



Développement et caractérisation d'un modèle d'infection non lytique de cellules de Leydig par le virus de l'Artérite Virale Equine

Lydie Martin

► To cite this version:

Lydie Martin. Développement et caractérisation d'un modèle d'infection non lytique de cellules de Leydig par le virus de l'Artérite Virale Equine. Biologie animale. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC201 . tel-02476809

HAL Id: tel-02476809

<https://theses.hal.science/tel-02476809>

Submitted on 13 Feb 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Développement et caractérisation d'un modèle d'infection non lytique de cellules de Leydig par le virus de l'Artérite Virale Équine

**Présentée et soutenue par
Lydie MARTIN**

Thèse soutenue publiquement le 12/02/2018 devant le jury composé de		
Monsieur Stéphane BERTAGNOLI	Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse	Rapporteur
Monsieur Michel SAMSON	Directeur de recherche, INSERM, Université de Rennes 1	Rapporteur
Madame Astrid VABRET	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Examineur
Madame Nathalie DEJUCQ-RAINSFORD	Directeur de recherche, INSERM, Université de Rennes 1	Examineur
Madame Béatrice GRASLAND	Chargé de recherche HDR, ANSES, Ploufragan-Plouzané	Examineur
Monsieur Stéphan ZIENTARA	Directeur de recherche, ANSES, Maisons-Alfort	Directeur de thèse
Madame Hélène BOURAÏMA-LELONG	Maître de conférences HDR, Université de Caen Normandie	Codirecteur de thèse
Monsieur Aymeric HANS	Chargé de recherche, ANSES, Laboratoire de Pathologie Équine de Dozulé	Examineur

Thèse dirigée par Stéphan ZIENTARA et Hélène BOURAÏMA-LELONG, Laboratoire de Pathologie Équine de Dozulé



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier tout particulièrement le Pr Stéphane Bertagnoli et le Dr Michel Samson pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

J'aimerais également remercier très sincèrement le Pr Astrid Vabret, le Dr Nathalie Dejucq-Rainsford et le Dr Béatrice Grasland pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je suis également très reconnaissante au Dr Claire Laugier, directrice du Laboratoire de pathologie équine de Dozulé, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour le point de vue pathologiste qu'elle a apporté à la relecture de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier le Dr Hélène Bouraïma-Lelong et le Dr Stéphan Zientara, mes deux co-directeurs de thèse, pour toute la gentillesse et bienveillance qu'ils ont eues à mon égard. Soyez assurés de toute ma reconnaissance.

Un merci tout particulier au Dr Aymeric Hans, mon encadrant, pour m'avoir accueillie en thèse dans son unité, pour toute sa patience, bienveillance et attention aiguës au ressenti de chacun. J'ai eu de la chance de t'avoir pour encadrant. Je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour tes conseils, ta disponibilité et tout le temps que tu m'as consacré, ainsi que mon profond respect.

Ma chère Delphine, que te dire... Je te dois tellement... Merci pour toute ton aide, tout le temps que tu m'as consacré, et toutes ces discussions en voiture. Merci d'avoir partagé mes joies et mes tristesses, et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles.

Mes sincères remerciements vont également à Marilyne Guillamin pour son aide en cytométrie en flux.

À Fanny, Gaël, Fabien C., Alexandre, et toute l'unité de virologie passée et présente. Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans votre accueil chaleureux et votre soutien à tous. Merci pour tous les moments qu'on a partagé.

Merci également à Anthony et Fabien D., mes collègues matinaux, pour votre bonne humeur dès le réveil.

Un merci tout particulier à Stéphanie, ma voisine de bureau et d'immeuble. Je tiens à te témoigner mon amitié et ma gratitude pour ton soutien. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussites.

Merci aussi à Alexandra pour ta bonne humeur incessante et ton trop plein de vie. Tu as été un vrai petit rayon de soleil.

À Jeanne Bouet, ma première petite stagiaire. Merci pour ton aide et pour avoir supporté mes côtés un peu maniaques. Je te souhaite de tout cœur de parvenir à devenir vétérinaire.

Un merci également à toutes les personnes des unités Bactériologie, Épidémiologie et Anatomie Pathologique, et Service Administratif, Financier et Entretien. Merci pour votre accueil chaleureux et pour ces trois années passées à vos côtés. Merci pour ces moments de l'APSD pleins de joie et de rigolades.

À ma Duduche, notre mascotte, tes petits câlins me manqueront.

À nos ponettes, Utopie et Ubiwane, moi qui adore les chevaux, j'ai été heureuse de vous voir tous les matins sur le chemin du labo.

Merci à l'association des doctorants OPTIC pour tous ces moments un peu plus légers.

À Céline, ma pharmacienne préférée, passionnée d'équitation, et amie de toujours.

À mon grand-père, le premier chercheur que j'ai rencontré dans ma vie, je suis certaine que tu aurais aimé me voir faire mes premiers pas dans la recherche.

À ma mère et ma sœur, qui ont toujours été là pour moi.

A mi padre, aunque nunca podrás leerla. Te quiero.

Y también a todo el resto de la familia. Gracias por todos esos momentos de diversión, de escapada, y de felicidad. Muchos besos.

ABRÉVIATIONS

aa : acide aminé

ABP : androgen binding protein = protéine liant les androgènes

Ac : anticorps

ACF : adjuvant complet de Freund

ADN : acide désoxyribonucléique

AIE : anémie infectieuse des équidés

AR : androgen receptor = récepteur aux androgènes

ARN : acide ribonucléique

Asn : asparagine

Asp : aspartate

Atg : autophagy related genes = gènes liés à l'autophagie

ATP : adénosine triphosphate

AVE : artérite virale équine (la maladie)

CCL : CC chemokine ligand = chimiokine de type CC

CD : cluster de différenciation

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CpG : cytosine-phosphate-guanine

CXCL : CXC chemokine ligand = chimiokine de type CXC

CVB3 : Cocksackievirus B3

Cys : cystidine

DAMPs : damage-associated molecular patterns = motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DC : dendritic cell = cellule dendritique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F-12 : DMEM:Ham's F-12 Nutrient Mixture

DMV : vésicule à double membrane

DUB : activité de dé-ubiquitination

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EAO : orchite auto-immune expérimentale

EAU : uvéite auto-immune expérimentale

EAV : Equine Arteritis Virus = Virus de l'Artérite Virale Équine

EBV : virus d'Epstein-Barr

ECA11 : chromosome équin 11

eiF2 α : eukaryotic initiation factor 2 α

EMC : encéphalomyocarditis

ECP : effet cytopathique

EDEM-1 : ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1

EHV : herpesvirus équin

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ER : estrogen receptor = récepteur aux œstrogènes

ERAD : endoplasmic reticulum associated degradation = machine de dégradation des protéines associée au réticulum endoplasmique

ERAV : Virus de la rhinite équine A

EU : groupe Européen d'EAV

EU-1 : sous-groupe Européen-1 d'EAV

EU-2 : sous-groupe Européen-2 d'EAV

FMDV : foot-and-mouth disease virus = virus de la fièvre aphteuse

FSH : hormone folliculo-stimulante

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GnRH : gonadotrophine hypophysaire (aussi appelée hormone de libération de la lutéinostimuline)

GP : glycoprotéine

HHV : herpès virus humain

His : histidine

HMGB1 : High-mobility group box 1 protein = protéine B1 du groupe de haute mobilité

HPV : papillomavirus

HSPs : heat shock proteins = protéines de choc thermique

HSV : virus herpès simplex

IFN : interféron

IFN-I : interférons de type I

Ig : immunoglobuline

IKK : I κ B kinase

IL : interleukine

IPNV : virus de la nécrose pancréatique infectieuse

IPS-1 : inositol-3-phosphate synthase isozyme 1

IP10 : IFN- γ -inducible protein 10

IRF : IFN regulatory factor

jpi : jour(s) post-infection

L_B : lymphocyte B

LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire

LC3-I : ATG4-cleaved-microtubule-associated protein light chain 3

LC3-II : LC3-I lié de façon covalente à la phosphatidyléthanolamine

LH : hormone lutéinisante

LPS : lipopolysaccharide

L_T : lymphocyte T

L_{Tc} : lymphocyte T cytotoxique

L_{Th} : lymphocyte T helper

MAMPs (= PAMPs) : microbe-associated molecular patterns (= pathogen-associated molecular patterns) motifs moléculaires associés aux micro-organismes (= motifs moléculaires associés aux pathogènes)

MCP1 : Monocyte chemotactic protein 1

MDA5 : melanoma differentiation-associated protein 5

MEM : Eagle's Minimum Essential Medium

MHV : virus de l'hépatite murine

MKK : Mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase

MLV : modified live vaccine = vaccin avec virus atténué

Mn : manganèse

MOI : multiplicity of infection = multiplicité d'infection

M_{pro} : protéase principale de l'EAV

MyD88 : myeloid differentiation primary response 88

NA : groupe Nord-Américain d'EAV

NEAA : acides aminés non essentiels

NendoU : nidoviral-endonuclease specific for U = endoribonucléase des nidovirus spécifique des pyrimidines en particulier des uridyles

NF-κB : nuclear factor-κB

NK (cellules) : natural killer cells = cellules tueuses naturelles

NP : nucleocapsid protein = nucléocapside

nsp : protéine non structurale

OIE : office international des épizooties = organisation mondiale de la santé animale

ORF : open reading frame = cadre ouvert de lecture

OS-9 : osteosarcoma-9 protein

PAMs : macrophages alvéolaires porcins

PBS : Tampon phosphate salin

PBST : PBS 1X contenant 0,1 % de Triton X-100

PBST : PBS 1X contenant 0,1 % de Triton X-100 et 1 % d'albumine de sérum bovin

PCR : polymerase chain reaction

PCP ou PLP : papain-like cysteine protease

p.i. : post-infection

PERK : protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase

PFU : plaque-forming units = Plaque de Lyse

PMOs : oligomères morpholino-phosphorodiamidate

P-PMOs : oligomères morpholino-phosphorodiamidate conjugués à un peptide

pp1a et pp1ab : précurseurs polyprotéiques 1a et 1ab

PRR : pattern recognition receptors = récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PTP1B : protéine-tyrosine phosphatase 1B (aussi appelée Ptpn1)

P0 : primo-infection

P1 : après un passage cellulaire

RdRp : RNA-dependent RNA polymerase = polymérase ARN dépendante ARN-dépendante

RIG1 : retinoic acid inducible gene 1

RLR : RIG-1 like receptor = récepteur de type RIG-1

RMA : puce à reséquençage à ADN à haute densité

RTC : complexe de réplication/transcription

RT-qPCR : real time-quantitative polymerase chain reaction

SARS-Cov : coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère

SD : standard deviation = déviation standard

SE : standard error = erreur standard

SEL1-L : protein sel-1 homolog 1 (aussi appelée Suppressor of lin-12-like protein 1)

sg ARNm : ARN messagers subgénomiques

SHBG : globuline fixant les hormones sexuelles

siARN : petits ARN interférants

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

S-S : disulfure

StAR : steroidogenic acute regulatory protein

SVF : sérum de veau fœtal

TCID50 : median tissue culture infective dose = quantité d'agents pathogènes qui produit un changement pathologique dans 50 % des cultures cellulaires inoculées

TGF-β : transforming growth factor beta = Facteur de croissance transformant bêta

Th : T helper (lymphocytes)

TLR : Toll like receptor = récepteur de type Toll

TNF : tumor necrosis factor = facteur de nécrose tumorale

TRAF : TNF receptor associated factor

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VNT : virus neutralization test = test de séroneutralisation

VSDRP : virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc

WPDV : virus de la maladie d'opossum

ZDB : domaine liant le zinc

Zn : zinc

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	21
I) Le virus de l'artérite virale équine.....	23
a. La maladie.....	23
i. Phase aiguë de la maladie	23
ii. Persistance du virus.....	29
iii. Transmission.....	31
b. Dépistage, prévention et thérapeutiques	33
i. Mesures sanitaires et dépistage.....	33
ii. Prophylaxie	37
iii. Traitements disponibles	42
c. Le Virus	47
i. Classification	47
ii. Structure du virus	50
iii. Infections in vitro.....	57
II) Infection virale et immunité.....	58
a. Déroulement de l'infection par l'EAV dans l'organisme et cellules infectées	58
b. L'infection par l'EAV et l'immunité innée.....	59
i. Détection des virus par les récepteurs de reconnaissance de motifs et production d'interférons.....	59
ii. Réponse inflammatoire	63
iii. Zone immunoprivilégiée du testicule.....	66
c. Développement d'une immunité adaptative	68
III) L'EAV : un virus dont la persistance dépend de la testostérone ?	71
a. Mise en évidence expérimentale d'un lien virus/testostérone	71
i. Impact de la castration.....	71
ii. Thérapeutiques anti-GnRH.....	71
iii. Autres virus et testostérone.....	73
b. Effet de la testostérone sur le système immunitaire	75
c. Effet possible de la testostérone sur la réplication de l'EAV	78
d. Testostérone ou œstrogènes ?.....	82
Objectifs des travaux.....	85
Matériels et Méthodes.....	89

I)	Lignées cellulaires.....	91
II)	Souche virale et infection.....	92
III)	Traitement à la testostérone.....	94
IV)	Titrages en PFU.....	95
V)	Analyse de la viabilité cellulaire	95
VI)	Détection de protéines par immunocytochimie	96
VII)	Détection de la nucléocapside de l'EAV par immunomarquage et cytométrie en flux	97
VIII)	Préparation des ARN viraux et analyse RT-qPCR.....	98
IX)	Analyses statistiques	100
	Résultats.....	103
I)	Mise en place d'un modèle <i>in vitro</i> d'infection non-cytopathique de cellules de l'appareil reproducteur mâle par l'EAV.....	105
a.	La permissivité des différentes lignées cellulaires à l'infection par l'EAV.....	105
i.	Détection de plages de lyse.....	105
ii.	Viabilité cellulaire	106
iii.	Détection de la présence virale par marquages immunofluorescents	107
b.	La réplication de l'EAV et la production de particules virales infectieuses dans les différentes lignées cellulaires.....	109
c.	Caractérisation de l'infection par l'EAV des cellules TM3 et PC-3	112
d.	L'infection par l'EAV induit l'expression génique des interférons dans les cellules TM3 ...	114
II)	Induction par l'EAV de gènes de l'immunité innée impliqués dans l'inflammation chez les cellules TM3.....	116
a.	L'infection par l'EAV induit l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules TM3.....	116
b.	L'infection par l'EAV induit l'expression génique de chimiokines dans les cellules TM3....	117
c.	L'infection par l'EAV induit l'expression génique des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) dans les cellules TM3	117
d.	Augmentation du pourcentage de cellules TM3 infectées après passage des cellules	120
III)	Essais de traitements avec la testostérone	122
a.	Expériences préliminaires de traitement avec la testostérone	122
b.	Évaluation de l'effet de la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées en cytométrie en flux	123
c.	Évaluation de l'effet de la testostérone sur la réplication de l'EAV.....	125
d.	Effet de la testostérone sur l'expression du gène StAR	127
	Discussion et Perspectives	129
I)	Établissement d'un modèle <i>in vitro</i> d'infection non-lytique par l'EAV	131

a.	Les différents types d'infection observés <i>in vitro</i>	131
i.	Absence d'infection ou infections abortives	131
ii.	Infections lytiques	133
iii.	Infections persistantes	134
b.	Infection persistante par état porteur	135
i.	L'infection des TM3 par l'EAV, semblable aux infections par état porteur.....	135
ii.	Équilibre virus-cellules et interférons dans les cellules TM3	136
iii.	Rupture d'équilibre virus-cellules.....	137
c.	Interférons.....	138
II)	L'induction de gènes inflammatoires chez les cellules de Leydig par l'EAV à l'origine de l'orchite observée chez les étalons?	139
a.	Implication des TLR/RLR dans l'orchite	139
b.	Implication des cytokines pro-inflammatoires dans l'orchite	141
c.	Implication des chimiokines dans l'orchite	143
III)	La testostérone a-t-elle un effet sur la réplication de l'EAV ?.....	149
IV)	PERSPECTIVES.....	151

Table des figures :

Figure 1 : Temps d'apparition et durée des signes cliniques de l'AVE.....	25
Figure 2 : Sites de persistance de l'EAV chez l'étalon.....	29
Figure 3 : Cycle de transmission de l'EAV.....	32
Figure 4 : Protection immunitaire chez les jeunes poulains.....	41
Figure 5 : Arbre phylogénétique des Nidovirales.....	48
Figure 6 : Structure de l'EAV.....	51
Figure 7 : Signalisation induite par les RLR suite à une infection virale.....	61
Figure 8 : Signalisation induite par les TLR.....	62
Figure 9 : Production d'hormones par le complexe hypothalamo-hypophysaire.....	72
Figure 10 : Mécanisme possible d'action de la testostérone sur la réplication de l'EAV.....	79
Figure 11 : Formation des vésicules à double membrane.....	81
Figure 12 : Action de la testostérone via ses dérivés.....	82
Figure 13 : Structure d'un testicule.....	84
Figure 14 : Détermination de l'effet cytopathique de l'EAV sur les différentes lignées par détection de PFU.....	105
Figure 15 : Détermination de l'effet cytopathique de l'EAV sur les différentes lignées par étude de la viabilité cellulaire.....	106
Figure 16 : Détection de la nucléocapside de l'EAV dans les cellules « infectées » par marquages immunofluorescents sur lame.....	107
Figure 17 : Détection de la nucléocapside de l'EAV dans les cellules « infectées » par cytométrie en flux.....	109
Figure 18 : Réplication de l'EAV et production virale dans les différentes lignées.....	111
Figure 19 : Propagation de l'EAV dans les cultures de cellules RK13, TM3 et PC-3.....	112
Figure 20 : Survie cellulaire des cellules RK13, TM3 et PC-3.....	113
Figure 21 : Expression relative des IFN-I par les cellules TM3 infectées.....	115
Figure 22 : Expression relative des cytokines pro-inflammatoires par les cellules TM3 infectées.....	116
Figure 23 : Expression relative des chimiokines par les cellules TM3 infectées.....	118

Figure 24 : Expression relative des PRR par les cellules TM3 infectées.....	119
Figure 25 : Pourcentage de cellules TM3 infectées après passage cellulaire.....	121
Figure 26 : Évaluation de l'effet de la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées (MOI 1) par marquages immunofluorescents sur lamelles.....	123
Figure 27 : Évaluation de l'effet de la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées (MOI 10) en cytométrie en flux.....	124
Figure 28 : Évaluation de l'effet de la testostérone sur la réplication de l'EAV.....	126
Figure 29 : Évaluation de l'effet de la testostérone sur l'expression génique de StAR.....	128
Figure 30 : Cytokines pro-inflammatoires et chimiokines dont l'expression génique est augmentée par l'EAV dans les cellules TM3 infectées.....	145
Figure 31 : Protéines impliquées indirectement dans la réplication du virus et dont l'expression ou les modifications post-traductionnelles dépendraient de la testostérone.....	153
Figure 32 : Construction d'un plasmide infectieux pour identifier les protéines virales nécessaires à l'effet de la testostérone sur le cycle viral.....	154

Table des tableaux :

Tableau 1 : Lésions décrites possibles par organe, tissu ou appareil.....	26
Tableau 2 : Les protéines de l'EAV.....	51-56
Tableau 3 : Taux plasmatiques de testostérone et d'œstrogènes suivant les étalons.....	83
Tableau 4 : Lignées utilisées pour cette étude.....	91
Tableau 5 : Doses de testostérone testées selon les expériences.....	95
Tableau 6 : Séquences des amorces et sonde utilisées dans l'étude	99
Tableau 7 : Bilan des infections des différentes lignées issues de l'appareil reproducteur mâle testées.....	114

Avant-propos

Le virus de l'artérite virale équine (EAV) est responsable d'une maladie spécifique des équidés, qui peut causer la mort des nouveau-nés, ainsi que l'avortement des juments gestantes. Le coût économique que représenterait une vague d'avortements et de morts de jeunes poulains causée par l'artérite virale équine (AVE), a conduit à la classer au niveau national comme un danger sanitaire de deuxième catégorie. Cette maladie est également surveillée au niveau international puisqu'elle est l'une des 11 maladies listées par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE).

L'AVE est une des quatre maladies avec l'anémie infectieuse des équidés (AIE), les herpes virozes équines (HVEs) et la dourine (maladie parasitaire), pour lesquelles l'Unité de Virologie et Parasitologie (VIPARE), du Laboratoire de Pathologie Équine de Dozulé, est laboratoire national (LNR) et européen (LRUE) de référence. Le laboratoire confirme les cas positifs détectés par les laboratoires de diagnostic, isole et caractérise les virus responsables des foyers, et analyse la cause des foyers grâce à des autopsies et des enquêtes épidémiologiques de terrain. Il vise également à l'amélioration des outils de diagnostic sérologiques et moléculaires de ces maladies, ainsi qu'à la compréhension des interactions hôtes-pathogènes afin de développer de nouveaux traitements. Le laboratoire fait partie de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), qui contribue à assurer la sécurité sanitaire humaine ainsi que celle des animaux et des végétaux et qui a cofinancé à 50 % cette thèse avec la région Normandie.

Ce travail s'inscrit dans l'étude de la persistance de l'EAV chez certains étalons. En effet, suite à la primo-infection, le virus peut persister dans l'appareil reproducteur des étalons. Les mécanismes permettant la persistance du virus ne sont cependant pas connus.

Afin de comprendre les interactions de l'EAV avec l'appareil reproducteur des étalons, je commencerai par décrire la maladie, le virus, le cycle viral, ainsi que le dépistage et les

Avant-propos

thérapeutiques existants. Puis, je décrirai les connaissances actuelles sur l'interaction de l'EAV avec le système immunitaire de l'hôte. Pour finir, je présenterai le rôle possible des hormones dans la persistance virale. Mes travaux porteront sur le développement d'un modèle d'étude de l'interaction virus-cellule de l'appareil reproducteur et sur la caractérisation de ce modèle.

Introduction

I) Le virus de l'artérite virale équine

a. La maladie

Le virus de l'artérite virale équine (EAV) a été isolé pour la première fois en 1953 dans la ville de Bucyrus, en Ohio (États-Unis), à partir du poumon de fœtus, dans un élevage où il y avait eu un pic de maladies respiratoires et d'avortements [1]. Cette maladie, autrefois appelée « fièvre typhoïde du cheval » [2], a reçu le nom d'« Artérite Virale » à cause de lésions caractéristiques de la maladie constamment présentes sur les artérioles des chevaux infectés de façon létale. En effet, une nécrose hyaline de la média de l'artère peut être observée [3-8]. Elle est caractérisée par une disparition du noyau des cellules musculaires lisses et par le remplacement du cytoplasme par du matériel hyalin, éosinophile ou fibrinoïde. Il s'ensuit alors la formation d'un œdème et l'infiltration de leucocytes dans l'adventice des vaisseaux. Les lésions artérielles peuvent finir éventuellement par une thrombose [5, 6].

Cette maladie a été détectée dans le monde entier, sauf en Islande, au Groenland, au Japon et en Antarctique [9-26]. L'analyse des séquences virales a d'ailleurs révélé des mouvements de virus entre les continents (européen et américain, européen et africain), via le transport de chevaux ou de semences infectés [12, 14]. La séroprévalence pour ce virus varie cependant entre les pays [9, 19-21, 26], au sein même des pays [10, 17, 19, 20], et suivant les races de chevaux étudiées [9, 21, 25, 27].

i. Phase aiguë de la maladie

Lors de la phase aiguë de la maladie, l'intensité des signes cliniques observés chez l'équidé infecté dépend, non seulement, de la virulence de la souche, de la voie d'infection, et de la dose virale présente lors de l'infection, mais aussi de l'âge et de la condition physique (gestation, sevrage, dénutrition ou carences alimentaires, parasitisme) de l'animal [4, 27-30].

Introduction

Ainsi, l'équidé peut présenter les signes cliniques suivants : de la fièvre (qui peut monter jusqu'à 39-41 °C), un abattement, une anorexie, des œdèmes (au niveau des paupières, du tronc, des membres, du prépuce ou du scrotum), une conjonctivite, un écoulement nasal important, etc [1, 4-6, 12, 13, 22, 28, 29, 31-38]. Le délai d'apparition et la durée de ces signes cliniques sont indiqués sur la figure 1. La présence d'un œdème au niveau du scrotum peut être la manifestation extérieure d'une **orchite** et/ou d'une épididymite [13, 35, 39], conduisant parfois à une infertilité passagère de l'étalon [13]. La plupart de ces signes cliniques sont communs à ceux causés par d'autres virus tels que le virus de la grippe équine, les herpesvirus équins (EHV-1 et 4), les virus de la rhinite équine A et B, les adénovirus équins, le virus de l'anémie infectieuse des équidés (AIE), le virus de l'encéphalite équine, le virus de la peste équine africaine, le virus hendra et le virus Getah [4, 24, 40]. Certains de ces signes cliniques peuvent aussi être provoqués par des bactéries streptocoques (purpura hémorragique) ou par une intoxication à l'Alysson blanc (*Berteroa incana*) [40]. C'est pourquoi, le diagnostic clinique de l'AVE doit toujours être confirmé par un test de laboratoire officiellement reconnu.

L'EAV n'entraîne que très rarement la mort des adultes, sauf dans le cas de souches très virulentes telles que Bucyrus [4, 6, 29, 41], qui entraînent des dommages vasculaires sévères (3-4 jours post-infection [jpi]) pouvant conduire à une coagulation intravasculaire disséminée [27] et à la mort de l'animal (5-7 jpi) [4]. Aucun complexe immun n'est retrouvé dans ces lésions [27].

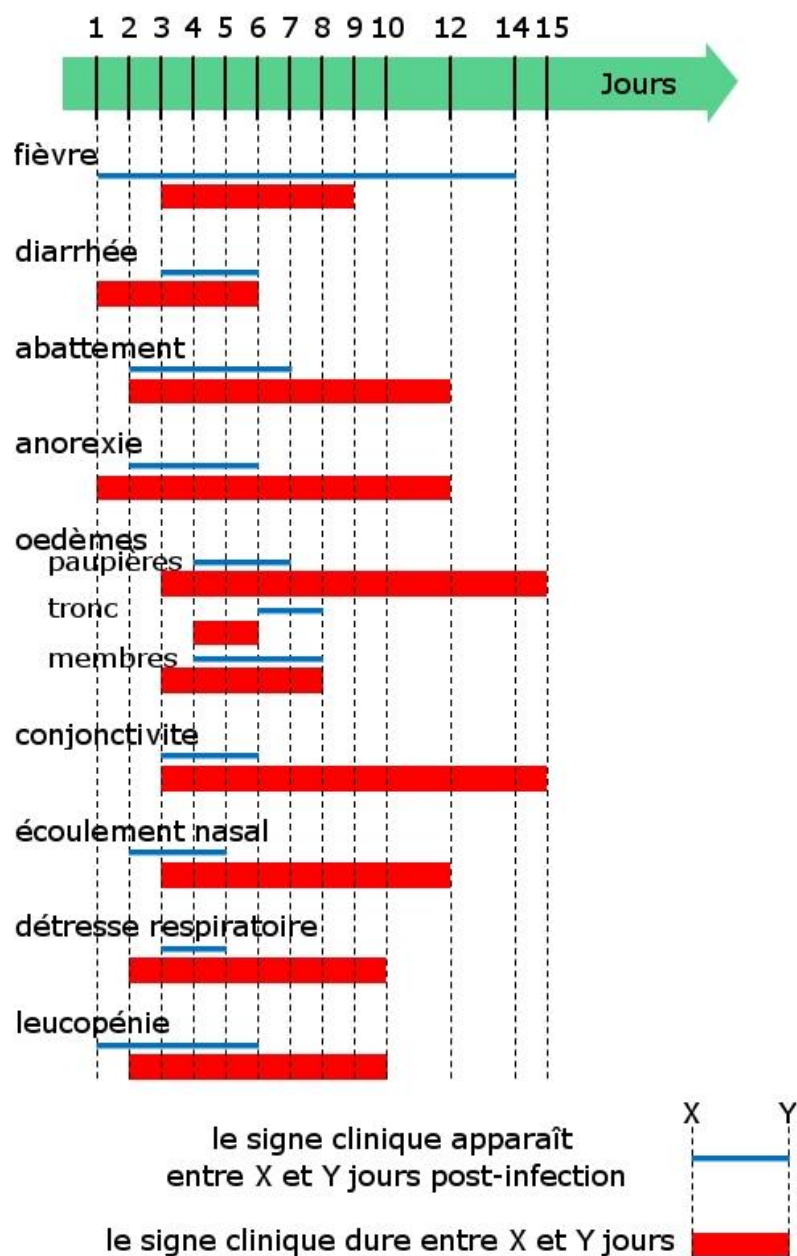


Figure 1 : Temps d'apparition et durée des signes cliniques de l'AVE

Figure réalisée à partir d'une synthèse bibliographique.

Introduction

Lors de l'autopsie de chevaux infectés par l'EAV, en plus des lésions caractéristiques présentes au niveau des artérioles musculaires, des lésions au niveau des veines, des vaisseaux lymphatiques, de certains appareils, organes et tissus peuvent être observées (Tableau 1). De plus, les nœuds lymphatiques, la rate et le thymus présentent parfois une réduction en cellules lymphoïdes [5, 6, 8].

	Hémorragies	Thrombi	Nécrose ischémique	Infiltration de cellules inflammatoires	Œdèmes	Lésions inflammatoires non précisées
appareil digestif	X	non précisé + colon	non précisé + colon		X	cecum + colon + intestin grêle
appareil reproducteur	cervix			X	X	vaisseaux sanguins
appareil respiratoire	poumons + muqueuses respiratoires supérieures	poumons		poumons	poumons	
cerveau					veines	
cœur			X	X	X	
foie			X	foie + artère hépatique	périvasculaire	
glandes surrénales	X		X			
nœuds lymphatiques	mésentériques				X	
pancréas				artérioles	artérioles	
poches gutturales	X					
rate	X		X		X	
reins			X	capillaires	X	
séreuses péritonéales et pleurales			X	X		
thymus	X					

Tableau 1 : Lésions décrites possibles par organe, tissu ou appareil

De façon plus grave, le virus peut être responsable d'une pneumonie interstitielle sévère fulminante chez le nouveau-né, conduisant à la mort de ce dernier [7, 8, 13, 23, 24, 30], et d'un syndrome pneumo-entérique progressif chez le poulain âgé de 1 à 6 mois [2, 5].

L'EAV peut également provoquer l'avortement chez 10 à 71% des juments gestantes (entre le 3^{ème} et le 10^{ème} mois de gestation) [2, 12, 13, 16, 22, 27, 42-44], même en l'absence de signes cliniques de la maladie [1, 6, 16, 31, 32, 42]. Les modèles d'infection expérimentale ont montré que ces avortements pouvaient se produire 7 à 57 jours après l'inoculation du virus [4, 31, 44]. Ces avortements interviennent plus précocement que dans le cadre d'autres infections virales telles que celle de l'herpesvirus équin (EHV-1), aussi appelé virus de la

rhinopneumonie, qui provoque l'avortement des juments 14 à 76 jours après le début de l'infection [4].

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les avortements dus à l'EAV. Le premier serait lié à une myométrite (inflammation du myomètre) avec infiltration de cellules mononucléaires [3, 4, 31] et formation d'un œdème au niveau de la couche sous-muqueuse, adjacente à l'endomètre, et de la couche sous-séreuse du myomètre, adjacente au périmètre, ainsi qu'au niveau du ligament large [3-5]. Cette myométrite conduit à une nécrose du myomètre [3, 31]. L'apport sanguin au fœtus via le placenta [5] serait ainsi réduit par une compression mécanique due à l'œdème de la sous-muqueuse [3], ou par une distension des tissus provoquée par la perte de tonicité du myomètre [3], entraînant ainsi une anoxie du placenta et du fœtus. Il s'en suivrait alors un détachement du placenta [3] et l'expulsion du fœtus qu'il soit déjà mort ou non à cause de l'anoxie [1, 3, 31, 42]. Une diminution de la production de progestérone par le placenta lésé, visible dès 48 heures avant l'avortement, ainsi qu'un relargage local de prostaglandines, pourraient aussi être impliqués dans l'avortement [3]. La fièvre est un autre effet secondaire de l'infection pouvant provoquer l'avortement.

Le deuxième mécanisme serait plutôt lié à une infection létale du fœtus [1, 6]. En effet, l'avortement peut avoir lieu en phase terminale de l'infection maternelle ou en phase précoce de rémission [1, 4], ce qui, dans ce cas, réduit la probabilité de l'implication d'un effet secondaire de l'infection maternelle (fièvre, toxémie) [1], d'autant plus que certaines juments ne présentent pas de signes cliniques autres que l'avortement [1, 16]. De plus, le virus a été retrouvé dans des artères, des tissus (rate, nœuds lymphatiques mésentériques, thymus, poumons, reins, cerveau, placenta, foie) et du sang d'avortons [1, 3, 4, 6, 16, 31, 32, 43]. Cependant, la présence de virus dans les tissus fœtaux pourrait être la conséquence de l'augmentation de la perméabilité du placenta lésé ; surtout qu'après environ 100 jours de

Introduction

gestation, lors d'une gestation normale, la perméabilité du placenta est déjà augmentée [3]. Cependant, le fait que parfois les titres viraux (dans le sang ou le placenta) ou le nombre de cellules infectées soient plus importants chez le fœtus que chez la mère [31], suggère qu'une infection transplacentaire du fœtus peut avoir lieu [6, 31]. La possibilité d'une infection transplacentaire est également supportée par le fait que, même si, en général, aucune lésion spécifique des artères n'est retrouvée chez les fœtus morts [3, 5], des lésions des petites artères musculaires peuvent être présentes, bien que moins sévères que chez la jument. Si elles sont présentes, elles le sont uniquement ou majoritairement au niveau du placenta, qui présente alors une nécrose fribriinoïde et une infiltration de cellules mononucléées et de quelques polynucléaires neutrophiles [6, 32]. La présence ou non de ces lésions pourrait dépendre de la souche virale incriminée [32]. D'autres lésions, rarement observées [42], telles que de l'autolyse [1, 3, 16, 31], des lésions inflammatoires (cerveau, foie, rate, nœuds lymphatiques, glandes surrénales, poumon, placenta) [6, 31, 32], des hémorragies (conjonctive, rate, poumons, muqueuses respiratoires et digestives) [1, 4, 5] et des œdèmes (tissu conjonctif sous-cutané, poumons, nœuds lymphatiques, tissus mésentériques, placenta) [1, 4, 31] peuvent être retrouvés chez des fœtus avortés ou morts *in utero* 2-4 jours [1, 4]. Une atrophie des follicules lymphoïdes (avec des lymphocytes dégénérés) dans la rate et les nœuds lymphatiques peut également être observée [31]. Ainsi, l'infection du fœtus induirait un stress fœtal qui activerait l'axe hypothalamo-hypophysaire conduisant à l'avortement [6].

Cependant, ces deux théories sur les causes de l'avortement ne s'opposent pas complètement et pourraient varier en fonction de l'état clinique de la jument suite à l'infection. En effet, si l'avortement a lieu au cours de la phase aiguë de l'infection, une myométrite en serait probablement la cause, alors que si l'infection est asymptomatique ou que la jument est en rémission de l'infection, l'avortement serait plutôt dû à une infection létale du fœtus [31].

ii. Persistance du virus

Suite à la primo-infection, le virus est éliminé au bout de 28-34 jours [45] sauf chez certains étalons où il persiste dans l'appareil reproducteur (entre 10 et 80 % des étalons [12, 27, 34, 36, 45, 46]), en absence de signes cliniques. Chez les chevaux qui parviennent à éliminer le virus, son élimination survient en même temps que l'apparition d'anticorps (Ac) neutralisants dans le sérum [36, 47]. Actuellement, aucune donnée ne suggère que la persistance du virus serait due à une pression de sélection du système immunitaire [27, 48].

Chez les étalons en état d'infection persistante, l'EAV est toujours retrouvé au niveau de l'ampoule du canal déférent [34, 36, 45], mais peut aussi être présent au niveau de la prostate et des glandes bulbo-uréthrales pour 80 % des étalons [34, 36, 45], du canal déférent, de l'épididyme et des vésicules séminales dans 60% des cas [34, 36, 45], et enfin, chez 40% d'entre eux, le virus peut être retrouvé au niveau de la vessie et de l'urètre distale [45] (Figure 2).

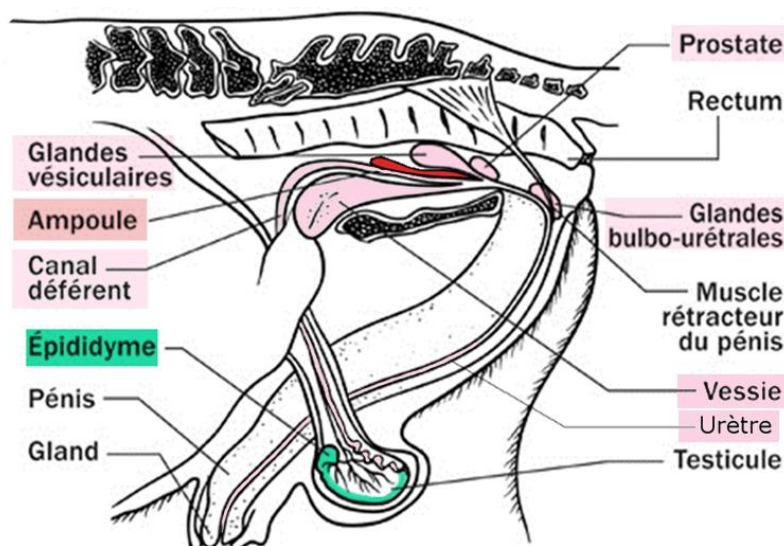


Figure 2 : Sites de persistance de l'EAV chez l'étalon

Les différents organes de l'appareil reproducteur dans lesquels persiste l'EAV sont en couleur. Figure adaptée à partir d'un schéma de «Anatomie, physiologie et reproduction de l'étalon », fiche technique de MAAARO, Agdex:460/30, 2011

<http://www.omafr.gov.on.ca/french/livestock/horses/facts/11-004.htm>

Introduction

Cette persistance virale dans l'appareil reproducteur s'accompagne de l'excrétion et donc de la présence de l'EAV dans la semence des étalons (10^2 - 10^6 PFU/mL de plasma séminal [34, 36, 45, 46]). Ces derniers sont alors appelés étalons excréteurs et sont considérés comme le réservoir de l'EAV. Ils peuvent propager la maladie s'ils sont utilisés comme reproducteurs [12, 13, 49, 50]. En effet, il a été montré qu'une jument inséminée avec une semence contaminée par l'EAV présentait un risque proche de 100 % d'être infectée par le virus [12, 14, 15].

