynck et M. B. Pensaert. 1997. «Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)». *Arch Virol.* vol. 142, no 12, p. 2483-2497.
- Dupuis, M., T. J. Murphy, D. Higgins, M. Ugozzoli, G. Van Nest, G. Ott et D. M. McDonald. 1998. «Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection». *Cellular Immunology.* vol. 186, no 1, p. 18-27.
- Eaves-Pyles, T. D., H. R. Wong, K. Odoms et R. B. Pyles. 2001. «Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein». *J Immunol.* vol. 167, no 12, p. 7009-7016.
- English, James J., Guy F. Davenport, Taline Elmayan, Hervé Vaucheret et David C. Baulcombe. 1997. «Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation». *The Plant Journal.* vol. 12, no 3, p. 597-603.
- Faaberg, K. S., C. Even, G. A. Palmer et P. G. Plagemann. 1995. «Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity». *J Virol.* vol. 69, no 1, p. 613-617.
- Faaberg, K. S., J. D. Hocker, M. M. Erdman, D. L. Harris, E. A. Nelson, M. Torremorell et P. G. Plagemann. 2006. «Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Viral Immunol.* vol. 19, no 2, p. 294-304.

- Faaberg, K. S., et P. G. Plagemann. 1995. «The envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus and their membrane topography». *Virology*. vol. 212, no 2, p. 512-525.
- Faaberg, K. S., et P. G. Plagemann. 1997. «ORF 3 of lactate dehydrogenase-elevating virus encodes a soluble, nonstructural, highly glycosylated, and antigenic protein». *Virology*. vol. 227, no 1, p. 245-251.
- Fang, L., Y. Jiang, S. Xiao, C. Niu, H. Zhang et H. Chen. 2006. «Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Virus Genes*. vol. 32, no 1, p. 5-11.
- Fernández-San Millán, Alicia, Susana M. Ortigosa, Sandra Hervás-Stubbs, Patricia Corral-Martínez, José M. Seguí-Simarro, Julien Gaétan, Pierre Coursaget et Jon Veramendi. 2008. «Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic». *Plant Biotechnol J*. vol. 6, no 5, p. 427-441.
- Fernandez, A., P. Suarez, J. M. Castro, E. Tabares et M. Diaz-Guerra. 2002. «Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death». *Virus Res*. vol. 83, no 1-2, p. 103-118.
- Fitter, S., P. M. Sincock, C. N. Jolliffe et L. K. Ashman. 1999. «Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with beta 1 and alpha IIb beta 3 integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion». *Biochem J*. vol. 338 (Pt 1), p. 61-70.
- Forsberg, R., T. Storgaard, H. S. Nielsen, M. B. Oleksiewicz, P. Cordioli, G. Sala, J. Hein et A. Botner. 2002. «The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe». *Virology*. vol. 299, no 1, p. 38-47.
- Foss, D. L., et M. P. Murtaugh. 2000. «Mechanisms of vaccine adjuvanticity at mucosal surfaces». *Anim Health Res Rev*. vol. 1, no 1, p. 3-24.
- Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant et G. Nunez. 2006. «Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages». *Nat Immunol*. vol. 7, no 6, p. 576-582.

- Franco, M. A., J. Angel et H. B. Greenberg. 2006. «Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines». *Vaccine*. vol. 24, no 15, p. 2718-2731.
- Fujii, S. I., K. Shimizu, C. Smith, L. Bonifaz et R. M. Steinman. 2003. «Activation of natural killer T cells by Î±-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein». *Journal of Experimental Medicine*. vol. 198, no 2, p. 267-279.
- Gagnon, C. A., G. Lachapelle, Y. Langelier, B. Massie et S. Dea. 2003. «Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions». *Arch Virol*. vol. 148, no 5, p. 951-972.
- Garrity, R. R., G. Rimmelzwaan, A. Minassian, W. P. Tsai, G. Lin, J. J. de Jong, J. Goudsmit et P. L. Nara. 1997. «Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope». *J Immunol*. vol. 159, no 1, p. 279-289.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski et J. L. Madara. 2001. «Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression». *J Immunol*. vol. 167, no 4, p. 1882-1885.
- Ghayur, T., S. Banerjee, M. Hugunin, D. Butler, L. Herzog, A. Carter, L. Quintal, L. Sekut, R. Talanian, M. Paskind, W. Wong, R. Kamen, D. Tracey et H. Allen. 1997. «Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production». *Nature*. vol. 386, no 6625, p. 619-623.
- Giritch, A., S. Marillonnet, C. Engler, G. van Eldik, J. Botterman, V. Klimyuk et Y. Gleba. 2006. «Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 103, no 40, p. 14701-14706.
- Glenz, K., B. Bouchon, T. Stehle, R. Wallich, M. M. Simon et H. Warzecha. 2006. «Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts». *Nat Biotechnol*. vol. 24, no 1, p. 76-77.
- Godeny, E. K., L. Chen, S. N. Kumar, S. L. Methven, E. V. Koonin et M. A. Brinton. 1993. «Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV)». *Virology*. vol. 194, no 2, p. 585-596.

- Godeny, E. K., D. W. Speicher et M. A. Brinton. 1990. «Map location of lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV) capsid protein (Vp1) gene». *Virology*. vol. 177, no 2, p. 768-771.
- Godeny, E. K., L. Zeng, S. L. Smith et M. A. Brinton. 1995. «Molecular characterization of the 3' terminus of the simian hemorrhagic fever virus genome». *J Virol*. vol. 69, no 4, p. 2679-2683.
- Goldberg, T. L., J. F. Lowe, S. M. Milburn et L. D. Firkins. 2003. «Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection». *Virology*. vol. 317, no 2, p. 197-207.
- Goldberg, Tony L., Edwin C. Hahn, Ronald M. Weigel et Gail Scherba. 2000. «Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois». *J Gen Virol*. vol. 81, no 1, p. 171-179.
- Gomord, V., et L. Faye. 2004. «Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants». *Curr Opin Plant Biol*. vol. 7, no 2, p. 171-181.
- Gonin, P., H. Mardassi, C. A. Gagnon, B. Massie et S. Dea. 1998. «A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Arch Virol*. vol. 143, no 10, p. 1927-1940.
- Gonin, P., B. Pirzadeh, C. A. Gagnon et S. Dea. 1999. «Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein». *J Vet Diagn Invest*. vol. 11, no 1, p. 20-26.
- Gorbalenya, A. E., L. Enjuanes, J. Ziebuhr et E. J. Snijder. 2006. «Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome». *Virus Res*. vol. 117, no 1, p. 17-37.
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko et V. M. Blinov. 1989. «Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis». *Nucleic Acids Res*. vol. 17, no 12, p. 4847-4861.
- Granell, A., A. Fernandez del-Carmen et D. Orzaez. 2010. «In planta production of plant-derived and non-plant-derived adjuvants». *Expert Rev Vaccines*. vol. 9, no 8, p. 843-858.

- Halbur, P. G., L. D. Miller, P. S. Paul, X. J. Meng, E. L. Huffman et J. J. Andrews. 1995. «Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs». *Vet Pathol.* vol. 32, no 2, p. 200-204.
- Halbur, P. G., P. S. Paul, X. J. Meng, M. A. Lum, J. J. Andrews et J. A. Rathje. 1996. «Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model». *J Vet Diagn Invest.* vol. 8, no 1, p. 11-20.
- Han, J., Y. Wang et K. S. Faaberg. 2006. «Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Virus Res.* vol. 122, no 1-2, p. 175-182.
- Hansen, J. E., O. Lund, N. Tolstrup, A. A. Gooley, K. L. Williams et S. Brunak. 1998. «NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility». *Glycoconj J.* vol. 15, no 2, p. 115-130.
- Hasegawa, H., T. Nomura, K. Kishimoto, K. Yanagisawa et S. Fujita. 1998. «SFA-1/PETA-3 (CD151), a member of the transmembrane 4 superfamily, associates preferentially with alpha 5 beta 1 integrin and regulates adhesion of human T cell leukemia virus type 1-infected T cells to fibronectin». *J Immunol.* vol. 161, no 6, p. 3087-3095.
- Haweker, H., S. Rips, H. Koiwa, S. Salomon, Y. Saijo, D. Chinchilla, S. Robatzek et A. von Schaewen. 2010. «Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity». *J Biol Chem.* vol. 285, no 7, p. 4629-4636.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill et A. Aderem. 2001. «The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5». *Nature.* vol. 410, no 6832, p. 1099-1103.
- Haynes, J. S., P. G. Halbur, T. Sirinarumitr, P. S. Paul, X. J. Meng et E. L. Huffman. 1997. «Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence». *Vet Pathol.* vol. 34, no 1, p. 39-43.

- Hedges, J. F., U. B. Balasuriya et N. J. MacLachlan. 1999. «The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated, integral membrane protein». *Virology*. vol. 264, no 1, p. 92-98.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda et S. Akira. 2002. «Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway». *Nat Immunol*. vol. 3, no 2, p. 196-200.
- Hoebe, K., E. Janssen et B. Beutler. 2004. «The interface between innate and adaptive immunity». *Nat Immunol*. vol. 5, no 10, p. 971-974.
- HogenEsch, H. 2002. «Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants». *Vaccine*. vol. 20 Suppl 3, p. S34-39.
- Holmgren, J., C. Czerkinsky, K. Eriksson et A. Mharandi. 2003. «Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges». *Vaccine*. vol. 21 Suppl 2, p. S89-95.
- Honko, A. N., et S. B. Mizel. 2004. «Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung». *Infect Immun*. vol. 72, no 11, p. 6676-6679.
- Honko, A. N., N. Sriranganathan, C. J. Lees et S. B. Mizel. 2006. «Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*». *Infect Immun*. vol. 74, no 2, p. 1113-1120.
- Hou, Y. H., J. Chen, G. Z. Tong, Z. J. Tian, Y. J. Zhou, G. X. Li, X. Li, J. M. Peng, T. Q. An et H. C. Yang. 2008. «A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets». *Vaccine*. vol. 26, no 11, p. 1438-1449.
- Huang, Y. W., et X. J. Meng. 2010. «Novel strategies and approaches to develop the next generation of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)». *Virus Res*. vol. 154, no 1-2, p. 141-149.
- Huang, Z., Q. Chen, B. Hjelm, C. Arntzen et H. Mason. 2009. «A DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants». *Biotechnol Bioeng*. vol. 103, no 4, p. 706-714.

- Huang, Z., L. Santi, K. LePore, J. Kilbourne, C. J. Arntzen et H. S. Mason. 2006. «Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice». *Vaccine*. vol. 24, no 14, p. 2506-2513.
- Huang, Zhong, Kate LePore, Galina Elkin, Yasmin Thanavala et Hugh S. Mason. 2008. «High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system». *Plant Biotechnol J*. vol. 6, no 2, p. 202-209.
- Huleatt, J. W., A. R. Jacobs, J. Tang, P. Desai, E. B. Kopp, Y. Huang, L. Song, V. Nakaar et T. J. Powell. 2007. «Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity». *Vaccine*. vol. 25, no 4, p. 763-775.
- Huleatt, J. W., V. Nakaar, P. Desai, Y. Huang, D. Hewitt, A. Jacobs, J. Tang, W. McDonald, L. Song, R. K. Evans, S. Umlauf, L. Tussey et T. J. Powell. 2008. «Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin». *Vaccine*. vol. 26, no 2, p. 201-214.
- Igietseme, J. U., F. O. Eko, Q. He et C. M. Black. 2004. «Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens». *Expert Rev Vaccines*. vol. 3, no 1, p. 23-34.
- Ishiguro, M., T. Hori, T. Ishida, M. Yoshida, K. Takabatake, S Kaneko, K Igarashi et M Samejima. 2010. «Molecular cloning of cDNAs encoding two glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolases from the basidiomycete *Flammulina velutipes*». *Plant Biotechnology*. vol. 27, no 3, p. 273-281.
- Janeway Jr, C. A. 1989. «Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. vol. 54, no 1, p. 1-13.
- Jani, D., N. K. Singh, S. Bhattacharya, L. S. Meena, Y. Singh, S. N. Upadhyay, A. K. Sharma et A. K. Tyagi. 2004. «Studies on the immunogenic potential of plant-expressed cholera toxin B subunit». *Plant Cell Rep*. vol. 22, no 7, p. 471-477.
- Jeon, S. H., T. Ben-Yedidia et R. Arnon. 2002. «Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus». *Vaccine*. vol. 20, no 21-22, p. 2772-2780.
- Jiang, W., P. Jiang, Y. Li, J. Tang, X. Wang et S. Ma. 2006. «Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and

respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 113, no 1-2, p. 169-180.

- Jiang, W., P. Jiang, X. Wang, Y. Li et Y. Du. 2008. «Enhanced immune responses of mice inoculated recombinant adenoviruses expressing GP5 by fusion with GP3 and/or GP4 of PRRS virus». *Virus Res.* vol. 136, no 1-2, p. 50-57.
- Jiang, X. L., Z. M. He, Z. Q. Peng, Y. Qi, Q. Chen et S. Y. Yu. 2007. «Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice». *Transgenic Res.* vol. 16, no 2, p. 169-175.
- Jiang, Y., L. Fang, S. Xiao, H. Zhang, Y. Pan, R. Luo, B. Li et H. Chen. 2007. «Immunogenicity and protective efficacy of recombinant pseudorabies virus expressing the two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vaccine.* vol. 25, no 3, p. 547-560.
- Jiang, Y., S. Xiao, L. Fang, X. Yu, Y. Song, C. Niu et H. Chen. 2006. «DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity». *Vaccine.* vol. 24, no 15, p. 2869-2879.
- Joensuu, J. J., A. J. Conley, M. Lienemann, J. E. Brandle, M. B. Linder et R. Menassa. 2010. «Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*». *Plant Physiol.* vol. 152, no 2, p. 622-633.
- Johnson, C. R., T. F. Griggs, J. Gnanandarajah et M. P. Murtaugh. 2011. «Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses». *J Gen Virol.* vol. 92, no Pt 5, p. 1107-1116.
- Johnson, C. R., W. Yu et M. P. Murtaugh. 2007. «Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol.* vol. 88, no Pt 4, p. 1184-1195.
- Johnson, W. E., J. D. Lifson, S. M. Lang, R. P. Johnson et R. C. Desrosiers. 2003. «Importance of B-cell responses for immunological control of variant strains of simian immunodeficiency virus». *J Virol.* vol. 77, no 1, p. 375-381.

- Jordan, M. B., D. M. Mills, J. Kappler, P. Marrack et J. C. Cambier. 2004. «Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population». *Science*. vol. 304, no 5678, p. 1808-1810.
- Jusa, E. R., Y. Inaba, M. Kouno, O. Hirose, I. Shibata, M. Kubota et H. Yasuhara. 1996. «Slow-reacting and complement-requiring neutralizing antibody in swine infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus». *J Vet Med Sci*. vol. 58, no 8, p. 749-753.
- Kajal, H., et A. Misra. 2011. «Preparation of tetanus toxoid and ovalbumin loaded gliadin nanoparticles for oral immunization». *J Biomed Nanotechnol*. vol. 7, no 1, p. 211-212.
- Kanamoto, H., A. Yamashita, H. Asao, S. Okumura, H. Takase, M. Hattori, A. Yokota et K. Tomizawa. 2006. «Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids». *Transgenic Res*. vol. 15, no 2, p. 205-217.
- Kantor, A. B., A. M. Stall, S. Adams, L. A. Herzenberg et L. A. Herzenberg. 1992. «Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 89, no 8, p. 3320-3324.
- Kapur, V., M. R. Elam, T. M. Pawlovich et M. P. Murtaugh. 1996. «Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States». *J Gen Virol*. vol. 77 (Pt 6), p. 1271-1276.
- Katz, J. B., A. L. Shafer, K. A. Eernisse, J. G. Landgraf et E. A. Nelson. 1995. «Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3». *Vet Microbiol*. vol. 44, no 1, p. 65-76.
- Kay, H. D., et D. A. Horwitz. 1980. «Evidence by reactivity with hybridoma antibodies for a probable myeloid origin of peripheral blood cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity». *J Clin Invest*. vol. 66, no 4, p. 847-851.
- Key, K. F., G. Haqshenas, D. K. Guenette, S. L. Swenson, T. E. Toth et X. J. Meng. 2001. «Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates». *Vet Microbiol*. vol. 83, no 3, p. 249-263.

- Kheyar, A., A. Jabrane, C. Zhu, P. Cleroux, B. Massie, S. Dea et C. A. Gagnon. 2005. «Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs». *Vaccine*. vol. 23, no 31, p. 4016-4022.
- Kim, J. K., A. M. Fahad, K. Shanmukhappa et S. Kapil. 2006. «Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10». *J Virol*. vol. 80, no 2, p. 689-696.
- Kim, T. G., M. Y. Kim et M. S. Yang. 2010. «Cholera toxin B subunit-domain III of dengue virus envelope glycoprotein E fusion protein production in transgenic plants». *Protein Expr Purif*.
- Kimman, T. G., L. A. Cornelissen, R. J. Moormann, J. M. Rebel et N. Stockhofe-Zurwieden. 2009. «Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology». *Vaccine*. vol. 27, no 28, p. 3704-3718.
- Knoops, K., M. Kikkert, S. H. Worm, J. C. Zevenhoven-Dobbe, Y. van der Meer, A. J. Koster, A. M. Mommaas et E. J. Snijder. 2008. «SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum». *PLoS Biol*. vol. 6, no 9, p. e226.
- Kong, Q., L. Richter, Y. F. Yang, C. J. Arntzen, H. S. Mason et Y. Thanavala. 2001. «Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants». *Proc Natl Acad Sci USA*. vol. 98, no 20, p. 11539-11544.
- Kool, M., T. Soullie, M. van Nimwegen, M. A. Willart, F. Muskens, S. Jung, H. C. Hoogsteden, H. Hammad et B. N. Lambrecht. 2008. «Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells». *J Exp Med*. vol. 205, no 4, p. 869-882.
- Kotakis, C., N. Vrettos, D. Kotsis, M. Tsagris, K. Kotzabasis et K. Kalantidis. 2010. «Light intensity affects RNA silencing of a transgene in *Nicotiana benthamiana* plants». *BMC Plant Biol*. vol. 10, p. 220.
- Kreutz, L. C., et M. R. Ackermann. 1996. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway». *Virus Res*. vol. 42, no 1-2, p. 137-147.

- Kristensen, C. S., A. Botner, H. Takai, J. P. Nielsen et S. E. Jorsal. 2004. «Experimental airborne transmission of PRRS virus». *Vet Microbiol.* vol. 99, no 3-4, p. 197-202.
- Kroese, M. V., J. C. Zevenhoven-Dobbe, J. N. Bos-de Ruijter, B. P. Peeters, J. J. Meulenberg, L. A. Cornelissen et E. J. Snijder. 2008. «The nsplalpha and nspl papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis». *J Gen Virol.* vol. 89, no Pt 2, p. 494-499.
- Kumar, S., A. Dhingra et H. Daniell. 2004. «Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance». *Plant Physiol.* vol. 136, no 1, p. 2843-2854.
- Kuo, L., Z. Chen, R. R. Rowland, K. S. Faaberg et P. G. Plagemann. 1992. «Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV): subgenomic mRNAs, mRNA leader and comparison of 3'-terminal sequences of two LDV isolates». *Virus Res.* vol. 23, no 1-2, p. 55-72.
- Labarque, G., K. V. Reeth, H. Nauwynck, C. Drexler, S. Van Gucht et M. Pensaert. 2004. «Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy». *Vaccine.* vol. 22, no 31-32, p. 4183-4190.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature.* vol. 227, no 5259, p. 680-685.
- Lager, K. M., W. L. Mengeling et S. L. Brockmeier. 1999. «Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate». *Am J Vet Res.* vol. 60, no 8, p. 1022-1027.
- Lai, M. M., R. S. Baric, P. R. Brayton et S. A. Stohlman. 1984. «Characterization of leader RNA sequences on the virion and mRNAs of mouse hepatitis virus, a cytoplasmic RNA virus». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 81, no 12, p. 3626-3630.
- Lambrecht, B. N., M. Kool, M. A. Willart et H. Hammad. 2009. «Mechanism of action of clinically approved adjuvants». *Curr Opin Immunol.* vol. 21, no 1, p. 23-29.