D'autres virus, tels que l'herpesvirus équin 1 (EHV-1) [51-53], le virus de la rhinite équine A (ERAV, semence contaminée par de l'urine contenant le virus) [40, 54] et le virus de l'AIE [55, 56], peuvent aussi se retrouver dans le sperme des étalons. Pour l'EHV-1, sa détection dans le sperme s'explique par la présence du virus dans l'épididyme et le testicule de l'étalon [53].

Chez l'homme certains virus sont aussi capables d'être excrétés dans le sperme tels que le virus Zika [57, 58], qui peut y être détecté jusqu'à 6 mois post-infection (p.i.) [57], le papillomavirus (HPV) [59, 60], les adénovirus [59, 60], le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [59, 60], le virus de l'hépatite B (VHB) [59, 60] et le virus des oreillons [61]. De même, de nombreux herpesvirus, comme les virus herpès simplex 1 et 2 (HSV1 et HSV2 = HHV1 et HHV2), le cytomégalovirus (CMV = HHV4), le virus d'Epstein-Barr (EBV = HHV5) et l'herpès virus humain de type 8 (HHV8), peuvent être présents dans le sperme de patients infectés [59, 60, 62]. Comme pour l'EAV et l'EHV-1, ceci peut être mis en corrélation avec la présence de ces virus dans l'appareil reproducteur. Ainsi les adénovirus, le VHB et le virus des oreillons ont été retrouvés dans les testicules, l'HHV8 dans la prostate, l'HSV2 et l'EBV dans ces deux organes, et le virus Zika (chez la souris et le macaque) [63-

66], le CMV et le VIH dans les deux organes cités précédemment ainsi que dans l'épididyme et les vésicules séminales [59, 60, 62].

Les étalons peuvent cesser d'excréter l'EAV de manière spontanée [46, 67]. Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus [47]. Cet état d'infection persistante peut durer plusieurs semaines ou années, voire même durant toute la vie de l'animal [29, 35, 36, 46, 68]. Les étalons en état d'infection persistante constituent donc un réservoir du virus entre les périodes de reproduction [12, 27, 47, 49, 69]. Chez ces étalons, suite à l'apparition de mutations dans le génome viral, favorisées, à chaque cycle de réplication, par une pression de sélection majoritairement d'ordre immunologique [49, 70], le virus peut diverger en quasi-espèces [12, 27, 47, 49, 50, 69-71]. La présence de la quasi-espèce favorise la persistance du virus dans l'appareil reproducteur, et une souche plus virulente peut émerger et être responsable d'épizooties majeures, comme celle de 2007 qui a touché la Normandie [12, 13, 27, 47-50, 70, 71].

iii. Transmission

Cette maladie, spécifique des équidés, peut être transmise par voies respiratoire [1, 4, 12-14] et vénérienne [9, 12-15, 29, 49, 50, 68, 72, 73].

La voie la plus efficace de transmission de l'EAV est la voie vénérienne. En effet, une fois la jument infectée lors de l'accouplement avec un étalon excréteur (ou lors d'une insémination artificielle avec sa semence), elle peut transmettre le virus à d'autres chevaux par voie respiratoire [49] (Figure 3). Cependant, seuls quelques variants du virus présents chez les étalons excréteurs vont pouvoir se répliquer efficacement dans les voies respiratoires [69, 71] et être transmis aux autres chevaux.

Introduction

Ainsi, la transmission par voie respiratoire peut s'effectuer lorsque des chevaux sont en contact direct ou indirect avec des chevaux en phase aiguë d'infection, aussi bien lors d'une course qu'à l'écurie ou au pâturage [1, 4, 29]. Ce contact avec le virus peut se faire via des sécrétions infectées, telles que les sécrétions nasales aérosolisées [29, 74-76], qui présentent des hauts titres viraux pendant 7-14 jpi [27, 74, 76], et les urines [29, 76, 77], ou via des tissus issus d'avortement (tels que le placenta), ou via d'autres objets contaminés (tels que les véhicules de transport) [29], tout comme pour les EHV [78]. Des cas de transmission aérienne à des étalons, par contact indirect avec un étalon en état d'infection persistante, probablement via un couchage ou du matériel contaminé avec du sperme, ont aussi été décrits [14, 79].

Parmi les chevaux infectés par voie aérienne, certains étalons peuvent devenir excréteurs et perpétuer le cycle de transmission du virus (Figure 3).

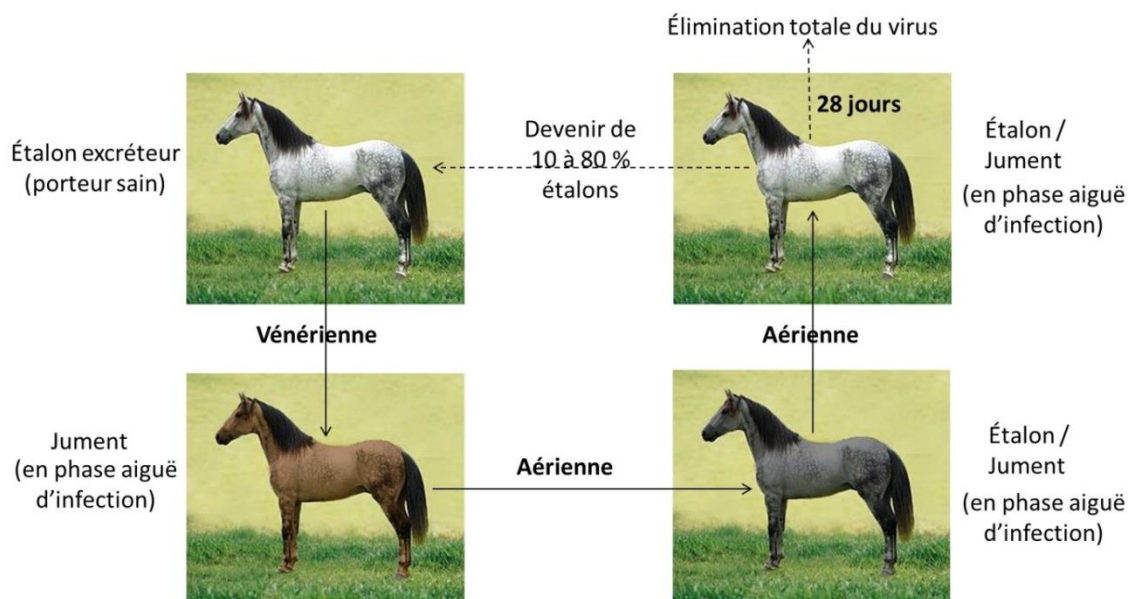


Figure 3 : Cycle de transmission de l'EAV

Une fois infectée par voie vénérienne, la jument peut transmettre l'EAV à d'autres chevaux par voie aérienne. Suite à cette infection, le virus va être éliminé en 28 jours ou va persister dans l'appareil reproducteur de certains étalons. Ces derniers vont excréter le virus dans leur semence et sont donc appelés étalons excréteurs. Un nouveau cycle de transmission pourra alors commencer.

Au cours de ce cycle, les quelques variants efficacement transmis par voie aérienne sont en général génétiquement stables lorsque l'épidémie se propage sur de courtes périodes (contrairement aux variants qui persistent dans l'appareil reproducteur des étalons excréteurs) [50, 71].

b. Dépistage, prévention et thérapeutiques

i. Mesures sanitaires et dépistage

Les avortements chez les juments et la mort des jeunes poulains provoqués par l'EAV pouvant représenter un coût économique important, l'AVE est, depuis 2006, au niveau national un danger sanitaire de deuxième catégorie. De plus, en France, suite à l'épizootie de 2007, tous les étalons utilisés en insémination artificielle doivent avoir un statut sanitaire indemne vis-à-vis de l'EAV [47]. Pour certains stud-books dont celui des Pours-sang anglais, ce statut sanitaire est aussi exigé pour les étalons utilisés en monte naturelle ainsi que pour les juments saillies [47]. En effet l'insémination n'est pas autorisée par le studbook Pours-sang anglais. Au niveau de l'Union Européenne, la collecte de semence d'étalons destinée au marché européen est possible si l'équidé n'est pas infecté par l'EAV. Par contre, en ce qui concerne les étalons et leur semence réservés au marché national, les États membres de l'Union Européenne restent maîtres des modalités réglementaires du contrôle de la maladie sur leur territoire [15, 47].

Le diagnostic de première intention afin de déterminer le statut sanitaire de l'équidé vis-à-vis de l'EAV est un test de séroneutralisation (appelé en anglais Virus Neutralization Test [VNT]) [40, 47]. Cette méthode de diagnostic, préconisée au niveau international par l'OIE et décrite au niveau national dans la Norme NF U47-035, permet de détecter et de quantifier les

Introduction

Ac présents dans le sérum capables de neutraliser le pouvoir lytique du virus sur des cellules hautement sensibles à l'infection [10, 40, 80]. Réaliser ce dépistage sur au moins deux sérums prélevés à un intervalle de 14 à 28 jours, permet non seulement de s'assurer s'il y a eu ou non infection (séroconversion ou non de l'animal) [15, 27] et si tel est le cas, de préciser son ancienneté [15].

Il existe un autre test sérologique : le test de fixation du complément. Bien que ce test ne soit presque plus utilisé [40], il présente l'avantage de mettre en évidence la présence d'Ac dirigés contre l'EAV issus d'une infection récente [40, 81]. Lors de ce test, le sérum à analyser est mis en contact avec des antigènes et du complément, puis des hématies et des Ac anti-hématies sont ajoutés. En présence d'Ac spécifiques de l'antigène testé, le complément s'étant fixé sur ces derniers, il ne peut être recruté au niveau des Ac anti-hématies, ce qui protège les hématies de la lyse due au complément et aux Ac anti-hématies.

En cas de résultat positif au VNT et en l'absence d'un certificat de vaccination, une épreuve virologique est réalisée. Dans la majorité des cas, ce dépistage se fait soit en effectuant un isolement viral sur culture cellulaire, soit en réalisant une détection d'acides nucléiques par biologie moléculaire [40, 47].

L'isolement viral est recommandé au niveau international par l'OIE en cas d'échanges internationaux. Il est réalisé en mettant en contact la fraction enrichie du sperme (plasma séminal) de l'étalon avec une culture de cellules RK13 hautement sensibles à l'infection par l'EAV [40, 82]. Pour le premier passage (P1) du « virus », l'échantillon, dilué au 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} , est mis en contact avec les cellules RK13. Après 2 à 6 jours d'incubation à 37°C en atmosphère humide avec 5 % de CO₂, si le virus est présent dans l'échantillon, un effet cytopathique (CPE) sur les cellules RK13 sera observé [40]. Pour les échantillons négatifs (absence de plages de lyse) au passage P1, deux autres passages (P2 et P3) sont réalisés en

inoculant sur un nouveau tapis cellulaire de RK13 le surnageant de culture du passage P1 pour le passage P2 et le surnageant de culture du passage P2 pour le passage P3 [40]. L'isolement viral peut aussi être réalisé à partir de prélèvements nasaux et de sang avec anticoagulant, pour lesquels le virus peut être isolé entre 2 et 8 à 19 jours (à 42 jours pour le sang) après infection naturelle par voie respiratoire [34, 36-38, 40, 47, 73], et à partir de tissus d'avortons (poumon, rate, nœuds lymphatiques ou placenta) [1, 3, 4, 6, 16, 31, 32, 40, 43, 83]. Lorsqu'un échantillon est positif selon cette technique, il est conseillé de confirmer la présence de l'EAV dans le surnageant en réalisant une RT-PCR ou par des tests utilisant les Ac spécifiques [40]. Dans certaines situations, la récolte de la semence d'étalon peut s'avérer difficile. En effet, de nombreux étalons ne sont utilisés qu'en monte naturelle et il est donc extrêmement délicat de pouvoir prélever de la semence sur ces équidés en toute sécurité. Dans ces conditions, il est possible de détecter la présence du virus dans la semence de l'étalon en accouplant ce dernier avec des juments séronégatives pour l'EAV et en vérifiant s'il y a ou non séroconversion de la jument 4 semaines après la saillie [9, 25, 40, 46, 73, 83, 84]. Dans le cas de l'utilisation d'une jument séropositive avant la saillie, une augmentation du titre d'Ac peut être observée lorsque l'étalon est excréteur [73].

Pour la détection d'acides nucléiques spécifiques de l'EAV, des PCR avec rétrotranscription (RT-PCR) peuvent être réalisées en ciblant une partie de l'ORF (open reading frame = cadre ouvert de lecture) 1b ou une partie des ORF 3 à 7 (cf I.c.ii de l'introduction), et peuvent être classiques, ou réalisées en nichées ou en temps réel (avec sonde Taqman) [14, 40, 48, 70, 85-91]. Elles sont plus reproductibles [88], plus rapides [13, 40, 88, 89, 91, 92] et moins chères que les isollements viraux [91, 92]. Cependant, la sensibilité et la spécificité de ces RT-PCR peuvent varier, les plus sensibles étant la RT-qPCR utilisant une sonde Taqman spécifique de l'ORF 7 et la RT-PCR nichée sur l'ORF 1b [14, 48, 70, 86-92]. Les RT-PCR nichées sont en général plus sensibles que les RT-PCR malgré un risque de contamination plus élevé [14, 87,

Introduction

90, 91]. Certaines RT-PCR sont d'ailleurs aussi sensibles (voire plus) et spécifiques que les isolements viraux [14, 40, 85-89, 91, 92]. De plus, il a récemment été démontré que la sensibilité des RT-PCR détectant l'EAV pouvait être augmentée en appliquant une méthode d'amplification universelle à l'aide de la Phi29, une ADN polymérase amplifiant aléatoirement la quantité de matrice initiale sans modifier la spécificité de la RT-PCR [93]. Cependant, certains échantillons testés, comme la semence, peuvent contenir des inhibiteurs de la Taq Polymérase (ou être extraits moins efficacement) [88, 89, 92, 94]. Il a également été démontré que les RT-PCR étaient moins fiables lorsque la semence testée avait été cryoconservée avec un faible titre viral [40, 95].

Les marquages immunofluorescents et immunohistochimiques, peuvent aussi permettre de détecter la présence du virus. Ils sont réalisés soit avec des Ac monoclonaux (dirigés contre les protéines N et GP5 du virus [cf I.c.ii de l'introduction]) [6, 7, 31, 40, 96-101] soit avec des Ac polyclonaux [7, 40, 102]. Ces outils de diagnostic peuvent être notamment réalisés suite à un avortement avec une suspicion d'une infection par l'EAV [6, 7, 31, 98, 99, 101].

Pour détecter une infection par l'EAV, d'autres techniques, telles que les tests ELISAs (Enzyme-linked immunosorbent assays) [11, 18-21, 98, 100, 103-107] et des immunoessais luminescents basés sur l'utilisation de microsphère (LuminexTM) [40, 108, 109], peuvent être utilisées en tant que test sérologique ou virologique.

Les tests ELISAs, de type spécifique [11, 20, 98, 100, 105, 107] ou compétitif [18, 103, 104, 106], peuvent mettre en évidence aussi bien la présence du virus [100] que celle d'Ac spécifiques dans le sérum. Pour la recherche d'Ac, la nature de l'antigène utilisé lors de ces tests ELISA (virus entier [11, 98, 104] ou une ou plusieurs protéines virales recombinantes [105, 107]) peut avoir une influence sur le résultat du test. Ainsi, certains ELISA

présenteraient une sensibilité et une spécificité proches de la VNT [21, 103-107]. Les tests ELISA sont moins chers, plus rapides et plus fiables (moins de différences entre les laboratoires) que le VNT [80, 100, 103, 104]. Les ELISA détectant les protéines virales sont cependant moins sensibles que les PCR [100], qui leur sont donc préférables en diagnostic.

En ce qui concerne les immunoessais luminescents basés sur l'utilisation de microsphères (technologie Luminex™), ils utilisent des billes trempées dans un mélange de deux solutions fluorescentes (100 combinaisons possibles) [109]. Ce mélange se retrouve à l'intérieur des billes et permet d'identifier chacune d'entre elles grâce à un laser rouge de cytomètre [109]. Sur ces billes, des Ac, des sondes nucléiques, ou comme pour le test qui a été développé par Go, Wong [108] pour détecter des Ac anti-EAV, des antigènes purifiés (recombinants) peuvent être fixés [109]. Les billes possédant les antigènes du virus sont mises en présence du sérum équin testé et d'Ac anti-IgG équines. Ces derniers couplés à un fluorophore détectable par un laser vert. Bien que rapide, pratique et plus économique, le test développé par Go, Wong [108] ne s'est cependant pas révélé aussi sensible et spécifique que le VNT.

ii. Prophylaxie

Les deux vaccins les plus couramment utilisés pour protéger les chevaux de l'EAV ont été développés à partir de la même souche virale (Bucyrus). Le premier est composé du virus atténué et est utilisé essentiellement en Amérique du Nord [40]. Il s'agit du *modified live virus (MLV) vaccine* : ARVAC®, qui a été obtenu après passages en série *in vitro* de la souche Bucyrus de l'EAV sur des cellules primaires de rein de cheval puis de rein de lapin, puis sur une lignée de cellules dermiques équines (les cellules E. Derm, aussi appelées NBL-6) [40, 41, 110-112]. Ce vaccin n'est cependant pas recommandé pour les juments gestantes (et tout particulièrement pendant leurs deux derniers mois de gestation à cause d'un risque d'avortement dû au vaccin) ni pour les poulains de moins de 6 semaines, sauf en cas de risque

Introduction

important d'exposition au virus [40, 41, 113]. Il est également conseillé de ne pas vacciner les chevaux avec ce vaccin 3 semaines avant une saillie [40].

Le deuxième vaccin, qui est le seul autorisé en Europe, a été réalisé à partir de la souche virale Bucyrus inactivée. Il s'agit du vaccin ARTERVAC ®, qui a été réalisé à partir de la souche Bucyrus de l'EAV produite sur une culture cellules équines, filtrée, puis inactivée chimiquement avant d'être combinée avec un adjuvant métabolisable [40]. Ce vaccin n'est pas recommandé non plus pour les juments gestantes (absence de données) [40]. Il existe aussi un vaccin inactivé réalisé sans adjuvant : le *formalin-inactivated vaccine without adjuvant* [40, 114, 115].

Ces vaccins utilisés en injection intramusculaire [40, 41, 115, 116] permettent une production d'Ac neutralisants, une à deux semaines après la première injection vaccinale (composée d'une seule dose pour le MLV et de deux doses pour les vaccins inactivés, espacées de 3-6 semaines pour celui avec adjuvant et de 4 semaines pour celui sans adjuvant) [40, 41, 83, 114-116]. Ils permettent ainsi une protection clinique (pas de signes cliniques en dehors d'une brève fièvre) dès 3-4 semaines après la vaccination primaire [40, 41, 73]. Bien que dans certains cas cette réponse Ac puisse persister pendant un ou deux ans [40, 41], une diminution plutôt rapide du titre d'Ac a été décrite dans d'autres cas [114-116]. Il est donc conseillé de faire des rappels de vaccination tous les 6 mois pour le vaccin inactivé avec adjuvant [40], tous les ans pour le MLV [40], et tous les 6 mois-1 an pour le vaccin inactivé sans adjuvant [114, 115]. En effet, suite à un rappel de vaccination, un haut titre d'Ac peut être obtenu pendant 9-12 mois [116] voire plusieurs années [40, 83] pour le MLV, et pendant 6 mois pour le vaccin inactivé sans adjuvant [114].

Il existe également d'autres vaccins expérimentaux. Parmi ceux-ci, dans le cas de la stratégie DIVA (différenciation des animaux infectés et des animaux vaccinés), il existe des EAV non-

virulents développés pour distinguer la présence d'Ac [117] ou du virus [118] due à la vaccination de celle due à une infection naturelle. Afin de distinguer la souche mutée des souches sauvages, une délétion du domaine de neutralisation majeur de GP5 (acides aminés 66 à 112) ou une substitution silencieuse d'un nucléotide, comme pour le plasmide prMLVB réalisé à partir du plasmide prMLV, lui-même obtenu à partir de la souche vaccinale atténuée de l'EAV, peuvent être réalisées [117, 118]. De plus, certains vaccins sont élaborés pour protéger les équidés de certaines souches virales en incorporant dans le plasmide prMLV les épitopes de neutralisation de souches possédant des phénotypes de séroneutralisation distincts [118]. Parmi les vaccins expérimentaux, il a aussi été développé des virus à cycle unique de réplication, tels qu'une particule répliquante recombinante d'un Alphavirus (à savoir le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne) coexprimant les protéines GP5 et M (cf I.c.ii de l'introduction) de la souche Bucyrus. Ce virus à cycle unique de réplication ne peut produire de particules virales infectieuses en dehors de lignées exprimant les protéines d'enveloppe et de capsid de cet Alphavirus [119, 120]. De même, des EAV mutants (appelés disabled infectious single-cycle [DISC]) ne peuvent produire de particules virales infectieuses en dehors de lignées exprimant la protéine manquante (GP2, GP3, GP4) [121]. Un vaccin a aussi été réalisé à partir d'une protéine recombinante du domaine N-terminal (acides aminés 18 à 122) de GP5 [122]. Il y a aussi des vaccins ADN avec des plasmides codant pour la protéine GP5 (chez la souris, obtention d'une meilleure efficacité vaccinale au niveau sérologique avec un plasmide codant pour le domaine N-terminal de GP5 qu'avec des plasmides codant pour la protéine N) [123] ou avec une combinaison de plasmides codant pour les ORFs 2, 5 et 7, et pour l'interleukine 2 équine [124]. Les vaccins obtenus à partir d'ADN recombinant ne sont cependant pas encore utilisés en filière équine [125].

D'autres traitements préventifs sont en cours de développement. En effet, il a été montré *in vitro* que la transfection de cellules équines par des siARNs ciblant l'ORF 1a avant une

Introduction

infection par l'EAV réduisait le titre viral dans la culture cellulaire [126]. De même, des cellules équine traitées avec 100U/mL d'interféron- γ équin recombinant sont protégées d'une infection avec 100 TCID₅₀ d'EAV [127]. Cependant, l'utilisation de ces techniques sur animal vivant est difficilement envisageable à cause des difficultés techniques de mise en place, particulièrement chez le cheval, et surtout par le coût exorbitant que cela représenterait au vu de la taille et du poids d'un équidé.

La vaccination des chevaux peut empêcher l'apparition d'une nouvelle épizootie, l'avortement chez les juments gestantes ainsi que la mort des nouveau-nés. Pour ces derniers, il faut cependant faire attention à ne pas pratiquer une vaccination tant qu'ils sont protégés par les Ac, aussi appelés immunoglobulines (Ig), maternels. En effet, bien que le poulain naisse sans Ig car la barrière placentaire équine est imperméable aux Ig [128-132], contrairement à celles de l'homme et de la souris qui laissent passer les IgG [132, 133], la jument transmet ses Ac neutralisants à son poulain lors de l'allaitement, essentiellement via son colostrum [128-132, 134] (Figure 4). Le colostrum, qui est le premier lait sécrété par la jument [131, 134], est une sécrétion épaisse et collante, de couleur jaune [130, 132, 135], produite par les glandes mammaires dans les deux dernières semaines de la gestation [130, 135]. Il contient essentiellement des IgG, et en moindre quantité des IgA et IgM [129, 135], contrairement au colostrum humain, qui contient majoritairement des IgA, et en moindre quantité des IgG et IgM [133]. La jument produit ensuite du lait en quantité, dès 12-24 h après le poulinage [129, 136-138], pendant 4 mois, avec un pic de production entre 1 et 3 mois [136-138]. Ce lait contient toujours des Ac mais en quantité moindre par rapport au colostrum (plus de dix fois moins) [129]. Le poulain possèdera donc des Ac maternels quelques heures après avoir consommé le colostrum [139, 140], avec un pic de présence au bout d'une semaine [139, 140], et sera donc immunisé contre les antigènes rencontrés par sa mère (Figure 4). De plus,

dans la nature la jument allaite son petit jusqu'à la prochaine mise bas [136, 141], vers 10 mois [141], même si elle a moins de lait après 6 mois [136-138], et en élevage, le sevrage du poulain se fait vers 5-6 mois [136, 141]. Ainsi, si la jument a été immunisée contre l'EAV suite à une infection ou une vaccination, les Ac maternels protégeront le poulain du virus et neutraliseront les vaccins, empêchant l'induction d'une réponse immune chez le poulain. Les Ac maternels anti-EAV disparaîtront ensuite graduellement au bout de 2 à 6 mois [129, 139, 140, 142], rarement 7 mois [139, 140], après la naissance.

Ainsi, si le poulain est vacciné trop tôt, il ne développera pas d'immunité contre le virus. Il est donc conseillé de faire vacciner les poulains de mère immunisée vers 5-6 mois [129, 134, 142]. De plus, même si le poulain produit des IgM et des IgG1 dès sa naissance, il ne commencera à produire la majorité des classes d'Ig qu'à partir de 2 mois [128, 129, 134] (Figure 4). Il ne faut donc pas le vacciner avant cette période.

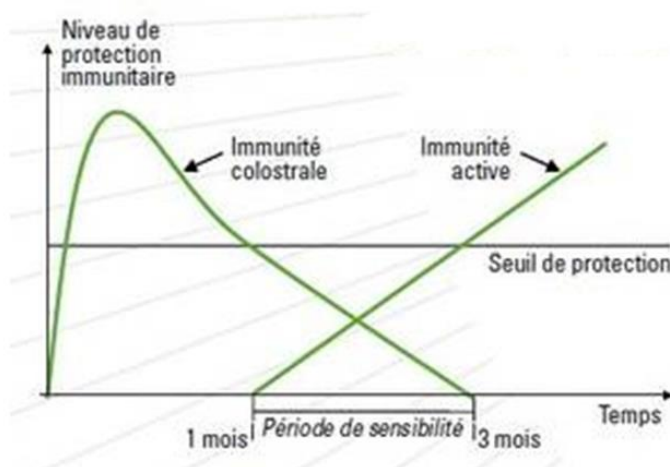


Figure 4 : Protection immunitaire chez les jeunes poulains

Naissant sans Ac, le poulain est protégé pendant le premier mois de sa vie par les Ac maternels qui sont présents dans le colostrum. Le poulain ne commencera à produire lui-même la majorité des classes d'Ig qu'à partir de 2 mois. D'après ANSES-Dozulé (Moussu C. and Saison A.) et al., 2010.

Il faut cependant faire attention à la qualité du colostrum qui ne doit pas présenter une concentration en Ac inférieure à 40 g/L [128, 131]. En effet, dans ce cas le poulain n'aurait

que 3 chances sur 10 d'être correctement immunisé [131] et risquerait donc d'être sensible non seulement à une infection par l'EAV mais aussi à celle par d'autres pathogènes (50 % de risque de morbidité pour un poulain mal immunisé, et 25 % de risques de mortalité [134]). Dans ce cas, il est conseillé de supplémenter le poulain avec du colostrum de bonne qualité [128, 130, 131, 134], qui a été préalablement congelé, ou qui est disponible sous forme de pâte ou de poudre lyophilisée [128, 130]. De plus, pour être correctement immunisé, le poulain doit avoir consommé le colostrum dans les 24 h suivant la naissance. En effet, la perméabilité du tube digestif aux macromolécules, nécessaire à l'absorption des Ac, est maximale durant les 12 premières heures puis décroît entre 12 et 24 h pour s'annuler au-delà de 24 h [128].

iii. Traitements disponibles

Parmi les « traitements » destinés aux étalons en état d'infection persistante, les castrations physique et chimique (traitements dirigés contre l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires [GnRH]) de l'animal peuvent être réalisées.

Parmi les traitements anti-GnRH, des vaccins anti-GnRH et des antagonistes du GnRH ont été développés. A l'origine, ces vaccins anti-GnRH ont été créés dans le but de supprimer les comportements agressifs ou sexuels chez les étalons non destinés à l'élevage mais pouvant être utilisé plus tard pour une reproduction éventuelle [84, 143-145]. De plus, il a été montré que la castration physique induisait des risques hémorragiques plus importants chez l'étalon âgé [143]. Ces vaccins ont aussi été développés dans le but de soigner des maladies hormono-dépendantes telles que les cancers humains de la prostate [144, 146-148] et du sein [144, 148].

Parmi ces vaccins, l'Equity® (CSL, Australie ; 2-3 injections de 200 µg, en intramusculaire ; les rappels étant effectués à 4 et éventuellement 8-12 semaines après la première injection) et

l'Improvac® (CSL, Australie ; 2 injections de 400µg, en intramusculaire, espacées de 4-5 semaines) [84, 149], ainsi que d'autres vaccins expérimentaux (2 à 5 injections de 0,2 à 1000 µg, en intramusculaire, espacées de 2 à 14 semaines) [150-154], ont été développés.

Parmi les antagonistes du GnRH, le cetrolix (BID, Europeptide, France ; 10 µg/kg en intraveineuse pendant 35-38 jours), l'antarelix (BID, Europeptide, France ; 10 µg/kg en intraveineuse pendant 35-38 jours ou 100 µg/kg en une seule prise souscutannée) et l'acycline (plusieurs injections de 330 µg/kg, en intramusculaire, espacées de 5 jours, pendant 50 jours) [67, 155, 156], peuvent être utilisés.

L'utilisation des vaccins anti-GnRH, ou des antagonistes du GnRH [67], diminue la taille du scrotum [84, 149-154, 156], le nombre de spermatozoïdes ainsi que leur qualité et leur mobilité [67, 84, 149-152, 154-156], avec un effet maximum 7 à 25 semaines après la 1^e injection [84, 151, 153, 154]. Les étalons reviennent ensuite progressivement à la normalité, atteinte 4 à 10 mois plus tard [84, 144, 149, 150, 153, 157]. Pour les antagonistes de Fortier, Vidament [67] et Davolli, Ball [156], l'optimum de leur action est atteint entre 8 et 14 semaines après le début du traitement, et les étalons reviennent à la normalité 1 à 4 mois plus tard [67, 155, 156].

Ces vaccins et antagonistes vont aussi limiter temporairement la présence de l'EAV dans le sperme des étalons excréteurs, sans altérer la fertilité de l'étalon à long terme [84]. Ainsi, le virus va disparaître 6 semaines à 6 mois après la 1^e injection [84, 150] (3 semaines après le début du traitement par les antagonistes de Fortier, Vidament [67]), mais va réapparaître 2 à 14 mois après la dernière injection pour certains étalons [150] (2 à 6 semaines après la fin du traitement [40 % toujours sans virus après 3,5 mois] par les antagonistes de Fortier, Vidament [67]). Il se peut néanmoins également que certains de ces résultats soient dus à une élimination spontanée du virus [145].

Introduction

Cependant, l'efficacité de ces vaccins (et de ces antagonistes) sur les hormones, et donc sur l'EAV, dépend des étalons : 50 à 80 % d'efficacité pour diminuer la concentration plasmatique en testostérone, 0 à 100 % d'efficacité pour diminuer la libido (plus efficace chez les jeunes) [67, 84, 143, 149-151, 153, 154]. En effet, l'efficacité des vaccins va dépendre du titre d'Ac anti-GnRH atteint [149-151, 153], qui peut lui-même dépendre de la composition du vaccin [145, 151, 153]. Ainsi, chez l'étalon mature, la vaccination va nécessiter un nombre de doses plus important (3-4 injections au lieu de 2) pour avoir des effets cliniques sur la concentration sanguine en testostérone [143, 145, 149, 150, 154]. De même pour les antagonistes, pour lesquels l'efficacité sur la libido dépend de l'âge des étalons : ils sont efficaces chez le poney de 2-5 ans avec une seule dose, même s'ils n'ont pas d'effet sur la testostérone en 4-6 semaines, mais ils ne sont pas efficaces chez l'étalon mature, même avec plusieurs doses [67, 143, 145, 155]. Lorsque les vaccins et antagonistes réussissent à agir sur le taux plasmatique de testostérone, celui-ci passe de $> 1 \text{ nmol/L}$ ($= 0,29 \text{ ng/mL}$) à $< 0,7 \text{ nmol/L}$ ($= 0,2 \text{ ng/mL}$), dès 4 à 8 semaines après la 1^e injection, et y reste pendant 7 à environ 12 mois [84, 149-154]. Le taux plasmatique physiologique de testostérone varie cependant suivant les saisons : $0,4 \text{ à } 3,2 \text{ ng/mL} = 1,39 \text{ à } 11,09 \text{ nmol/L}$ en période de reproduction et $0,065 \text{ à } 1,9 \text{ ng/mL} = 0,23 \text{ à } 6,59 \text{ nmol/L}$ hors période de reproduction [158-161]. Pour les antagonistes de Fortier, Vidament [67] et Davolli, Ball [156], le taux plasmatique de testostérone diminue dès la 1^e semaine de traitement mais revient à la normale dès la 1^e semaine d'arrêt.

De plus, lorsque la vaccination est efficace, la suppression de la production de testostérone peut faire perdre la place de dominant à l'animal [145]. D'après des études menées sur une période allant jusqu'à un an après la 1^e injection, cette suppression de la testostérone ou de la libido peut d'ailleurs s'avérer non réversible dans certains cas où un 2^e rappel a été effectué [84, 149, 150]. Ces vaccins injectés en intramusculaire peuvent aussi causer, comme un

certain nombre d'autres vaccins, des des réactions inflammatoires locales au site d'injection (27-75 % des chevaux vaccinés) [84, 149, 150, 152-154] ou de la fièvre [150-152, 154].

Parmi les autres méthodes anti-GnRH développées dans le but de supprimer les comportements agressifs ou sexuels chez les étalons non destinés à l'élevage, et pouvant donc avoir un effet sur l'EAV bien que n'ayant pas été testées, l'administration chronique de progestagènes (dont l'altrenogest [Regumate®]) et les agonistes à forte dose peuvent être utilisés. En effet, les progestagènes suppriment la sécrétion hypothalamique de GnRH et ont un effet « calmant » au niveau du système nerveux central [143, 145, 162], diminuant ainsi le comportement agressif ou sexuel [143, 163-165]. Cependant, pour une thérapie efficace, ils doivent être administrés fréquemment et pendant de longues périodes [143, 165]. Or, ils peuvent provoquer des effets indésirables lors de longues administrations, surtout chez les chevaux prépubères (2-4 ans), pour lesquels la spermatogénèse secondaire est toujours supprimée 8 semaines après arrêt du traitement [143, 145, 163]. De plus, ils possèdent un effet anabolique qui peut être considéré comme du dopage lors des courses de chevaux [143, 145] et qui peut ne pas être toléré pour les chevaux destinés à l'alimentation humaine [143].

En administration chronique, l'utilisation d'agonistes d'abord une hypersécrétion de gonadotrophines, puis une désensibilisation pituitaire, entraînant une diminution de la sécrétion de gonadotrophines et de la production de stéroïdes par le testicule [166-169]. La spermatogénèse est aussi altérée, mais la libido n'est pas affectée [167]. Cependant leur effet dépend des espèces et la plupart des étalons semblent être résistants à l'effet supprimeur [143, 169, 170]. De plus, certaines études ne voient que l'induction de l'hypersécrétion des hormones [159].

Introduction

Les inconvénients principaux de ces traitements anti-GnRH sont que leur efficacité varie selon les étalons et que certains étalons traités ne parviennent pas à rétablir un taux de testostérone ou une libido physiologiques après la vaccination dans certains cas où un 2^e rappel a été effectué [84, 149, 150]. Un autre inconvénient est le coût très important de doses effectives pour les antagonistes du GnRH [143, 145].

De plus, dans le cas d'une castration physique, l'étalon ne peut plus être utilisé ni en monte naturelle ni en insémination artificielle. Ainsi, d'autres traitements sont en cours de développement.

In vitro, il a été développé des oligomères morpholino-phosphorodiamidate conjugués à un peptide (P-PMOs) capables d'éliminer l'EAV de cellules Vero en état d'infection aiguë [171] et de cellules issues de l'appareil reproducteur femelle (cellules HeLa) en état d'infection persistante [172]. Les oligomères morpholino-phosphorodiamidate (PMOs) sont des brins d'ADN simple brin, de 20-25 nucléotides généralement, capables de s'apparier à une séquence d'ARN complémentaire (région 5' UTR de l'EAV pour les P-PMOs qui ont été développés), et d'empêcher sa traduction et répllication par encombrement stérique [171, 172]. Les PMOs sont hydrosolubles et résistants aux nucléases [173], et leur adressage aux cellules peut être amélioré par ligation à des peptides riches en arginine [174-176]. Ils sont alors appelés P-PMOs. L'efficacité de ces P-PMOs reste cependant à démontrer *in vivo* [172].