- Lamphear, B. J., S. J. Streatfield, J. M. Jilka, C. A. Brooks, D. K. Barker, D. D. Turner, D. E. Delaney, M. Garcia, B. Wiggins, S. L. Woodard, E. E. Hood, I. R. Tizard, B. Lawhorn et J. A. Howard. 2002. «Delivery of subunit vaccines in maize seed». *J Control Release*. vol. 85, no 1-3, p. 169-180.
- Larochelle, R., S. D'Allaire et R. Magar. 2003. «Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Quebec». *Virus Res*. vol. 96, no 1-2, p. 3-14.
- Lee, C., A. Bachand, M. P. Murtaugh et D. Yoo. 2004. «Differential host cell gene expression regulated by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP4 and GP5 glycoproteins». *Vet Immunol Immunopathol*. vol. 102, no 3, p. 189-198.
- Lee, C. M., C. H. Chen, S. N. Lu, H. D. Tung, W. J. Chou, J. H. Wang, T. M. Chen, C. H. Hung, C. C. Huang et W. J. Chen. 2003. «Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan». *Scand J Gastroenterol*. vol. 38, no 1, p. 95-101.
- Lee, L. H., E. Burg, 3rd, S. Baqar, A. L. Bourgeois, D. H. Burr, C. P. Ewing, T. J. Trust et P. Guerry. 1999. «Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*». *Infect Immun*. vol. 67, no 11, p. 5799-5805.
- Lee, S. E., S. Y. Kim, B. C. Jeong, Y. R. Kim, S. J. Bae, O. S. Ahn, J. J. Lee, H. C. Song, J. M. Kim, H. E. Choy, S. S. Chung, M. N. Kweon et J. H. Rhee. 2006. «A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity». *Infect Immun*. vol. 74, no 1, p. 694-702.
- Lee, S. E., Y. I. Koh, M. K. Kim, Y. R. Kim, S. Y. Kim, J. H. Nam, Y. D. Choi, S. J. Bae, Y. J. Ko, H. J. Ryu, J. T. Koh, H. E. Choy et J. H. Rhee. 2008. «Inhibition of airway allergic disease by co-administration of flagellin with allergen». *J Clin Immunol*. vol. 28, no 2, p. 157-165.
- Lee, S. M., et S. B. Kleiboeker. 2005. «Porcine arterivirus activates the NF-kappaB pathway through IkappaB degradation». *Virology*. vol. 342, no 1, p. 47-59.
- Lee, S. M., et S. B. Kleiboeker. 2007. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway». *Virology*. vol. 365, no 2, p. 419-434.

- Lelivelt, C. L., M. S. McCabe, C. A. Newell, C. B. Desnoo, K. M. van Dun, I. Birch-Machin, J. C. Gray, K. H. Mills et J. M. Nugent. 2005. «Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.)». *Plant Mol Biol.* vol. 58, no 6, p. 763-774.
- Lentz, E. M., M. V. Mozgovoij, D. Bellido, M. J. Dus Santos, A. Wigdorovitz et F. F. Bravo-Almonacid. 2011. «VP8* antigen produced in tobacco transplastomic plants confers protection against bovine rotavirus infection in a suckling mouse model». *J Biotechnol.* vol. 156, no 2, p. 100-107.
- Lenzi, P., N. Scotti, F. Alagna, M. L. Tornesello, A. Pompa, A. Vitale, A. De Stradis, L. Monti, S. Grillo, F. M. Buonaguro, P. Maliga et T. Cardi. 2008. «Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco». *Transgenic Res.* vol. 17, no 6, p. 1091-1102.
- Levi, R., et R. Arnon. 1996. «Synthetic recombinant influenza vaccine induces efficient long-term immunity and cross-strain protection». *Vaccine.* vol. 14, no 1, p. 85-92.
- Li, B., S. Xiao, Y. Wang, S. Xu, Y. Jiang, H. Chen et L. Fang. 2009. «Immunogenicity of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein encoded by a synthetic ORF5 gene». *Vaccine.* vol. 27, no 13, p. 1957-1963.
- Li, J., J. Guo, Z. Su, M. Hu, W. Liu et Q. Wei. 2011. «Calcineurin subunit B activates dendritic cells and acts as a cancer vaccine adjuvant». *Int Immunol.* vol. 23, no 5, p. 327-334.
- Li, Qiu-Li, Xiao-Rong Gao, Xiao-Hong Yu, Xing-Zhi Wang et Li-Jia An. 2003. «Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco». *Biotechnology Letters.* vol. 25, no 17, p. 1431-1436.
- Lightfield, K. L., J. Persson, S. W. Brubaker, C. E. Witte, J. von Moltke, E. A. Dunipace, T. Henry, Y. H. Sun, D. Cado, W. F. Dietrich, D. M. Monack, R. M. Tsois et R. E. Vance. 2008. «Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin». *Nat Immunol.* vol. 9, no 10, p. 1171-1178.
- Limaye, A., V. Koya, M. Samsam et H. Daniell. 2006. «Receptor-mediated oral delivery of a bioencapsulated green fluorescent protein expressed in

- transgenic chloroplasts into the mouse circulatory system». *Faseb J.* vol. 20, no 7, p. 959-961.
- Lindblad, E. B. 2004. «Aluminium adjuvants in retrospect and prospect». *Vaccine.* vol. 22, no 27-28, p. 3658-3668.
- Lindblad, E. B. 2004. «Aluminium compounds for use in vaccines». *Immunol Cell Biol.* vol. 82, no 5, p. 497-505.
- Liu, F., I. Mboudjeka, S. Shen, T. H. Chou, S. Wang, T. M. Ross et S. Lu. 2004. «Independent but not synergistic enhancement to the immunogenicity of DNA vaccine expressing HIV-1 gp120 glycoprotein by codon optimization and C3d fusion in a mouse model». *Vaccine.* vol. 22, no 13-14, p. 1764-1772.
- Loemba, H. D., S. Mounir, H. Mardassi, D. Archambault et S. Dea. 1996. «Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Arch Virol.* vol. 141, no 3-4, p. 751-761.
- Lopez-Fuertes, L., E. Campos, N. Domenech, A. Ezquerro, J. M. Castro, J. Dominguez et F. Alonso. 2000. «Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages». *Virus Res.* vol. 69, no 1, p. 41-46.
- Lopez Fuertes, L., N. Domenech, B. Alvarez, A. Ezquerro, J. Dominguez, J. M. Castro et F. Alonso. 1999. «Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection». *Virus Res.* vol. 64, no 1, p. 33-42.
- Lopez, O. J., M. F. Oliveira, E. A. Garcia, B. J. Kwon, A. Doster et F. A. Osorio. 2007. «Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent». *Clin Vaccine Immunol.* vol. 14, no 3, p. 269-275.
- Loving, C. L., S. L. Brockmeier et R. E. Sacco. 2007. «Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus». *Immunology.* vol. 120, no 2, p. 217-229.
- Luo, Z., et Z. Chen. 2007. «Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis». *Plant Cell.* vol. 19, no 3, p. 943-958.

- Machesky, L. 1996. «Plasmid preparations with diatomaceous earth». *Methods Mol Biol.* vol. 58, p. 269-272.
- Macnab, R.M. 1996. «Flagella and Motility». In *In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology (Vol. 1)*, R. Curtiss, p. 123-145: ASM Press.
- Madsen, K. G., C. M. Hansen, E. S. Madsen, B. Strandbygaard, A. Bøtner et K. J. Sørensen. 1998. «Sequence analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus of the American type collected from Danish swine herds». *Archives of Virology.* vol. V143, no 9, p. 1683-1700.
- Mannhalter, J. W., H. O. Neychev, G. J. Zlabinger, R. Ahmad et M. M. Eibl. 1985. «Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation». *Clin Exp Immunol.* vol. 61, no 1, p. 143-151.
- Mardassi, H., P. Gonin, C. A. Gagnon, B. Massie et S. Dea. 1998. «A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form». *J Virol.* vol. 72, no 8, p. 6298-6306.
- Mardassi, H., B. Massie et S. Dea. 1996. «Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Virology.* vol. 221, no 1, p. 98-112.
- Mardassi, H., S. Mounir et S. Dea. 1995. «Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain». *Arch Virol.* vol. 140, no 8, p. 1405-1418.
- Mardassi, H., S. Mounir et S. Dea. 1995. «Structural gene analysis of a Quebec reference strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)». *Adv Exp Med Biol.* vol. 380, p. 277-281.
- Mardassi, H., L. Wilson, S. Mounir et S. Dea. 1994. «Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification». *J Clin Microbiol.* vol. 32, no 9, p. 2197-2203.
- Marillonnet, S., A. Giritich, M. Gils, R. Kandzia, V. Klimyuk et Y. Gleba. 2004. «In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by

- recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 101, no 18, p. 6852-6857.
- Mason, H. S., D. M. Lam et C. J. Arntzen. 1992. «Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 89, no 24, p. 11745-11749.
- Mateu, E., et I. Diaz. 2008. «The challenge of PRRS immunology». *Vet J.* vol. 177, no 3, p. 345-351.
- Mateu, E., I. Diaz, L. Darwich, J. Casal, M. Martin et J. Pujols. 2006. «Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005». *Virus Res.* vol. 115, no 2, p. 198-206.
- Mateu, E., M. Martin et D. Vidal. 2003. «Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain». *J Gen Virol.* vol. 84, no Pt 3, p. 529-534.
- Matoba, N., A. Magerus, B. C. Geyer, Y. Zhang, M. Muralidharan, A. Alfsen, C. J. Arntzen, M. Bomsel et T. S. Mor. 2004. «A mucosally targeted subunit vaccine candidate eliciting HIV-1 transcytosis-blocking Abs». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 101, no 37, p. 13584-13589.
- McClure, B. A., et T. Guilfoyle. 1989. «Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism». *Science.* vol. 243, p. 91-93.
- McClure, B. A., G. Hagen, C. S. Brown, M. A. Gee et T. J. Guilfoyle. 1989. «Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean». *Plant Cell.* vol. 1, no 2, p. 229-239.
- McDermott, P. F., F. Ciacci-Woolwine, J. A. Snipes et S. B. Mizel. 2000. «High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation». *Infect Immun.* vol. 68, no 10, p. 5525-5529.
- McDonald, W. F., J. W. Huleatt, H. G. Foellmer, D. Hewitt, J. Tang, P. Desai, A. Price, A. Jacobs, V. N. Takahashi, Y. Huang, V. Nakaar, L. Alexopoulou, E. Fikrig et T. J. Powell. 2007. «A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity». *J Infect Dis.* vol. 195, no 11, p. 1607-1617.

- McEwen, J., R. Levi, R. J. Horwitz et R. Arnon. 1992. «Synthetic recombinant vaccine expressing influenza haemagglutinin epitope in Salmonella flagellin leads to partial protection in mice». *Vaccine*. vol. 10, no 6, p. 405-411.
- McFarland, H. I., S. R. Nahill, J. W. Maciaszek et R. M. Welsh. 1992. «CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection». *J Immunol*. vol. 149, no 4, p. 1326-1333.
- McSorley, S. J., B. T. Cookson et M. K. Jenkins. 2000. «Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with Salmonella typhimurium». *J Immunol*. vol. 164, no 2, p. 986-993.
- Means, T. K., F. Hayashi, K. D. Smith, A. Aderem et A. D. Luster. 2003. «The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells». *J Immunol*. vol. 170, no 10, p. 5165-5175.
- Meier, W. Á., J. Galeota, F. A. Osorio, R. J. Husmann, W. M. Schnitzlein et F. A. Zuckermann. 2003. «Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination». *Virology*. vol. 309, no 1, p. 18-31.
- Meng, X. J. 2000. «Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development». *Veterinary Microbiology*. vol. 74, no 4, p. 309-329.
- Meng, X. J., P. S. Paul, P. G. Halbur et I. Morozov. 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*. vol. 76 (Pt 12), p. 3181-3188.
- Mengeling, W. L., K. M. Lager, A. C. Vorwald et K. J. Koehler. 2003. «Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vet Microbiol*. vol. 93, no 1, p. 13-24.
- Merrell, D. S., et S. Falkow. 2004. «Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis». *Nature*. vol. 430, no 6996, p. 250-256.
- Mett, V., J. Lyons, K. Musiychuk, J. A. Chichester, T. Brasil, R. Couch, R. Sherwood, G. A. Palmer, S. J. Streatfield et V. Yusibov. 2007. «A plant-produced plague

- vaccine candidate confers protection to monkeys». *Vaccine*. vol. 25, no 16, p. 3014-3017.
- Meulenberg, J. J., E. J. de Meijer et R. J. Moormann. 1993. «Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence». *J Gen Virol*. vol. 74 (Pt 8), p. 1697-1701.
- Meulenberg, J. J., M. M. Hulst, E. J. de Meijer, P. L. Moonen, A. den Besten, E. P. de Kluyver, G. Wensvoort et R. J. Moormann. 1993. «Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV». *Virology*. vol. 192, no 1, p. 62-72.
- Meulenberg, J. J., A. Petersen-den Besten, E. P. De Kluyver, R. J. Moormann, W. M. Schaaper et G. Wensvoort. 1995. «Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus». *Virology*. vol. 206, no 1, p. 155-163.
- Meulenberg, J. J., A. Petersen-den Besten, E. P. de Kluyver, R. J. Moormann, W. M. Schaaper et G. Wensvoort. 1995. «Characterization of structural proteins of Lelystad virus». *Adv Exp Med Biol*. vol. 380, p. 271-276.
- Meulenberg, J. J., A. Petersen den Besten, E. de Kluyver, A. van Nieuwstadt, G. Wensvoort et R. J. Moormann. 1997. «Molecular characterization of Lelystad virus». *Vet Microbiol*. vol. 55, no 1-4, p. 197-202.
- Meulenberg, J. J., A. P. van Nieuwstadt, A. van Essen-Zandbergen, J. N. Bos-de Ruijter, J. P. Langeveld et R. H. Meloen. 1998. «Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies». *Virology*. vol. 252, no 1, p. 106-114.
- Meza, T. J., D. Kamfjord, A. M. Hakelien, I. Evans, L. H. Godager, A. Mandal, K. S. Jakobsen et R. B. Aalen. 2001. «The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors». *Transgenic Res*. vol. 10, no 1, p. 53-67.
- Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller et A. Aderem. 2006. «Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf». *Nat Immunol*. vol. 7, no 6, p. 569-575.
- Miao, E. A., E. Andersen-Nissen, S. E. Warren et A. Aderem. 2007. «TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system». *Semin Immunopathol*. vol. 29, no 3, p. 275-288.

- Mizel, S. B., A. H. Graff, N. Sriranganathan, S. Ervin, C. J. Lees, M. O. Lively, R. R. Hantgan, M. J. Thomas, J. Wood et B. Bell. 2009. «Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates». *Clin Vaccine Immunol.* vol. 16, no 1, p. 21-28.
- Mizel, S. B., et J. A. Snipes. 2002. «Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5». *J Biol Chem.* vol. 277, no 25, p. 22414-22420.
- Mizel, S. B., A. P. West et R. R. Hantgan. 2003. «Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin». *J Biol Chem.* vol. 278, no 26, p. 23624-23629.
- Mizel, Steven B., et John T. Bates. 2010. «Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential». *J Immunol.* vol. 185, no 10, p. 5677-5682.
- Molenkamp, R., H. van Tol, B. C. Rozier, Y. van der Meer, W. J. Spaan et E. J. Snijder. 2000. «The arterivirus replicase is the only viral protein required for genome replication and subgenomic mRNA transcription». *J Gen Virol.* vol. 81, no Pt 10, p. 2491-2496.
- Molina, A., S. Hervas-Stubbs, H. Daniell, A. M. Mingo-Castel et J. Veramendi. 2004. «High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts». *Plant Biotechnol J.* vol. 2, no 2, p. 141-153.
- Molina, A., J. Veramendi et S. Hervas-Stubbs. 2005. «Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus». *Virology.* vol. 342, no 2, p. 266-275.
- Moore, K. W., P. Vieira, D. F. Fiorentino, M. L. Trunstin, T. A. Khan et T. R. Mosmann. 1990. «Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1». *Science.* vol. 248, no 4960, p. 1230-1234.
- Moors, M. A., L. Li et S. B. Mizel. 2001. «Activation of interleukin-1 receptor-associated kinase by gram-negative flagellin». *Infect Immun.* vol. 69, no 7, p. 4424-4429.
- Moravec, T., M. A. Schmidt, E. M. Herman et T. Woodford-Thomas. 2007. «Production of Escherichia coli heat labile toxin (LT) B subunit in soybean

- seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine». *Vaccine*. vol. 25, no 9, p. 1647-1657.
- Morozov, I., X. J. Meng et P. S. Paul. 1995. «Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Arch Virol*. vol. 140, no 7, p. 1313-1319.
- Mosca, F., E. Tritto, A. Muzzi, E. Monaci, F. Bagnoli, C. Iavarone, D. O'Hagan, R. Rappuoli et E. De Gregorio. 2008. «Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 105, no 30, p. 10501-10506.
- Murtaugh, M. P., M. R. Elam et L. T. Kakach. 1995. «Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus». *Arch Virol*. vol. 140, no 8, p. 1451-1460.
- Murthy, K. G., A. Deb, S. Goonesekera, C. Szabo et A. L. Salzman. 2004. «Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro». *J Biol Chem*. vol. 279, no 7, p. 5667-5675.
- Music, N., et C. A. Gagnon. 2010. «The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis». *Anim Health Res Rev*. vol. 11, no 2, p. 135-163.
- Musiychuk, K., N. Stephenson, H. Bi, C. E. Farrance, G. Orozovic, M. Brodelius, P. Brodelius, A. Horsey, N. Ugulava, A. M. Shamloul, V. Mett, S. Rabindran, S. J. Streatfield et V. Yusibov. 2007. «A launch vector for the production of vaccine antigens in plants». *Influenza Other Respi Viruses*. vol. 1, no 1, p. 19-25.
- Mutti, N. S., J. Louis, L. K. Pappan, K. Pappan, K. Begum, M. S. Chen, Y. Park, N. Dittmer, J. Marshall, J. C. Reese et G. R. Reeck. 2008. «A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 105, no 29, p. 9965-9969.
- Nelsen, C. J., M. P. Murtaugh et K. S. Faaberg. 1999. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents». *J Virol*. vol. 73, no 1, p. 270-280.

- Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings et D. A. Benfield. 1994. «Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus». *J Vet Diagn Invest.* vol. 6, no 4, p. 410-415.
- Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings, T. Drew, G. Wensvoort, J. E. Collins et D. A. Benfield. 1993. «Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies». *J Clin Microbiol.* vol. 31, no 12, p. 3184-3189.
- Newman, T. C., M. Ohme-Takagi, C. B. Taylor et P. J. Green. 1993. «DST sequences, highly conserved among plant SAUR genes, target reporter transcripts for rapid decay in tobacco». *Plant Cell.* vol. 5, no 6, p. 701-714.
- Nielsen, H. V., J. P. Christensen, E. C. Andersson, O. Marker et A. R. Thomsen. 1994. «Expression of type 3 complement receptor on activated CD8+ T cells facilitates homing to inflammatory sites». *J Immunol.* vol. 153, no 5, p. 2021-2028.
- Nochi, T., H. Takagi, Y. Yuki, L. Yang, T. Masumura, M. Mejima, U. Nakanishi, A. Matsumura, A. Uozumi, T. Hiroi, S. Morita, K. Tanaka, F. Takaiwa et H. Kiyono. 2007. «Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 104, no 26, p. 10986-10991.
- O'Hagan, D. T. 2004. «Recent developments in vaccine delivery systems». In *New Generation Vaccines*, 2nd, M. M. Levine, J.B. Kaper, R. Rappuoli, M. Lui et M.F. Good, p. 259-270. New York: Marcel Dekker.
- O'Keefe, B. R., F. Vojdani, V. Buffa, R. J. Shattock, D. C. Montefiori, J. Bakke, J. Mirsalis, A. L. d'Andrea, S. D. Hume, B. Bratcher, C. J. Saucedo, J. B. McMahon, G. P. Pogue et K. E. Palmer. 2009. «Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 106, no 15, p. 6099-6104.
- Oey, M., M. Lohse, L. B. Scharff, B. Kreikemeyer et R. Bock. 2009. «Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 106, no 16, p. 6579-6584.
- Ogra, P. L. 2000. «Mucosal immune response in the ear, nose and throat». *Pediatr Infect Dis J.* vol. 19, no 5 Suppl, p. S4-8.