D'autres PMOs ont aussi prouvé leur efficacité, *in vitro* [175, 177-179] et *in vivo* [179-181], sur d'autres nidovirus tels que le VSDRP (Virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc) [177], le virus de l'hépatite murine (MHV) [178, 179], et le SARS-CoV [179], mais aussi sur d'autres virus à ARN tels que les *Flaviridae* comme le virus de l'hépatite C (VHC) [180], le virus West Nile [175], le virus de la dengue [175], et le virus de la fièvre jaune [175], ou les *Filoviridae* comprenant le virus Ebola [181].

Il a aussi été démontré que des agents fixant les carbohydrates (dont les glycoprotéines), tels que les lectines (pouvant provenir de plantes), pouvaient avoir *in vitro* et *in vivo* [182] des propriétés antivirales contre les nidovirus (tels que l'EAV, le VSDRP, le MHV, le SARS-CoV ou des coronavirus félins)[183-185], mais aussi contre certains herpesvirus (HSV1 et HSV2, l'EBV, le CMV et l'herpès virus humain de type 6 [HHV6]) [186-188], certains rétrovirus (le VIH et les virus de l'immunodéficience simienne et féline) [186, 188, 189], le VHC [190, 191], les virus de la grippe A et B [187, 188, 192], le virus Ebola [182], etc.

Cependant, ces traitements antiviraux entraîneraient des coûts importants lors d'une application *in vivo* chez les étalons infectés.

Parmi les « traitements » éventuels, une méthode consiste non pas à traiter l'étalon mais à retirer le virus de la semence infectée par l'EAV, afin de pouvoir continuer à l'utiliser en reproduction [193]. Cette technique est aussi valable chez l'homme pour les semences contaminées par le VIH ou le VHC [194-196]. Pour cela, brièvement, la semence est diluée dans un liquide préservant sa capacité fertilisante et centrifugée sur des gradients de densité, puis les culots de sperme sont mis en contact avec une solution de lavage afin de récupérer au bout de 30-45 minutes la partie supérieure du surnageant [193, 194, 196].

c. Le Virus

i. Classification

L'EAV appartient à l'ordre des *Nidovirales*, qui comprend la famille des *Arteriviridae*, la famille des *Coronaviridae*, la famille des *Mesoniviridae* et la famille des *Roniviridae* [76, 197-202]. Au sein de la famille des *Arteriviridae*, jusqu'en 2016, il n'y avait qu'un seul genre : celui des *Arterivirus*, auquel appartenait l'EAV, tout comme le Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (VSDRP), le Virus augmentant la lactate déshydrogénase

Introduction

chez la souris (LDV), le Virus de la fièvre hémorragique simienne (SHFV), et le Virus de la Maladie de l'Opossum (WPDV) [76, 200, 203-207]. Désormais, avec la description de nouveaux arterivirus, la famille des *Arteriviridae* a été divisée en plusieurs genres : le genre *Dipartevirus*, le genre *Equartevirus*, le genre *Nesartevirus*, le genre *Porartevirus* et le genre *Simartevirus* [201, 206, 207] (Figure 5).

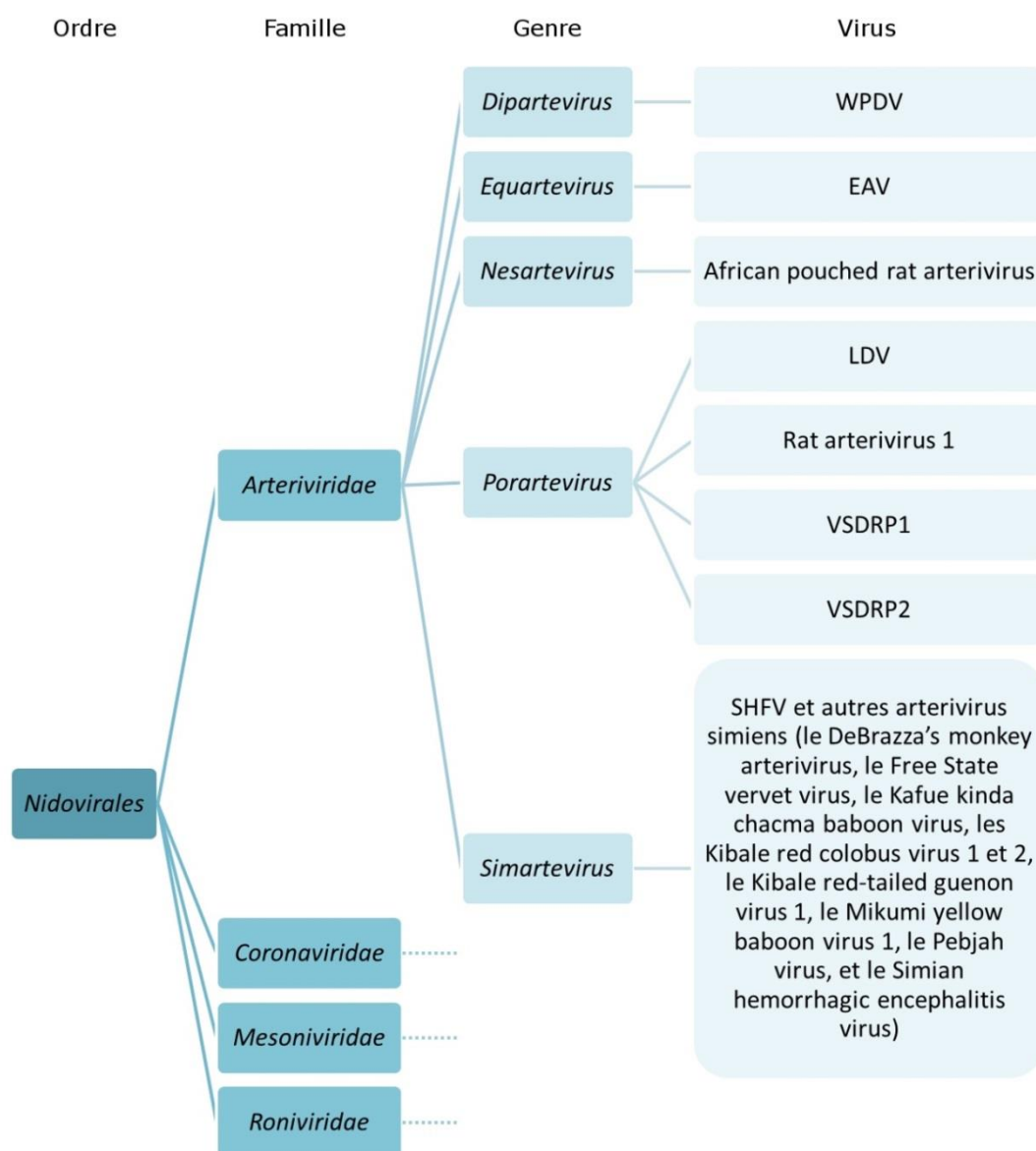


Figure 5 : Arbre phylogénétique des Nidovirales

L'ordre des Nidovirales est divisé en quatre familles dont celle des Arteriviridae à laquelle appartient l'EAV. Au sein de cette famille, l'EAV est classé dans le genre *Equartevirus*. Figure réalisée à partir d'une synthèse bibliographique.

Ces virus étaient classés dans le genre *Arterivirus*, car des lésions importantes au niveau des artères étaient retrouvées chez leurs hôtes suite à l'infection [203]. Cependant, les signes cliniques associés aux infections peuvent être bien différents. Ainsi, le LDV est le seul à être généralement non-pathogène (infection asymptomatique ou pathologie légère avec immunomodulation) : il provoque l'augmentation de l'expression de la lactate déshydrogénase chez la souris [76, 204, 208]. Le SHFV peut établir, suivant les espèces, soit des infections persistantes (pour les patas, les babouins olives et les grivets [singes verts africains]), soit des infections fatales (pour les SHFV africains lorsqu'ils infectent des singes rhesus asiatiques) [76, 204, 208, 209].

Tous les anciens *Arterivirus* ont une spécificité d'espèce très importante : l'EAV est spécifique des équidés (chevaux, ânes, mules, zèbres) [20, 78, 208], le VSDRP et le LDV infectent respectivement les porcins et les murinés [204, 208], le SHFV est spécifique de plusieurs espèces de singes (patas, babouins olives, grivets [singes verts africains], singes rhesus asiatiques, colobes rouge d'Ouganda et cercopithèques asagènes) [204, 208, 209], et le WPDV infecte l'opossum d'Australie, aussi appelé l'opossum à queue en brosse [204, 208]. Aucun *Arteriviridae* pouvant infecter les humains n'a été identifié à ce jour. Cependant les perspectives de xénogreffes pour les êtres humains (pour l'instant interdites en France), pour pallier le manque de don d'organes, à partir des porcins ou des singes, qui pourraient être infectés par des *Arteriviridae*, soulève la question d'une éventuelle adaptation des *Arteriviridae* aux humains [204].

Les souches d'EAV sont classées en deux groupes : le Nord-Américain (NA) et l'Européen (EU), qui est lui-même subdivisé en deux sous-groupes : le sous-groupe Européen-1 (EU-1) et le sous-groupe Européen-2 (EU-2) [10, 12, 13]. Cette classification des souches d'EAV est en général basée sur l'analyse de l'ORF5 [93]. Elle peut cependant aussi se faire en analysant

Introduction

la région codante de la protéine non structurale nsp9 située sur l'ORF1 du génome viral [93]. Le groupe NA et le groupe EU ne présentent que 15 % de différences au niveau nucléotidique et les divergence principales de séquence se situent au niveau de l'ORF1a, qui présente une variation importante dans la région centrale de nsp2, de l'ORF3 et de l'ORF5 [27]. Cette classification des souches peut se réaliser à l'aide de puces à reséquençage à ADN à haute densité (RMA) [93].

ii. Structure du virus

Comme tous les autres *Arteriviridae*, l'EAV est un virus enveloppé sphérique [199], sans spicules ou autres projections de grandes taille [199], à ARN simple brin positif encapsidé dans une capside isométrique [199, 210] (Figure 6). Sa capside de 25-35 nm de diamètre est composée de protéines N organisées en tétramères [2, 76, 210-212], arrangées en double-couche [203], et séparées de l'enveloppe par 2-3 nm [203], pour former un virus de 40-70 nm de diamètre [211, 212]. L'EAV possède un génome de 12,7kb, ce qui est le plus petit génome des *Nidovirales*. En effet, les *Coronaviridae* et *Roniviridae* possèdent les plus larges génomes ARN connus [26-32 kb], alors que les *Mesoniviridae* possèdent un génome d'environ 20 kb, et les *Arteriviridae* possèdent un génome entre 12,7 et 15,7 kb) [2, 36, 43, 199, 202, 213, 214]. Ce génome, dont les 2/3 sont occupés par l'ORF1a et l'ORF1b [199], code pour 8 protéines structurales et 12 protéines non-structurales (nsp), qui sont décrites dans le tableau ci-dessous. Les protéines nsp (Tableau 2) sont obtenues à partir des précurseurs polyprotéiques pp1a et pp1ab, traduits à partir des ORFs 1a et 1b et clivés de façon co ou post-traductionnelle [214].

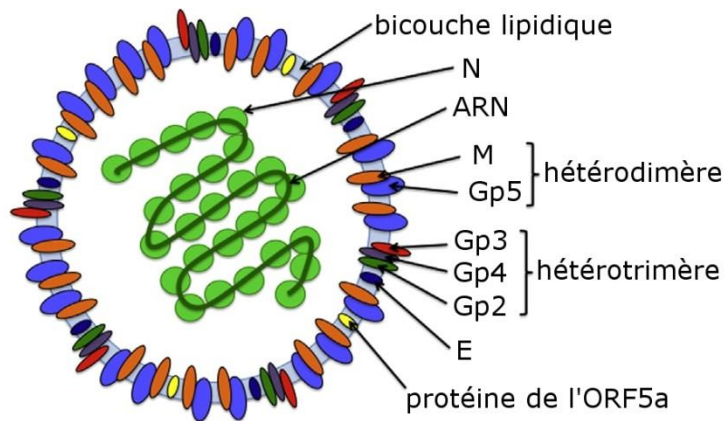


Figure 6 : Structure de l'EAV

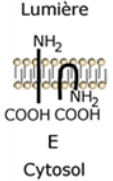
L'EAV est un virus enveloppé sphérique. Il possède 7 types de protéines membranaires dont 5 d'entre elles sont organisées en hétérodimères et hétérotrimères. Son génome ARN simple brin positif est entouré d'une capsidie isométrique composée de protéines N organisées en tétramères.

Figure traduite d'après Veit et al. 2014.

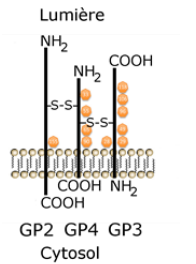
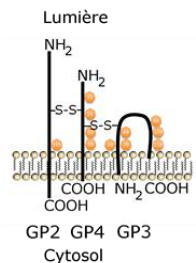
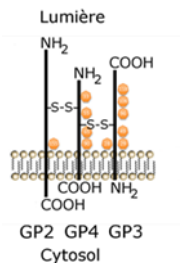
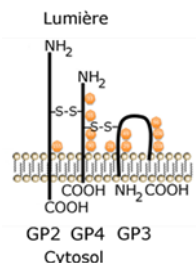
Tableau 2 : Les protéines de l'EAV

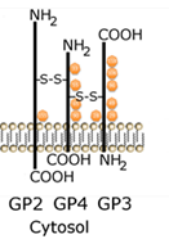
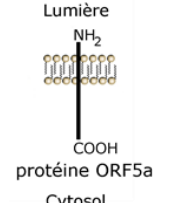
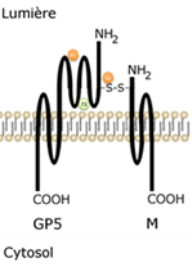
Nsp1	<p>Réplicase Protéase PCPβ (papain-like cystein protease)[27, 199]</p> <p>Codée par l'ORF1a, 29 kDa, première protéine virale exprimée ; possède un domaine en doigt de zinc (<i>zinc finger</i>), grâce à quatre résidus Cys et His, qui permet les interactions protéine-acides nucléiques et protéine-protéine, et un domaine papain-like cysteine protease (PCP ou PLP) α et β (α est fonctionnellement inactive mais aide à la liaison aux protéines et acides nucléiques). [27, 208, 215]</p> <p>Nsp1 est essentielle pour la transcription d'ARN messagers subgénomiques (sg ARNm) mais n'est pas indispensable à la réplication du génome [199], et contrôle la balance entre les deux processus. Elle est également importante pour la biogenèse des virions et régule l'abondance des divers ARNm dans les cellules infectées. [27]</p> <p>capacité d'inhiber la synthèse d'IFN-β [215, 216]</p> <p>localisation : noyau (première localisation) et cytoplasme (région périnucléaire, plus tard dans l'infection) [215-217]</p>
Nsp2	<p>Réplicase Protéase CP (papain-like cystéine protéase), PLP2-DUB protein [27, 199, 218]</p> <p>Codée par l'ORF1a, 61 kDa ; son domaine PLP2-DUB est un cofacteur dans le</p>

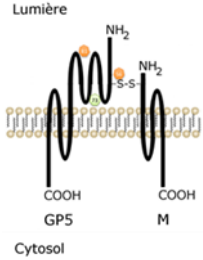
	<p>clivage du site entre nsp4 et nsp5 par nsp4 ; possède trois régions hydrophobes (vers l'acide aminé [aa] 450, aa 490, et entre aa 520 et aa 640, la dernière région étant suffisamment large pour contenir plusieurs domaines transmembranaires) et une région N-terminale possédant un domaine à activité cystéine protéase, responsable du clivage entre nsp2 et nsp3, et une activité de dé-ubiquitination (DUB)[218], qui enlève l'ubiquitine (fixation à l'ubiquitine grâce à un doigt de zinc) des facteurs de signalisation de l'immunité innée [218], et dirige le clivage du site entre nsp2 et nsp3 [218]</p> <p>Formation des vésicules ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation = machine de dégradation des protéines associée au réticulum endoplasmique) à double membrane pour réplication du génome à l'intérieur (prolifération des membranes du réticulum endoplasmique, induction d'une courbure de la membrane du réticulum endoplasmique permettant le doublement de la membrane des vésicules)</p> <p>capacité d'inhiber la synthèse d'IFN-β [216]</p> <p>localisation : cytoplasme (région périnucléaire)</p>
Nsp3	<p>Codée par l'ORF1a, 22 kDa, hautement hydrophobe, possède probablement 4 domaines transmembranaires (joue probablement un rôle dans l'interaction entre le complexe de réplication/transcription [RTC] et les membranes de l'hôte) et 4 cystéines dans le premier domaine luminal prédit (aa 853 à 902) impliquées dans la formation de vésicules à double membrane [27]</p> <p>Son domaine N-terminal (aa 833 à 993) sert probablement de séquence signal pour l'insertion de la polyprotéine pp1ab (après clivage nsp1) avant le clivage de nsp2 [27]</p> <p>Formation des vésicules ERAD à double membrane pour réplication du génome à l'intérieur (induction d'une courbure de la membrane du réticulum endoplasmique permettant le doublement de la membrane des vésicules)</p>
Nsp4	<p>Protéase principale du virus, M_{pro}, chymotrypsine-like serine protease [27]</p> <p>Codée par l'ORF1a, 21 kDa, possède un domaine C-terminal (qui joue un rôle dans les interactions protéines-protéines) connecté à la structure catalytique en double tonneau (dont les aa Ser-120 [résidu le plus important], His-39 et Asp-65 porte l'activité catalytique) par les aa 155 et 156. [27]</p> <p>Processe les polypeptides pp1a et pp1ab après libération des nsp1 et 2 [27]</p>
Nsp5	<p>Codée par ORF1a, 41 kDa, possède de nombreuses régions hydrophobes, joue probablement un rôle dans l'association du RTC (et des intermédiaires nsp5-8ou7ou12) à la membrane [27]</p> <p>Formation vésicules ERAD à double membrane pour réplication du génome à l'intérieur (rend le réticulum endoplasmique vésiculeux, interagit probablement</p>

	avec OS-9 et EDEM-1 de ERAD via un N-glycan pour permettre formation des DMVs, peut détourner ERAD tuning vesicles [stade plus tardif])
Nsp6	Codée par l'ORF1a, 3 kDa, générée par la voie mineure de protéolyse [27]
Nsp7 α/β	Réplicase , codée par l'ORF1a, 25 kDa, générée par la voie mineure de protéolyse, site de clivage par nsp4 entre α (région N-terminale, contient quatre régions hydrophobes, <i>three α-helices packed against a mixed β-sheet</i> , nécessaire pour la synthèse d'ARN) et β (région C-terminale) [27] localisation : cytoplasme (région périnucléaire)
Nsp8	Codée par l'ORF1a, 5,5 kDa [27]
Nsp9	Réplicase , codée par l'ORF1b, 80kDa, aa 1678 à 2370 de pp1a, contient le domaine RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) [199] et est donc la sous-unité catalytique du RTC, initie la synthèse d'ARN par un mécanisme <i>de novo</i> impliquant <i>homopolymeric templates in a template-specific manner</i> (étape qui peut être bloquée par une augmentation de la concentration intracellulaire de Zn^{2+}) [27]
Nsp10	Réplicase , codée par l'ORF1b, 51kDa, possède, en N-terminal, un domaine prédictif liant le zinc (ZBD, avec treize résidus Cys et His ; rôle dans réplication ARN, transcription sg ARNm et biogénèse des virions) et, en C-terminal, un domaine hélicase [199] (possède un domaine ATPase et activités de déroulement de duplex d'acide nucléique qui nécessitent la présence en 5' d'une région simple brin pour lui indiquer la polarité 5'-3' de la réaction). Sous-unité de la réplicase la plus conservée [27]
Nsp11	Codée par l'ORF1b, 26 kDa [27] Endoribonucléase spécifique des pyrimidines en particulier uridydes (NendoU [nidoviral-endonuclease specific for U] [199], marqueur génétique non présent chez les virus à ARN autres que les <i>Nidovirales</i> [198]) (activité dépendante, <i>in vitro</i> , des cations divalents tels que Mn^{2+} [198, 199]), clive préférentiellement les ARN doubles brins mais peut aussi cliver les simples brins [198] capacité d'inhiber la synthèse d'IFN- β [216]
Nsp12	Codée par l'ORF1b, 12 kDa [27]
E  (à partir de [27])	Protéine structurale, petite et hydrophobe [203], codée par l'ORF2a (sur un ARNm bicistronique avec l'ORF2b), 8 kDa [27] protéine transmembranaire intégrale avec une séquence signal ancre [<i>anchor</i>] non clivée, présente au centre de la molécule ; protéine transmembranaire de type III ou traverse deux fois la membrane en ayant ses deux bout terminaux du côté cytoplasmique ; possède un unique résidu cystéine qui ne fait pas de pont S-S, ainsi qu'un site de myristoylation en N-terminal suivi d'un site de phosphorylation pour la caséine kinase II [27]

Introduction

	<p>3^e protéine d'enveloppe la plus abondante, probablement liée de façon non-covalente à GP2/CP3/GP4, essentielle pour la formation de particules virales [27]</p>
<p>GP2</p> <p>(GP2b autrefois appelée G_S [219])</p>   <p>(à partir de [27])</p>	<p>Protéine structurale glycosylée, codée par l'ORF2b (sur un ARNm bicistronique avec l'ORF2a), 25 kDa [27, 211]</p> <p>glycoprotéine transmembranaire de type I avec un unique site de N-glycosylation en Asn-155, trois cystéines extracellulaires en N-terminal qui semblent être importantes pour la liaison interprotéines [Cys-102 en liaison avec GP4, et Cys-48 et Cys-137 forment un pont S-S intramoléculaire] et pour la fonction de la protéine et une cystéine au niveau de son site d'ancrage → suivant les ponts S-S il en résulte quatre monomères et un dimère de GP2 [27]</p> <p>la forme dimérique de GP2 forme un hétérotrimère avec GP3 (via GP4, une fois GP2/4 formé, après libération du virus, et donc un hétérodimère GP2/GP4 aussi présent sur les particules virales) et GP4 (forme entièrement glycosylée) avec pont S-S [203] (hétérotrimère qui est responsable du tropisme cellulaire [203, 220], favorise l'incorporation de E dans le virion [203, 221]). Cet hétérotrimère est probablement lié de façon non-covalente à E, essentielle pour la formation de particules virales infectieuses (et donc l'entrée du virus dans la cellule) [27]</p>
<p>GP3</p>   <p>(à partir de [27])</p>	<p>Protéine structurale glycosylée, codée par l'ORF3, 36-42 kDa [27]</p> <p>glycoprotéine transmembranaire de classe II, c'est-à-dire liée à la membrane par sa séquence N-terminale non clivée, ou protéine de classe IV, c'est-à-dire ancrée à la membrane par ses deux domaines terminaux hydrophobes ; possède six sites de N-glycosylation potentiels (Asn-28, Asn-29, Asn-49, Asn-96, Asn-106, Asn-118) [50], deux sites putatifs de N-myristoylation, et trois sites potentiels de phosphorylation par la caséine kinase II [27]</p> <p>elle forme un hétérotrimère avec GP2 (forme dimérique) et 4 (forme entièrement glycosylée) en formant un pont S-S avec GP4 une fois que le virus a été formé [203] (responsable du tropisme cellulaire [203, 220]), favorise l'incorporation de E dans le virion [221]), probablement lié de façon non-covalente à E, essentielle pour la formation de particules virales infectieuses (et donc l'entrée du virus dans la cellule) [27]</p>
<p>GP4</p>	<p>Protéine structurale glycosylée, codée par l'ORF4, 28 kDa sous sa forme entièrement glycosylée [27]</p> <p>glycoprotéine transmembranaire de type I, c'est-à-dire avec séquence d'adressage en N-terminal et séquence d'ancrage en C-terminal, trois des quatre</p>

 <p>GP2 GP4 GP3 Cytosol</p> <p>(à partir de [27])</p>	<p>sites de N-glycosylation potentiels (Asn-33, Asn-55, Asn-65, Asn-90) qu'elle possède sont effectivement glycosylés, mais le processus est inefficace donc seule une faible partie des GP4 est entièrement glycosylée [27]</p> <p>la forme entièrement glycosylée forme un hétérotrimère avec GP2 (forme dimérique) et GP3 (interagit avec GP4, une fois GP2/4 formé, après libération du virus, et donc hétérodimère GP2/GP4 aussi présent sur les particules virales) avec ponts SS [203] (responsable du tropisme cellulaire [203, 220], favorise l'incorporation de E dans le virion [221]). Cet hétérotrimère est probablement lié de façon non-covalente à E, essentielle pour la formation de particules virales infectieuses (et donc entrée du virus ds la cellule) [27]</p>
<p>ORF5a protein</p>  <p>proteïne ORF5a Cytosol</p> <p>(à partir de [27])</p>	<p>Protéine structurale ?, codée par l'ORF5a, 59 aa, codée par le même sg ARNm que GP5, impliquant probablement une lecture de faible affinité par le ribosome [27]</p> <p>protéine transmembranaire de type III avec une séquence signal centrale, un domaine N-terminal luminal, et un domaine C-terminal cytosolique [27]</p> <p>elle pourrait être la 8^e protéine structurale des <i>Arteriviridae</i> et pourrait être importante pour l'infection car son absence (cripples EAV) entraîne une réduction du titre viral ainsi que la formation de PFU plus petites [27]</p>
<p>GP5 (autrefois appelée G_L [219])</p>  <p>GP5 M Cytosol</p> <p>(à partir de [27])</p>	<p>Protéine structurale glycosylée (un ou deux sites de glycosylation [Asn56 et Asn81] [50], sauf pour les EAV durant le pic de 2006-2007 aux USA, qui ont un troisième site potentiel sur Asn73 [50]), codée par l'ORF5b [211], 30 à 42 kDa (smear dû à l'addition de poly-N-acétyllactosamine durant le transport de la protéine le long de la voie de sécrétion [le rôle de ces modifications n'est pas clair]) [27]</p> <p>protéine transmembranaire intégrale de type IV avec trois domaines transmembranaires compris entre l'aa 116 et l'aa 181, possède un ectodomaine de 95 aa (aa19 à 115) qui contient une séquence en N-terminal (aa 1 à 18) qui est clivée et quatre sites de fixation d'Ac neutralisants (aa 49, aa 61, aa 67 à 90, aa 99 à 106 [222]; ces sites, en dehors du premier, sont situés dans la région variable de la protéine, et le dernier site exprime des épitopes dont les séquences se chevauchent et qui pourraient interagir avec les trois autres sites pour former des épitopes conformationnels) [27]</p> <p>protéine d'enveloppe la plus abondante avec M [199] avec laquelle elle forme un hétérodimère lié par un pont S-S [199] entre Cys-34 de GP5 et Cys-8 de M (le GP5 néosynthétisé interagit rapidement avec une protéine M ; la formation de GP5/M est nécessaire pour obtenir les modifications post-traductionnelles, c'est-à-dire</p>

	<p>les glycosylations, de GP5 et la maturation conformationnelle des sites servants d'épitopes, même induire une production d'Ac neutralisants chez le cheval peut être induite avec des peptides dérivants de portions de l'ectodomaine de GP5) [27] ; les résidus sialiques de GP5 sont reconnus par la sialoadhésine CD169 (lectine présente sur les macrophages)[203] ; essentielle pour la formation de particules virales (GP5/M permet probablement l'interaction entre N et l'enveloppe virale) [221]</p>
<p>M</p>  <p>(à partir de [27])</p>	<p>Protéine structurale non glycosylée, codée par l'ORF6, 16 kDa [27, 40, 211]</p> <p>protéine d'enveloppe la plus conservée chez les <i>Arteriviridae</i> [203] ; possède trois domaines transmembranaires [199, 203], une courte région N-terminale (aa 10 à 18) exposée à la surface du virion et une région C-terminale d'environ 72 aa enfermée à l'intérieur du virus ; possède cinq résidus méthionines et un cystéine ; le domaine C-terminal [aa 88 à 162] contient des épitopes linéaires [27]</p> <p>protéine d'enveloppe la plus abondante avec GP5 [199] avec laquelle elle forme un hétérodimère lié par un pont S-S [199] entre Cys-34 de GP5 et Cys-8 de M (la protéine M néosynthétisée est incorporée lentement dans l'hétérodimère) [203] ; M se lie aux protéoglycanes à héparane sulfate de la cellule [203] ; essentielle pour la formation de particules virales (GP5/M permet probablement l'interaction entre N et l'enveloppe virale) [221] ; forme également un homodimère avec des liaisons covalentes mais cet homodimère n'est pas incorporé dans le virus [27]</p> <p>probablement impliquée dans la construction du virus [27]</p>
N	<p>nucléocapside, codée par l'ORF7 (très conservée parmi les différentes souches du virus), 14 kDa [27, 40, 211]</p> <p>tétramère, arrangées en double couche (double-layered) et séparées de l'enveloppe par 2-3nm [203] ; c'est le domaine N-terminal [aa 1 à 17], la région la moins conservée, qui interagit probablement avec l'ARN viral génomique lors de l'assemblage de la nucléocapside [27] ; le domaine C-terminal [aa 49 à 110] permet quant à lui la formation d'un dimère grâce une conformation en feuillet bêta encadrée par des hélices alpha [27] ; la région de l'aa 1 à l'aa 69 a été identifiée comme la région la plus immunoréactive</p> <p>protéine virale la plus abondante de la cellule et qui représente plus de 30 % des molécules protéiques dans les particules virales [27] ; essentielle pour la formation de particules virales (GP5/M permet probablement l'interaction entre N et l'enveloppe virale) [221] ;</p> <p>synthétisée dans le cytoplasme où elle est localisée majoritairement (une partie est localisée dans les nucléoles du noyau) [27, 217]</p>

iii. Infections *in vitro*

Contrairement aux autres *Arteriviridae*, l'EAV est capable d'infecter *in vitro* de nombreuses cultures primaires de cellules équines, de lapin et d'hamster [223-225]. Il est également capable d'infecter diverses lignées cellulaires telles que des cellules dermiques équines (cellules E. Derm, aussi appelée NBL-6 [23, 82, 115, 226]), des cellules endothéliales équines (cellules EEC [213]), des cellules de poumon de hamster (cellules HmLu [223]), et des cellules de rein de lapin (cellules RK13 [2, 23, 24, 43, 82, 115, 213] et LLC-RK1 [226]), d'hamster (cellules BHK-21 [115, 213, 220, 223, 226, 227]) et de singe (cellules Vero, JINET, LLC-MK2 et MARC-145 [2, 22, 82, 115, 213, 220, 223]).

D'autres *Arteriviridae*, tels que le VSDRP, ne peuvent se répliquer que dans quelques cultures cellulaires. En effet, la majorité des souches virales de VSDRP est connue pour se répliquer dans des cultures primaires de macrophages alvéolaires porcins (PAMs) [76, 210, 213, 228, 229], et peut se répliquer ou peut être adaptée à la culture sur des lignées (dont CL2621 et MARC-145) dérivant d'une lignée de singes verts africains (MA-104) [76, 210, 213, 228, 229].

Cependant, l'EAV n'est pas capable d'infecter des animaux non-équins, et aucun modèle *in vitro* d'infection persistante de cellules de l'appareil reproducteur mâle n'était disponible au début de ce projet.

II) Infection virale et immunité

a. Déroulement de l'infection par l'EAV dans l'organisme et cellules infectées

Lors d'une infection par voie respiratoire, l'EAV infecte d'abord, les macrophages [6, 76, 210, 230, 231]. Cependant des expériences *in vitro* ont montré que, contrairement aux macrophages dérivant de monocytes circulants, les macrophages alvéolaires ne permettaient pas une réplication productive de l'EAV [230].

Ainsi, à 24 h p.i., l'EAV a infecté les macrophages alvéolaires et l'épithélium respiratoire (pneumocytes) [232]. Après 48 h p.i., l'EAV peut être trouvé au niveau des nœuds lymphatiques satellites [232]. Après réplication du virus dans les nœuds lymphatiques [232], les monocytes circulants [232] et les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires [6, 36, 230, 232, 233], l'EAV va se propager au reste de l'organisme [232]. Il va ainsi atteindre les organes lymphoïdes (nœuds lymphatiques, rate) [6, 35, 38, 45, 232], le foie [38], les reins (cellules épithéliales tubulaires, cellules endothéliales glomérulaires, cellules mésangiales glomérulaires) [38, 45, 232], le fluide péricardique [45], l'intestin (entérocytes, cellules endothéliales vasculaires) [232], les organes de l'appareil reproducteur mâle [35, 38, 45] et les cellules épithéliales des glandes endométriales de la jument gestante [31]. Au niveau des cellules immunitaires, l'EAV peut infecter, en plus des macrophages, les L_T (CD3+) de certains chevaux [233, 234] et L_B IgM+ [233].

Entre 6 et 8 jpi, l'EAV a infecté, au niveau des vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales [36, 230, 232, 233], les myocytes de la média [232], ainsi que les péricytes [232]. À 10 jpi, les dommages les plus importants sont observés dans les vaisseaux sanguins [232]. Puis le virus va disparaître progressivement (sauf dans le cas de la persistance au niveau de l'appareil reproducteur mâle) [232]. Il va cependant rester 10 à 21 jours au niveau de l'épithélium rénal tubulaire [232].

b. L'infection par l'EAV et l'immunité innée

i. Détection des virus par les récepteurs de reconnaissance de motifs et production d'interférons

Comme d'autres virus de la famille des *Arteriviridae*, tels que le VSDRP, le LDV et le SHFV [208, 215, 216, 235, 236], l'EAV est capable d'inhiber la réponse interféron (IFN) de type I (IFN-I = IFN- α et β) des cellules qu'il infecte [208, 215, 216, 218]. Les IFN-I sont produits par les cellules suite à une infection virale afin de protéger les cellules adjacentes de l'infection. En effet, les IFN-I induisent la transcription et la synthèse de protéines anti-virales qui peuvent bloquer plusieurs étapes clés de l'infection productive des cellules comme l'entrée du virus dans la cellule, la décapsidation du virus, la transcription des ARNm viraux, la synthèse des protéines virales, la réplication du virus, l'assemblage ou le relargage des virions néoformés [237].

Les protéines de l'EAV responsables de cet effet inhibiteur sur la production des IFN- α et β sont trois protéines non structurales du virus appelées nsp1 [208, 215, 216], nsp2 [216, 218] et nsp11 [216] ; nsp1 présentant le plus fort effet inhibiteur [216].

En effet, nsp2 via son domaine PLP2-DUB, qui possède une activité de dé-ubiquitination (DUB), enlève l'ubiquitine des facteurs de signalisation de l'immunité innée [218]. L'ubiquitination de ces facteurs permettant d'initier les cascades de signalisations [218, 238], leur dé-ubiquitination empêche la production d'IFN- β suite à la reconnaissance de l'ARN viral [218] (Figure 7).

Cette reconnaissance du génome viral s'effectue via les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR=Pattern Recognition Receptors), comprenant les Toll Like Receptors (TLR) et les RIG-1 Like Receptors (RLR), qui sont respectivement des glycoprotéines

Introduction

transmembranaires et des récepteurs cytoplasmiques [133, 237, 239, 240]. Ils sont impliqués dans la détection des pathogènes via la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux micro-organismes (MAMPs, aussi appelés PAMPs, pour Pathogen-associated molecular patterns) [133, 239, 240]. Les TLR sont capables de reconnaître des lipoprotéines, des glycoprotéines et des génomes de pathogènes [133, 237, 239-241], alors que les RLR (RIG-1 et MDA5), qui sont des ARN hélicases, ne détectent que les génomes [133, 237, 239] (Figure 7).

Certains TLR, tels que le TLR-2 et le TLR-4, qui sont situés à la surface de la cellule eucaryote, reconnaissent essentiellement les MAMPs bactériens. En effet, le TLR-2 reconnaît les lipoprotéines bactériennes ou virales, les peptidoglycanes et les acides lipotéïchoïques [133, 239-242] ; et le TLR-4 reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) et les glycoprotéines virales [133, 237, 239-241]. Ces deux TLR peuvent cependant reconnaître des ligands endogènes parmi les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs), qui sont des molécules associées à des dégâts cellulaires causés par une inflammation, tels que la protéine HMGB1 (high-mobility group box 1 = protéine B1 du groupe de haute mobilité) et plusieurs protéines HSPs (heat shock proteins = protéines de choc thermique) [243, 244].

D'autres TLR tels que les TLR-3, 7 et 8, situés au niveau des endosomes, sont connus pour la reconnaissance des génomes viraux. Ainsi, le TLR-3 reconnaît les ARN doubles brins viraux, et les TLR-7 et 8 (seul le TLR-7 pour la souris, contrairement à l'homme) reconnaissent les ARN simples brins riches en G/U d'origine virale, et également bactérienne pour le TLR-7 [133, 237, 239, 240, 242, 245]. Quant au TLR-9, récepteur endosomal lui-aussi, il reconnaît les motifs non-méthylés d'ADN CpG (cytosine-phosphate-guanine) aussi bien des bactéries que des virus à ADN [133, 237, 239, 240].