- Ohme-Takagi, M., C. B. Taylor, T. C. Newman et P. J. Green. 1993. «The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 90, no 24, p. 11811-11815.
- Okugawa, S., S. Yanagimoto, K. Tsukada, T. Kitazawa, K. Koike, S. Kimura, H. Nagase, K. Hirai et Y. Ota. 2006. «Bacterial flagellin inhibits T cell receptor-mediated activation of T cells by inducing suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1)». *Cell Microbiol*. vol. 8, no 10, p. 1571-1580.
- Oleksiewicz, M. B., A. Botner et P. Normann. 2002. «Porcine B-cells recognize epitopes that are conserved between the structural proteins of American- and European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol*. vol. 83, no Pt 6, p. 1407-1418.
- Oleksiewicz, M. B., A. Botner, P. Toft, P. Normann et T. Storgaard. 2001. «Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes». *J Virol*. vol. 75, no 7, p. 3277-3290.
- Oleksiewicz, M. B., E. J. Snijder et P. Normann. 2004. «Phage display of the Equine arteritis virus nsp1 ZF domain and examination of its metal interactions». *J Virol Methods*. vol. 119, no 2, p. 159-169.
- Oliveira, F. M., A. F. Silva-Neto, C. A. Silva et C. M. Gontijo. 1998. «Coupling of palmitate to ovalbumin inhibits the induction of oral tolerance». *Braz J Med Biol Res*. vol. 31, no 11, p. 1421-1424.
- Osorio, F. A., J. A. Galeota, E. Nelson, B. Brodersen, A. Doster, R. Wills, F. Zuckermann et W. W. Laegreid. 2002. «Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity». *Virology*. vol. 302, no 1, p. 9-20.
- Ostrowski, M., J. A. Galeota, A. M. Jar, K. B. Platt, F. A. Osorio et O. J. Lopez. 2002. «Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain». *J Virol*. vol. 76, no 9, p. 4241-4250.
- Ott, G. 2001. «The adjuvant MF59: A ten year perspective». In *Vaccine Adjuvants: Preparation methods and research protocols*, D. O'Hagan, p. 211-228. Tomowa, New Jersey: Human Press.

- Pashine, A., N. M. Valiante et J. B. Ulmer. 2005. «Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants». *Nat Med.* vol. 11, no 4 Suppl, p. S63-68.
- Pasternak, A. O., W. J. Spaan et E. J. Snijder. 2006. «Nidovirus transcription: how to make sense...?». *J Gen Virol.* vol. 87, no Pt 6, p. 1403-1421.
- Patton, J. B., R. R. Rowland, D. Yoo et K. O. Chang. 2009. «Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages». *Virus Res.* vol. 140, no 1-2, p. 161-171.
- Pedersen, K. W., Y. van der Meer, N. Roos et E. J. Snijder. 1999. «Open reading frame 1a-encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum-derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex». *J Virol.* vol. 73, no 3, p. 2016-2026.
- Peltz, S. W., G. Brewer, P. Bernstein, P. A. Hart et J. Ross. 1991. «Regulation of mRNA turnover in eukaryotic cells». *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* vol. 1, no 2, p. 99-126.
- Pereira, C. M., B. E. Guth, M. E. Sbrogio-Almeida et B. A. Castilho. 2001. «Antibody response against Escherichia coli heat-stable enterotoxin expressed as fusions to flagellin». *Microbiology.* vol. 147, no Pt 4, p. 861-867.
- Pino, O., M. Martin et S. M. Michalek. 2005. «Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of Salmonella enterica Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses». *Infect Immun.* vol. 73, no 10, p. 6763-6770.
- Pirzadeh, B., et S. Dea. 1997. «Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants». *J Gen Virol.* vol. 78 (Pt 8), p. 1867-1873.
- Pirzadeh, B., et S. Dea. 1998. «Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol.* vol. 79 (Pt 5), p. 989-999.
- Plagemann, P. G. 2004. «GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus». *Virus Res.* vol. 102, no 2, p. 225-230.

- Plagemann, P. G., et V. Moennig. 1992. «Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses». *Adv Virus Res.* vol. 41, p. 99-192.
- Plagemann, P. G., R. R. Rowland et K. S. Faaberg. 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.* vol. 147, no 12, p. 2327-2347.
- Plagemann, P.G.W. 1996. «Lactate dehydrogenase elevating virus and related viruses». In *Fields Virology*, 3, B.N. Fields, D.M. Knipe et P.M. Howley, p. 1105-1120. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Plana Duran, J., I. Climent, J. Sarraseca, A. Urniza, E. Cortes, C. Vela et J. I. Casal. 1997. «Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection». *Virus Genes.* vol. 14, no 1, p. 19-29.
- Plebanski, M., M. Katsara, K. C. Sheng, S. D. Xiang et V. Apostolopoulos. 2010. «Methods to measure T-cell responses». *Expert Rev Vaccines.* vol. 9, no 6, p. 595-600.
- Plotkin, S. A. 2010. «Correlates of protection induced by vaccination». *Clin Vaccine Immunol.* vol. 17, no 7, p. 1055-1065.
- Qiu, H. J., Z. J. Tian, G. Z. Tong, Y. J. Zhou, J. Q. Ni, Y. Z. Luo et X. H. Cai. 2005. «Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 106, no 3-4, p. 309-319.
- Ramon, G. 1924. «Sur la toxine et surranatoxine diphtheriques.». *Ann. Inst. Pasteur.* vol. 38, p. 1.
- Reed, S. G., S. Bertholet, R. N. Coler et M. Friede. 2009. «New horizons in adjuvants for vaccine development». *Trends Immunol.* vol. 30, no 1, p. 23-32.
- Reggi, S., S. Marchetti, T. Patti, F. De Amicis, R. Cariati, B. Bembi et C. Fogher. 2005. «Recombinant human acid beta-glucosidase stored in tobacco seed is stable, active and taken up by human fibroblasts». *Plant Mol Biol.* vol. 57, no 1, p. 101-113.

- Reitter, J. N., et R. C. Desrosiers. 1998. «Identification of replication-competent strains of simian immunodeficiency virus lacking multiple attachment sites for N-linked carbohydrates in variable regions 1 and 2 of the surface envelope protein». *J Virol.* vol. 72, no 7, p. 5399-5407.
- Restrepo, M. A., D. D. Freed et J. C. Carrington. 1990. «Nuclear transport of plant potyviral proteins». *Plant Cell.* vol. 2, no 10, p. 987-998.
- Rhee, S. H., A. C. Keates, M. P. Moyer et C. Pothoulakis. 2004. «MEK is a key modulator for TLR5-induced interleukin-8 and MIP3alpha gene expression in non-transformed human colonic epithelial cells». *J Biol Chem.* vol. 279, no 24, p. 25179-25188.
- Richter, L. J., Y. Thanavala, C. J. Arntzen et H. S. Mason. 2000. «Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization». *Nat Biotechnol.* vol. 18, no 11, p. 1167-1171.
- Rigano, M. M., S. Dreitz, A. P. Kipnis, A. A. Izzo et A. M. Walmsley. 2006. «Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine». *Vaccine.* vol. 24, no 5, p. 691-695.
- Rodríguez-Narciso, César, Mayra Pérez-Tapia, Rosa Rangel-Cano, Celio Silva, Mariana Meckes-Fisher, Rafael Salgado-Garciglia, Sergio Estrada-Parra, Rodolfo López-Gómez et Iris Estrada-García. 2011. «Expression of *Mycobacterium leprae* HSP65 in tobacco and its effectiveness as an oral treatment in adjuvant-induced arthritis». *Transgenic Res.* vol. 20, no 2, p. 221-229.
- Rodriguez, M. J., J. Sarraseca, J. Garcia, A. Sanz, J. Plana-Duran et J. Ignacio Casal. 1997. «Epitope mapping of the nucleocapsid protein of European and North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol.* vol. 78 (Pt 9), p. 2269-2278.
- Rosales-Mendoza, S., R. E. Soria-Guerra, R. Lopez-Revilla, L. Moreno-Fierros et A. G. Alpuche-Solis. 2008. «Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge». *Plant Cell Rep.* vol. 27, no 1, p. 79-84.
- Rowland, R. R., R. Kervin, C. Kuckleburg, A. Sperlich et D. A. Benfield. 1999. «The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a

- potential nucleolar localization signal sequence». *Virus Res.* vol. 64, no 1, p. 1-12.
- Rowland, R. R., M. Steffen, T. Ackerman et D. A. Benfield. 1999. «The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332». *Virology.* vol. 259, no 2, p. 262-266.
- Royae, A. R., R. J. Husmann, H. D. Dawson, G. Calzada-Nova, W. M. Schnitzlein, F. A. Zuckermann et J. K. Lunney. 2004. «Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 102, no 3, p. 199-216.
- Ruhlman, T., R. Ahangari, A. Devine, M. Samsam et H. Daniell. 2007. «Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts--oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice». *Plant Biotechnol J.* vol. 5, no 4, p. 495-510.
- Saif, L. J. 1999. «Comparative pathogenesis of enteric viral infections of swine». *Adv Exp Med Biol.* vol. 473, p. 47-59.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis et H. A. Erlich. 1988. «Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase». *Science.* vol. 239, no 4839, p. 487-491.
- Salman, H. H., J. M. Irache et C. Gamazo. 2009. «Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination». *Vaccine.* vol. 27, no 35, p. 4784-4790.
- Samac, D. A., et S. Austin-Phillips. 2006. «Alfalfa (*Medicago sativa* L.)». *Methods Mol Biol.* vol. 343, p. 301-311.
- Sanders, C. J., Y. Yu, D. A. Moore, 3rd, I. R. Williams et A. T. Gewirtz. 2006. «Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity». *J Immunol.* vol. 177, no 5, p. 2810-2818.
- Sandhu, J. S., S. F. Krasnyanski, L. L. Domier, S. S. Korban, M. D. Osadjan et D. E. Buetow. 2000. «Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response». *Transgenic Res.* vol. 9, no 2, p. 127-135.

- Santi, L., L. Batchelor, Z. Huang, B. Hjelm, J. Kilbourne, C. J. Arntzen, Q. Chen et H. S. Mason. 2008. «An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles». *Vaccine*. vol. 26, no 15, p. 1846-1854.
- Santi, L., A. Giritch, C. J. Roy, S. Marillonnet, V. Klimyuk, Y. Gleba, R. Webb, C. J. Arntzen et H. S. Mason. 2006. «Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system». *Proc Natl Acad Sci USA*. vol. 103, no 4, p. 861-866.
- Sarti, F., G. Perera, F. Hintzen, K. Kotti, V. Karageorgiou, O. Kammona, C. Kiparissides et A. Bernkop-Schnurch. 2011. «In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A». *Biomaterials*. vol. 32, no 16, p. 4052-4057.
- Sawicki, S. G., et D. L. Sawicki. 1995. «Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands». *Adv Exp Med Biol*. vol. 380, p. 499-506.
- Sawicki, S. G., D. L. Sawicki et S. G. Siddell. 2007. «A contemporary view of coronavirus transcription». *J Virol*. vol. 81, no 1, p. 20-29.
- Schubert, D., B. Lechtenberg, A. Forsbach, M. Gils, S. Bahadur et R. Schmidt. 2004. «Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects». *Plant Cell*. vol. 16, no 10, p. 2561-2572.
- Schwarz, K., T. Storni, V. Manolova, A. Didierlaurent, J. C. Sirard, P. Rothlisberger et M. F. Bachmann. 2003. «Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses». *Eur J Immunol*. vol. 33, no 6, p. 1465-1470.
- Shah, J. A., P. A. Darrah, D. K. Ambrozak, T. N. Turon, S. Mendez, J. Kirman, C. Y. Wu, N. Glaichenhaus et R. A. Seder. 2003. «Dendritic cells are responsible for the capacity of CpG oligodeoxynucleotides to act as an adjuvant for protective vaccine immunity against *Leishmania major* in mice». *Journal of Experimental Medicine*. vol. 198, no 2, p. 281-291.
- Shanmukhappa, K., J. K. Kim et S. Kapil. 2007. «Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection». *Virol J*. vol. 4, p. 62.

- Shao, H. B., D. M. He, K. X. Qian, G. F. Shen et Z. L. Su. 2008. «The expression of classical swine fever virus structural protein E2 gene in tobacco chloroplasts for applying chloroplasts as bioreactors». *C R Biol.* vol. 331, no 3, p. 179-184.
- Shoji, Y., J. A. Chichester, H. Bi, K. Musiyuchuk, P. de la Rosa, L. Goldschmidt, A. Horsey, N. Ugulava, G. A. Palmer, V. Mett et V. Yusibov. 2008. «Plant-expressed HA as a seasonal influenza vaccine candidate». *Vaccine.* vol. 26, no 23, p. 2930-2934.
- Siegrist, C.A. (2008). Vaccine immunology. In *Vaccines*. S.A. Plotkin, W.A. Orenstein et P.A. Offit. Philadelphia, PA, Elsevier Inc: 17-36 p
- Silin, D. S., O. V. Lyubomska, V. Jirathitikal et A. S. Bourinbaiar. 2007. «Oral vaccination: where we are?». *Expert Opin Drug Deliv.* vol. 4, no 4, p. 323-340.
- Sincock, P. M., S. Fitter, R. G. Parton, M. C. Berndt, J. R. Gamble et L. K. Ashman. 1999. «PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function». *J Cell Sci.* vol. 112 (Pt 6), p. 833-844.
- Sipos, W., C. Duvigneau, P. Pietschmann, K. Holler, R. Hartl, K. Wahl, R. Steinborn, M. Gemeiner, M. Willheim et F. Schmoll. 2003. «Parameters of humoral and cellular immunity following vaccination of pigs with a European modified-live strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)». *Viral Immunol.* vol. 16, no 3, p. 335-346.
- Skehel, J. J., D. J. Stevens, R. S. Daniels, A. R. Douglas, M. Knossow, I. A. Wilson et D. C. Wiley. 1984. «A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 81, no 6, p. 1779-1783.
- Skidmore, S. 2002. «Overview of Hepatitis E Virus». *Curr Infect Dis Rep.* vol. 4, no 2, p. 118-123.
- Snijder, E. J. 1998. «The arterivirus replicase. The road from RNA to protein(s), and back again». *Adv Exp Med Biol.* vol. 440, p. 97-108.
- Snijder, E. J., J. C. Dobbe et W. J. Spaan. 2003. «Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity». *J Virol.* vol. 77, no 1, p. 97-104.

- Snijder, E. J., et J. J. Meulenberg. 1998. «The molecular biology of arteriviruses». *J Gen Virol.* vol. 79 (Pt 5), p. 961-979.
- Snijder, E. J., H. van Tol, K. W. Pedersen, M. J. Raamsman et A. A. de Vries. 1999. «Identification of a novel structural protein of arteriviruses». *J Virol.* vol. 73, no 8, p. 6335-6345.
- Snijder, E. J., H. van Tol, N. Roos et K. W. Pedersen. 2001. «Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex». *J Gen Virol.* vol. 82, no Pt 5, p. 985-994.
- Snijder, E. J., A. L. Wassenaar et W. J. Spaan. 1993. «Proteolytic processing of the N-terminal region of the equine arteritis virus replicase». *Adv Exp Med Biol.* vol. 342, p. 227-232.
- Snijder, E. J., A. L. Wassenaar et W. J. Spaan. 1994. «Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus». *J Virol.* vol. 68, no 9, p. 5755-5764.
- Snijder, E. J., A. L. Wassenaar, W. J. Spaan et A. E. Gorbalenya. 1995. «The arterivirus Nsp2 protease. An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases». *J Biol Chem.* vol. 270, no 28, p. 16671-16676.
- Snijder, E., A. L. Wassenaar, J. A. Den Boon et W. J. Spaan. 1995. «Proteolytic processing of the arterivirus replicase». *Adv Exp Med Biol.* vol. 380, p. 443-451.
- Song, C., R. Lu, D. Bienzle, H. C. Liu et D. Yoo. 2009. «Interaction of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein with the inhibitor of MyoD family-a domain-containing protein». *Biol Chem.* vol. 390, no 3, p. 215-223.
- Song, L., Y. Zhang, N. E. Yun, A. L. Poussard, J. N. Smith, J. K. Smith, V. Borisevich, J. J. Linde, M. A. Zacks, H. Li, U. Kavita, L. Reiserova, X. Liu, K. Dumuren, B. Balasubramanian, B. Weaver, J. Parent, S. Umlauf, G. Liu, J. Huleatt, L. Tussey et S. Paessler. 2009. «Superior efficacy of a recombinant flagellin:H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin». *Vaccine.* vol. 27, no 42, p. 5875-5884.

- Spaan, W., H. Delius, M. Skinner, J. Armstrong, P. Rottier, S. Smeekens, B. A. van der Zeijst et S. G. Siddell. 1983. «Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences». *Embo J.* vol. 2, no 10, p. 1839-1844.
- Spilman, Michael S., Craig Welbon, Eric Nelson et Terje Dokland. 2009. «Cryo-electron tomography of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: organization of the nucleocapsid». vol. 90, no 3, p. 527-535.
- Springer, T., G. Galfre, D. S. Secher et C. Milstein. 1979. «Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody». *Eur J Immunol.* vol. 9, no 4, p. 301-306.
- Stadejek, T., M. B. Oleksiewicz, D. Potapchuk et K. Podgorska. 2006. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes». *J Gen Virol.* vol. 87, no Pt 7, p. 1835-1841.
- Stadejek, T., A. Stankevicius, T. Storgaard, M. B. Oleksiewicz, S. Belak, T. W. Drew et Z. Pejsak. 2002. «Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses». *J Gen Virol.* vol. 83, no Pt 8, p. 1861-1873.
- Stano, Armando, André J. van der Vlies, Mikael M. Martino, Melody A. Swartz, Jeffrey A. Hubbell et Eleonora Simeoni. 2011. «PPS nanoparticles as versatile delivery system to induce systemic and broad mucosal immunity after intranasal administration». *Vaccine.* vol. 29, no 4, p. 804-812.
- Strandskog, G., T. Ellingsen et J. B. Jorgensen. 2007. «Characterization of three distinct CpG oligonucleotide classes which differ in ability to induce IFN alpha/beta activity and cell proliferation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leukocytes». *Dev Comp Immunol.* vol. 31, no 1, p. 39-51.
- Strasser, R., J. Stadlmann, M. Schahs, G. Stiegler, H. Quendler, L. Mach, J. Glossl, K. Weterings, M. Pabst et H. Steinkellner. 2008. «Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure». *Plant Biotechnol J.* vol. 6, no 4, p. 392-402.
- Strindeliuss, L., M. Filler et I. Sjöholm. 2004. «Mucosal immunization with purified flagellin from *Salmonella* induces systemic and mucosal immune responses in C3H/HeJ mice». *Vaccine.* vol. 22, no 27-28, p. 3797-3808.