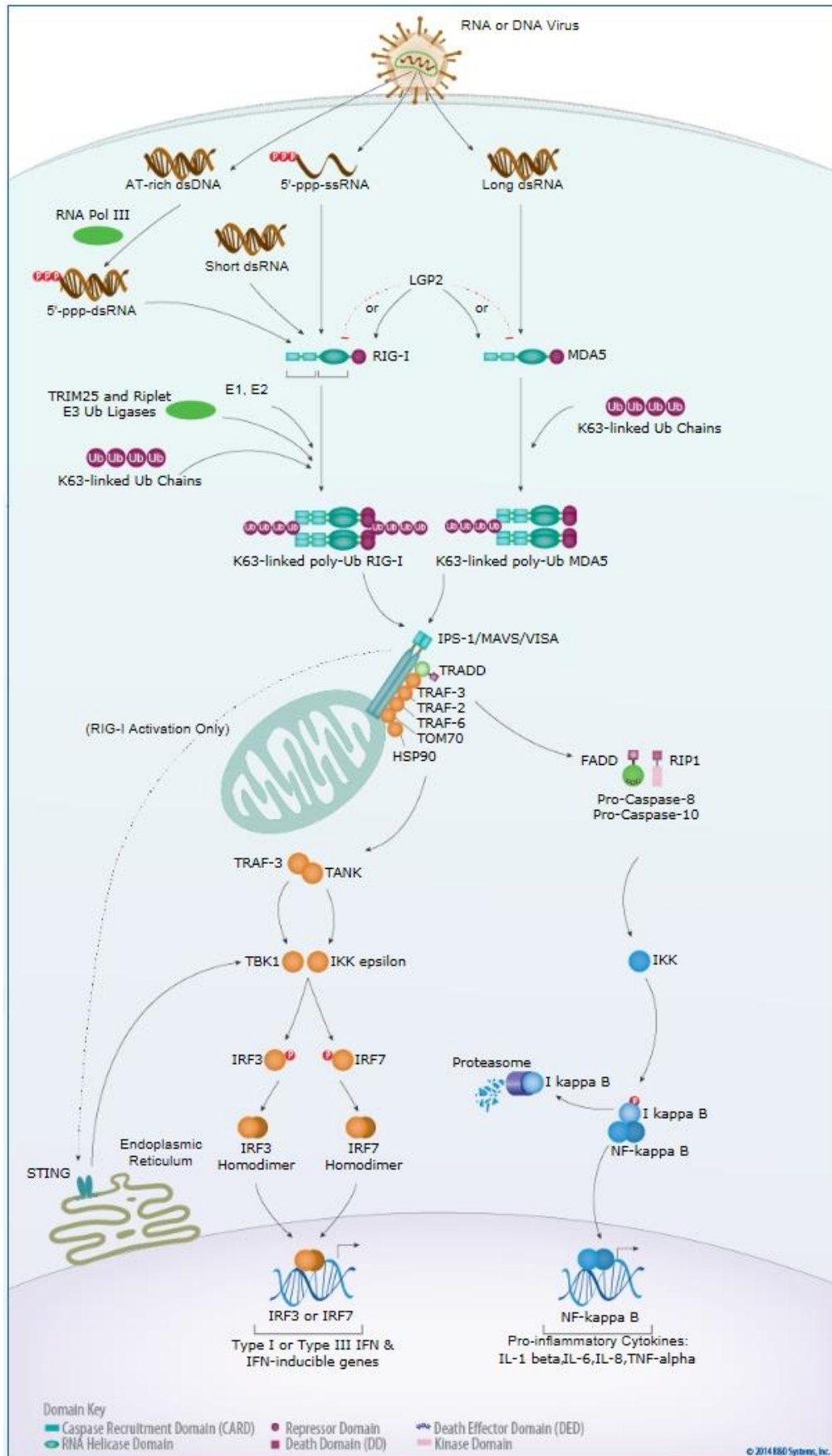


Figure 7 : Signalisation induite par les RLR suite à une infection virale
D'après R & D systems.

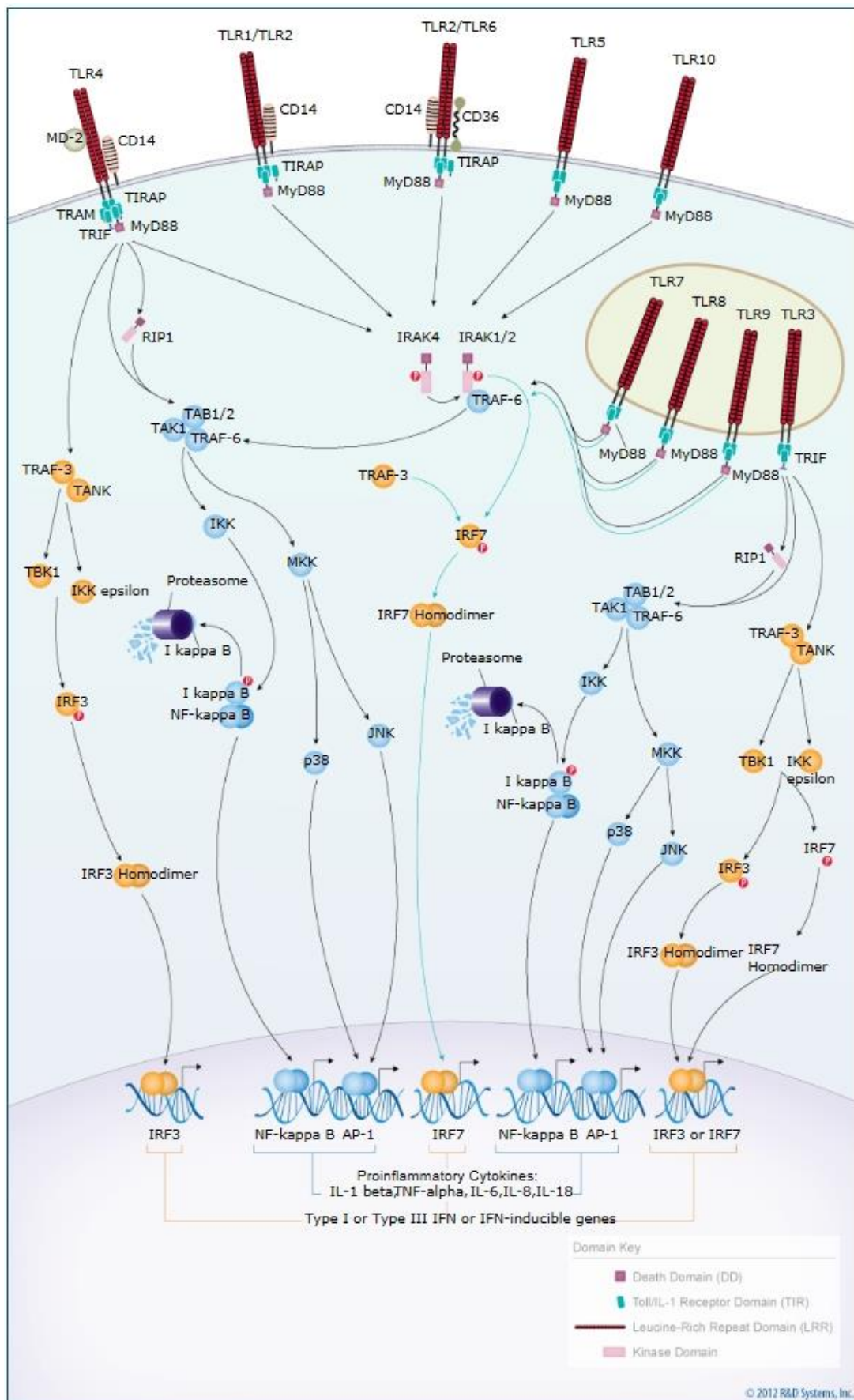


Figure 8 : Signalisation induite par les TLR
D'après R & D systems.

Plusieurs facteurs de signalisation de l'immunité innée utilisent l'ubiquitination, et sont donc ciblés par nsp2. C'est le cas de RIG-1 [238], MDA5 [238], MyD88 (adaptateur de tous les TLR sauf le TLR-3 [246]) et TRAF-6 [246, 247]. L'auto-polyubiquitination de TRAF-6 lui permet de recruter et d'activer le complexe TAB2/TAK1, qui va alors phosphoryler et activer le complexe IKK (formé de deux sous-unités catalytiques [IKK α et IKK β] et d'une sous-unité régulatrice [IKK γ aussi appelée NEMO]) ainsi que les MKK kinases, qui vont ensuite activer les voies des kinases JNK et p38 [246, 247]. IKK phosphoryle alors I κ B, l'inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B (nuclear factor- κ B), entraînant ainsi sa polyubiquitination, permettant le relargage du facteur de transcription et sa translocation nucléaire [246, 247]. Ceci permet d'induire l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (Figure 8). L'activation des cascades de signalisation par ubiquitination de RIG-1, MDA5 ou MyD88, permet, quant à elle, l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires ainsi que celle des IFN (Figures 7 et 8).

Nsp1, quant à elle, possède une localisation nucléaire [215, 216], et inhibe les voies IRF3 (IFN regulatory factor 3) et NF- κ B [215, 216], sans empêcher pour autant la translocation de IRF3 dans le noyau [215], et agit probablement en empêchant la fixation de IRF3 et de NF- κ B sur les promoteurs des gènes qu'ils induisent [216].

ii. Réponse inflammatoire

Au niveau des artères, l'EAV peut provoquer une nécrose de la média, la formation d'un œdème, l'infiltration par des leucocytes, et éventuellement une thrombose.

Dans ces lésions, il n'y a ni IgG ni complément C3, ce qui met hors de cause les complexes immuns [27]. Ces lésions pourraient être dues à l'induction par l'EAV de la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs pro-coagulants par les cellules endothéliales des

Introduction

vaisseaux sanguins ainsi que par les macrophages (résidents ou circulants) [27, 230]. En effet, il a été montré que leur infection induisait la transcription des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6, IL-1 β et IL-8, ainsi que la production de TNF- α [230]. De plus, dans les macrophages, cette induction est plus importante en présence d'une souche virulente d'EAV [230].

Le TNF- α , qui est une des cytokines pro-inflammatoires principales, est généralement produit par les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les mastocytes, les cellules tueuses naturelles (cellules NK) et des lymphocytes T (L_T) [133]. Le TNF- α est connu principalement pour induire des changements dans les jonctions intercellulaires, entraînant une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, qui s'accompagne éventuellement d'une perte accrue de liquide et d'une coagulation sanguine locale [133]. Cette dernière action est due au fait que le TNF- α augmente l'adhésion des plaquettes aux parois des vaisseaux : le caillot ainsi formé permet de maintenir une infection, qui est limitée, à une échelle locale [133]. Cependant, quand la présence du TNF- α s'étend à la circulation générale, l'action du TNF- α entraînant une vasodilatation des vaisseaux (et donc une diminution de la pression artérielle), une augmentation de la perméabilité vasculaire (et donc une fuite de liquide vers les tissus), et une coagulation intravasculaire diffuse des petits vaisseaux (le sang ne peut ainsi plus coaguler à cause d'une consommation excessive des facteurs de coagulation), le TNF- α peut entraîner un choc septique et la défaillance des organes vitaux [133]. En plus de l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, le TNF- α augmente l'expression des molécules d'adhérence (sélécines E et P, ICAM-1 et ICAM-2), qui facilitent la diapédèse des cellules immunitaires [133].

Les autres cytokines pro-inflammatoires principales sont des interleukines (IL) : l'IL-6, l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-12 α et l'IL-12 β .

L'IL-6, généralement produite par les phagocytes, les L_T et les cellules endothéliales, est impliquée dans l'induction de la fièvre [133]. Elle possède, avec le TNF- α et l'IL-1 β , des propriétés pyrogènes en initiant la synthèse des protéines de la phase aiguë par le foie, dont celle de la protéine C réactive (capable d'activer la voie du complément) et des lectines [133]. Ensuite, les protéines induites pourront fixer les pathogènes pour permettre leur opsonisation et leur phagocytose, ou leur lyse s'il y a activation du complément [133]. L'activation du complément va servir de chimiotactisme pour les cellules phagocytaires, et les composants terminaux du complément vont faire des pores dans les pathogènes [133]. L'IL-6 stimule aussi la multiplication et la différenciation des L_B [133]. Elle contribue également à induire la différenciation des lymphocytes Th17 et à inhiber celle des L_T régulateurs [133, 248, 249].

Les IL-1 α et IL-1 β sont toutes les deux généralement produites par les macrophages et les cellules épithéliales [133]. En plus de leur rôle pyrogène, elles activent les macrophages et les L_T [133]. L'IL-1 β induit également la production d'IL-6 [250].

L'IL-8 (CXCL-8), généralement produite par les macrophages et les DC, recrute les neutrophiles, les basophiles et les L_T [133]. Elle active les neutrophiles, augmente leurs molécules d'adhésion, et induit leur dégranulation [133, 251]. Elle existe chez le cheval et l'humain, mais pas chez la souris, chez laquelle MIP-2 (CXCL-2) est retrouvée parmi les équivalents fonctionnels [252-254].

L'IL-12, généralement produite par les macrophages et les DC, active les NK et induit la différenciation des L_T CD4⁺ en L_{Th1} [133].

Introduction

Ainsi, l'infection par l'EAV augmente indirectement l'expression de molécules d'adhérence (sélectine-E) par les cellules endothéliales des artères pulmonaires [230]. L'augmentation de la perméabilité vasculaire, et l'infiltration leucocytaire qui s'ensuit, après la production de facteurs chimiotactiques, conduisent à une hémorragie et à la formation d'œdèmes autour de ces vaisseaux [27]. L'inflammation, qui a pour rôle de limiter la réplication des virus, pourrait donc provoquer, en contre-partie, les lésions artérielles.

Un certain nombre d'autres virus sont capables d'induire des inflammations dont les HSV1 et 2 (encéphalites), le CMV (encéphalite, rétinite, colite) et le VHB [255].

iii. Zone immunoprivilégiée du testicule

Lors de la primo-infection des étalons, l'EAV peut provoquer une inflammation des testicules (orchite) [13, 36, 39], de l'épididyme et de l'ampoule du canal déférent [36]. Les mécanismes impliqués ne sont cependant pas connus.

Les testicules de mammifères sont des zones immunoprivilégiées de l'organisme [133, 241, 256, 257], c'est-à-dire des zones où la réponse immune est amoindrie et où les cellules immunitaires circulantes ne s'infiltrant pas en condition physiologique. Cet immunoprivilège permet d'éviter le contact des cellules immunitaires avec des auto-antigènes qui ne seraient pas considérés comme du soi [241, 257]. En effet, un certain nombre de nouveaux antigènes sont produits lors du développement des cellules germinales au cours de la spermatogenèse, qui a lieu une fois que l'immunocompétence et la reconnaissance du soi ont été établies [241, 257, 258]. Au niveau des testicules, c'est la barrière hémato-testiculaire qui permet d'empêcher le contact entre les cellules immunitaires et la majorité des antigènes des cellules

germinales [257]. Cette barrière est formée par les jonctions serrées, les jonctions communicantes, et les jonctions adhérentes spécialisées dont les desmosomes-like des cellules de Sertoli [257, 259]. Cependant, une partie des auto-antigènes, situées au-delà de la barrière hémato-testiculaire, restent accessibles aux cellules du système immunitaire [257, 258]. Aussi, des cytokines anti-inflammatoires sont exprimées de façon constitutive dans le testicule [257]. En effet, la majorité de l'IL-10 présent est produit par les macrophages, et la majorité du TGF- β présent est produit par les cellules de Sertoli, qui produisent également les activines A (inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 et l'IL-6) et B [257]. Les androgènes produits par les cellules de Leydig contribuent également à diminuer la réponse immunitaire [257] (cf III.b de l'introduction).

Cependant, cet immunoprivilège peut être rompu sous certaines conditions pathologiques (infection, traumatisme, inflammation, ...) et peut conduire à une orchite auto-immune [39, 241, 256, 257, 260]. Ainsi, des infections par l'EAV, le virus de l'AIE, le virus de la grippe ou des bactéries, peuvent provoquer des orchites chez l'étalon [39]. Certains facteurs, tels qu'une malformation des organes génitaux [261, 262] ou un défaut d'immunisation (dans le cas où l'adulte n'aurait été ni vacciné, ni en contact l'agent infectieux dans son jeune âge), peuvent favoriser la propagation l'infection et donc favoriser l'apparition de l'orchite. En effet, chez l'homme, il est connu que le virus des oreillons peut provoquer des orchites lorsque la primo-infection a lieu après la puberté [59, 60, 256, 260, 263, 264]. D'autres virus, tels que le virus varicelle-zona, le virus de la rubéole, le virus de la variole, le virus de la grippe, le VIH, l'EBV, le Coxsackievirus, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), le virus Marburg, le SARS-CoV, le phlebovirus, les arbovirus du groupe B (virus de la Dengue, virus West-Nile), les entérovirus et les adénovirus, peuvent aussi provoquer des

Introduction

orchites [59, 60, 260]. De même, elles peuvent être provoquées par des bactéries telles que gonococci, pneumococci et salmonella [260].

L'orchite est une inflammation du testicule caractérisée par une dilatation des vaisseaux sanguins irriguant le testicule, une infiltration de leucocytes (dont les macrophages circulants, les DC, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes) dans le testicule [36, 241, 257], ainsi que des dommages localisés aux tubes séminifères [257]. D'ailleurs, lors de l'orchite, de nombreux leucocytes sont présents dans le sperme [39, 265]. Lors la phase aiguë de l'orchite, le testicule est enflammé, chaud, très douloureux (peut faire boiter certains animaux), et peut quintupler de volume [39]. Cette inflammation est souvent associée à une inflammation de l'épididyme [39, 260, 265] et du scrotum [265]. L'origine de cette inflammation peut débuter dans l'épididyme et peut être dû à une néphrite, prostatite, vésiculite ou épididymite [260].

c. Développement d'une immunité adaptative

L'infection par l'EAV aboutit, 1 à 2 semaines p.i., à la production d'Ac par les L_B [34, 36-38]. Cette apparition d'Ac neutralisants coïncide avec la disparition du virus de la circulation sanguine même si le virus peut persister dans l'appareil reproducteur de l'étalon [36, 38, 47]. Certains Ac produits nécessitent la présence du complément pour pouvoir neutraliser le virus [27, 81, 111, 226, 266]. Ces derniers présentent un pic de production à 2-3 semaines p.i. et disparaissent progressivement en 8 mois, alors que ceux permettant directement la neutralisation du virus circulant présentent un pic de production 2-4 mois p.i. et peuvent persister plus de trois ans [27]. Il existe cependant une grande variation au niveau de la réponse humorale suivant les chevaux, et l'apparition tardive des Ac neutralisants pourrait être impliquée dans la persistance du virus [203].

Bien qu'il existe plusieurs souches d'EAV, elles possèdent toutes le même sérotype, c'est-à-dire qu'elles permettent toutes la production d'Ac polyclonaux capables de neutraliser n'importe quelle souche d'EAV [27]. Les Ac anti-EAV peuvent reconnaître la protéine GP5, qui exprime les déterminants antigéniques majeurs (4 sites de fixation), les protéines M et N, ainsi que les protéines nsp2, nsp4, nsp5 et nsp12 [48, 107, 222, 267, 268]. La vaccination avec un virus atténué ou inactivé permet une production importante d'Ac neutralisants, mais une différence au niveau de l'affinité des Ac par rapport à ceux produits lors d'une infection naturelle (ou expérimentale) peut être observée. En effet, lors de la vaccination avec un vaccin MLV, les Ac produits vont reconnaître faiblement nsp4 et ne vont pas reconnaître nsp5, alors qu'un cheval infecté expérimentalement ou en état d'infection persistante, va posséder des Ac qui vont reconnaître fortement les protéines nsp2, nsp4, nsp5 et nsp12 [267].

Au niveau des L_T , lors de leur convalescence, les chevaux développent une réponse L_T cytotoxiques (L_{Tc}) spécifique du virus [269]. Les précurseurs de ces L_{Tc} persistent pendant au moins un an après l'infection [269].

Certains chevaux présentent des L_T qui sont sensibles à l'infection par l'EAV [234, 270-272].

Cette sensibilité dépend de l'haplotype du cheval concernant le chromosome équin 11 (ECA11), qui code pour des protéines intervenant lors de l'attachement et de l'entrée du virus, pour des protéines intervenant dans l'organisation du cytosquelette, et pour des protéines intervenant dans la voie NF- κ B [271]. En effet, ceux qui présentent l'haplotype dominant, vont présenter des L_T susceptibles à l'infection par l'EAV, alors que les autres vont présenter des L_T qui vont y être résistants [271]. Ces deux groupes de chevaux présentent d'ailleurs des profils d'expression des ARNm de cytokines pro-inflammatoires et immunorégulatrices

Introduction

différents : les chevaux avec les L_T résistants à l'infection *in vitro* par l'EAV présentent une expression génique plus importante pour l'IL-8, les IFN- α et γ , et l'IL-10 ; et un pic d'expression plus tardif pour l'IL-1 β et l'IL-6 [270]. Les signes cliniques de la maladie sont aussi plus importants (fièvre plus importante, risques accrus d'avoir des écoulements nasaux séreux, des hémorragies pétéchiales et des oedèmes des membres) chez les chevaux possédant les L_T résistants à l'infection *in vitro* par l'EAV [270]. En parallèle, tous les étalons en état d'infection persistante possèdent des L_T susceptibles à l'infection *in vitro* par l'EAV, ce qui ferait de l'haplotype dominant d'ECA11 un facteur de prédisposition génétique à la persistance du virus [272].

Les auteurs ont supposé que la population de L_T infectée était les L_T régulateurs [270, 272], à cause d'un plus grand pourcentage de cellules CD4⁺ infectées par rapport au pourcentage de cellules CD8⁺ infectées [234, 272]. Cependant, les auteurs ont réalisé des simples marquages du CD4 ou du CD8 pour identifier les « sous-populations » de L_T, alors que ces deux marqueurs peuvent être exprimés par certains monocytes/macrophages [273], et que les macrophages sont le premier type cellulaire infecté par l'EAV. Dans le cas où il s'agirait effectivement de L_T CD4⁺, il pourrait également s'agir de L_{Th1}, qui jouent un rôle dans l'activation des macrophages et des L_{Tc}, et favorisent l'inflammation aiguë [133]. L'élimination de ces derniers par l'EAV pourrait réduire les signes inflammatoires. Il est aussi possible que, chez les chevaux possédant les L_T sensibles à l'infection, les L_{Tc} soient détruits par le virus, limitant ainsi la destruction des cellules infectées par les L_{Tc}, et favorisant la propagation du virus, l'accès du virus au système reproducteur et sa persistance. Pour les autres chevaux, les L_{Tc} n'étant pas infectés, ils pourraient provoquer l'apoptose et la lyse des cellules infectées, favorisant ainsi l'inflammation, et aggravant donc les signes cliniques de la maladie, dont les oedèmes.

III) L'EAV : un virus dont la persistance dépend de la testostérone ?

a. Mise en évidence expérimentale d'un lien virus/testostérone

i. Impact de la castration

L'EAV peut persister dans l'appareil reproducteur des étalons [36, 45] alors qu'il n'y a pas de persistance du virus chez la jument et chez le hongre (étalon castré dont la testostérone $< 0,1 \text{ ng/mL} = 0,35 \text{ nmol/L}$ [274]) [37], et qu'il n'y a pas de persistance à long terme du virus chez l'étalon sexuellement immature (étalon < 15 mois dont la testostérone $< 0,7 \text{ ng/mL} = 2,43 \text{ nmol/L}$ [274]) [34, 38], bien que le virus puisse y persister pendant 6-7 mois après l'infection [34]. De plus, lorsque l'on castré un étalon en état d'infection persistante, le virus n'est plus détecté dans la semence (liquide séminal produit par la prostate, les vésicules séminales et les glandes bulbo-uréthrales, ainsi que le reste de spermatozoïdes qui était stocké dans le canal déférent et son ampoule [275, 276]) et les glandes annexes de l'appareil reproducteur 4 à 26 jours après la castration [34, 37, 277, 278]. Or le testicule est l'organe dans lequel est synthétisée majoritairement l'hormone mâle, la testostérone ; et lorsqu'un étalon excréteur est castré, mais traité avec de la testostérone, le virus est toujours présent dans sa semence et dans les glandes annexes de l'appareil reproducteur [34, 37, 277, 278]. Ceci suggérerait un rôle de la testostérone dans la persistance à long terme de l'EAV.

ii. Thérapeutiques anti-GnRH

D'autres expériences ont montré que les vaccins anti-GnRH, dirigés contre l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires, aussi appelée hormone de libération de la lutéinostimuline (LHRH), ou les antagonistes du GnRH, pouvaient limiter temporairement la présence de l'EAV dans le sperme des étalons excréteurs [67, 84, 150].

Introduction

Or, les vaccins anti-GnRH, et les antagonistes du GnRH, ont été développés pour supprimer l'expression de nombreuses hormones en empêchant l'action d'une seule, la GnRH, sécrétée par les neurones de l'hypothalamus, sur les récepteurs pituitaires gonadotropes de l'hypophyse [143, 144, 148, 156, 166, 279]. Ceci empêche la sécrétion des gonadotropines LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante) aussi bien chez l'homme et la souris que chez le cheval [144, 146, 147, 155, 156, 166, 279] (Figure 9).

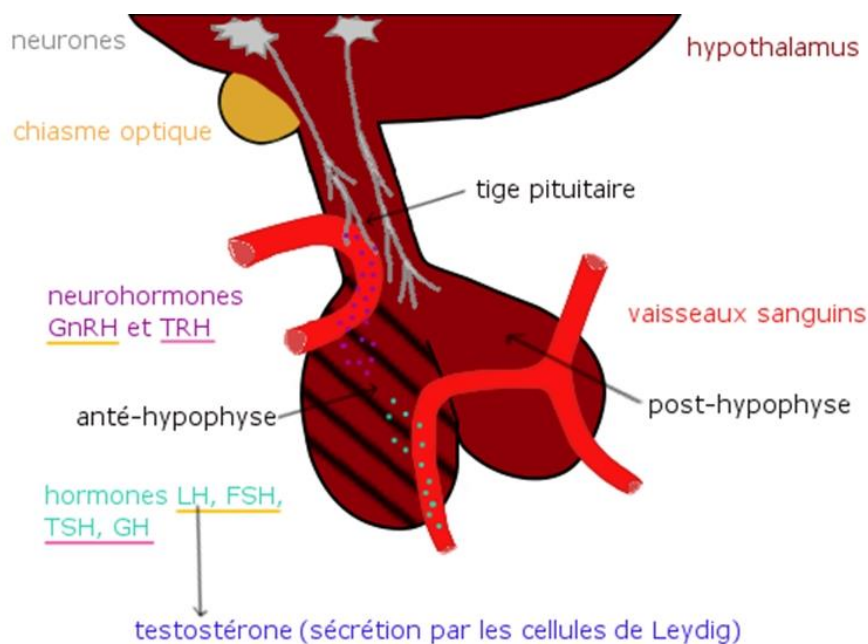


Figure 9 : Production d'hormones par le complexe hypothalamo-hypophysaire

La GnRH (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires) et la TRH (thyroliibérine), sécrétées par l'hypothalamus, agissent sur l'anté-hypophyse. La GnRH permet ainsi la sécrétion de LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante), et la TRH celle de TSH (thyroétropine) et GH (hormone de croissance). La LH ainsi libérée va stimuler la sécrétion de testostérone. Figure réalisée à partir d'une synthèse bibliographique.

Les gonadotropines sont indispensables à la mise en place puis à la persistance de la fonction de reproduction. Elles participent notamment à la descente des testicules dans les bourses, et améliorent la production et la qualité de la semence, aussi bien chez les étalons normaux que subfertiles, en dehors des périodes de reproduction [145]. La LH induit la production de

testostérone par les cellules de Leydig [145, 280, 281]. La testostérone présente comme la LH une sécrétion qui varie au cours de la journée [145, 160, 280]. La FSH agit quant à elle sur les cellules de Sertoli en régulant entre autres leur prolifération et leur différenciation [282, 283], et en faisant sécréter l'ABP (protéine liant les androgènes) qui concentre la testostérone dans le testicule [280, 281].

Cet effet indirect des vaccins anti-GnRH, et des antagonistes du GnRH, sur la testostérone et sur l'EAV renforce donc encore le lien potentiel entre la testostérone et la persistance de l'EAV.

iii. Autres virus et testostérone

Il a déjà été montré qu'il pouvait y avoir des liens entre les virus et les taux hormonaux, dont celui de la testostérone.

En effet, les virus peuvent avoir un effet sur les taux hormonaux. Ainsi, le virus Zika diminue le taux de testostérone présent au niveau des testicules (2 fois environ) et du sérum (100 fois environ) de souris [63, 64]. De même, le virus des oreillons diminue la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig [59, 60, 256, 264], et l'infection par le VHC est corrélée avec une concentration sérique de testostérone libre plus faible [59]. L'infection par d'autres virus va au contraire être corrélée à une augmentation du taux de testostérone, comme dans certains cas de chronicité pour le VIH1 alors que les patients atteints du SIDA présentent une diminution des androgènes circulants [59, 60].

Les virus peuvent également modifier la présence des récepteurs hormonaux puisque, lors de l'infection *in vitro* par l'HSV1, l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes est augmentée [284].

Introduction

A l'inverse, les hormones peuvent avoir un effet sur la réplication de certains virus. Ainsi, en présence de concentrations physiologiques d'oestrogènes, de progesterone et de corticostéroïdes, la réplication du CMV murin est augmentée (2-3 fois en extracellulaire) *in vitro* [285]. De même, en présence de dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse), une augmentation (10 fois en extracellulaire mais moins en intracellulaire pour Dreyer, Sydiskis [286]) de la réplication de l'HSV1 [284, 286] et du virus de la tumeur mammaire de la souris a été observée. Pour ce dernier, l'effet est visible pour des cellules cancéreuses uniquement [287-289]. L'hormone thyroïde quant à elle supprime ou augmente la réplication *in vitro* de l'HSV1 dépendamment des lignées [290].

Les hormones peuvent également avoir une influence sur les symptômes provoqués par les virus. Ainsi, la testostérone augmente la pathogénicité du variant M du virus de l'encéphalomyocarditis (EMC) : les souris DBA/2 mâles non castrés ou castrés et traités avec de la testostérone développent un diabète expérimental, contrairement aux femelles et mâles castrés [291]. De même l'oestrogène et la progestérone augmentent *in vitro* l'induction de l'apoptose par l'HPV de type 16 [292]. Au contraire, dans le cas d'une infection par le virus de la grippe, la testostérone réduirait chez la souris la gravité des symptômes [293].

Les mécanismes d'action des hormones sur les virus ne sont cependant pas connus.

Dans d'autres cas, un lien entre la sévérité de l'infection virale et les taux hormonaux a été mis en évidence sans savoir lequel de la sévérité de l'infection virale ou de l'hormone agit sur l'autre. Ainsi, il a été montré que, pour l'HCV, il y avait un risque plus important de fibrose sévère lorsque les taux sériques de testotérone totale étaient élevés [294, 295], et qu'il y avait plus de SHBG (globuline fixant les hormones sexuelles) [296], bien qu'il y ait moins de testotérone libre [296]. Dans ce cas, l'augmentation de la testotérone totale serait sûrement due à une augmentation des SHBG induite par le virus [296].

De même, pour le VIH, l'infection de femmes présentant des pertes de poids de plus de 10% est corrélée avec des taux de testostérone libre et totale plus bas [297, 298]. Chez les hommes, un risque de comorbidité plus élevé est aussi corrélé à un taux de testostérone plus bas [299, 300]. De plus, le taux de testostérone libre diminue avec la durée d'infection par les VIH [297, 301] et, lors d'une coinfection par les HCV et HCB, des taux de SHBG plus hauts sont observés [297, 301].

b. Effet de la testostérone sur le système immunitaire

Plusieurs études ont montré que les femmes/femelles ont un système immunitaire plus actif que les hommes/mâles. Ainsi, au niveau pathologique, les femmes sont plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes [302-308], et de faire des tempêtes cytokiniques (production massive de cytokines pro-inflammatoires) suite à une infection [309-311], alors que les hommes sont, en général, plus sensibles aux infections (virales, bactériennes, parasitaires et champignons) [302, 303, 308, 310], et ont plus de risques de développer des cancers [302, 303, 308]. Les réponses aux vaccinations sont d'ailleurs plus importantes chez les femmes [302, 303, 306, 309, 310, 312], qui possèdent un plus haut niveau d'Ig circulantes (dont les IgM) [302, 306], développent une réponse humorale plus importante [302, 308, 310, 312], et produisent plus de cytokines pro-inflammatoires en réponse à la vaccination [302, 309-311].

Ces différences sont dues, notamment, aux différences génétiques (XX contre XY) [302, 303, 308] et aux hormones principales des deux genres. En effet, la testostérone a un effet inhibiteur sur le système immunitaire [302], alors que l'œstradiol a un effet stimulateur sur le système immunitaire [302], sauf lors des grossesses où, sécrété à fortes doses, il a un effet

Introduction

inhibiteur [306, 311]. La progestérone, sécrétée elle aussi à fortes doses pendant la grossesse, a également un effet inhibiteur sur le système immunitaire [302, 306].

Cette réponse aux hormones est permise par la présence des récepteurs aux hormones sur de nombreuses cellules du système immunitaire. Ainsi, le récepteur aux androgène (AR) est retrouvé sur les L_T (expression plus forte sur les $CD8^+$) [302, 303, 306] et les L_B [302, 303] ; les récepteurs aux œstrogènes (ER) sur la plupart des cellules immunitaires (dont les L_T , les L_B , les neutrophiles, les macrophages, les DC et les cellules NK) [302, 311] ; et le récepteur à la progestérone sur les L_T activés lors de la grossesse [302].

Ainsi, la testostérone induit la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, par les L_T $CD4^+$ [302, 303, 305], ainsi que la production de TGF β , une autre cytokine anti-inflammatoire [306], et diminue la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages stimulés [303]. La testostérone augmente également le nombre de L_T régulateurs et de cellules myéloïdes suppressives [303].

Au niveau des L_B , la testostérone diminue la lymphopoïèse [303, 306], augmente l'apoptose des L_B immatures, et inhibe une commutation de classe efficace des immunoglobulines [302]. Tout ceci a pour effet de diminuer la réponse Ac [306]. Ainsi, les mâles avec les niveaux les plus élevés de testostérone présentent le plus faible taux d'Ac neutralisants en réponse à la vaccination [310, 312].

Au niveau des L_T , la testostérone diminue leur prolifération [303, 306] et leur migration [303]. De plus, bien que favorisant la réponse Th1 (par rapport à la réponse Th2) [302, 304], et donc l'activité des L_T $CD8^+$ [302, 306], la testostérone inhibe aussi la différenciation des L_T en L_{Th1} [313], qui sont les lymphocytes T helper sollicités de manière prépondérante lors des infections virales. Ainsi, chez la souris, la castration entraîne une infiltration de L_T dans les poumons, la prostate et l'intestin [313].

L'œstradiol, quant-à-lui, promeut la production d'IFN-I par les DC plasmacytoïdes en réponse à une infection virale [302, 311] ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (dépend de la dose d'œstradiol) [302, 306, 311]. Il peut aussi inhiber l'activité des L_T régulateurs [312].

Au niveau de L_B , l'œstradiol réduit l'apoptose des L_B immatures, et augmente l'hypermutation somatique ainsi que la commutation de classe des immunoglobulines [302]. Ceci a pour conséquence d'augmenter la réponse Ac [306, 312].

D'ailleurs, au niveau des L_T , l'œstrogène favorise la réponse Th2 (par rapport à la réponse Th1), et donc la production des Ac [302, 304, 308].

Puisque la testostérone a un effet inhibiteur sur le système immunitaire, la castration des mâles dans certains modèles murins permet le développement de certains modèles auto-immuns [303, 304, 306] et les rend plus susceptibles aux chocs endotoxiques [303]. De même, l'injection de testostérone à des modèles murins féminins de maladies auto-immunes et inflammatoires (lupus, encéphalite autoimmune expérimentale, polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Sjödren) entraîne une réduction de la sévérité de la maladie [303, 304, 306, 314]. De plus, un traitement à la testostérone dans certaines maladies diminue le taux Ac [303] et de cytokines pro-inflammatoires [303, 304], ainsi que la quantité de lymphocytes T et B (L_T et L_B) [303].

Ainsi, il se pourrait que la persistance de l'EAV soit due à un système immunitaire moins efficace chez l'étalon. D'autant plus que, chez la jument, la disparition de l'EAV est corrélée avec l'apparition des Ac neutralisants. Il se pourrait donc qu'un taux d'Ac neutralisants insuffisamment élevé chez l'étalon favorise la persistance de l'EAV.

c. Effet possible de la testostérone sur la réplication de l'EAV

Il a été montré que la testostérone inhibait la différenciation des L_T en L_{Th1} [313] grâce à la fixation de l'AR sur l'intron 3 du gène *Ptpn1*. Cette fixation de l'AR provoque l'augmentation l'expression de la protéine PTP1B (la Protéine-Tyrosine Phosphatase 1B, aussi appelée Ptpn1) [313, 315].

Or cette protéine PTP1B est une protéine ubiquitaire [316, 317], localisée au niveau de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique [316, 318], qui peut voir son expression augmenter en réponse à un régime gras [319, 320], par exemple. Parmi ses cibles, cette phosphatase dé-phosphoryle la Tyrosine 615 (chez la souris) ou 619 (chez l'homme) de PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) [318, 321] (Figure 10).

Cette phosphorylation est nécessaire à l'activité de PERK [322], qui permet, sous sa forme phosphorylée (sur plusieurs acides aminés) [322], la phosphorylation d'eIF2 α [317, 318, 322-324], qui induit l'expression génique et protéique d'Atg12 [323, 324], et donc favorise la conversion de LC3-I (ATG4-cleaved-microtubule-associated protein light chain 3) en LC3-II (LC3-I lié de façon covalente à la phosphatidyléthanolamine) [323, 324], induite par le complexe Atg12-Atg5-Atg16 [323, 324] (Figure 10). Ainsi, l'augmentation de l'expression de PTP1B, en réponse à un régime gras, provoque la diminution de LC3-II et du ratio LC3-I/LC3-II [319], et provoque donc une augmentation de la biodisponibilité de LC3-I dans le cytosol. Dans ces régimes gras, une induction de l'expression de LC3-I, qui est dépendante de PTP1B, a été également observée [319].