- Suarez, P., M. Diaz-Guerra, C. Prieto, M. Esteban, J. M. Castro, A. Nieto et J. Ortin. 1996. «Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis». *J Virol.* vol. 70, no 5, p. 2876-2882.
- Suarez, P., R. Zardoya, M. J. Martin, C. Prieto, J. Dopazo, A. Solana et J. M. Castro. 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.* vol. 42, no 1-2, p. 159-165.
- Sun, J. B., C. Czerkinsky et J. Holmgren. 2010. «Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit». *Scand J Immunol.* vol. 71, no 1, p. 1-11.
- Sur, J. H., V. L. Cooper, J. A. Galeota, R. A. Hesse, A. R. Doster et F. A. Osorio. 1996. «In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection». *J Clin Microbiol.* vol. 34, no 9, p. 2280-2286.
- Suradhat, S., et R. Thanawongnuwech. 2003. «Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol.* vol. 84, no Pt 10, p. 2755-2760.
- Suradhat, S., R. Thanawongnuwech et Y. Poovorawan. 2003. «Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol.* vol. 84, no Pt 2, p. 453-459.
- Surzycki, R., K. Greenham, K. Kitayama, F. Dibal, R. Wagner, J. D. Rochaix, T. Ajam et S. Surzycki. 2009. «Factors effecting expression of vaccines in microalgae». *Biologicals.* vol. 37, no 3, p. 133-138.
- Szymanski, C. M., S. M. Logan, D. Linton et B. W. Wren. 2003. «Campylobacter--a tale of two protein glycosylation systems». *Trends Microbiol.* vol. 11, no 5, p. 233-238.
- Tacket, C. O., H. S. Mason, G. Losonsky, J. D. Clements, M. M. Levine et C. J. Arntzen. 1998. «Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato». *Nat Med.* vol. 4, no 5, p. 607-609.

- Takai, R., A. Isogai, S. Takayama et F. S. Che. 2008. «Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice». *Mol Plant Microbe Interact.* vol. 21, no 12, p. 1635-1642.
- Takakura, Y., F. S. Che, Y. Ishida, F. Tsutsumi, K. Kurotani, S. Usami, A. Isogai et H. Imaseki. 2008. «Expression of a bacterial flagellin gene triggers plant immune responses and confers disease resistance in transgenic rice plants». *Mol Plant Pathol.* vol. 9, no 4, p. 525-529.
- Thanavala, Y., M. Mahoney, S. Pal, A. Scott, L. Richter, N. Natarajan, P. Goodwin, C. J. Arntzen et H. S. Mason. 2005. «Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 102, no 9, p. 3378-3382.
- Thanawongnuwech, R., A. Amonsin, A. Tatsanakit et S. Damrongwatanapokin. 2004. «Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand». *Vet Microbiol.* vol. 101, no 1, p. 9-21.
- Tian, K., X. Yu, T. Zhao, Y. Feng, Z. Cao, C. Wang, Y. Hu, X. Chen, D. Hu, X. Tian, D. Liu, S. Zhang, X. Deng, Y. Ding, L. Yang, Y. Zhang, H. Xiao, M. Qiao, B. Wang, L. Hou, X. Wang, X. Yang, L. Kang, M. Sun, P. Jin, S. Wang, Y. Kitamura, J. Yan et G. F. Gao. 2007. «Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark». *PLoS One.* vol. 2, no 6, p. e526.
- Tijms, M. A., D. D. Nedialkova, J. C. Zevenhoven-Dobbe, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 2007. «Arterivirus subgenomic mRNA synthesis and virion biogenesis depend on the multifunctional nsp1 autoprotease». *J Virol.* vol. 81, no 19, p. 10496-10505.
- Tijms, M. A., et E. J. Snijder. 2003. «Equine arteritis virus non-structural protein 1, an essential factor for viral subgenomic mRNA synthesis, interacts with the cellular transcription co-factor p100». *J Gen Virol.* vol. 84, no Pt 9, p. 2317-2322.
- Tijms, M. A., L. C. van Dinten, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 2001. «A zinc finger-containing papain-like protease couples subgenomic mRNA synthesis to genome translation in a positive-stranded RNA virus». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 98, no 4, p. 1889-1894.

- Tincer, G., S. Yerlikaya, F. C. Yagci, T. Kahraman, O. M. Atanur, O. Erbatur et I. Gursel. 2011. «Immunostimulatory activity of polysaccharide-poly(I:C) nanoparticles». *Biomaterials*. vol. 32, no 18, p. 4275-4282.
- Treisman, R. 1985. «Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences». *Cell*. vol. 42, no 3, p. 889-902.
- Tsujimoto, H., T. Uchida, P. A. Efron, P. O. Scumpia, A. Verma, T. Matsumoto, S. K. Tschoeke, R. F. Ungaro, S. Ono, S. Seki, M. J. Clare-Salzler, H. V. Baker, H. Mochizuki, R. Ramphal et L. L. Moldawer. 2005. «Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions». *J Leukoc Biol*. vol. 78, no 4, p. 888-897.
- van Aken, D., W. E. Benckhuijsen, J. W. Drijfhout, A. L. Wassenaar, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 2006. «Expression, purification, and in vitro activity of an arterivirus main proteinase». *Virus Res*. vol. 120, no 1-2, p. 97-106.
- van Aken, D., E. J. Snijder et A. E. Gorbalenya. 2006. «Mutagenesis analysis of the nsp4 main proteinase reveals determinants of arterivirus replicase polyprotein autoprocessing». *J Virol*. vol. 80, no 7, p. 3428-3437.
- van Aken, D., J. Zevenhoven-Dobbe, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 2006. «Proteolytic maturation of replicase polyprotein ppla by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7». *J Gen Virol*. vol. 87, no Pt 12, p. 3473-3482.
- van Dinten, L. C., J. A. den Boon, A. L. Wassenaar, W. J. Spaan et E. J. Snijder. 1997. «An infectious arterivirus cDNA clone: identification of a replicase point mutation that abolishes discontinuous mRNA transcription». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 94, no 3, p. 991-996.
- van Dinten, L. C., S. Rensen, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 1999. «Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication». *J Virol*. vol. 73, no 3, p. 2027-2037.
- van Dinten, L. C., H. van Tol, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 2000. «The predicted metal-binding region of the arterivirus helicase protein is involved in subgenomic mRNA synthesis, genome replication, and virion biogenesis». *J Virol*. vol. 74, no 11, p. 5213-5223.

- van Dinten, L. C., A. L. Wassenaar, A. E. Gorbalenya, W. J. Spaan et E. J. Snijder. 1996. «Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains». *J Virol.* vol. 70, no 10, p. 6625-6633.
- van Gorp, H., W. van Breedam, P. L. Delputte et H. J. Nauwynck. 2008. «Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Gen Virol.* vol. 89, no Pt 12, p. 2943-2953.
- van Marle, G., L. C. van Dinten, W. J. Spaan, W. Luytjes et E. J. Snijder. 1999. «Characterization of an equine arteritis virus replicase mutant defective in subgenomic mRNA synthesis». *J Virol.* vol. 73, no 7, p. 5274-5281.
- van Nieuwstadt, A. P., J. J. Meulenberg, A. van Essen-Zanbergen, A. Petersen-den Besten, R. J. Bende, R. J. Moormann et G. Wensvoort. 1996. «Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion». *J Virol.* vol. 70, no 7, p. 4767-4772.
- Van Reeth, K., G. Labarque, H. Nauwynck et M. Pensaert. 1999. «Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity». *Res Vet Sci.* vol. 67, no 1, p. 47-52.
- Vandepapelière, P., Y. Horsmans, P. Moris, M. Van Mechelen, M. Janssens, M. Koutsoukos, P. Van Belle, F. Clement, E. Hanon, M. Wettendorff, N. Garçon et G. Leroux-Roels. 2008. «Vaccine Adjuvant Systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers». *Vaccine.* vol. 26, no 10, p. 1375-1386.
- Vanderheijden, N., P. L. Delputte, H. W. Favoreel, J. Vandekerckhove, J. Van Damme, P. A. van Woensel et H. J. Nauwynck. 2003. «Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages». *J Virol.* vol. 77, no 15, p. 8207-8215.
- Varshney, Grish C., W. Mahana, A. M. Filloux, A. Venien et A. Paraf. 1991. «Structure of Native and Heat-denatured Ovalbumin as Revealed by Monoclonal Antibodies: Epitopic Changes during Heat Treatment». *Journal of Food Science.* vol. 56, no 1, p. 224-227.

- Vassilieva, Elena V., Bao-Zhong Wang, Andrei N. Vzorov, Li Wang, Ying-Chun Wang, Jadranka Bozja, Rui Xu et Richard W. Compans. 2011. «Enhanced Mucosal Immune Responses to HIV Virus-Like Particles Containing a Membrane-Anchored Adjuvant». *mBio*. vol. 2, no 1.
- Verheije, M. H., T. J. Welting, H. T. Jansen, P. J. Rottier et J. J. Meulenberg. 2002. «Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting». *Virology*. vol. 303, no 2, p. 364-373.
- Verma, D., et H. Daniell. 2007. «Chloroplast vector systems for biotechnology applications». *Plant Physiol*. vol. 145, no 4, p. 1129-1143.
- Verthelyi, Daniela. 2006. «Adjuvant Properties of CpG Oligonucleotides in Primates». In *DNA Vaccines Methods and Protocols*, 2nd, W.M. Saltzman, H. Shen et J.L. Brandsma, p. 139-158. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Vezina, L. P., L. Faye, P. Lerouge, M. A. D'Aoust, E. Marquet-Blouin, C. Burel, P. O. Lavoie, M. Bardor et V. Gomord. 2009. «Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants». *Plant Biotechnol J*. vol. 7, no 5, p. 442-455.
- Vezina, S. A., H. Loemba, M. Fournier, S. Dea et D. Archambault. 1996. «Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Can J Vet Res*. vol. 60, no 2, p. 94-99.
- Vicente-Suarez, I., J. Brayer, A. Villagra, F. Cheng et E. M. Sotomayor. 2009. «TLR5 ligation by flagellin converts tolerogenic dendritic cells into activating antigen-presenting cells that preferentially induce T-helper 1 responses». *Immunol Lett*. vol. 125, no 2, p. 114-118.
- Voinnet, O., S. Rivas, P. Mestre et D. Baulcombe. 2003. «An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus». *Plant J*. vol. 33, no 5, p. 949-956.
- Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu et K. Shortman. 1992. «The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells». *J Exp Med*. vol. 176, no 1, p. 47-58.