Or LC3-I peut être liée de façon non covalente à la membrane d'EDERosomes, aussi appelés ERAD (endoplasmic reticulum associated degradation) tuning vésicules [325]. Ces vésicules contiennent la protéine transmembranaire SEL1-L, à laquelle sont fixées, du côté luminal,

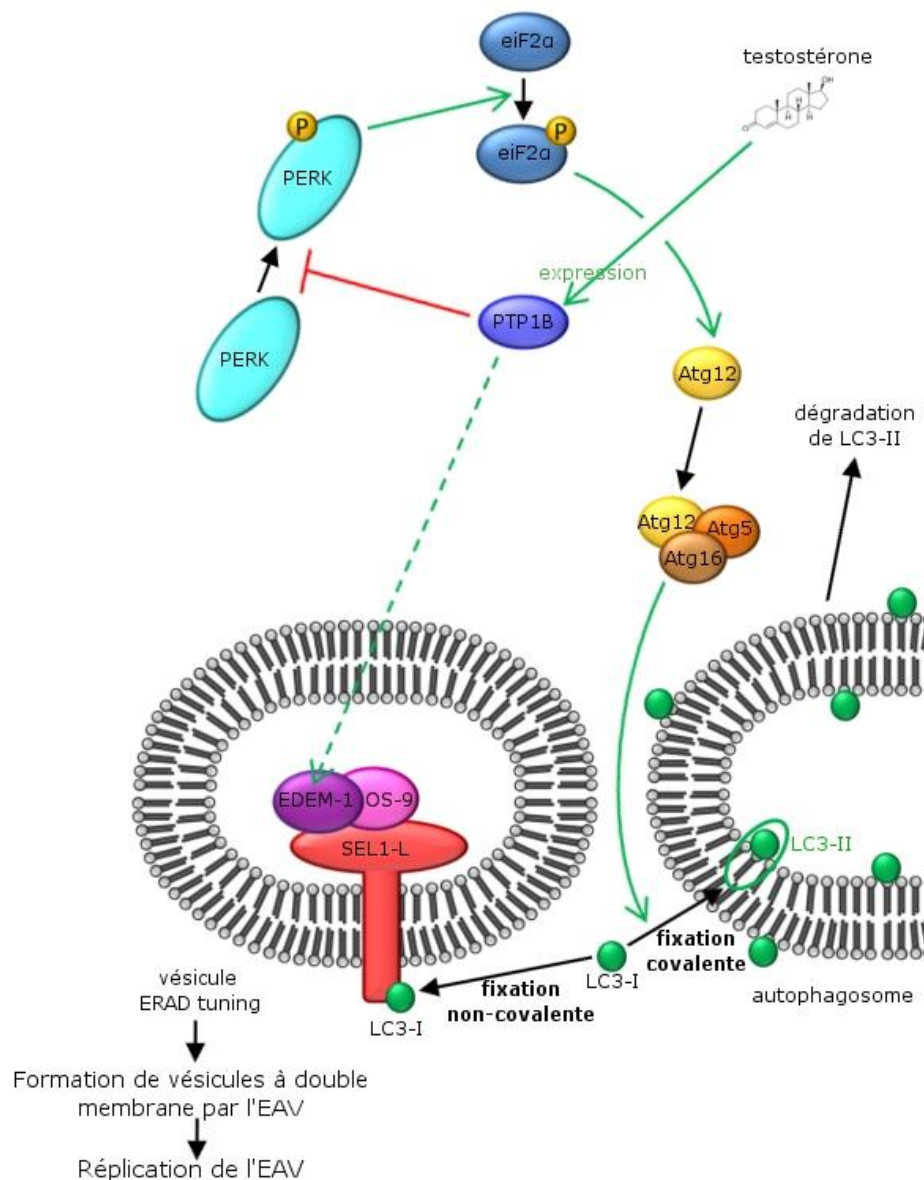


Figure 10 : Mécanisme possible d'action de la testostérone sur la réplication de l'EAV

La testostérone peut augmenter l'expression de PTP1B (Protéine-Tyrosine Phosphatase 1B). Cette dernière est capable d'augmenter l'expression de EDEM-1 (ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1) et de déphosphoryler PERK (protein kinase R [PKR]-like endoplasmic reticulum kinase). La forme phosphorylée de PERK est impliquée dans l'autophagie en induisant une cascade entraînant la conversion de LC3-I (ATG4-deaved-microtubule-associated protein light chain 3) en LC3-II, c'est-à-dire la liaison covalente de LC3-I à la phosphatidyléthanolamine. Ainsi la testostérone pourrait augmenter l'expression de EDEM-1 et la disponibilité de LC3-I, deux protéines présentes sur les vésicules tuning ERAD qui sont détournées par l'EAV pour sa réplication. Figure réalisée à partir d'une synthèse bibliographique.

Introduction

EDEM-1 (ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like1) et OS-9, et du côté cytosolique, LC3-I [325] (Figures 10 et 11).

Par ailleurs, la présence de PTP1B est nécessaire pour l'induction de l'expression de EDEM en réponse à un stress du réticulum endoplasmique [317] (Figure 10).

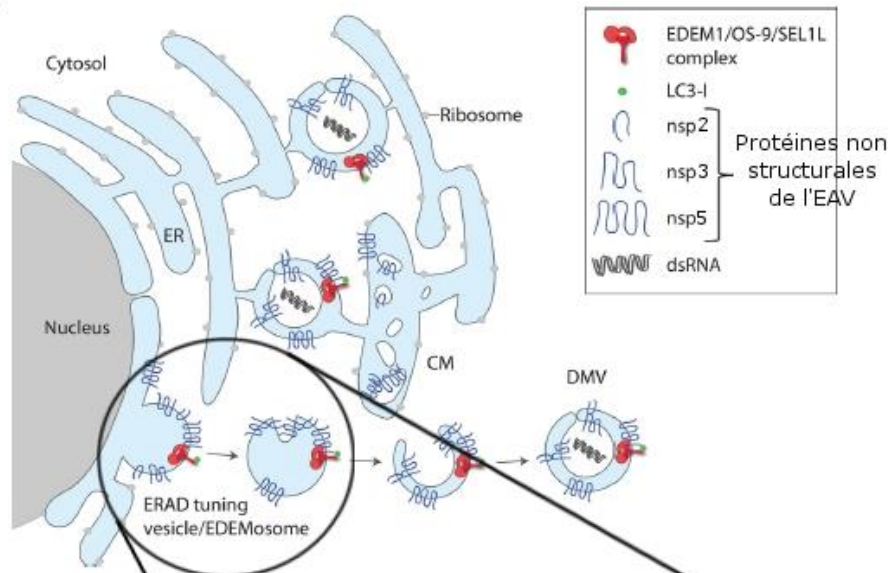
Or, il se trouve que l'EAV, comme le MHV (un *Coronaviridae*) [325], détourne les vésicules ERAD tuning pour effectuer sa réplication [325]. En effet, il a été montré que le génome de l'EAV colocalisait avec LC3-I et EDEM-1 [326], et que l'EAV induisait des vésicules à double membrane (DMVs) contenant LC3 [325] (Figure 11), 3 à 6 h après le début de l'infection [27]. Aussi, il a aussi été montré que la réplication de l'EAV était normale dans des cellules déficientes en autophagie, mais qu'elle était affectée par une déplétion de LC3 [326].

Plusieurs protéines virales du complexe de réplication et transcription (RTC), synthétisées dans le RE, sont impliquées dans l'induction de ces DMVs : nsp 2 permet la prolifération des membranes, nsp 3 en co-action avec nsp 2 permet d'avoir des membranes dédoublées en induisant la courbure de la membrane du réticulum, et nsp 5 permet d'avoir un RE vésiculeux [325]. OS-9 et EDEM1 étant des enzymes liant ou procédant les sucres, il se peut qu'une interaction via un N-glycan de nsp 5 permettent aux protéines virales de détourner les facteurs ERAD du réticulum [325]. Il a aussi été démontré que nsp 5 pouvait détourner les vésicules ERAD tuning plus tardivement dans leur processus de formation [325].

La réplication de l'EAV dans ces DMVs permet au virus d'être protégé des enzymes dégradantes et d'échapper à la détection par le système de l'immunité innée de l'hôte [325]. Ainsi, si la testostérone favorise la formation des DMVs, en plus de favoriser la réplication du virus, la machinerie ERAD, qui intervient dans la dégradation des protéines non fonctionnelles et éventuellement des protéines virales, est isolée de la lumière du RE et

devient moins utilisable par la cellule infectée. Celle-ci peut donc moins traiter les peptides viraux pour les présenter via le CMHI, ce qui favorise l'échappement du virus à la détection par les TCR des L_T .

(A)



(B)

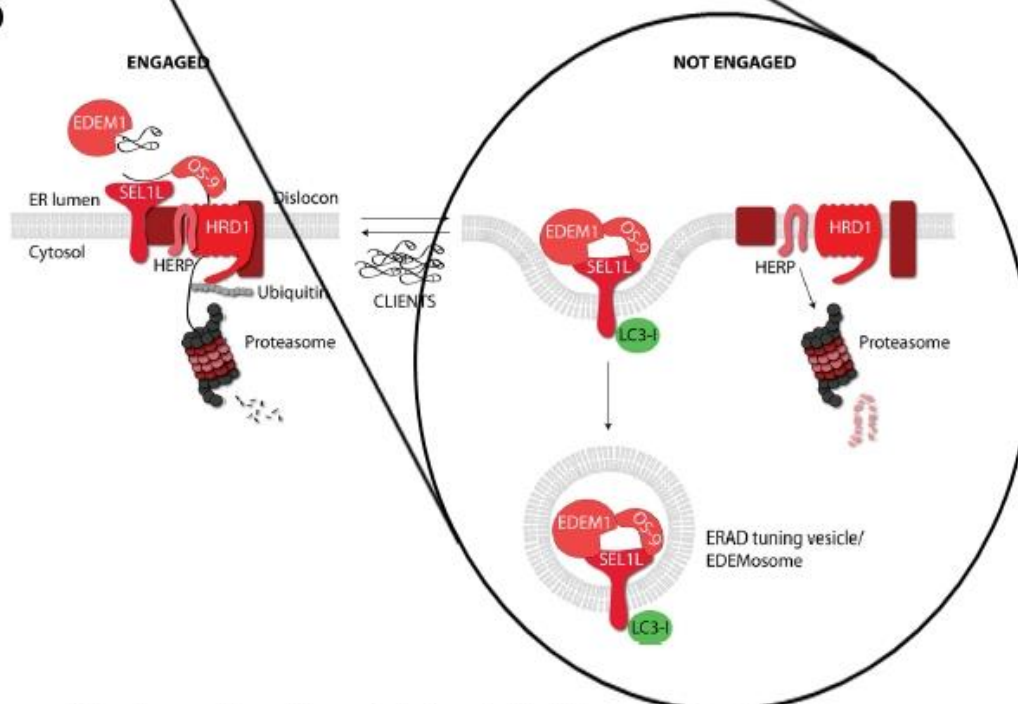


Figure 11 : Formation des vésicules à double membrane

Le complexe EDEM-1/OS-9/SEL-1 participe à l'adressage des protéines mal repliées du réticulum endoplasmique (ER) au protéasome (B). Ce complexe peut cependant être isolé de la lumière du ER lors de la formation de vésicules ERAD tuning, aussi appelées EDEMosomes (B). Sur ces vésicules, LC3-I est associé de façon non-covalente (B). Ces vésicules sont détournées par l'EAV (virus à génome ARN+) pour former des vésicules à double membrane (DMV) à l'intérieur desquelles il se réplique (A). Figure modifiée d'après Noak et al. 2014.

d. Testostérone ou œstrogènes ?

Il est cependant important de se demander si le rôle de la testostérone dans la persistance du virus est bien dû à la testostérone en elle-même ou à son dérivé l'œstradiol (Figure 12).

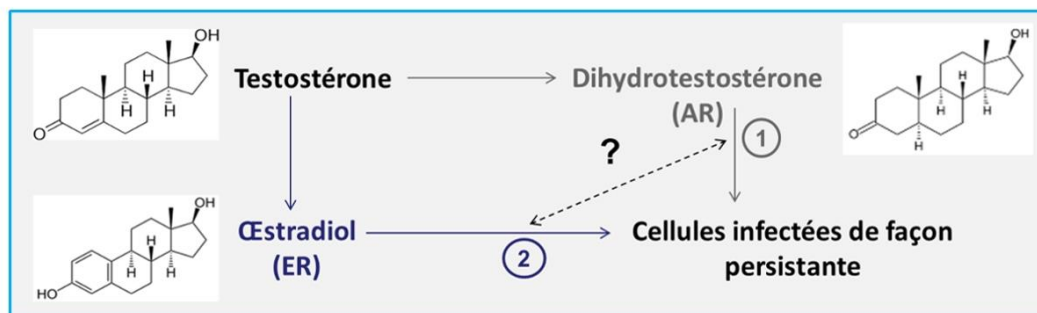


Figure 12 : Action de la testostérone via ses dérivés

Suite à son entrée dans la cellule, la testostérone peut être réduite en dihydrotestostérone et se fixer sur le récepteur aux androgènes (AR). Elle peut cependant aussi être aromatisée en œstradiol et se fixer sur les récepteurs aux œstrogènes (ER). Ainsi un effet de la testostérone permettant la persistance du virus dans des cellules pourrait être dû aussi bien à l'action des androgènes (testostérone et dihydrotestostérone) que des œstrogènes (œstradiol). Figure réalisée à partir d'une synthèse bibliographique.

En effet, parmi les mammifères l'étalon est celui qui produit le plus d'œstradiol [274, 327]. De plus, les étalons de moins de 15 mois, non matures sexuellement et les étalons castrés, dans lesquels le virus ne peut persister à long terme, présentent certes un taux de testostérone plus bas que les étalons sexuellement matures ou stériles, mais également un taux d'œstrogènes plus bas [158-161, 274, 328] (Tableau 3).

D'autant plus que, pour l'étalon, la souris, le rat et l'humain, plusieurs organes de l'appareil reproducteur mâle, dont les glandes annexes de l'appareil reproducteur, possèdent non seulement l'AR mais également les ER. En effet, l'AR est présent dans des cellules de l'épididyme, du canal déférent, de la prostate, de la vessie et des vésicules séminales [329-332]. La présence des ER, répartis en deux catégories α et β , peut quant à elle varier selon les espèces. Ainsi, l'ER α peut être retrouvé dans les cellules de l'épididyme, du canal déférent,

	Taux plasmatique de testostérone	Taux plasmatique d'œstrogènes
étalons castrés	< 0,1 ng/mL = 0,35 nmol/L	< 10 pg/mL
étalons non matures sexuellement	< 0,7 ng/mL = 2,43 nmol/L	< 35 pg/mL
étalons matures	entre 1,9 et 2 ng/mL = 6,59 et 6,93 nmol/L (en période de reproduction: 0,4 à 3,2 ng/mL = 1,39 à 11,09 nmol/L hors période de reproduction: 0,065 à 1,9 ng/mL = 0,23 à 6,59 nmol/L)	entre 90 et 150 pg/mL
étalons stériles	< 1,7 ng/mL = 5,89 nmol/L	< 90 pg/mL (sauf si plus de huit ans : ~300 pg/mL)

Tableau 3 : Taux plasmatiques de testostérone et d'œstrogènes suivant les étalons

de la prostate, de l'ampoule du canal déférent et des glandes uréthrales [330, 331] ; et l'ER β dans les cellules de l'épididyme, du canal déférent, de la prostate, de la vessie et des glandes uréthrales [329-331].

Au niveau des testicules, l'AR est exprimé par les cellules myoïdes péritubulaires (qui entourent les tubes séminifères), les cellules de Leydig (qui produisent la testostérone), les cellules de Sertoli, mais pas par les cellules germinales [259, 283, 333]. Les ER α et β peuvent aussi être retrouvés dans le testicule [280, 329, 333], bien que leur localisation sur les différents types cellulaires dépende des espèces et de l'âge des individus [333] : les ER α et β sont présents au niveau des cellules de Leydig à tout âge [333], au niveau des cellules de Sertoli à tout âge pour l'ER β [333, 334] et jusqu'à la puberté pour l'ER α [333], au niveau des cellules germinales à tout âge pour l'ER α [327, 333] et avant la puberté pour l'ER β [327, 333, 334], et au niveau des cellules myoïdes péritubulaires est présent uniquement l'ER α après la puberté [333] (Figure 13).

Introduction

Aussi, plusieurs cellules des testicules possèdent l'enzyme appelée aromatasase [334, 335] et sont donc capables de transformer la testostérone en œstradiol [280, 281] (Figure 12) : les cellules de Leydig [334, 335], les cellules de Sertoli [334, 335] et les cellules germinales [334]. Pour ces dernières l'activité de l'aromatasase est plus importante dans les cellules matures (spermatozoïdes) [334].

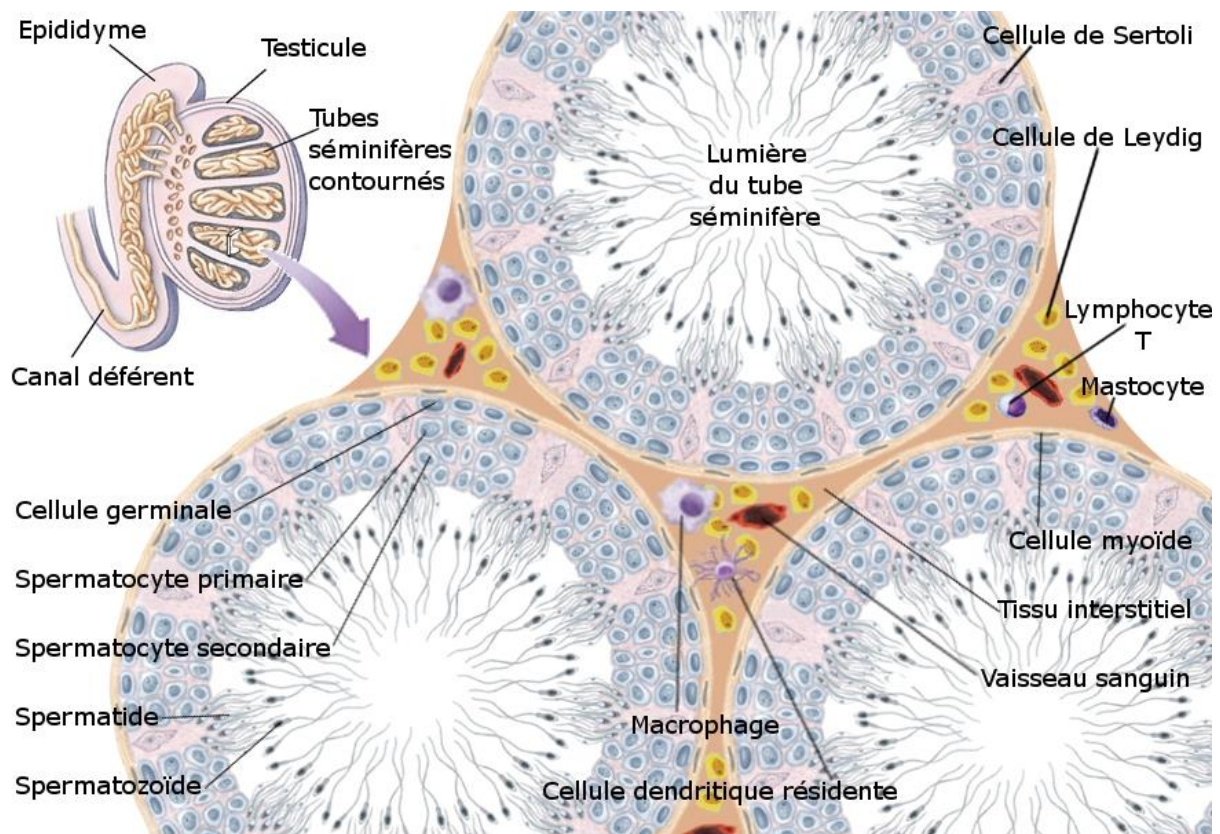


Figure 13 : Structure d'un testicule

Représente une coupe sagittale du testicule, de l'épididyme, et du canal déférent, ainsi qu'une coupe transversale des tubes séminifères. Figure modifiée d'après Boeck University 2007.
<http://lewebpedagogique.com/brefjailuleblogduprofdesvt/2014/11/19/gametogenese/>

Objectifs des travaux

Pouvant provoquer la mort des nouveau-nés, ainsi que l'avortement chez les juments gestantes, l'EAV est un danger sanitaire et économique pour la filière équine. Suite à la primo-infection, le virus est éliminé par la jument alors qu'il persiste dans l'appareil reproducteur de certains étalons.

Bien que cette persistance virale soit connue depuis de nombreuses années, les mécanismes permettant cette persistance restent inconnus à ce jour. Comprendre ces mécanismes est la première étape vers le développement de thérapeutiques ciblées pour éliminer la persistance du virus chez les étalons excréteurs. Cependant, il n'existe pas de modèle animal non équin pour l'EAV, qui est un virus spécifique des équidés. De plus, aucun modèle *in vitro* d'infection non lytique de cellules de l'appareil reproducteur mâle par l'EAV n'était disponible.

Afin d'étudier la persistance du virus, le premier objectif de mon sujet de thèse a donc été de développer un modèle d'infection *in vitro* non lytique de cellules de l'appareil reproducteur mâle par l'EAV. Pour cela, en l'absence de lignées équines issues de l'appareil reproducteur mâle disponibles, plusieurs lignées issues de l'appareil reproducteur mâle de diverses espèces ont été testées.

Parmi les lignées testées, la seule lignée présentant une infection non lytique dérivait de cellules de Leydig murines, qui sont des cellules présentes dans les testicules. L'EAV pouvant provoquer une orchite chez les étalons, mais les mécanismes n'étant pas connus à ce jour, le deuxième objectif de cette thèse a été d'étudier l'effet de l'EAV sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines de ces cellules de Leydig.

La suppression temporaire ou définitive de la testostérone des étalons en état d'infection persistante, respectivement par vaccin anti-GnRH et par castration, permet l'élimination de l'EAV de l'appareil reproducteur mâle. Les cellules de Leydig exprimant le récepteur à la

Objectifs des travaux

testostérone, le troisième objectif de cette thèse était d'étudier le rôle de la testostérone sur la réplication de l'EAV.

Matériels et Méthodes

I) Lignées cellulaires

Sept lignées dérivant de l'appareil reproducteur mâle (décrites dans le Tableau 4) ont été testées : les cellules 92BR, les cellules DDT1 MF-2, les cellules ST [336], les cellules PC-3, les cellules TM3, les cellules GC-1 spg et les cellules LNCaP. Les cellules RK13 (rein de lapin), qui sont très permissives à l'EAV, et qui sont recommandées par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) pour détecter la présence de l'EAV dans la semence des étalons et pour amplifier le virus, ont été utilisées comme contrôle positif de l'infection par l'EAV.

Lignée	Source	Type cellulaire	Morphologie
RK13	ATCC® CCL37™	rein de lapin	épithéliale
92BR	HPA 90011874	testicule d'âne	fibroblaste
DDT1 MF-2	ATCC® CRL-1701™	leiomyosarcome du canal déférent du hamster doré syrien	épithéliale
ST	ATCC® CRL-1746™	testicule de porc (cellules de Sertoli immatures)	fibroblaste
PC-3	ATCC® CRL-1435™	adénocarcinome de prostate humaine dérivé d'un site métastatique : l'os	épithéliale
TM3	ATCC® CRL-1714™	cellules de Leydig immatures murines	épithéliale
GC-1 spg	ATCC® CRL-2053™	spermatogonies de type B immortalisées murines	épithéliale
LNCaP (Clone FGC)	ATCC® CRL-1740™	carcinome de prostate humaine dérivé d'un site métastatique : nœud lymphatique supraclaviculaire gauche	épithéliale

Tableau 4 : Lignées utilisées pour cette étude

Les milieux de culture cellulaire ont tous été complétés avec 50 unités/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine, et de l'HEPES à 25 mM pour les cellules RK13, 92BR, DDT1 MF-2, ST, PC-3, et GC-1 spg, et à 15 mM pour les cellules TM3. De plus, 1 mM de pyruvate de

Matériels et Méthodes

sodium a été ajouté aux milieux de culture cellulaire des cellules RK13, 92BR, ST, PC-3, et GC-1 spg, et 0,5 mM à ceux des cellules TM3. Avant d'être ajoutés aux milieux de culture, le sérum de veau fœtal (SVF) et le sérum de cheval ont été décomplémentés à 56°C pendant 30 minutes.

Les cellules RK13, 92BR et ST ont été cultivées dans du MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) complété avec des acides aminés non essentiels (NEAA) 1X, et soit avec 10 % de SVF pour les cellules RK13 et ST, ou 15 % de SVF pour les cellules 92BR. Les cellules DDT1 MF-2 et GC-1 spg ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complété avec, respectivement, 5 % et 10 % de SVF. Les cellules TM3 ont été cultivées dans du DMEM/F-12 (DMEM:Ham's F-12 Nutrient Mixture) complété avec 5 % de sérum de cheval et 2,5 % de SVF. Les cellules LNCaP ont été cultivées dans du milieu RPMI complété avec 10 % de SVF. Les cellules PC-3 ont été cultivées dans du milieu Ham's F-12K (Kaighn's) complété avec 10 % de SVF.

Toutes les lignées ont été maintenues à 37 °C en atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Les milieux de cultures et réactifs proviennent de Gibco (Invitrogen), sauf le sérum de cheval (Dominique Dutscher).

II) Souche virale et infection

La souche Bucyrus de l'EAV (ATCC® VR-796TM) a été utilisée pour les infections. Les cellules TM3 ont été infectées à une MOI de 10 sauf lors des expériences préliminaires visant à évaluer l'effet du traitement à la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées par marquage immunofluorescent sur lamelles où une MOI de 1 a été utilisée. Les cellules 92BR, DDT1 MF-2, ST, PC-3, TM3, GC-1 spg et LNCaP cells ont été infectées en suspension avec une multiplicité d'infection (MOI) de 10, et les cellules RK13 ont été infectées avec une MOI

de 1. Pour les expériences de traitement à la testostérone évaluant son effet sur le pourcentage de cellules infectées et sur la réplication du virus, analysées en cytométrie en flux ou en RT-qPCR, respectivement, l'infection a été réalisée dans du milieu DMEM/F12 complété avec 2,5 % de SVF (Gibco) passé sur charbon, et ne contenant donc plus de testostérone endogène, et décomplémenté. Afin de favoriser le contact virus-cellules, les cellules, reprises dans 2 ml de milieu, ont été pré-incubées pendant 1 heure avec le virus, à 37 °C, en atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Les cellules non-infectées ont été inoculées avec du milieu de RK13 sans virus.

Les cellules ont ensuite étéensemencées :

- 2×10^4 cellules par puits, 4 réplicats par condition, en plaques 96 puits pour les expériences de survie cellulaire,
- 5×10^4 cellules par puits en chambres de culture Falcon[®] de 8 compartiments pour les marquages immunofluorescents sur lames,
- $2,5 \times 10^5$ cellules par puits de plaque 6 puits, avec lamelle en verre, pour les expériences préliminaires visant à évaluer l'effet du traitement à la testostérone sur l'infection,
- 2×10^6 et 3×10^6 cellules par flasque T25 et flasque T75, respectivement, une seule T25 n'étant pas suffisante pour les cellules RK13 et 92BR. Ces flasques ont été utilisées pour les analyses de cytométrie en flux, pour étudier l'expression des gènes de l'immunité innée dans les cellules TM3, et pour les expériences de traitement à la testostérone,
- 8×10^5 cellules par puits en plaques 6 puits pour étudier la réplication de l'EAV et la production de particules virales infectieuses.

Une fois les cellules adhérees au plastique, après 4 à 5 heures d'incubation à 37°C à 5% de CO₂, le milieu de culture cellulaire a été remplacé par du milieu frais, sauf pour les cellules LNCaP, qui ont des difficultés d'adhérence, et pour lesquelles le milieu n'a pas été changé. Par contre, pour les expériences préliminaires de traitement à la testostérone, le milieu a été changé quatre heures avant traitement. Pour les marquages immunofluorescents sur lames, réalisés lors du développement du modèle d'infection, le milieu n'a pas été changé. Concernant l'étude de la dissémination du virus, les milieux de culture des cellules TM3 et PC-3 ont été changés après le 3^e jour de culture.

III) Traitement à la testostérone

Lors des expériences préliminaires visant à évaluer l'effet du traitement à la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées, par marquage immunofluorescent sur lamelles, les cellules ont été traitées avec de la testostérone (Sigma) à 1 jpi. Quatre heures avant d'ajouter la testostérone, le milieu complet des cellules a été remplacé par du milieu DMEM/F12 réduit en sérum contenant seulement 1 % de sérum de cheval décomplémenté et 0,5 % de SVF décomplémenté. Après avoir resuspendu la testostérone à une concentration de 100 mg.mL⁻¹ dans du chloroforme, différentes doses diluées dans du milieu DMEM/F12 réduit en sérum ont été testées : 1, 10, 25 et 50 ng.mL⁻¹ dans une expérience, et 200 ng.mL⁻¹ dans une deuxième expérience (Tableau 5).

Lors des expériences visant à évaluer l'effet du traitement à la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées en cytométrie en flux, sur la réplication de l'EAV et sur l'expression du gène codant pour la Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR), la testostérone a été diluée dans du milieu DMEM/F12 complété avec 2,5 % de SVF passé sur charbon et décomplémenté. Plusieurs doses de testostérone ont été testées et le traitement a commencé à 1 jpi ou 5 heures p.i. selon les expériences (Tableau 5).

Expérience	Concentration en testostérone (ng/mL)							
	1	10	25	50	100	200	250	500
pourcentage cellules infectées sur lamelle (1e)	x	x	x	x				
pourcentage cellules infectées sur lamelle (2e)						x		
pourcentage cellules infectées en cytométrie en flux (1e)	x	x	x	x				
pourcentage cellules infectées en cytométrie en flux (2e)		x		x	x	x		x
pourcentage cellules infectées en cytométrie en flux (3e)		x	x	x	x		x	x
pourcentage cellules infectées en cytométrie en flux (traitement à 5 h p.i.)					x			x
réplication de l'EAV (1e)	x	x	x	x				
réplication de l'EAV (2e)		x	x	x	x		x	x
expression génique de StAR (1e)	x	x	x	x				
expression génique de StAR (2e)	x	x	x	x				
expression génique de StAR (3e)		x	x	x	x		x	x

Tableau 5 : Doses de testostérone testées selon les expériences

IV) Titrages en PFU

Des tapis préformés de cellules 92BR, DDT1 MF-2, ST, PC-3, TM3, GC-1 spg et LNCaP, en plaques 6 puits, ont été inoculés avec des dilutions sériées au 1/10 d'EAV (10^{-1} à 10^{-8}) : la souche Bucyrus de l'EAV (ATCC[®] VR-796TM) a été utilisée pour étudier l'effet cytopathique (ECP) de l'EAV sur ces lignées.

La production de virus infectieux dans les surnageants de culture cellulaire a été évaluée sur des tapis préformés de cellules RK13.

Les inoculums ont été remplacés après 4 heures d'incubation par du milieu de culture frais, réduit en sérum et contenant 0,75% de carboxyméthylcellulose. À 3 jpi, les tapis cellulaires ont été fixés avec une solution de formaldéhyde 4 % contenant 10 % d'une solution de crystal violet à 0,02 g/mL méthanol.

V) Analyse de la viabilité cellulaire

La survie cellulaire a été mesurée avec un test de viabilité cellulaire utilisant la luciférase (CellTiter-Glo[®] de Promega). Ce test évalue le nombre de cellules vivantes en quantifiant

l'ATP produit par les cellules en culture. Brièvement, en présence d'ATP et d'oxygène, la luciférase oxyde la luciférine en une forme luminescente. Le signal luminescent ainsi généré est proportionnel au nombre de cellules métaboliquement actives. L'activité de la luciférase a été mesurée dans des puits contrôles contenant des cellules non infectées ou des cellules lysées avec de l'IGEPAL (Sigma) dilué au 1/400. Avant la quantification de l'ATP, la plaque a été équilibrée à température ambiante pendant 30 min. Dans chaque puits, la moitié du milieu de culture a été enlevée et remplacée par un volume équivalent de CellTiter-Glo[®]. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 30 min à température ambiante sous agitation douce (50 rpm). Les lysats ont été analysés au lecteur de microplaques multimode TECAN Infinite[®] F200 PRO. La luminescence a été enregistrée pendant 1 seconde sans atténuation.

VI) Détection de protéines par immunocytochimie

Les Ac suivants ont été utilisés : un Ac monoclonal reconnaissant spécifiquement la nucléocapside (NP) de l'EAV Bucyrus (VMRD, cat no 17D3, souris IgG1, dilution 1/500), un Ac secondaire de chèvre anti-IgG de souris conjugué au fluorophore Dylight[®] 488 (Thermo-Scientific, cat no 35503, dilution 1/200) et un Ac monoclonal anti-tubuline conjugué à l'Alexa Fluor[®] 647 (Abcam, clone YOL1/34, rat monoclonal IgG2a, dilution 1/100). La fixation non-spécifique de l'Ac anti-NP et de son Ac secondaire a été évaluée sur des cellules non infectées.

Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde 4 % froid pendant 30 minutes à température ambiante, puis perméabilisées avec une solution froide de méthanol/acétone (50/50) pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS 1X contenant 0,1 % de Triton X-100 (PBST). Elles ont été incubées avec l'Ac anti-NP pendant 1 heure à température ambiante, puis avec l'Ac secondaire pendant 1 heure à température

ambiante, et enfin avec l'Ac anti-tubuline sur la nuit à 4 °C. Après chaque incubation, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBST pendant 5 minutes. Les lamelles ont été montées avec du milieu de montage Vectashield® pour fluorescence contenant du DAPI H-1200 pour marquer l'ADN et donc visualiser les noyaux cellulaires (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les lames ont été analysées par microscopie à fluorescence avec le EVOS® FL Cell Imaging System (Life technologies).

Pour les expériences préliminaires évaluant l'effet de la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées, seul l'Ac anti-NP a été utilisé. Les cellules ont été comptées sur le microscope EVOS® FL Cell Imaging System. Pour chaque lamelle, les cellules ont été comptées sur au moins dix champs répartis sur toute la lamelle, pour arriver à un total d'au moins 3000 cellules comptées. Le pourcentage de cellules infectées a été évalué sur chaque champ.

VII) Détection de la nucléocapside de l'EAV par immunomarquage et cytométrie en flux

Les cellules ont été dissociées avec de la trypsine et fixées dans du formaldéhyde 4 % pendant 30 min à 4 °C. Un maximum de 10^6 cellules a été centrifugé à 240 g pendant 3 minutes à 4 °C, puis les cellules ont été resuspendues et perméabilisées pendant 10 min sur glace avec une solution froide de méthanol/acétone (50/50). Du PBS 1X contenant 0,1 % de Triton X-100 et 1 % d'Albumine de Sérum Bovin (BSA) (PBSTB) a été ajouté, et les cellules ont été centrifugées pendant 3 min à 240 g à 4 °C. Les cellules ont ensuite été lavées en PBSTB et centrifugées comme décrit précédemment. Après avoir bloqué les sites antigéniques non spécifiques avec du PBSTB pendant 20 min sur glace, les cellules ont été incubées avec l'Ac anti-NP pendant 30 min sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois en PBSTB et

centrifugées pendant 5 min à 835 g à 4 °C, avant d'être incubées 30 min sur glace avec l'Ac secondaire décrit précédemment. Puis elles ont été lavées 2 fois et resuspendues dans du formaldéhyde 2 %. Les échantillons ont été passés sur un cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter) pour mesurer la taille des cellules, leur granularité et la fluorescence émise dans le canal FL1 (505-545 nm). Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

VIII) Préparation des ARN viraux et analyse RT-qPCR

Les ARN cellulaires ont été extraits comme suit. Les tapis cellulaires en plaques 6 puits et en flasques T25 ont été lysés avec 1 mL et 2,5 mL de Trizol (Ambion), respectivement. Les extractions d'ARN ont été réalisées sur 500 µL d'échantillons auxquels 100 µL de chloroforme ont été ajoutés. Le mélange a été vortexé pendant 3 min, laissé 3 min à température ambiante, puis centrifugé à 12000 g pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse a été récupérée, approximativement 200 µL, auxquels 300 µL d'éthanol 70 % ont été ajoutés. Ce mélange a ensuite subi une extraction d'ARN en utilisant le RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur, avec un traitement DNase sur colonne avec 5 unités de Turbo DNase[™] (Ambion) pour éliminer les éventuelles contaminations ADN. Une seconde étape d'élution a été réalisée pour récupérer les ARN.

Le surnageant des cellules a été centrifugé à 835 g pendant 10 min pour éliminer les cellules mortes. Puis une extraction des ARN a été réalisée sur 140 µL du surnageant centrifugé en utilisant le QiAamp[®] Viral RNA kit (Qiagen), suivant les instructions du fournisseur en y ajoutant une deuxième étape d'élution.

La détection du génome viral a été réalisée par RT-qPCR en utilisant le QuantiTect[™] Virus + ROX Vial Kit (Qiagen). Les séquences des amorces et de la sonde utilisées (Tableau 6) pour

l'amplification de l'ORF7 ont été décrites par Balasuriya, Leutenegger [86]. Une gamme de copies de génome d'EAV a été réalisée pour quantifier le nombre de copies présentes dans les échantillons. Pour obtenir cette gamme de copies de génome, un plasmide contenant l'ORF7 a été transcrit avec l'ARN polymérase T3 (Thermo Scientific) en suivant les recommandations du fournisseur. Les données ont été acquises en triplicat avec un MasterCycler realplex⁴ epgradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). Les cycles de PCR ont été : 20 min à 50 °C, 5 min à 95 °C, et 45 cycles de 15 s à 95 °C suivies de 45 s à 60 °C. La quantité d'ARN viraux présents dans les cellules a été normalisée par rapport à la quantité totale d'ARN (mesurée avec le spectrophotomètre Nanodrop 2000c, Thermo Scientific).

Gènes cibles	Paires d'amorces (5' → 3') ou Sonde		Concentration utilisée
	Sens	Antisens	
EAV ORF7	GGCGACAGCCTACAAGCTACA	CGGCATCTGCAGTGAGTGA	0,4 µM
EAV ORF7 (Sonde)	[6FAM]-TTGCGGACCCGCATCTGACCAA-[TAM]		0,2 µM
β-actin-TM3	TCTGGCACCACACCTTCTA	AGGCATACAGGGACAGCAC	1 µM
GAPDH	CCAGGTTGTCTCCTGCGACTTCA	GGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	1 µM
IFN-α	TTCCTCAGACTCATAACCTCAGGA	ATTTGTACCAGGAGTGTCAGGC	0,6 µM
IFN-β	GACGTGGGAGATGTCCTCAAC	GGTACCTTTGCACCCTCCAGTA	0,75 µM
TNF-α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	1 µM
IL-6	ATTCCTCTGTGCCACCTTAC	GGTCAGCACCACCATCTTATT	1 µM
IL-1α	TCTCAGATTCAAACTGTTCTGTG	AGAAAATGAGGTCGGTCTCACTA	1 µM
IL-1β	TTCAGGCAGGCAGTATCACTC	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC	1 µM
IL-12α	CAATCACGCTACCTCCTTTTT	CAGCAGTGCGAGGAATAATGTTTC	1 µM
IL-12β	GTCCTCAGAAGCTAACCATCTCC	CCAGAGCCTATGACTCCATGTC	1 µM
CCL2 (MCP-1)	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTACGGGT	1 µM
CCL5 (RANTES)	TGCCCACGTCAAGGAGTATTTT	AACCCACTTCTTCTCTGGGTTG	1 µM
CCL11	CCAGAGCCTAAGAACTGCTTGATT	GGAAGTACATGAAGCCAAGTCCTT	1 µM
CCL20	CGACTGTTGCCTCTCGTACA	AGGAGGTTACAGCCCTTTT	1 µM
CXCL9	CTTGAGCCTAGTCGTGATAAC	CCAGCTTGGTGAGGTCTATC	1 µM
CXCL10	CCAAGTGCTGCCGTCAATTTT	TCCCTAAGGCCCTCATTCTCA	1 µM
MDA5	AGATCAACACCTGTGGTAACACC	CTCTAGGGCCTCCACGAACA	1 µM
RIG-1	CCACCTACATCCTCAGCTACATGA	TGGGCCCTTGTGTTCTTCT	1 µM
IPS-1	AGACACCAAGTTGCCCAAG	CTGGAAGGAAACGGTTGGAGA	1 µM
TRL-2	GCAAACGCTGTTCTGCTCAG	AGGCGTCTCCCTCTATTGTATT	1 µM
TRL-3	GTGAGATACAACGTAGCTGACTG	TCCTGCATCCAAGATAGCAAGT	1 µM
TLR-9	ACAACCTCTGACTTCGTCCACC	TCTGGGCTCAATGGTCATGTG	1 µM
StAR	ATGTTCTCTCGTCACGTTCAAG	CCCAGTGCTCTCCAGTTGAG	1 µM

Tableau 6 : Séquences des amorces et sonde utilisées dans l'étude

Matériels et Méthodes

L'expression des gènes de l'immunité innée et de StAR, et l'effet de la testostérone sur la réplication intracellulaire de l'EAV, ont été évalués par RT-qPCR en utilisant le QuantiFast® SYBR® Green RT-PCR kit (Qiagen). Les séquences des amorces (Tableau 6) ont été précédemment décrites par Wu, Shi [256] sauf les séquences des gènes de références, qui sont de Li, Hu [337] et Shen, Liu [338], et les séquences des gènes codant pour les IL-12 α et β , qui sont de Yang, Zheng [339], pour CCL5, qui est de Cambien, Richard-Fiardo [340], pour CCL11, qui est de Peters, Mekonnen [341], pour CXCL9 et 20, qui sont de Schwinge, Carambia [304], et pour les IL-1 α et β ainsi que pour les TLR-3 et 9, qui ont été trouvées sur PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>). Le gène de la β -actine a été utilisé comme référence pour normaliser l'expression des gènes cibles. Le gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisé pour vérifier la stabilité du gène de l'actine au cours de l'infection. De plus, les échantillons ont été analysés en triplicat et les données ont été générées à l'aide du LightCycler® 480 II (Roche, Germany). Une première étape de rétrotranscription de 10 min à 50°C a été réalisée, puis une activation de la HotStarTaq Plus ADN polymérase de 5 min à 95 °C, et 45 cycles de 10 s à 95 °C suivies de 30 s à 60 °C. Les données ont été analysées en utilisant la méthode des $2^{\Delta\Delta Ct}$ avec $\Delta\Delta Ct = (\text{moyenne des Ct du gène d'intérêt} - \text{moyenne des Ct de l'actine})_{\text{cellules non-infectées ou non traitées à la testostérone}} - (\text{moyenne des Ct du gène d'intérêt} - \text{moyenne des Ct de l'actine})_{\text{cellules infectées ou traitées à la testostérone}}$.

IX) Analyses statistiques

L'erreur standard (SE) sert à estimer si une différence entre deux moyennes est significative [342, 343], et la déviation standard (SD) sert à décrire la distribution d'une population à partir d'un échantillon de cette population [342, 343]. Les données ont donc été exprimées sous la forme de moyennes des réplicats biologiques [343, 344] \pm SE pour les expériences de survie

cellulaire, ou \pm SD pour les marquages immunofluorescents pour cytométrie en flux, la quantification de la réplication de l'EAV et la quantification de la production de particules virales infectieuses.

Pour les expériences de survie cellulaire, afin d'évaluer si les résultats des cellules infectées étaient significativement différents de ceux des cellules non-infectées, deux tests statistiques ont été réalisés :

- le test de Student unilatéral pour comparaison à une moyenne théorique a été utilisé lorsque les données ont été normalisées par rapport aux données des cellules non-infectées. Les résultats des cellules infectées ont été comparés à la moyenne théorique de 100 % (moyenne des cellules non-infectées) ;
- le test de Student unilatéral pour données appariées, car les cellules infectées et non-infectées proviennent du même passage cellulaire d'une seule et même lignée, a été utilisé lorsque les données ont été normalisées par rapport aux données obtenues à 1 jpi.

Résultats

I) Mise en place d'un modèle *in vitro* d'infection non-cytopathique de cellules de l'appareil reproducteur mâle par l'EAV

a. La permissivité des différentes lignées cellulaires à l'infection par l'EAV

i. Détection de plages de lyse

Afin de tester la permissivité des 8 lignées cellulaires sélectionnées à l'infection par l'EAV, des tests préliminaires ont été effectués. Dans un premier temps, les infections ont été réalisées sur des tapis cellulaires confluents préformés pour chacune des lignées choisies. Ces tapis préformés ont été incubés en présence d'une solution d'EAV, souche Bucyrus, diluée de 10^{-1} à 10^{-8} . Ces tests de titrage en PFU réalisés avec des cellules hautement permissives, telles que les cellules RK13, montrent des effets cytopathiques (ECP) trois jpi. Il en est de même pour les cellules 92BR et DDT1 MF-2. En effet, les tapis cellulaires ont été totalement attaqués respectivement pour les dilutions 10^{-4} , 10^{-3} et 10^{-2} de l'EAV Bucyrus (Figure 14). Des plages de lyse (PFU) ont été visibles à partir de la dilution 10^{-6} pour les cellules RK13, et des dilutions 10^{-4} à 10^{-6} pour les cellules 92BR et DDT1 MF-2 (Figure 14). L'ECP, caractéristique d'une infection *in vitro* par l'EAV, a été moins important pour les cellules ST avec seulement de petites plages de lyse visibles sur les tapis cellulaires après 3 jpi avec la solution virale diluée à 10^{-1} . Le dernier groupe de lignées cellulaires testées, comprenant les cellules PC-3, TM3, GC-1 spg et LNCaP, n'a montré aucun ECP sur les tapis cellulaires à 3 jpi, quelle que soit la dilution d'EAV Bucyrus utilisée (Figure 14).

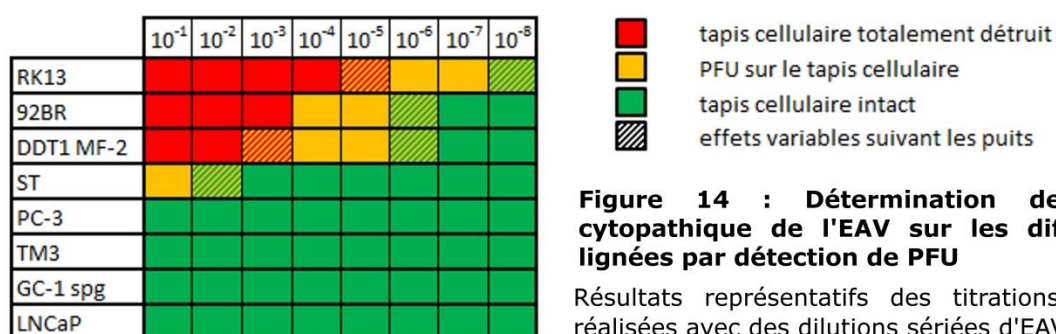


Figure 14 : Détermination de l'effet cytopathique de l'EAV sur les différentes lignées par détection de PFU

Résultats représentatifs des titrations en PFU réalisées avec des dilutions sériées d'EAV

ii. Viabilité cellulaire

En complément des tests de titrage en PFU, la viabilité des différentes lignées cellulaires infectées par l'EAV a été mesurée, à 1 et 3 jpi, par analyse de la production d'ATP.

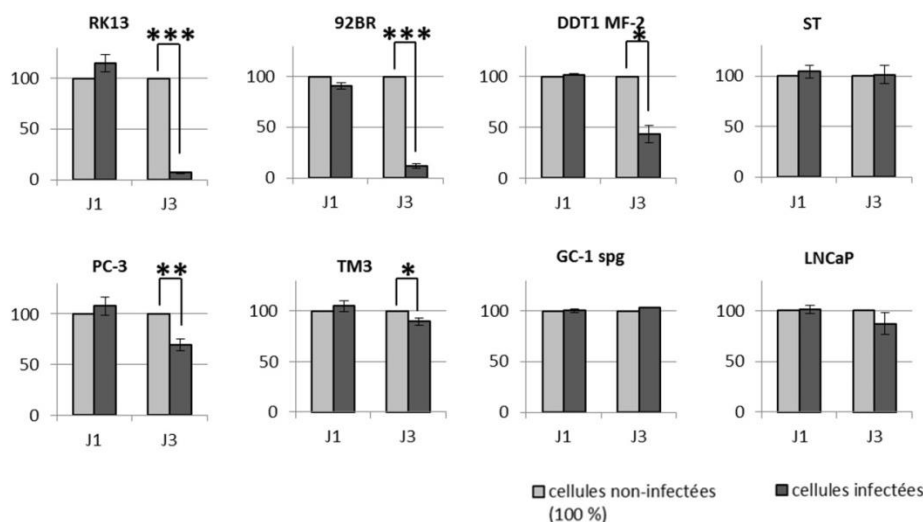


Figure 15 : Détermination de l'effet cytopathique de l'EAV sur les différentes lignées par étude de la viabilité cellulaire

Expériences de Cell titer glo. Les cellules RK13 ont été infectées avec une MOI de 1. Les autres lignées ont été infectées avec une MOI de 10. Après 1 et 3 jpi (J1 et J3 respectivement), le signal luminescent obtenu a été normalisé par rapport au signal luminescent obtenu pour les cellules non-infectées. Les résultats proviennent de 3 à 7 expériences indépendantes (moyenne +/- SE). Un test de Student unilatéral pour comparaison à une moyenne théorique a été réalisé en comparant les résultats des cellules infectées avec la moyenne théorique de 100 % (moyenne des cellules non-infectées).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

La viabilité cellulaire mesurée à 3 jpi, dans les cellules RK13 infectées à une MOI de 1 et de 10 (données non montrées) est d'environ 7 % (Figure 15). Ce taux de survie atteint environ 43 % et 12 % pour les cellules DDT1 MF-2 et 92BR, respectivement (Figure 15) et confirme les résultats obtenus lors des titrages en PFU. Les taux de survie enregistrés pour les cellules GC-1 spg et LNCaP confirment qu'aucune mort cellulaire n'a été associée à l'infection par l'EAV (Figure 15). Pour les cellules ST, aucune mort cellulaire n'a été détectée par ce test. Bien qu'aucune PFU n'ait été observée lors des tests de titrage en PFU sur les cellules TM3 et PC-3, le test de survie cellulaire a montré que l'infection par l'EAV pourrait induire la mort de certaines cellules ou bien un ralentissement de la croissance cellulaire. En effet, les taux de survie cellulaire enregistrés à 3 jpi étaient d'environ 89 % et 69 % pour les cellules TM3 et PC-3, respectivement.

iii. Détection de la présence virale par marquages immunofluorescents

Pour mieux caractériser l'infection des différentes lignées par l'EAV, des marquages immunofluorescents sur lames, utilisant des Ac monoclonaux pour détecter la nucléocapside virale (NP) et la tubuline pour visualiser la morphologie des cellules, ont été réalisés.

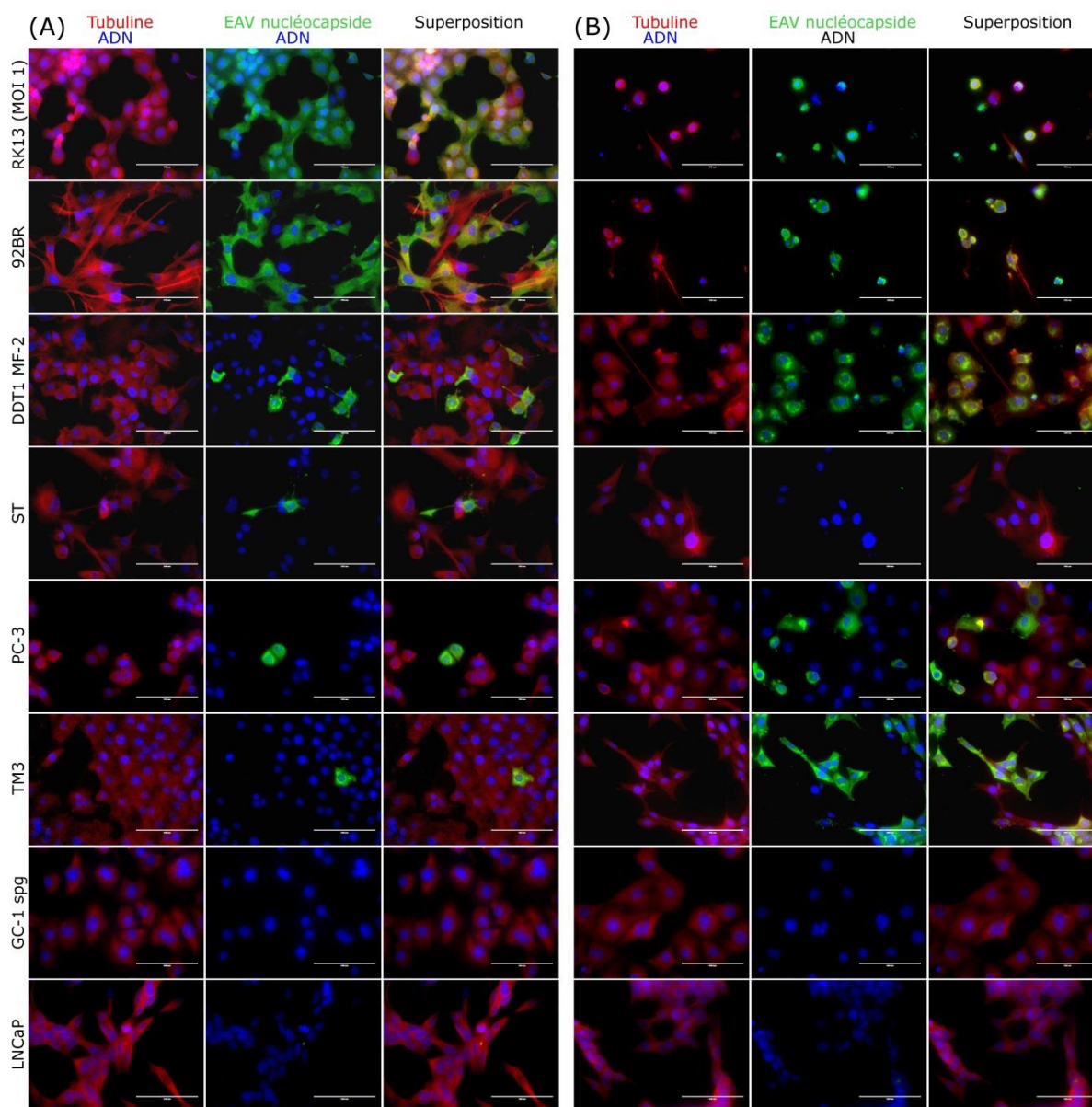


Figure 16 : Détection de la nucléocapside de l'EAV dans les cellules "infectées" par marquages immunofluorescents sur lames

(A et B) Images représentatives de marquages immunofluorescents sur lames après 1 jpi (A) et 3 jpi (B). Le code couleur utilisé est indiqué. Les barres d'échelle représentent 100 μm.

L'infection des cellules a été détectée dès 1 jpi pour les cellules RK13, 92BR, DDT1 MF-2, ST, PC-3 et TM3, mais pas pour les cellules GC-1 spg et LNCaP cells (Figure 16A). De plus,

Résultats

la NP est encore détectée à 3 jpi dans les cellules RK13, 92BR, DDT1 MF-2, PC-3 et TM3, alors qu'elle ne l'est plus dans les cellules ST, et n'est toujours pas détectée dans les cellules GC1 spg et LNCaP (Figure 16B).

Les expériences de cytométrie en flux ont confirmé que plus de 90 % des cellules RK13 et 92BR étaient infectées dès 1 jpi (Figures 17A et 17B). L'infection par l'EAV des cellules DDT1 MF-2 a été moins efficace par rapport aux cellules RK13 et 92BR puisque seulement 6 % des cellules DDT1 MF-2 étaient positives pour la NP à 1 jpi. Cependant, l'infection virale s'est propagée rapidement pour atteindre environ 85 % de cellules DDT1 MF-2 positives pour la NP à 3 jpi (Figure 17B). De façon similaire aux cellules DDT1 MF-2, seulement 2 % et 3,2 % des cellules PC-3 et TM3 étaient respectivement infectées à 1 jpi. Le virus s'est aussi propagé dans ces deux lignées cellulaires puisque respectivement 24 % et 31,5 % des cellules PC-3 et TM3 étaient infectées à 3 jpi en absence d'ECP majeur (Figure 17B). De façon surprenante, aucune cellule infectée n'a été détectée par cytométrie en flux à 1 jpi dans les cellules ST (Figure 17B) alors que quelques cellules étaient détectées par immunocytochimie (Figure 16A). D'un autre côté, à 3 jpi, aucune infection par l'EAV n'a été détectée dans les cellules ST par marquages immunofluorescents sur lames et par cytométrie en flux (Figures 16B and 17B). Aucune cellule infectée n'a été détectée par cytométrie en flux pour les cellules LNCaP et GC-1 spg après infection par l'EAV (Figure 15C). Ces résultats confirment ceux obtenus lors des marquages sur lames et indiquent que les cellules LNCaP, d'origine humaine, et les cellules GC-1spg, d'origine murine, ne semblent pas être sensibles à l'infection par l'EAV.

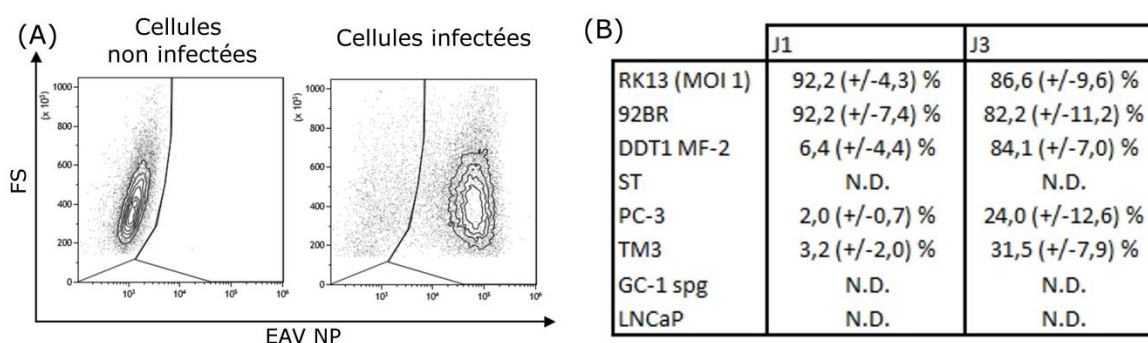


Figure 17 : Détection de la nucléocapside de l'EAV dans les cellules "infectées" par cytométrie en flux
 (A) Graphiques représentatifs pour la sélection des populations cellulaires infectées et non-infectées. Exemple des cellules RK13 à 1 jpi. (B) Pourcentage de cellules infectées obtenu par cytométrie en flux après 1 et 3 jpi (J1 et J3 respectivement). Les résultats proviennent de 2 à 5 expériences indépendantes (moyenne +/- SD).

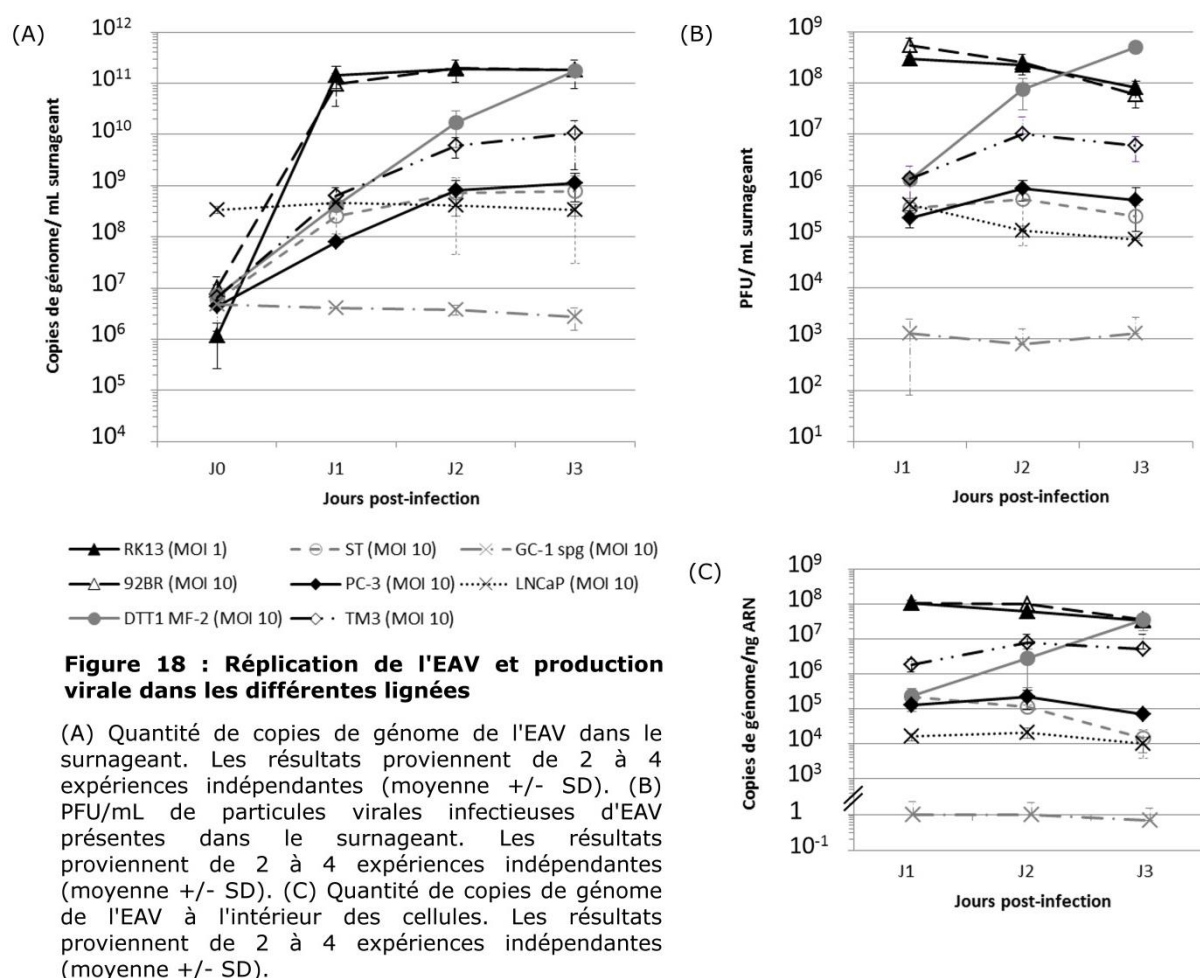
b. La réplication de l'EAV et la production de particules virales infectieuses dans les différentes lignées cellulaires

La réplication de l'EAV a été évaluée en mesurant le nombre de copies de génome viral présentes à l'intérieur des cellules et dans le surnageant des lignées infectées par l'EAV (Figures 18A et 18C).

Le nombre de copies de génome viral mesuré dans le surnageant des cellules RK13 et 92BR a atteint, dès 1 jpi, son maximum avec $\sim 10^{11}$ copies de génome viral par mL de surnageant de culture de cellules infectées. Cette quantité de génome viral détectée est stable pendant 3 jours (Figure 18A). Ces deux lignées ont également montré la même quantité de copies de génome viral intracellulaires, à savoir $\sim 10^7$ - 10^8 copies de génome / ng ARN total, entre 1 et 3 jpi (Figure 18C). À 1 jpi, les cellules DDT1 MF-2, ST, PC-3 et TM3 ont produit entre 5×10^7 et 1×10^9 copies de génome d'EAV par mL de surnageant, et entre 10^5 et 10^6 copies de génome viral par ng d'ARN totaux (Figures 18A et 18C). Il est intéressant de noter que le nombre de copies de génome viral intracellulaire détecté dans les cellules TM3 infectées était dix fois plus important que ceux détectés dans les cellules PC-3 et DDT1 MF-2 (Figure 18C), alors que ces lignées présentent environ le même pourcentage de cellules infectées à 1 jpi : respectivement 3,2 %, 2 % et 6,4 % (Figure 17B). À 3 jpi, les cellules DDT1 MF-2 infectées ont produit autant de copies de génome viral dans les cellules et dans le surnageant de culture

Résultats

que les cellules RK13 et 92BR (Figures 18A et 18C). Cette détection de génome viral semble corrélée au pourcentage de cellules infectées. En effet, seulement 6 % des cellules DDT1 MF-2 étaient infectées à 1 jpi alors que 90 % des cellules RK13 et 92BR l'étaient. Ce pourcentage était d'environ 85 % pour les cellules RK13, 92BR et DDT1 MF-2 à 3 jpi. La lignée TM3 a aussi produit une quantité importante de copies de génome viral avec 10^{10} copies de génome par mL de surnageant, et 10^7 copies de génome par ng d'ARN total, détectées respectivement dans le surnageant et à l'intérieur des cellules à 2 jpi. À 3 jpi, les cellules TM3 infectées à 30 % ont produit seulement 10 fois moins de copies de génome viral dans le surnageant et à l'intérieur des cellules que les cellules RK13 infectées à 90 %. De façon surprenante, après 3 jpi, bien qu'aucune infection des cellules ST n'a été détectée par marquages immunofluorescents et que les cellules PC-3 présentaient environ le même pourcentage de cellules infectées que les cellules TM3 (Figures 16B et 17B), ces deux lignées cellulaires ont produit moins de 10^9 copies de génome viral par mL de surnageant, et moins de 10^5 copies de génome viral intracellulaires par ng ARN total, ce qui représente respectivement un et presque deux \log_{10} de moins que les cellules TM3 infectées (Figures 18A and 18C). Cependant, cette absence d'infection détectée par marquages immunofluorescents dans les cellules ST, à 3 jpi, peut être corrélée avec une diminution du nombre de copies de génome viral intracellulaires après 1 jpi. Enfin, aucune production de copies de génome viral n'a été détectée après infection des cellules LNCaP et GC-1 spg par l'EAV, ni dans le surnageant ni à l'intérieur des cellules (Figures 18A et 18C).



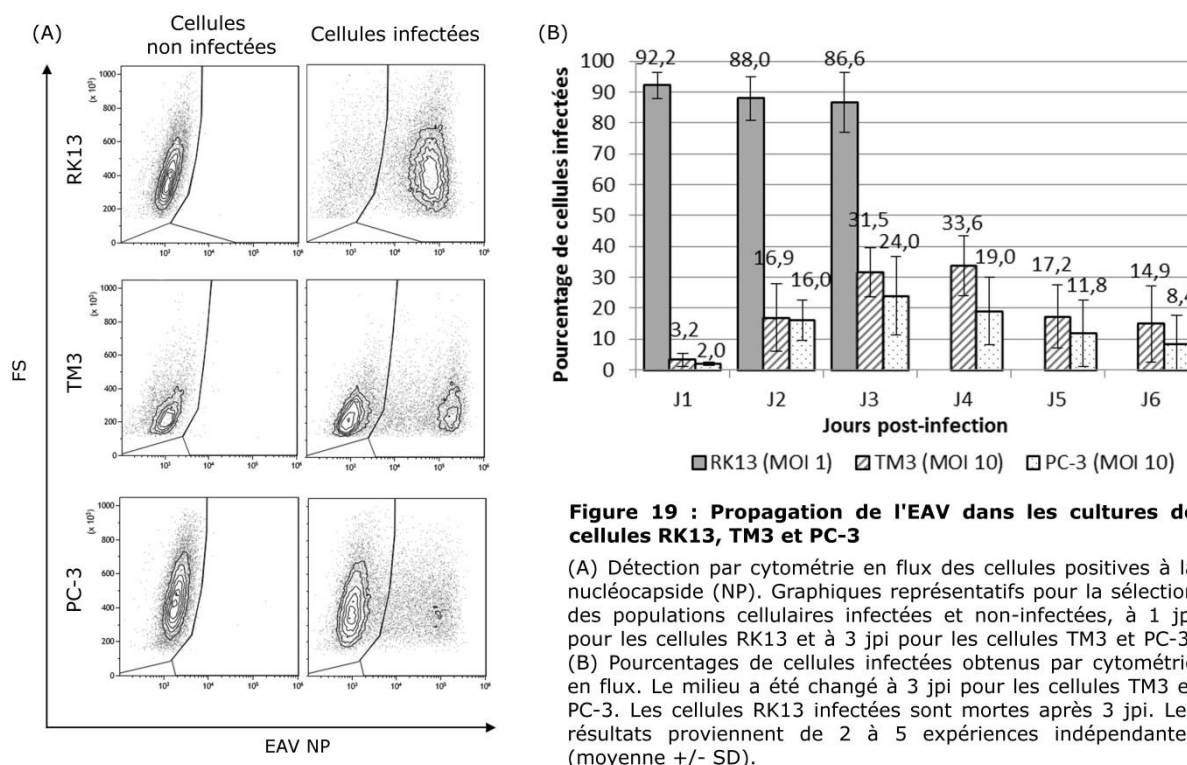
En plus de la production de copies de génome viral, la production de particules virales infectieuses, par les différentes lignées infectées par le virus de l'EAV, a été testée par titrage en PFU sur des tapis cellulaires préformés de cellules RK13. Entre 10^8 et 10^9 particules virales infectieuses par mL de surnageant ont été retrouvées à 3 jpi dans les milieux de culture des cellules RK13, 92BR et DTT1 MF-2 (Figure 18B). À 3 jpi, la production virale a été évaluée à environ 10^5 PFU par mL de surnageant dans les cellules ST et PC-3, et à environ 10^7 PFU par mL de surnageant dans les cellules TM3 sans ECP majeur (Figure 18B). Contrairement au nombre de copies de génome viral produites, le nombre de PFU par mL de surnageant diminue dès 2 jpi pour les cellules 92BR, RK13 et LNCaP cells (Figures 18A and 18B).

Résultats

En conclusion, les cellules LNCaP et GC1-spg ne semblaient pas permissives à l'infection par l'EAV, et l'infection des cellules ST n'a pas été détectable à 3 jpi. De plus, l'infection des cellules 92BR et DDT1 MF-2 a été cytopathique en 3 jours. Seules les lignées PC-3 et TM3 étaient permissives à l'infection par l'EAV sans ECP majeur à 3 jpi. Par conséquent, le reste de l'étude s'est concentré sur l'infection des cellules TM3 et PC-3.

c. Caractérisation de l'infection par l'EAV des cellules TM3 et PC-3

La dissémination de l'EAV dans les cellules TM3 et PC-3 a été étudiée, car aucun ECP majeur n'a été détecté après 3 jpi.



Ces deux lignées ont été infectées avec une MOI de 10, et seulement 2 à 3 % de cellules étaient infectées à 1 jpi (Figure 19) en comparaison des 92,2 % de cellules infectées pour la lignée RK13, hautement permissive, infectée à une MOI de 1. Le pourcentage de cellules infectées a augmenté de 1 à 3 jpi pour atteindre environ 25 % pour les cellules PC-3 et environ 30 % pour les cellules TM3. Puis, de 4 à 6 jpi la proportion de cellules infectées a

diminué pour passer de ~20 % à ~8 % pour les cellules PC-3 et de ~30 % à ~15 % pour les cellules TM3 (Figure 19), alors que les cellules RK13 sont mortes à cause de l'ECP dû à l'EAV.

Afin de confirmer nos premiers résultats indiquant que l'infection par l'EAV n'induisait pas d'ECP majeur chez les cellules TM3 et PC-3, des tests de croissance et de survie cellulaire ont été réalisés sur ces deux lignées en mesurant la quantité d'ATP présent dans chaque condition sur une période de 7 jours.

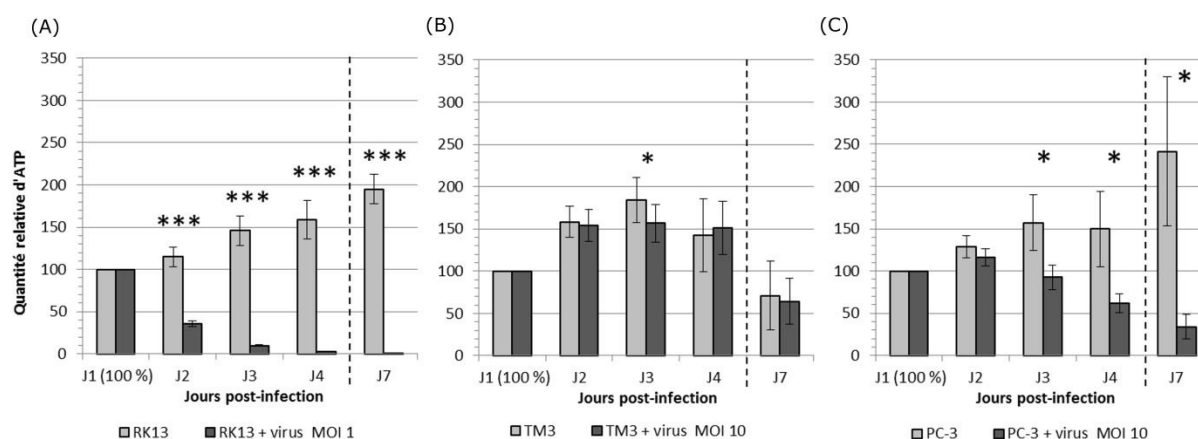


Figure 20 : Survie cellulaire des cellules RK13, TM3 et PC-3

Expériences de Cell titer glo. Pour chaque condition, le signal luminescent a été normalisé par rapport au signal luminescent obtenu à 1 jpi. Les résultats proviennent de 4 à 7 expériences indépendantes (mean +/- SE). Un test de Student unilatéral pour données appariées a été réalisé en comparant les résultats des cellules infectées aux résultats des cellules non-infectées. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Les expériences de survie cellulaire réalisées à 1, 2, 3, 4 et 7 jpi sur les cellules RK13, hautement permissives à l'EAV, ont montré que dès 2 jpi l'infection par l'EAV se caractérisait par 74 % de mort cellulaire, et que celle-ci atteignait 90 % à 3 jpi et plus de 95 % à 4 jpi et 7 jpi (Figure 20A). Pour les cellules PC-3, l'infection par l'EAV semble avoir eu un effet sur leur croissance cellulaire puisqu'à 3 jpi le taux de survie était de 92 +/- 15 % pour les cellules infectées et de 157 +/- 33 % pour les cellules non-infectées (Figure 20C). Dans ces cellules, la mort cellulaire due à l'infection par l'EAV a commencé à 4 jpi et a continué

Résultats

jusqu'à 7 jpi avec des taux de survie, respectivement, de 62+/-12 % et 34+/-14 %. De façon intéressante, l'infection par l'EAV des cellules TM3 n'a pas modifié leur taux de mortalité, par rapport aux cellules non-infectées, sur une période de 7 jours (Figure 20B) même si leur croissance semble légèrement ralentie à 3 jpi.