- Wang, H. B., et P. F. Weller. 2008. «Pivotal advance: Eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production». *J Leukoc Biol.* vol. 83, no 4, p. 817-821.
- Wang, M. B., et P. M. Waterhouse. 2000. «High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation». *Plant Mol Biol.* vol. 43, no 1, p. 67-82.
- Wang, S., L. Fang, H. Fan, Y. Jiang, Y. Pan, R. Luo, Q. Zhao, H. Chen et S. Xiao. 2007. «Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vaccine.* vol. 25, no 49, p. 8220-8227.
- Wang, X., M. Eaton, M. Mayer, H. Li, D. He, E. Nelson et J. Christopher-Hennings. 2007. «Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability». *Arch Virol.* vol. 152, no 2, p. 289-303.
- Wang, X., J. Li, P. Jiang, Y. Li, B. Zeshan et J. Cao. 2009. «GM-CSF fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus increased the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge». *Virus Res.* vol. 143, no 1, p. 24-32.
- Wassenaar, A. L., W. J. Spaan, A. E. Gorbalenya et E. J. Snijder. 1997. «Alternative proteolytic processing of the arterivirus replicase ORF1a polyprotein: evidence that NSP2 acts as a cofactor for the NSP4 serine protease». *J Virol.* vol. 71, no 12, p. 9313-9322.
- Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong et G. M. Shaw. 2003. «Antibody neutralization and escape by HIV-1». *Nature.* vol. 422, no 6929, p. 307-312.
- Weigel, D. Glazebrook, J. 2002. «In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*». In *Arabidopsis: A laboratory manual*, 1st edition, p. 129-140. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Weiland, E., M. Wiczorek-Krohmer, D. Kohl, K. K. Conzelmann et F. Weiland. 1999. «Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4». *Vet Microbiol.* vol. 66, no 3, p. 171-186.

- Weimer, E. T., S. E. Ervin, D. J. Wozniak et S. B. Mizel. 2009. «Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*». *Vaccine*. vol. 27, no 48, p. 6762-6769.
- Welch, S. K., R. Jolie, D. S. Pearce, W. D. Koertje, E. Fuog, S. L. Shields, D. Yoo et J. G. Calvert. 2004. «Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates». *Vet Immunol Immunopathol*. vol. 102, no 3, p. 277-290.
- Wensvoort, G., E. P. de Kluyver, J. M. Pol, F. Wagenaar, R. J. Moormann, M. M. Hulst, R. Bloemraad, A. den Besten, T. Zetstra et C. Terpstra. 1992. «Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad». *Vet Microbiol*. vol. 33, no 1-4, p. 185-193.
- Wensvoort, G., C. Terpstra, J. M. Pol, E. A. ter Laak, M. Bloemraad, E. P. de Kluyver, C. Kragten, L. van Buiten, A. den Besten, F. Wagenaar et et al. 1991. «Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus». *Vet Q*. vol. 13, no 3, p. 121-130.
- Wieringa, R., A. A. de Vries, M. J. Raamsman et P. J. Rottier. 2002. «Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus». *J Virol*. vol. 76, no 21, p. 10829-10840.
- Wissink, E. H., M. V. Kroese, J. G. Maneschijn-Bonsing, J. J. Meulenberg, P. A. van Rijn, F. A. Rijsewijk et P. J. Rottier. 2004. «Significance of the oligosaccharides of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoproteins GP2a and GP5 for infectious virus production». *J Gen Virol*. vol. 85, no Pt 12, p. 3715-3723.
- Wissink, E. H., M. V. Kroese, H. A. van Wijk, F. A. Rijsewijk, J. J. Meulenberg et P. J. Rottier. 2005. «Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *J Virol*. vol. 79, no 19, p. 12495-12506.
- Wissink, E. H., H. A. van Wijk, M. V. Kroese, E. Weiland, J. J. Meulenberg, P. J. Rottier et P. A. van Rijn. 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*. vol. 84, no Pt 6, p. 1535-1543.

- Wootton, S. K., E. A. Nelson et D. Yoo. 1998. «Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Clin Diagn Lab Immunol.* vol. 5, no 6, p. 773-779.
- Wootton, S. K., R. R. Rowland et D. Yoo. 2002. «Phosphorylation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein». *J Virol.* vol. 76, no 20, p. 10569-10576.
- Wootton, S. K., et D. Yoo. 2003. «Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages». *J Virol.* vol. 77, no 8, p. 4546-4557.
- Wu, W. H., Y. Fang, R. Farwell, M. Steffen-Bien, R. R. Rowland, J. Christopher-Hennings et E. A. Nelson. 2001. «A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b». *Virology.* vol. 287, no 1, p. 183-191.
- Wu, X. L., W. C. Hou, M. M. Wang, X. P. Zhu, F. Li, J. D. Zhang, X. Z. Li et X. Q. Guo. 2008. «RNA silencing-mediated resistance is related to biotic / abiotic stresses and cellular RdRp expression in transgenic tobacco plants». *BMB Rep.* vol. 41, no 5, p. 376-381.
- Xue, Q., Y. G. Zhao, Y. J. Zhou, H. J. Qiu, Y. F. Wang, D. L. Wu, Z. J. Tian et G. Z. Tong. 2004. «Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFN γ ». *Vet Immunol Immunopathol.* vol. 102, no 3, p. 291-298.
- Yang, L., M. L. Frey, K. J. Yoon, J. J. Zimmerman et K. B. Platt. 2000. «Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization». *Arch Virol.* vol. 145, no 8, p. 1599-1619.
- Yang, S. X., J. Kwang et W. Laegreid. 1998. «Comparative sequence analysis of open reading frames 2 to 7 of the modified live vaccine virus and other North American isolates of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Arch Virol.* vol. 143, no 3, p. 601-612.
- Yonekura, K., S. Maki-Yonekura et K. Namba. 2003. «Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy». *Nature.* vol. 424, no 6949, p. 643-650.

- Yoon, I. J., H. S. Joo, W. T. Christianson, H. S. Kim, J. E. Collins, R. B. Morrison et G. D. Dial. 1992. «An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera». *J Vet Diagn Invest.* vol. 4, no 2, p. 144-147.
- Yoon, I. J., H. S. Joo, S. M. Goyal et T. W. Molitor. 1994. «A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera». *J Vet Diagn Invest.* vol. 6, no 3, p. 289-292.
- Yoon, K. J., L. L. Wu, J. J. Zimmerman, H. T. Hill et K. B. Platt. 1996. «Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs». *Viral Immunol.* vol. 9, no 1, p. 51-63.
- Yoon, K. J., L. L. Wu, J. J. Zimmerman et K. B. Platt. 1997. «Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection». *Vet Microbiol.* vol. 55, no 1-4, p. 277-287.
- Yoon, K. J., J. J. Zimmerman, S. L. Swenson, M. J. McGinley, K. A. Eernisse, A. Brevik, L. L. Rhinehart, M. L. Frey, H. T. Hill et K. B. Platt. 1995. «Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection». *J Vet Diagn Invest.* vol. 7, no 3, p. 305-312.
- Yuan, S., M. P. Murtaugh et K. S. Faaberg. 2000. «Heteroclite subgenomic RNAs are produced in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection». *Virology.* vol. 275, no 1, p. 158-169.
- Yuan, S., M. P. Murtaugh, F. A. Schumann, D. Mickelson et K. S. Faaberg. 2004. «Characterization of heteroclite subgenomic RNAs associated with PRRSV infection». *Virus Res.* vol. 105, no 1, p. 75-87.
- Yusibov, V., et S. Rabindran. 2008. «Recent progress in the development of plant derived vaccines». *Expert Rev Vaccines.* vol. 7, no 8, p. 1173-1183.
- Zeng, L., E. K. Godeny, S. L. Methven et M. A. Brinton. 1995. «Analysis of simian hemorrhagic fever virus (SHFV) subgenomic RNAs, junction sequences, and 5' leader». *Virology.* vol. 207, no 2, p. 543-548.

- Zhang, X., N. A. Buehner, A. M. Hutson, M. K. Estes et H. S. Mason. 2006. «Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein». *Plant Biotechnol J.* vol. 4, no 4, p. 419-432.
- Zhang, X., et H. Mason. 2006. «Bean Yellow Dwarf Virus replicons for high-level transgene expression in transgenic plants and cell cultures». *Biotechnol Bioeng.* vol. 93, no 2, p. 271-279.
- Zhang, Y., R. D. Sharma et P. S. Paul. 1998. «Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Vet Microbiol.* vol. 63, no 2-4, p. 125-136.
- Zheng, Q., D. Chen, P. Li, Z. Bi, R. Cao, B. Zhou et P. Chen. 2007. «Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)». *Virus Genes.* vol. 35, no 3, p. 585-595.
- Zhou, F., J. A. Badillo-Corona, D. Karcher, N. Gonzalez-Rabade, K. Piepenburg, A. M. Borchers, A. P. Maloney, T. A. Kavanagh, J. C. Gray et R. Bock. 2008. «High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes». *Plant Biotechnol J.*
- Zhou, Y. J., T. Q. An, Y. X. He, J. X. Liu, H. J. Qiu, Y. F. Wang et G. Tong. 2006. «Antigenic structure analysis of glycosylated protein 3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus». *Virus Res.* vol. 118, no 1-2, p. 98-104.
- Zhou, Y. X., M. Y. Lee, J. M. Ng, M. L. Chye, W. K. Yip, S. Y. Zee et E. Lam. 2006. «A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice». *World J Gastroenterol.* vol. 12, no 2, p. 306-312.
- Ziebuhr, J., E. J. Snijder et A. E. Gorbalenya. 2000. «Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales». *J Gen Virol.* vol. 81, no Pt 4, p. 853-879.