D'après l'ensemble des résultats obtenus et synthétisés dans le Tableau 7, les cellules TM3 sont donc un modèle intéressant pour étudier les relations hôte-pathogène lors de l'infection par l'EAV.

Lignée	Absence de lyse lors des titrages en PFU	IF	Réplication de l'EAV	Production de particules virales infectieuses	Dissémination de l'EAV	Survie cellulaire à 7 jpi
92BR	✗	✓	✓	✓		
DDT1 MF-2	✗	✓	✓	✓		
LNCaP	✓	✗	✗			
GC-1 spg	✓	✗	✗			
ST	✓/✗	✗	✓	✓		
PC-3	✓	✓	✓	✓	✓	✗
TM3	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tableau 7: Bilan des infections des différentes lignées issues de l'appareil reproducteur mâles testées

d. L'infection par l'EAV induit l'expression génique des interférons dans les cellules TM3

Au cours d'infections de 7 jours, les cellules TM3 n'ont pas présenté d'ECP majeur, et seulement 30 % des cellules étaient infectées. L'étude de l'expression génique des IFN-I, qui pourraient atténuer la dissémination du virus dans les cultures cellulaires a donc été entreprise. L'expression génique relative des IFN- α et β dans les cellules TM3 infectées a été analysée à 1, 2, 3 et 4 jpi. Dès 2 jpi les IFN- α et β sont détectés et atteignent leur pic

d'expression à 3 jpi. L'infection par l'EAV a induit une forte surexpression, jusqu'à 17 fois, de ces deux molécules antivirales (Figure 21).

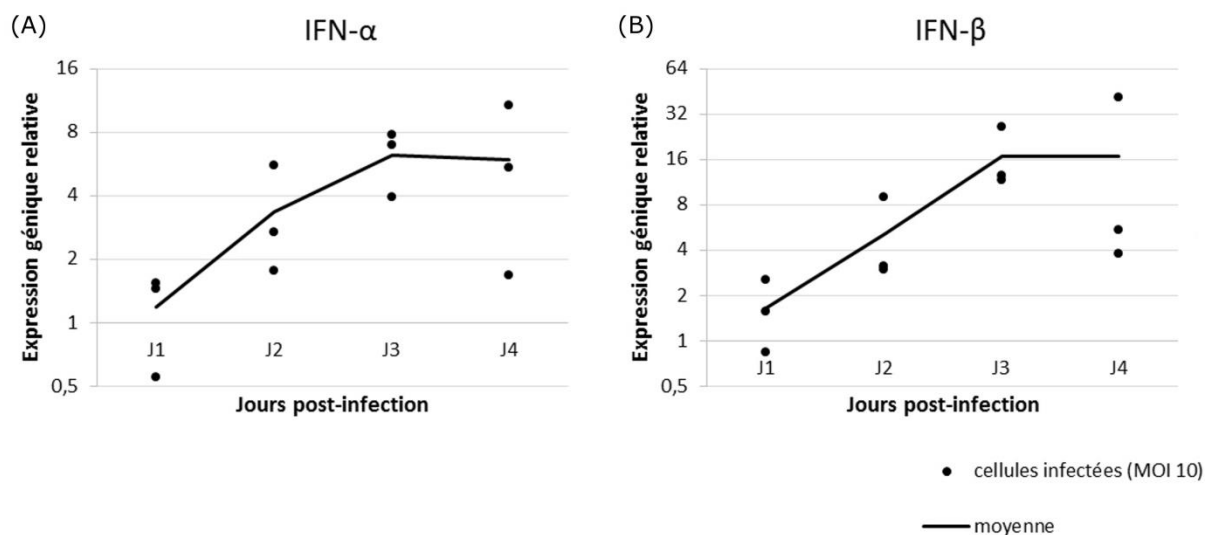


Figure 21 : Expression relative des IFN-I par les cellules TM3 infectées

L'expression relative des gènes IFN-α (A) and IFN-β (B) a été calculée. Les résultats proviennent de 3 expériences indépendantes. Les données ont été normalisées par rapport à l'actine en utilisant la méthode des $2\Delta\Delta Ct$. Chaque expérience indépendante est représentée par un point par jour. La moyenne des trois expériences est représentée par un trait continu.

II) Induction par l'EAV de gènes de l'immunité innée impliqués dans l'inflammation chez les cellules TM3

a. L'infection par l'EAV induit l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules TM3

L'expression génique relative de cytokines pro-inflammatoires a été quantifiée par RT-qPCR.

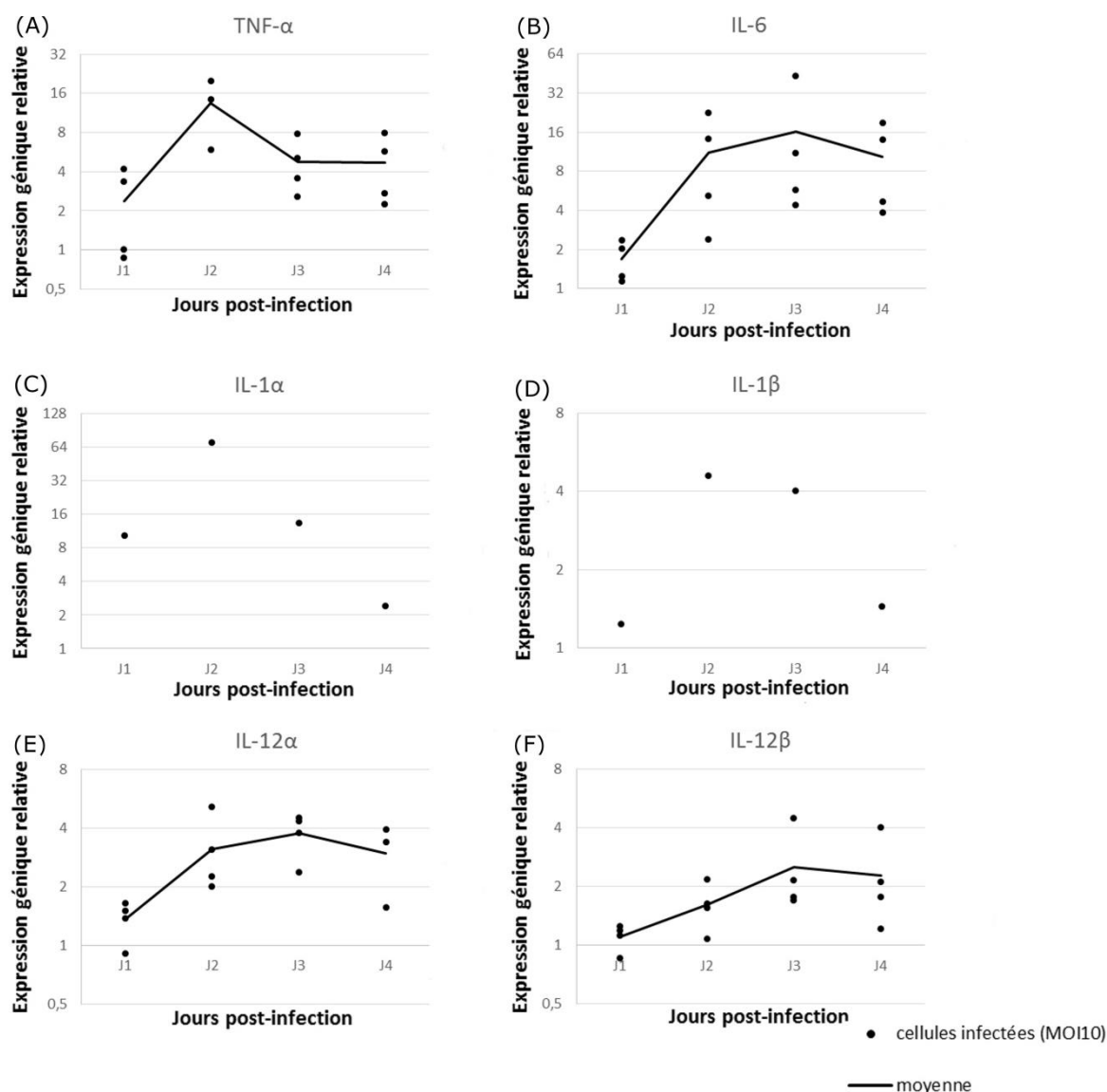


Figure 22 : Expression relative des cytokines pro-inflammatoires par les cellules TM3 infectées

L'expression relative des gènes TNF- α (A), IL-6 (B), IL-1 α (C), IL-1 β (D), IL-12 α (E) et IL-12- β (F) a été calculée. Les résultats proviennent de 1 à 4 expériences indépendantes. Les données ont été normalisées par rapport à l'actine en utilisant la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Chaque expérience indépendante est représentée par un point par jour. La moyenne des expériences est représentée par un trait continu.

L'expression génique relative du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 α dans les cellules TM3 infectées a été détectée à 1 jpi et a atteint son maximum à 2 jpi, pour le TNF- α et l'IL-1 α , ou 3 jpi, pour l'IL-6. L'infection par l'EAV a induit une forte surexpression, jusqu'à 64 fois, de ces cytokines pro-inflammatoires. Elle induit également une surexpression génique de l'IL-1 β et des IL-12 α et β , jusqu'à 5 fois. L'expression génique de ces trois cytokines a été détectée dès 2 jpi et a atteint son maximum à 2 jpi, pour l'IL-1 β , ou 3 jpi, pour les IL-12 α et β (Figure 22).

b. L'infection par l'EAV induit l'expression génique de chimiokines dans les cellules TM3

En ce qui concerne les chimiokines CCL2, CCL5, CCL20, CXCL9 et CXCL10, leur expression génique relative, dans les cellules TM3 infectées, a été détectée dès 1 jpi et augmente jusqu'à 3 jpi, sauf pour CCL20, dont l'expression génique maximale est observée à 2 jpi. Comme pour les cytokines pro-inflammatoires, l'infection par l'EAV a induit une forte surexpression, jusqu'à 1720 fois, de ces chimiokines, excepté peut-être pour CCL11, dont la surexpression serait la plus faible des gènes testés (Figure 23).

c. L'infection par l'EAV induit l'expression génique des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) dans les cellules TM3

L'expression génique des RLR (MDA5 et RIG-1) et de TLR (TLR-2, TLR-3 et TLR-9) suite à l'infection par l'EAV a ensuite été étudiée. L'infection par l'EAV provoque une augmentation de l'expression génique relative de MDA5 et RIG-1 dès 2 jpi. Celle-ci est maximale à 3 jpi (surexpression allant jusqu'à 46 fois). L'IPS-1 (IFN γ promoter stimulator) ne présente pas de surexpression génique suite à l'infection par l'EAV (Figure 24).

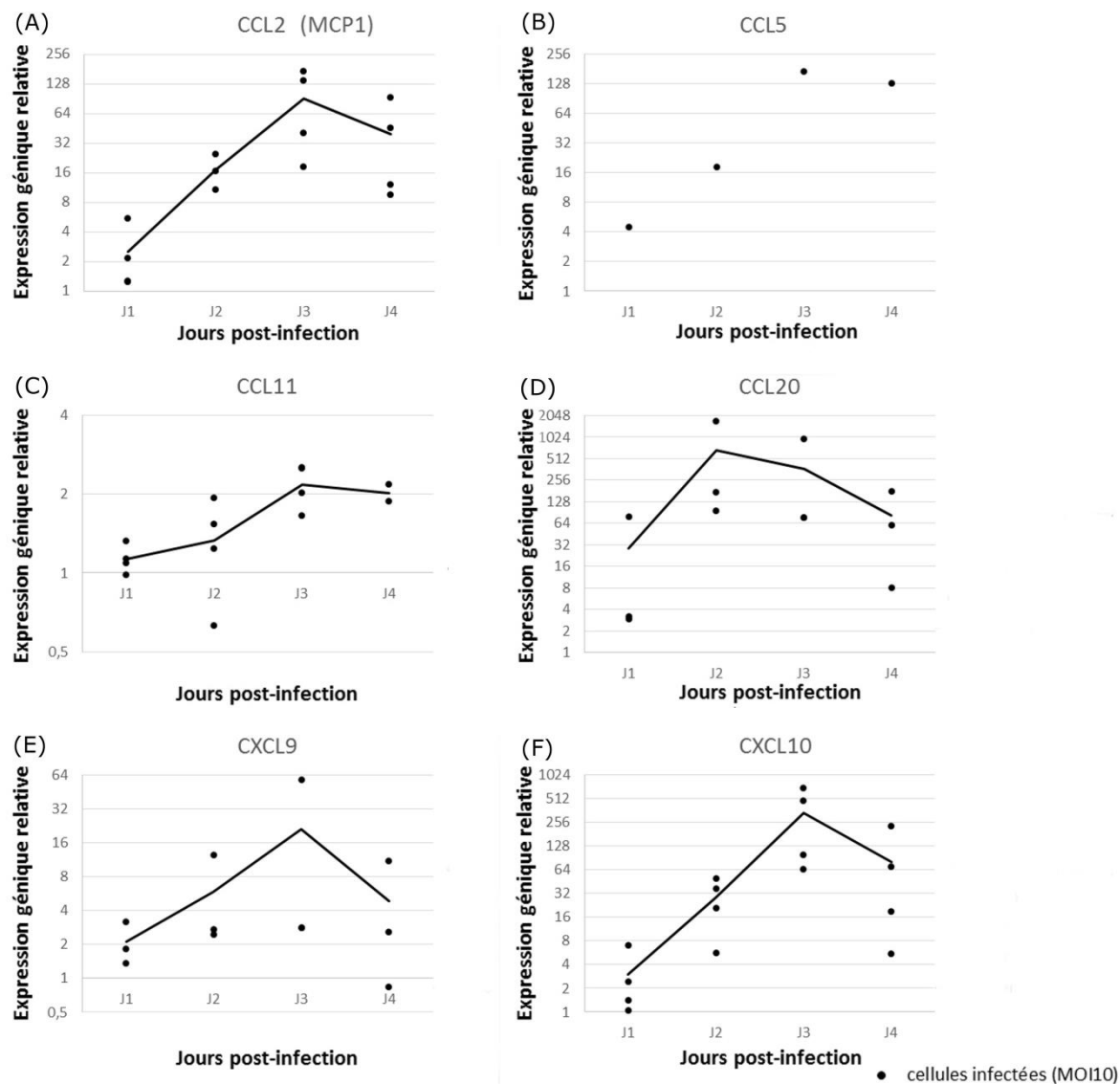


Figure 23 : Expression relative des chimiokines par les cellules TM3 infectées — moyenne

L'expression relative des gènes CCL2 (A), CCL5 (B), CCL11 (C), CCL20 (D), CXCL9 (E) et CXCL10 (F) a été calculée. Les résultats proviennent de 1 à 4 expériences indépendantes. Les données ont été normalisées par rapport à l'actine en utilisant la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Chaque expérience indépendante est représentée par un point par jour. La moyenne des expériences est représentée par un trait continu.

Pour le TLR-9, son expression génique, augmentée jusqu'à 20 fois, à 2 jpi, dans les cellules infectées, a été détectée dès 1 jpi. Quant au TLR-2, il ne présente pas de réelle augmentation de son expression génique suite à l'infection par l'EAV (Figure 24). Pour le TLR-3 deux expériences ont montré une surexpression génique allant jusqu'à 16 fois à 3 jpi.

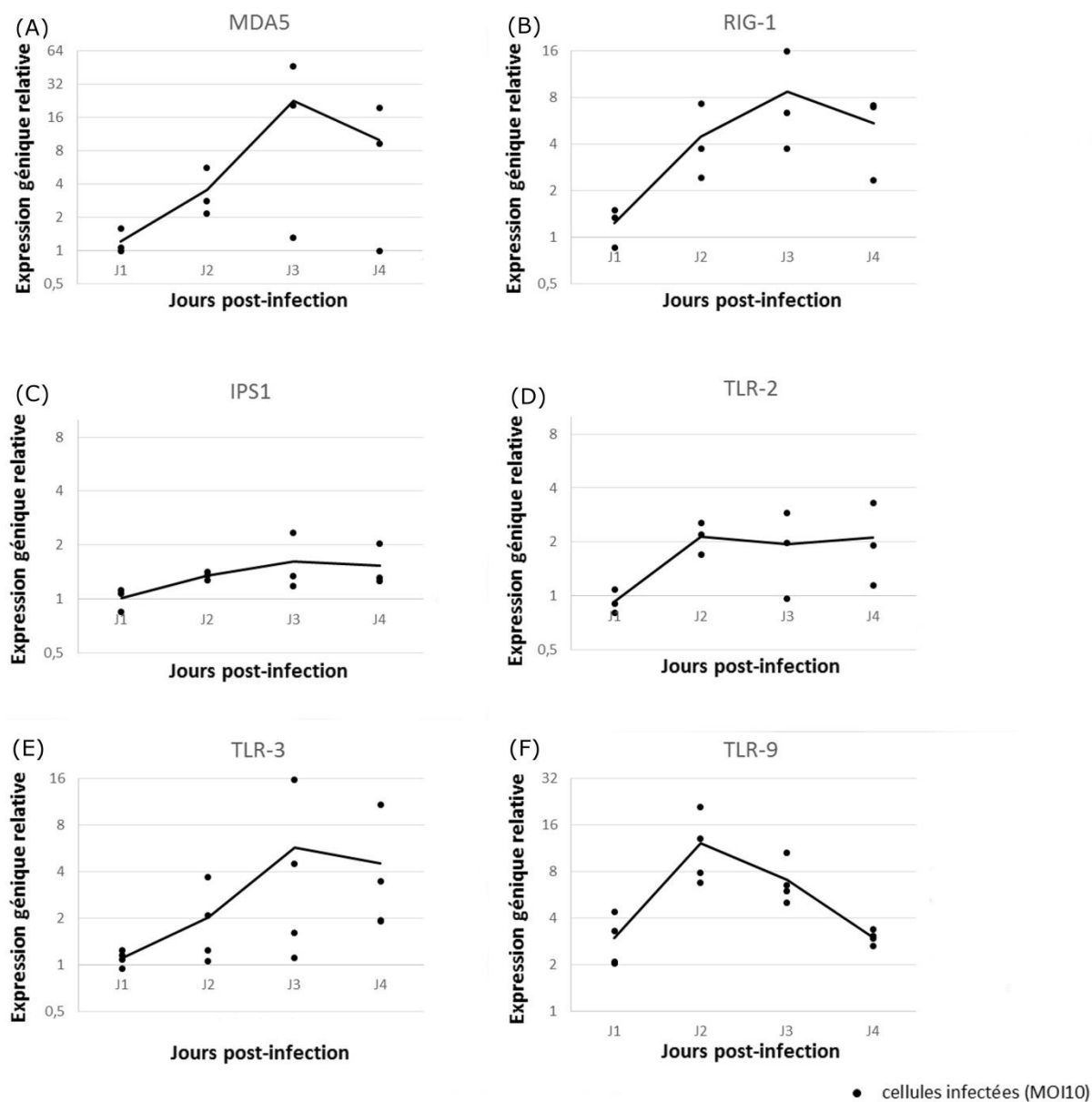


Figure 24 : Expression relative des PRR par les cellules TM3 infectées

L'expression relative des gènes MDA5 (A), RIG-1 (B), IPS1 (C), TLR-2 (D), TLR-3 (E) et TLR-9 (F) a été calculée. Les résultats proviennent de 3 à 4 expériences indépendantes. Les données ont été normalisées par rapport à l'actine en utilisant la méthode des $2\Delta\Delta Ct$. Chaque expérience indépendante est représentée par un point par jour. La moyenne des expériences est représentée par un trait continu.

d. Augmentation du pourcentage de cellules TM3 infectées après passage des cellules

Certains gènes tels que l'IPS-1 et le TLR-2 ne semblent pas montrer de réelle surexpression génique suite à l'infection par l'EAV. Cependant, dans ce modèle d'infection des cellules TM3, en quatre jours d'infection, au maximum ~30 % de cellules sont infectées. Il se peut donc que ces gènes présentent réellement une légère surexpression génique dans les cellules infectées, mais que celle-ci soit indétectable à cause de l'absence de surexpression génique dans les cellules non-infectées, qui représentent minimum 70 % de la population.

Pour mieux étudier l'expression génique de gènes éventuellement peu surexprimés par l'infection, nous avons développé un protocole permettant d'augmenter le pourcentage de cellules infectées.

En effet, après le passage des cellules à 1 et 2 jpi de P0 (primo-infection), le pourcentage de cellules infectées devient supérieur à 50 %. Par contre, lorsque les cellules infectées sont passées à J3 de P0, le pourcentage de cellules infectées n'est pas augmenté (Figure 25).

Ainsi, en passant les cellules TM3 à 1 jpi de P0, les cellules présentent plus de 50 % de cellules infectées et peuvent permettre l'étude des gènes pour lesquels la surexpression génique est plutôt faible et incertaine. Par manque de temps, l'étude de la réponse inflammatoire de ces cellules suite à l'infection par l'EAV n'a pu être réalisée.

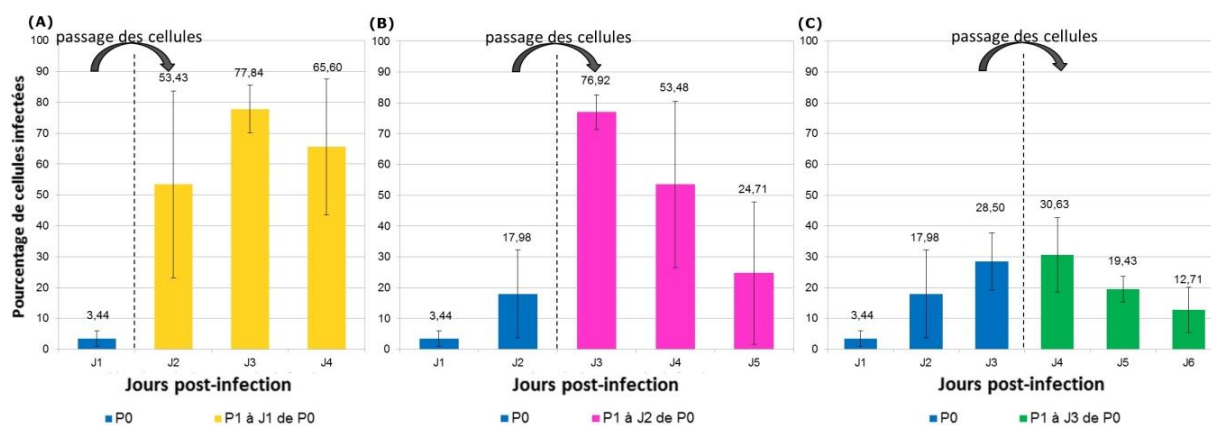


Figure 25 : Pourcentage de cellules TM3 infectées après passage cellulaire

Les cellules TM3 infectées (MOI 10) ont été passées après 1 (A), 2 (B), ou 3 (C) jpi (n = 2). Le pourcentage de cellules infectées avant (P0) et après passage (P1) a été obtenu par cytométrie en flux.

III) Essais de traitements avec la testostérone

Les cellules TM3 expriment le récepteur à la testostérone [345] et sont capables de réaliser la stéroïdogénèse. L'infection de ces cellules est donc un modèle intéressant pour étudier les relations hôte-pathogène et pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance du virus au niveau de l'appareil reproducteur, notamment en étudiant l'effet de la testostérone sur le cycle viral.

a. Expériences préliminaires de traitement avec la testostérone

Dans un premier temps, l'effet de la testostérone sur la dissémination de l'infection dans les cultures de TM3 a été évalué par marquages immunofluorescents sur lamelles après un traitement de 48 heures.

Différentes concentrations ont été testées : 1, 10, 25 et 50 ng.mL⁻¹. Le pourcentage de cellules semblent augmenter légèrement pour 25 et 50 ng.mL⁻¹ (Figure 26) : la médiane passe de ~20 % à 26 et 29 %, respectivement. Une dose plus élevée de testostérone (200 ng.mL⁻¹) a été testée mais n'a cependant pas modifié le pourcentage de cellules infectées (Figure 26). En effet, la médiane reste à 12 % de cellules infectées.

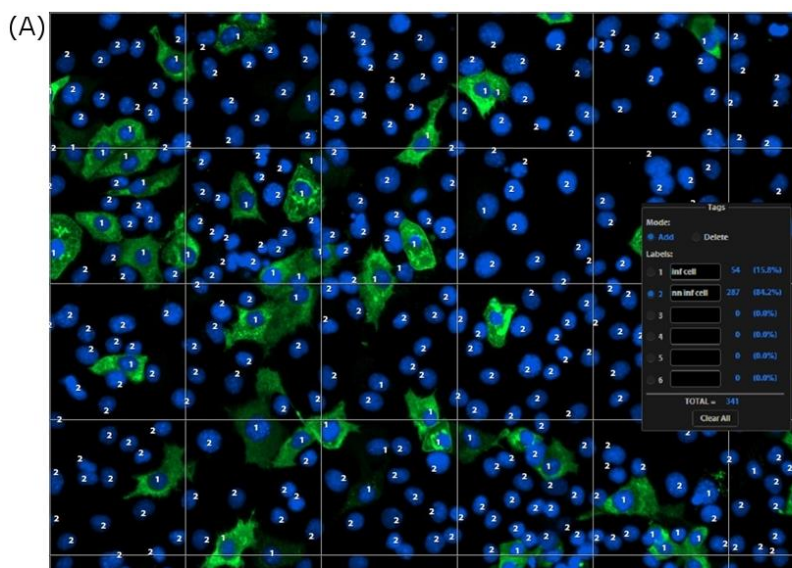
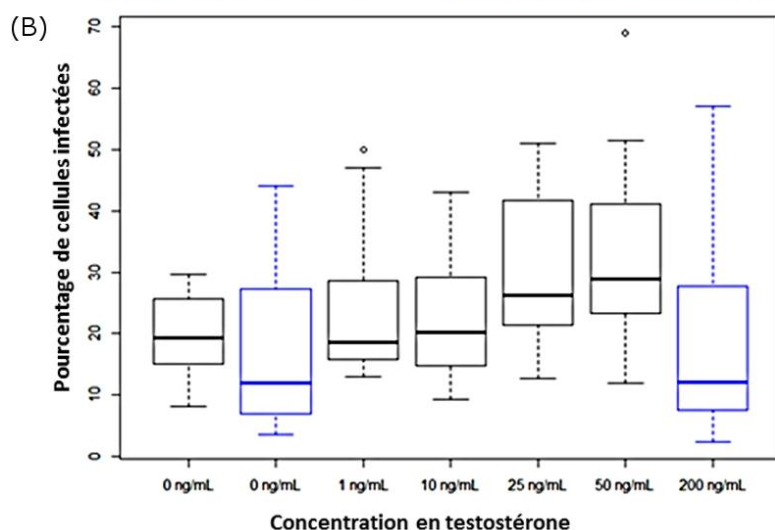


Figure 26 :
Évaluation de l'effet
de la testostérone
sur le pourcentage
de cellules infectées
(MOI 1) par
marquages
immunofluorescents
sur lamelles

(A) Image (x20) d'un comptage de cellules infectées sur microscope à fluorescence (image d'une condition sans testostérone). Le marquage vert montre la présence de la nucléocapside et le bleu celle de l'ADN.
(B) Pourcentages de cellules infectées après 2 jours de traitement à la testostérone (3 jpi). En noir sont représentés les résultats de la 1^{re} expérience et en bleu sont représentés ceux de la 2^e. Au moins 10 champs ont été comptés par lamelle.



b. Évaluation de l'effet de la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées en cytométrie en flux

L'étude de l'effet de la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées a ensuite été poursuivie en cytométrie en flux.

Une gamme plus importante de doses a été testée au cours de trois expériences indépendantes de traitement à la testostérone commencé à 1 jpi : 1, 10, 25, 50, 100, 200, 250 et 500 ng.mL⁻¹. Le pourcentage de cellules infectées (MOI 10) a été déterminé à 1 et 2 jours

Résultats

(Figures 27A et 27B) de traitement. Après 1 jour de traitement, deux expériences semblaient montrer une légère diminution du pourcentage de cellules infectées (de 27 % pour les cellules non traitées à un pourcentage compris entre 20 et 25 % pour les cellules traitées, et de 22 % à un pourcentage compris entre 19 et 20 %) avec la testostérone alors que la troisième n'a pas montré d'effet, sauf pour une dose qui a présenté une légère augmentation de ~21 % à 23 %. Après 2 jours de traitement, une expérience a montré une légère augmentation du pourcentage de cellules infectées (de 15 % à un pourcentage compris entre 15 et 21 %), alors qu'une deuxième a montré une légère diminution du pourcentage (de 13 % à un pourcentage descendant jusqu'à 10 %) et que la troisième a présenté un pourcentage stagnant ou augmenté que très légèrement (pourcentage entre 8 et 10 %). En conclusion, aucune tendance claire ne semble se dégager de ces expériences.

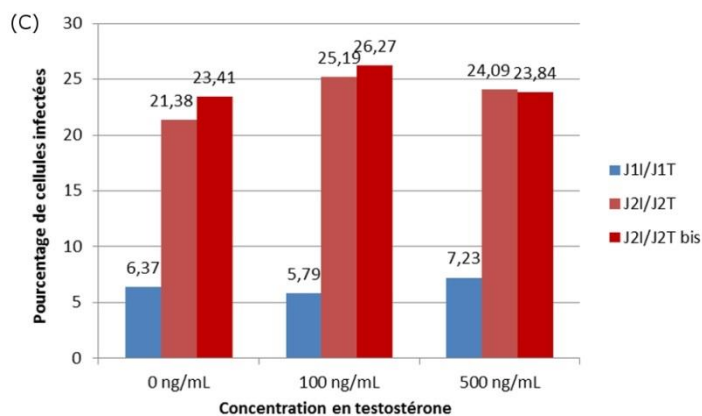
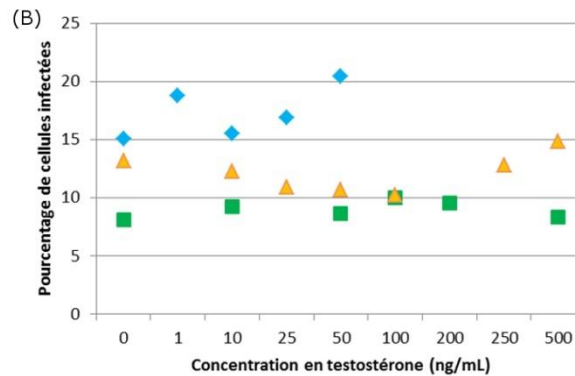
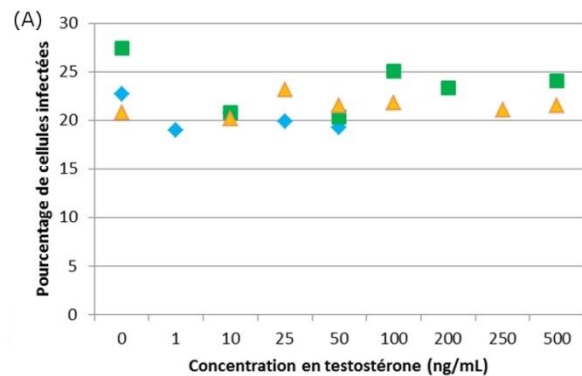


Figure 27 : Évaluation de l'effet de la testostérone sur le pourcentage de cellules infectées (MOI 10) en cytométrie en flux

(A et B) Effet de la testostérone à 1 jour (A) et 2 jours (B) de traitement avec la testostérone commencé à 1 jpi. Différentes concentrations ont été testées lors des trois expériences indépendantes représentées. (C) Effet de la testostérone à 1 jour et 2 jours de traitement avec la testostérone commencé à 5 heures p.i. Pour le 2e jour de traitement, deux flasques par condition ont été marquées.

Une deuxième approche qui consistait à traiter les cellules TM3 juste après l'infection, soit 5 heures p.i. au lieu de 24 heures, a été testée. Les cellules ont été traitées avec 100 et 500 ng.mL⁻¹ de testostérone (Figure 27C). Les résultats de ce traitement analysés à 1 et 2 jpi indiquent que, même à des doses élevées, il ne semble pas y avoir d'effet majeur sur le pourcentage de cellules infectées. Après 1 jour de traitement, aucun effet n'a été observé : les cellules présentent toutes environ 6 % de cellules infectées. Après 2 jours de traitement, un pourcentage très légèrement supérieur a été observé pour les cellules traitées avec 100 ng.mL⁻¹ de testostérone : les cellules passent de ~22,5 % à ~25,5 % de cellules infectées (Figure 27C). Par conséquent, ces résultats montrent que si la testostérone a un effet sur le pourcentage de cellules infectées, celui-ci serait faible.

c. Évaluation de l'effet de la testostérone sur la réplication de l'EAV

Après avoir analysé l'effet du traitement à la testostérone sur la dissémination de l'infection au sein de la culture cellulaire, l'effet du traitement a été évalué sur la réplication de l'EAV dans ces mêmes cultures.

Les cellules TM3 infectées ont été traitées à l'aide de différentes doses de testostérone : 1, 10, 25, 50, 100, 250 et 500 ng.mL⁻¹.

La réplication de l'EAV a été suivie par la quantification de l'ARN viral à partir des ARN totaux extraits des cellules infectées et des ARN extraits à partir du surnageant des cultures infectées. Au niveau intracellulaire, la testostérone n'a aucun effet sur la quantité de génome de l'EAV après 1 jour de traitement (Figure 28A). Par contre, le traitement à la testostérone pourrait augmenter la quantité de génome viral jusqu'à 2 fois après 2 et 3 jours de traitements à 500 ng.mL⁻¹ (Figures 28B et 28C). Ces valeurs restent cependant dans la zone d'incertitude de la méthode des $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Résultats

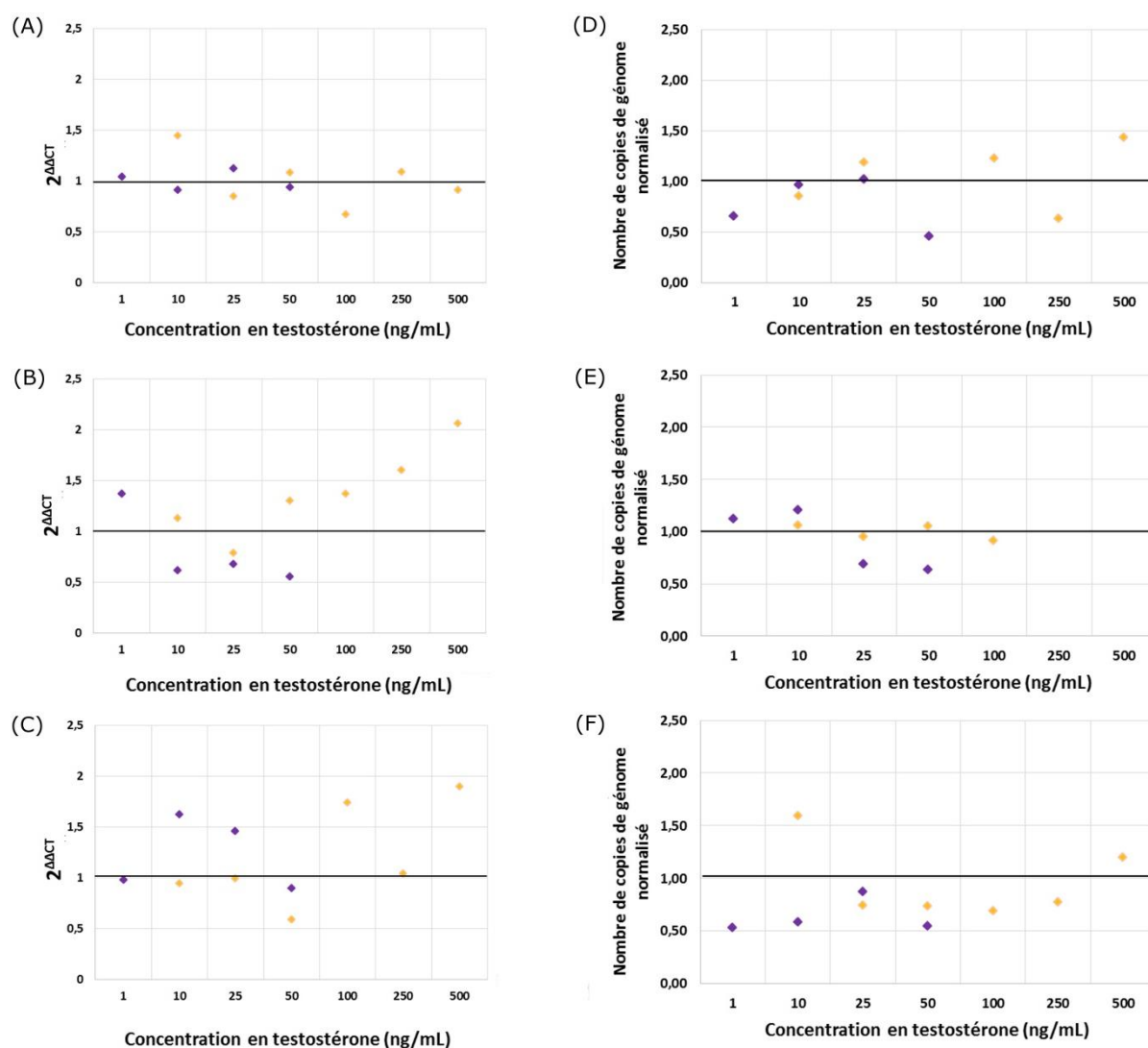


Figure 28 : Évaluation de l'effet de la testostérone sur la réplication de l'EAV

(A, B, et C) L'expression relative du génome de l'EAV dans les cellules a été calculée après 1 (A), 2 (B), et 3 (C) jours d'un traitement à la testostérone commencé à 1 jpi sur des cellules infectées à MOI 10. Les données ont été normalisées par rapport à l'actine en utilisant la méthode des $2\Delta\Delta Ct$. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur.

(D, E, et F) Le nombre de copies de génome de l'EAV présentes dans le surnageant a été calculé après 1 (A), 2 (B), et 3 (C) jours d'un traitement à la testostérone commencé à 1 jpi sur des cellules infectées à MOI 10. Ce nombre a été normalisé par rapport au nombre de copies de génome de l'EAV présentes dans la condition non traitée. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur.

Pour le surnageant, après 1 jour de traitement, un résultat semblerait montrer une légère diminution du nombre de copies de génome de l'EAV à 50 ng.mL⁻¹, mais d'après l'autre expérience, cette tendance n'est observée que pour une concentration de 250 ng.mL⁻¹ et celle de 500 ng.mL⁻¹ présenterait même une augmentation. Après 2 jours de traitement, il y aurait une légère diminution du nombre de copies de génome pour 25 et 50 ng.mL⁻¹ pour une

expérience. De même, après 3 jours de traitement, pour une expérience il y aurait une légère diminution du nombre de copies de génome pour 1 ng.mL^{-1} , 10 ng.mL^{-1} et 50 ng.mL^{-1} , mais pas pour 25 ng.mL^{-1} , alors qu'il y aurait une légère augmentation pour 10 ng.mL^{-1} dans une deuxième expérience. Les résultats préliminaires obtenus suite au traitement des cellules par la testostérone semblent donc indiquer que la testostérone n'aurait pas d'effet sur la quantité de génome viral de l'EAV détecté dans le surnageant des cultures de cellules (Figures 28D, 28E et 28F).

d. Effet de la testostérone sur l'expression du gène StAR

L'expression du gène codant pour la protéine StAR, qui régule la première étape de la stéroïdogénèse (l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie), est induite, entre autres, par la testostérone [345]. L'induction de l'expression de ce gène a été vérifiée dans notre modèle de cellules TM3.

Plusieurs doses ont été testées au cours de trois expériences indépendantes : 1, 10, 25, 50, 100, 250 et 500 ng.mL^{-1} . Aucune réelle sur-expression ou sous-expression de StAR n'a été observée (Figure 29).

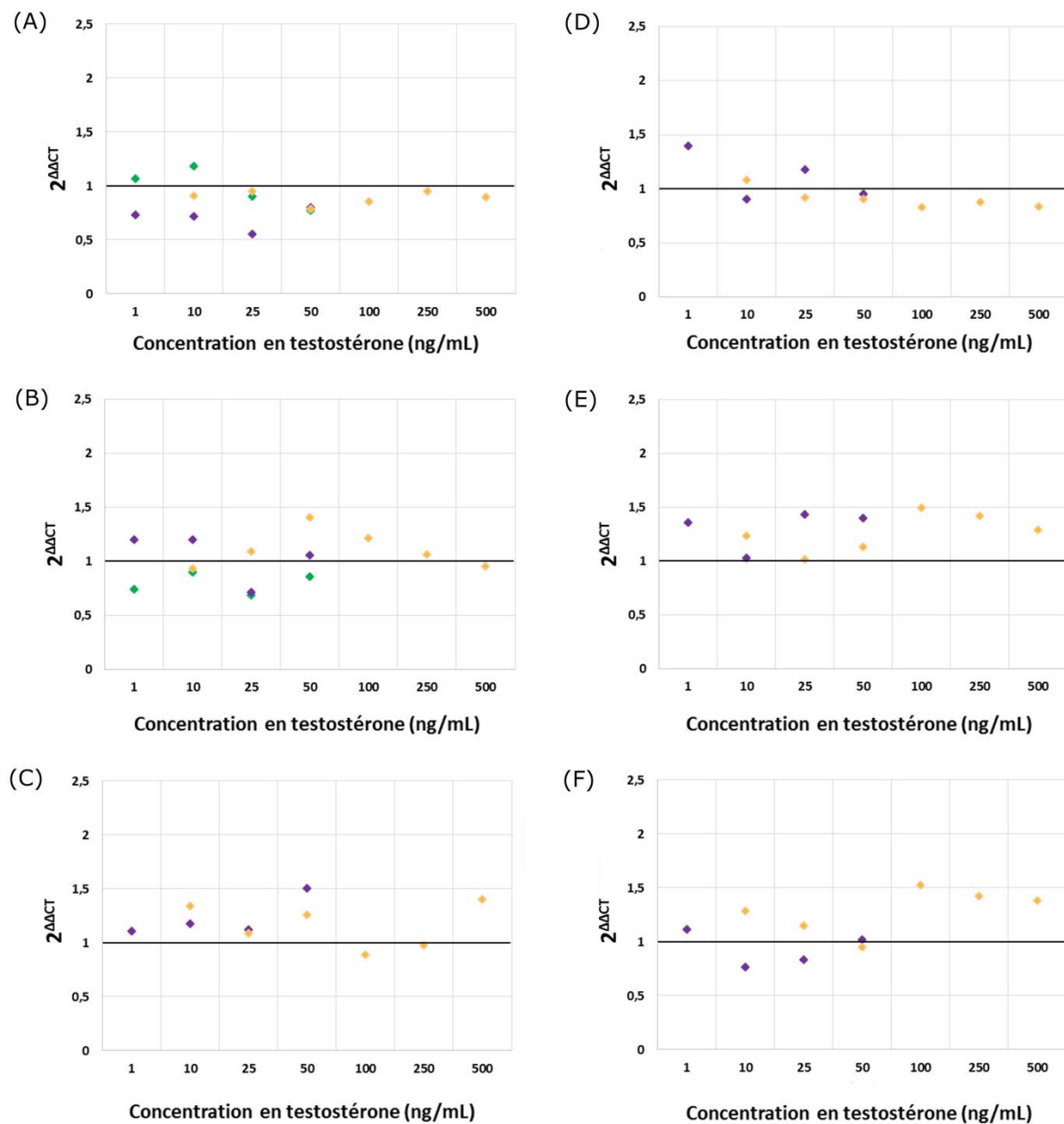


Figure 29 : Évaluation de l'effet de la testostérone sur l'expression génique de StAR

L'expression génique relative de StAR dans les cellules non infectées (A,B, et C) ou infectées (D, E, et F) a été calculée après 1 (A et D), 2 (B et E) et 3 (C et F) jours d'un traitement à la testostérone. Les données ont été normalisées par rapport à l'actine en utilisant la méthode des $2^{\Delta\Delta Ct}$. Chaque expérience indépendante est représentée par une couleur.

Discussion et Perspectives

La persistance de l'EAV dans l'appareil reproducteur mâle est une des conséquences de l'infection chez certains étalons. Les mécanismes impliqués dans cette persistance sont toujours mal connus. L'EAV est spécifique des équidés et aucun modèle animal, autre que l'étalon, n'existe pour étudier cette persistance *in vivo*. L'un des objectifs de ma thèse était de développer un modèle d'infection *in vitro* d'une lignée cellulaire issue de l'appareil reproducteur mâle, permettant d'étudier les mécanismes impliqués dans la persistance de l'EAV dans l'appareil reproducteur des étalons, et plus particulièrement le rôle de la testostérone dans le cycle viral de l'EAV.

I) Établissement d'un modèle *in vitro* d'infection non-lytique par l'EAV

L'ensemble des lignées testées au cours de cette étude a permis de cribler une grande partie des différents types cellulaires retrouvés dans l'appareil reproducteur mâle.

a. Les différents types d'infection observés *in vitro*

i. Absence d'infection ou infections abortives

Parmi les lignées cellulaires testées, les cellules LNCaP, issues d'un carcinome de prostate humaine, et les cellules GC-1 spg, des spermatogonies murines de type B immortalisées, ne semblent pas être permissives à l'infection. En effet, aucun génome viral n'a été retrouvé parmi les ARN extraits à partir des cellules GC-1 spg. Cette absence indiquerait que l'EAV n'a pas pu pénétrer dans la cellule et que les cellules GC-1 spg n'exprimeraient vraisemblablement pas le récepteur de l'EAV, et seraient donc résistantes à l'infection. La présence d'ARN viral a été mise en évidence dans les cellules LNCaP suite à l'infection. En revanche, les quantités d'ARN viraux détectées à l'intérieur des cellules LNCaP, suite à l'infection, n'augmentent pas au cours de l'infection. Ceci semble suggérer que les cellules LNCaP présentent une infection abortive, avec entrée du virus dans les cellules mais blocage

de la réplication virale dans ces cellules, ou que les cellules sont résistantes à l'infection par l'EAV et que les ARN viraux détectés proviennent de particules virales restées attachées à la membrane des cellules. Ainsi, le génome viral détecté dans le surnageant des cellules GC-1 spg et LNCaP proviendrait du reste de l'inoculum viral.

D'autre part, la présence d'une quantité de génome viraux 100 fois plus importante dans le surnageant de culture des cellules LNCaP que dans celui des cellules GC-1 spg, suite aux infections par l'EAV, pourrait s'expliquer par des protocoles légèrement différents. En effet, le virus est laissé au contact des LNCaP durant toute la durée de l'expérience alors qu'un temps d'incubation de 5 heures a été réalisé pour les autres lignées cellulaires, dont les GC-1 spg. Cette différence est due aux difficultés d'adhérence des LNCaP.

Les cellules ST, des cellules de testicule de porc, sont quant à elles très peu permissives à l'infection puisque moins de 1 % des cellules sont infectées après 1 jpi. Ce faible pourcentage de cellules infectées visibles en marquages immunofluorescents sur lames n'a pas été détecté en cytométrie en flux. Cette petite différence de pourcentage d'infection des cellules ST entre les deux techniques pourrait s'expliquer par le renouvellement du milieu de culture 5 heures après infection pour les expériences de cytométrie en flux, alors que, pour les marquages sur lames, le virus est resté en contact avec les cellules durant toute l'expérience jusqu'à la fixation de cellules pour l'immunomarquage. L'absence de marquage à 3 jpi, à l'aide des deux techniques, indique que le virus ne s'est pas disséminé au reste de la culture cellulaire. Le virus a donc pu être éliminé de la culture cellulaire, ou son expression inhibée, ou le virus a tué les rares cellules permissives de la culture cellulaire.

ii. Infections lytiques

Lors de l'infection de cellules permissives, l'infection peut se révéler productive ou non productive. Lors d'infections cytopathiques, comme celles observées pour les cellules RK13, 92BR (cellules de testicule d'âne) et DDT1 MF-2 (cellules du canal déférent d'hamster), l'infection est productive avec libération de particules virales infectieuses.

Pour des cellules hautement permissives, telles que les cellules RK13 et 92BR, cette production de particules virales est importante dès 1 jpi et atteint un plateau à 2 jpi. Ce maximum de production à 2 jpi est associé à une diminution du pouvoir infectieux du virus présent dans le surnageant de culture et à la mortalité de plus de 50 % des cellules. Cela indique que la production de particules virales infectieuses est très rapide et que ces dernières sont très sensibles dans le milieu extérieur et que leur pouvoir infectieux commence à diminuer à peine 24 heures après avoir été relarguées dans le milieu extracellulaire.

Les cellules DDT1 MF-2 sont capables de produire autant de particules virales infectieuses que les cellules RK13 et 92BR et de présenter un pourcentage de cellules infectées également proche de ces dernières. Cependant, cette production et la dissémination du virus au sein de la culture nécessitent un délai supplémentaire de 2 jours par rapport aux cellules RK13 et 92BR. Ce dernier résultat laisse penser que l'étape clé de l'infection des cellules DDT1 MF-2 par l'EAV est l'entrée du virus dans la cellule, et que la réplication du virus ne semble pas inhibée dans cette lignée. De plus, le fait que le virus se propage rapidement dans les cellules DDT1 MF-2 suggère une adaptation rapide du virus à cette lignée.

Pour les cellules PC-3, des expériences de survie cellulaire d'une semaine ont révélé que l'infection de ces cellules induisait une mort lente de la culture cellulaire. Cependant, le fait que ces cellules présentent plus de 50 % de mort cellulaire à 7 jpi, alors qu'au maximum 30 %

de cellules sont infectées à un temps donné, pourrait suggérer que la mort cellulaire observée n'est pas uniquement liée au virus.

iii. Infections persistantes

Lors de l'infection *in vitro* de cellules permissives, les cellules peuvent éventuellement présenter une infection persistante. Cette infection peut être non-productive, comme pour les infections latentes (hors période de réactivation du virus), ou productive, comme pour les infections chroniques. Ces dernières regroupent les infections chroniques diffuses (aussi appelées « steady-state infections ») et les infections chroniques focales (aussi appelées infections par état porteur = « carrier-state infections » ou « carrier cultures ») [346, 347].

Lors d'infections latentes, le génome viral persiste dans les cellules, intégré dans le génome de la cellule hôte ou présent sous forme d'épisomes, est répliqué en même temps que le génome cellulaire, et est réparti entre les cellules filles avec une transmission verticale du virus [346-349]. Au cours de ces infections, même si certains gènes sont exprimés il n'y a pas nécessairement production de particules virales infectieuses [347, 350]. Il existe un autre cas plus rare d'infection non-productive : la persistance intracytoplasmique au cours de laquelle il y a production de particules virales infectieuses sans que ces dernières ne soient libérées dans le surnageant de culture [347]. Ce type d'infection a déjà été décrit pour le LCMV pour lequel on retrouve des particules virales infectieuses à l'intérieur des cellules, probablement dans des vésicules cytoplasmiques, pouvant passer de cellule à cellule via des contacts cellulaires directs [351].

Lors d'infections chroniques diffuses, les cellules sont en majorité infectées par le virus et produisent des particules virales sans être lysées [346, 347, 352]. Lors d'infections chroniques

focales, ou infections par état porteur, on retrouve en permanence une petite proportion de cellules infectées de façon lytique [255, 346, 347, 352].

b. Infection persistante par état porteur

i. L'infection des TM3 par l'EAV, semblable aux infections par état porteur

L'infection des cellules TM3, des cellules de Leydig immatures murines, par l'EAV, est productive, sans ECP majeur même après 7 jpi, alors que les cellules RK13 en présentent un en 3 jpi. Étonnamment, elles ont produit des particules virales infectieuses avec seulement un \log_{10} de moins que les cellules RK13, alors qu'à 3 jpi elles présentaient environ 30 % de cellules infectées contre environ 90 % de cellules infectées pour les cellules RK13. Les cellules TM3 présentent également à 3 jpi une production de particules virales infectieuses 100 fois plus importante que celle d'un précédent modèle d'infection persistante par l'EAV de cellules HeLa-H, une lignée humaine issue de l'appareil reproducteur féminin, qui produisait environ 10^5 PFU/mL pour environ 20 % de cellules infectées [353]. On peut aussi remarquer, que chez les cellules TM3, l'infection ne modifie pas la viabilité cellulaire ni la croissance cellulaire par rapport aux cellules infectées, même si à 3 jpi la croissance cellulaire semble légèrement ralentie. Cet effet, présent le jour où le pourcentage de cellules TM3 infectées est le plus important, pourrait s'expliquer par une faible lyse cellulaire ou un léger ralentissement dans la croissance des cellules. Cependant, dans le cas où il y aurait effectivement de la lyse cellulaire, un équilibre entre lyse et croissance cellulaire se serait installé. La diminution de la quantité d'ATP détectée due à la lyse cellulaire serait donc compensée par l'apparition de nouvelles cellules suite à la croissance cellulaire, qui est d'ailleurs plus importante dans les cellules TM3 que dans les autres lignées testées. En effet, les TM3 nécessitent d'être

passées 2 fois par semaine au 1/20-1/30, alors que les autres lignées sont passées 2 fois par semaine maximum au 1/10.

L'ensemble de ces éléments indique la possibilité d'une infection des cellules TM3 par état porteur. En effet, lors d'une infection par état porteur, seule une petite proportion de cellules, comprise entre 1 et 70 % en fonction du type cellulaire et du virus, est infectée et produit des titres importants de virus infectieux (de 10^3 à 10^9 PFU/mL) avant d'être tuée. Le virus ainsi relargué va infecter à son tour d'autres cellules et le cycle continue ainsi de suite [347, 354-363]. Dans ce type d'infection, un équilibre entre croissance et lyse cellulaire s'établit, permettant la survie d'une population cellulaire continuellement infectée [346, 347, 356, 358, 364].

Ce type d'infections a été décrit pour d'autres virus à ARN simple brin de polarité positive, tels que les Coxsackievirus B [354-356, 358-360, 362] et le virus de la fièvre aphteuse (Foot-and-Mouth Disease Virus [FMDV]) [365-368], pour des virus à ARN double-brin, tels que le Virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (IPNV) [363] et la souche Dearing du réovirus de type 3 (T3D) [361, 369, 370], et pour des virus à ADN, tels que le polyoma virus [357] et les adénovirus [346].

ii. Équilibre virus-cellules et interférons dans les cellules TM3

Cet équilibre entre croissance et mort cellulaires peut être permis par la présence d'inhibiteurs dans le milieu de culture, tels que les IFN [346, 363, 364, 371] et les Ac [346, 362, 364]. Cet équilibre peut aussi s'expliquer par une coévolution virus-cellules permise par une différence de sensibilité des cellules à l'infection. Ces différences de sensibilité peuvent être dues à des mutations dans le récepteur du virus ou à une réduction de son expression [358, 360], et au

développement éventuel d'une voie d'entrée indépendante du récepteur principal [358], ou à un blockage intracellulaire durant le processus d'entrée [361] ou de la réplication du virus [365]. Cette coévolution inclut également l'émergence éventuelle de particules virales défectives interférantes [369, 370].

Puisque une surexpression génique des IFN- α et β est observée dans notre modèle d'infection des cellules TM3 par l'EAV, les IFN pourraient jouer un rôle dans cette infection semblable aux infections par état porteur.

Ainsi, lors d'infections par état porteur, contrairement aux infections chroniques diffuses, le virus peut être éliminé de la culture cellulaire en augmentant la concentration d'Ac, d'IFN ou d'inhibiteurs non-spécifiques [346, 347, 356, 361, 362, 368].

iii. Rupture d'équilibre virus-cellules

Lorsque cet équilibre entre le virus et les cellules est rompu, cela peut mener soit à une élimination du virus de la culture cellulaire [356, 359, 366], soit à la mort de la culture cellulaire. La rupture de l'équilibre provoquée par une réplication excessive du virus, par rapport à la vitesse de croissance des cellules qui ne sont pas encore infectées, est dépendante de la MOI initiale, de la virulence de la souche, et du fait de passer ou non les cellules infectées. En effet, Rehren, Ritter [355] ont montré que la souche Nancy du coxsackievirus B3 (CVB3) avec une MOI de 0,01-0,1 TCID₅₀/cellule conduisait à une infection par état porteur, alors qu'une autre souche (la souche CVB3 PD dérivée de CVB3 Nancy) avec une MOI de 1-100 TCID₅₀/cellule conduisait à une infection lytique. De plus, Pinkert, Klingel [358] ont montré que les cellules HL-1 (atrial cardiomyocytes murins) infectées avec une MOI de 10, 1 ou 0,1, ne présentaient pas de lyse majeure à 3 jpi, mais lorsqu'ils les ont passées à 2 jpi, seules les cellules infectées avec une MOI de 0,1 ont été capables de pousser à

confluence. De même, Crowell and Syverton [362] ont observé qu'après le 7^e passage cellulaire les cellules infectées n'arrivaient plus à pousser en tapis confluent, alors que des cultures infectées purent être maintenues en culture 9 mois sans passages, et Schnurr and Schmidt [359] ont observé que les cellules infectées passées poussaient en confluence moins importante que des cellules non infectées. De façon similaire, dans notre étude, les cellules TM3 infectées à une MOI de 10 et passées après 1 ou 2 jpi, ne sont pas parvenues à pousser en tapis confluent (données non montrées). De plus, certains favorisent l'état porteur en changeant régulièrement le milieu de culture cellulaire (tous les 1 ou 2 jours) [355, 357].

c. Interférons

Bien que l'IFN- α soit généralement produit par les leucocytes, dont les macrophages, infectés par un virus, et que l'IFN- β soit généralement produit par les fibroblastes et les autres types cellulaires infectés par un virus [133, 237], les cellules de Leydig infectées ont montré une surexpression de ces deux IFN-I.

De plus, cette surexpression des IFN-I intervient malgré la capacité des protéines nsp1, nsp2 et nsp11 de l'EAV à diminuer l'induction de l'expression génique de l'IFN- β dans des cellules endothéliales équine, d'après Go, Li [216] [208, 215, 216, 218]. Cependant, il a déjà été montré pour d'autres arterivirus capables d'inhiber la production d'IFN-I, que certaines cellules produisaient quand même des IFN-I (pour le VSDRP, le LDV et le SHFV), que cette expression d'IFN-I pouvait être transitoire (pour le VSDRP), et que la production d'IFN-I dépendait des types cellulaires (pour le VSDRP) et des espèces (pour le SHFV) [208]. Il a également été montré que la suppression de la production d'IFN- α pouvait être post-

transcriptionnelle (pour le VSDRP) [208]. Cette dernière hypothèse semble peu probable dans notre cas.

En effet, dans notre modèle d'infection, la production des IFN-I atteint son maximum à 3 jpi, et ceci peut être corrélé aux faits que le pourcentage de cellules infectées et la production virale atteignent eux-aussi leur maximum à 3 jpi. On peut également mettre ceci en relation avec le fait qu'en passant les cellules TM3 infectées à 1 ou 2 jpi, on augmente le pourcentage de cellules infectées, alors que ce n'est pas le cas en les passant à 3 jpi. Ainsi, l'absence d'augmentation du pourcentage de cellules infectées, lorsque les cellules TM3 sont passées à 3 jpi, pourrait être due à la présence importante des interférons, et pourrait expliquer que certaines équipes parviennent à maintenir des cultures en état d'infection persistante par état porteur en les passant à 1 semaine p.i., puis tous les 3-4 jours [356] ou tous les 8-10 jours [363].

II) L'induction de gènes inflammatoires chez les cellules de Leydig par l'EAV à l'origine de l'orchite observée chez les étalons?

a. Implication des TLR/RLR dans l'orchite

L'infection des cellules TM3 par l'EAV a provoqué une augmentation de l'expression génique des TLR (TLR-3 et 9) et RLR (MDA5 et RIG-I) impliqués dans la détection des virus. Le TLR-2 reconnaissant essentiellement les MAMPs d'origine bactérienne, il semble logique de ne pas observer de réelle augmentation de son expression génique lors de l'infection par l'EAV.

Suite à l'activation des TLR et RLR, les voies de signalisation des facteurs de transcription NF- κ B et des IRF (IFN regulatory factors) sont activées (cf figures du II.b.i. de l'introduction).

Pour les RLR, l'activation de ces voies de signalisation se fait par l'intermédiaire de l'IPS-1. C'est suite à un changement de conformation des RLR, induit par la fixation des ARN viraux, que les RLR peuvent interagir avec l'IPS-1. Dans nos expériences, malgré l'augmentation de l'expression de MDA5 et RIG-I, nous n'avons pas observé de surexpression de l'IPS-1. Le fait que leur protéine adaptatrice ne soit pas surexprimée chez les cellules infectées pourrait être dû au fait que cette protéine n'interagit pas directement avec les génomes viraux. Cependant, sur une infection de 4 jours, les cellules TM3 présentent un maximum de 30 % de cellules infectées. Il se pourrait donc que l'IPS-1 soit légèrement surexprimé mais pas suffisamment pour être détecté par RT-qPCR.

Il a été démontré que les TLR étaient impliqués dans l'induction de maladies auto-immunes et inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde (TLR-2 et 4) [240], le lupus érythémateux systémique (TLR-5 et 7 ; mais le TLR-9 peut avoir un effet protecteur) [240], le diabète de type 1 (TLR-3) [240], la myocardite (TLR-4, 7 et 8) [240], l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (modèle de la sclérose en plaque) (TLR-2 et 9) [240, 372], l'uvéite auto-immune expérimentale (EAU) (TLR-2, 3, 4 et 9) [240, 373] et l'orchite auto-immune expérimentale (EAO) (TLR-2 et 4) [241].

En effet, afin de déclencher cette orchite expérimentale, les souris sont immunisées avec un vaccin contenant de l'adjuvant complet de Freund (ACF). L'ACF, qui permet aussi l'induction d'autres maladies auto-immunes expérimentales telles que l'EAE et l'EAU [374, 375], contient des antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* pouvant activer les TLR-2 et 4 [241]. D'autres molécules activant les TLR, telles qu'un oligonucléotide au motif CpG,

reconnu par le TLR-9, le LPS, reconnu par le TLR-4, et *Bordetella pertussis*, peuvent aussi être utilisés comme adjuvant dans l'induction de ces maladies auto-immunes [241, 372, 373, 376]. Les souris déficientes en TLR-2 ou TLR-4 montrent donc une plus faible susceptibilité à l'EAO, et les doubles-mutantes sont pour ainsi dire sans EAO (pas d'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires) [241].

Il a aussi été démontré, pour le virus des oreillons, un autre virus responsable d'orchites, que l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig était dépendante du TLR-2 et de RIG-I [256].

L'implication des TLR-2, 4 et 9 dans les maladies auto-immunes et inflammatoires induites via des adjuvants laisse à supposer que les TLR reconnaissant l'EAV pourraient eux aussi être impliqués dans l'orchite observée chez certains étalons infectés par l'EAV.

b. Implication des cytokines pro-inflammatoires dans l'orchite

Le TNF- α augmentant non seulement la perméabilité des vaisseaux sanguins, mais aussi l'expression des molécules d'adhérence qui facilitent la diapédèse des cellules immunitaires, il est compréhensible que, lors de l'infection des cellules TM3 par l'EAV, le pic d'expression du TNF- α soit plus précoce que celui des chimiokines permettant d'attirer les cellules immunitaires (respectivement au 2^e et 3^e jpi). Cependant le TNF- α possède une restriction traductionnelle à l'état basal qui empêche sa traduction en absence d'infection [377, 378]. Il faudrait donc vérifier l'expression protéique de la cytokine.

L'infection des cellules de Leydig par l'EAV induit aussi l'expression génique des autres cytokines pro-inflammatoires principales : l'IL-6, les IL-1 α et β , et les IL-12 α et β .

Il était déjà connu que l'EAV, tout comme d'autres *Arteriviridae* (VSDRP et SHFV), était capable d'induire ces cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-1 β) dans certaines cellules, dont les macrophages et les cellules endothéliales [208, 230, 379]. Ces cytokines sont d'ailleurs probablement responsables de l'inflammation des artères observée lors de l'infection par les *Arteriviridae* [230].

Il a également été montré que d'autres virus réalisant des infections persistantes par état porteurs étaient capables d'induire des cytokines pro-inflammatoires. C'est le cas du Coxsakievirus B3, qui induit l'IL-6, les IL-1 α et β , l'IL-8 et l'IL-12 α [355].

Ces cytokines pro-inflammatoires sont retrouvées dans de nombreuses maladies inflammatoires et auto-immunes. Ainsi, le TNF- α est impliqué dans la polyarthrite rhumatoïde [248, 380], l'IL-6 est impliquée dans la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque [249], l'IL-8 est impliquée dans les inflammations chroniques [252], et l'IL-12 est impliquée dans l'EAE [376].

Lors de l'EAO, l'expression du TNF- α et de l'IL-6 augmente au niveau des cellules de Sertoli et des cellules interstitielles [241]. Le TNF- α et l'IL-6 vont alors entraîner une apoptose des cellules germinales [381, 382]. Cette augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules de Sertoli pourrait cependant être due à un effet secondaire de l'altération des cellules germinales, puisque celle-ci suffit à induire l'expression du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans les cellules de Sertoli via l'activation des TLR-2 et 4 [241, 383].

De plus, bien que les cellules de Leydig et de Sertoli soient capables de produire de manière constitutive de l'IL-6 et de l'IL-1 [384], il a été démontré que le virus des oreillons, impliqué dans des orchites d'origine virale, induisait dans ces cellules la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) [256].

Il serait donc probable que la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de Leydig, en réponse à l'infection par l'EAV, puisse conduire à la formation d'une orchite.

c. Implication des chimiokines dans l'orchite

Les chimiokines sont les cytokines qui attirent les cellules immunitaires sur le site de l'infection via la formation d'un gradient de concentration [133]. Plusieurs types cellulaires peuvent migrer : les granulocytes regroupant les leucocytes polynucléaires neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles ; les monocytes qui se différencient en macrophages, les DC, les mastocytes, les L_T et L_B , et les cellules NK [133, 385].

Ces chimiokines sont réparties pour la plupart en deux groupes, en fonction de la présence ou non d'un résidu entre les deux résidus cystéines présents en N-terminal de la protéine : les chimiokines CXC (cystéine-résidu aléatoire-cystéine) et les chimiokines CC (cystéine-cystéine) [133].

Plusieurs chimiokines sont classées parmi les chimiokines CXC ou α [386] :

- CXCL2 qui attire les L_T naïfs, les monocytes et les neutrophiles, et active ces derniers [133, 385],
- CXCL8 (aussi appelée IL-8), qui mobilise, active et dégranule les neutrophiles, et attire également les monocytes, les basophiles et les L_T CD8+ [133, 385],
- CXCL9 (aussi appelée Mig) qui recrute les L_T activés ($Th1 > Th2$), L_B , les cellules NK et les DC plasmacytoïdes, et agit aussi sur les cellules endothéliales [133],
- CXCL10 (aussi appelée IFN- γ -inducible protein of 10 kDa [IP-10]), qui attire les monocytes/macrophages, les cellules NK, les mastocytes, les L_T activés (réponse $Th1 > réponse Th2$) (dans lesquels elle aide à la prolifération et à l'activation des L_T

effecteurs), les L_T au repos et les L_B , et agit aussi sur les cellules endothéliales [133, 385, 387].

Ces deux dernières cytokines se fixent sur le même récepteur que CXCL11 (aussi appelée IFN-inducible T cell α chemoattractant [I-TAC]), à savoir CXCR3, qui est exprimé par une partie des L_T CD4+ ou CD8+ circulants (dont une majorité de L_T mémoires), les L_T activés (et plus spécialement par ceux de type Th1), les cellules NK, les DC, les L_B leucémiques, les éosinophiles, les cellules endothéliales microvasculaires en division, et certains thymocytes [387, 388]. Mais bien que possédant le même récepteur, elles n'ont probablement pas le même rôle *in vivo* [387, 388].

Parmi les chimiokines CC ou β [386], on peut citer :

- CCL2 (aussi appelée monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]), qui recrute les basophiles, les mastocytes, les monocytes, qui se différencient en macrophages sur place, les DC immatures, les L_T et les cellules NK, et active les macrophages et la libération d'histamine par les basophiles et les mastocytes [133, 386, 387],
- CCL5 (aussi appelée RANTES), impliqué dans l'inflammation chronique, qui attire les monocytes, les cellules NK, les L_T (L_T mémoire préférentiellement, Th1>Th2), les basophiles, les éosinophiles, les mastocytes et les cellules DC, et active les LT et la dégranulation des basophiles [133, 385],
- CCL11, qui attire les éosinophiles, les monocytes et les L_T [133],
- CCL20 (aussi appelée MIP-3A), qui attire les L_T mémoires, les L_B et les DC immatures [133, 385].

Nos résultats montrant une surexpression génique de CCL2, CCL5, CCL20, CXCL9 et CXCL10, dans les cellules de Leydig infectées par l'EAV, ces dernières pourraient recruter au niveau des testicules les basophiles, les éosinophiles, les mastocytes, les

monocytes/macrophages, les DC immatures, les cellules NK, les L_T et les L_B , et activer les macrophages, les L_T , ainsi que la dégranulation des basophiles et des mastocytes provoquant la libération d'histamine (Figure 30).

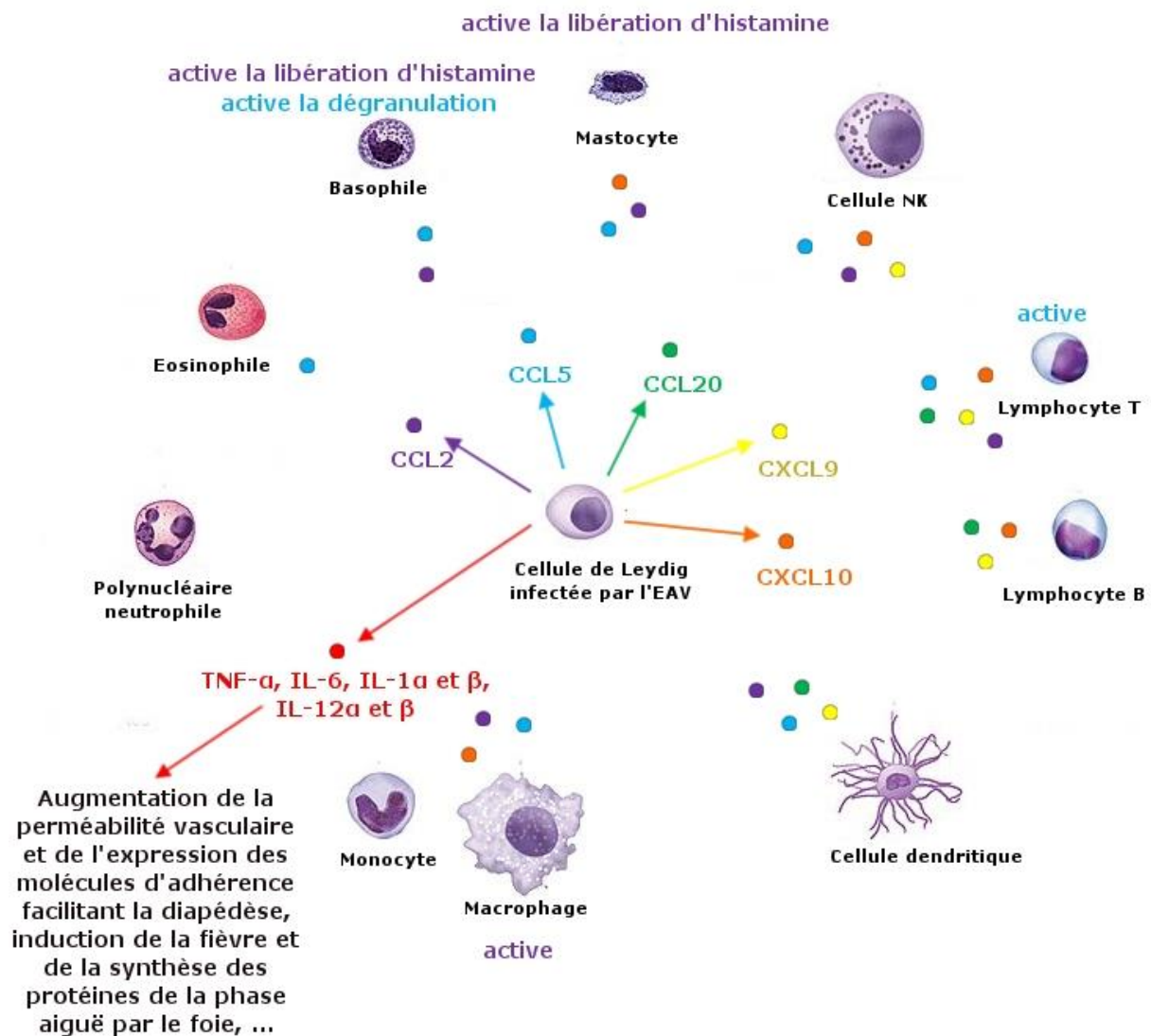


Figure 30 : Cytokines pro-inflammatoires et chimiokines dont l'expression génique est augmentée par l'EAV dans les cellules TM3 infectées

Les chimiokines sont représentées près des cellules qu'elles attirent. Certaines de leurs actions spécifiques à un type cellulaire donné sont indiquées de la couleur de la chimiokine. Figure réalisée à partir d'une synthèse bibliographique.

Il a été décrit que les IFN pouvaient induire ou réprimer l'expression de certaines chimiokines [389]. Ainsi les IFN de types I et II stimulent la production de CXCL9 et/ou CXCL10 dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les fibroblastes, les neurones, les monocytes/macrophages et les neutrophiles [387, 389].

Il a également été démontré que certaines de chimiokines étaient exprimées lors de maladies inflammatoires et auto-immunes. Ainsi, CXCL10 est présent dans de nombreuses maladies inflammatoires de type Th1 et dans des maladies auto-immunes, dont les maladies de peau (telles que le psoriasis), la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, l'hépatite chronique active et les maladies inflammatoires de l'intestin, mais aussi dans les méningites virales, et les encéphalomyélites provoquées par le coronavirus neurotrope MHV [387, 388]. Une induction de CCL2 est également retrouvée dans les cellules de Sertoli et les cellules interstitielles lors de l'EAO, qui est caractérisée, entre autres, par une infiltration de leucocytes (dont les L_T et les macrophages) dans les testicules [241].

L'infection de cellules de Leydig et de Sertoli par le virus des oreillons induit, comme pour l'infection de cellules de Leydig par l'EAV, la production de CXCL10 [256, 264] et de CCL2 [256].

L'induction de ces chimiokines par l'EAV dans les cellules de Leydig pourrait donc être impliquée dans l'orchite observée chez certains étalons lors de la primo-infection.

Les premières cellules attirées sur le lieu de l'infection sont les leucocytes polynucléaires neutrophiles et les monocytes [133]. Les leucocytes polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les DC réalisent la phagocytose et permettent la destruction intracellulaire des agents pathogènes [133]. Les macrophages et les DC réalisent également la présentation d'Ag [133, 390]. Les macrophages activés sont également capables de produire les cytokines pro-

inflammatoires principales : le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-12 [133, 303, 390]. Les neutrophiles possèdent quatre types de granules qui participent à l'inflammation et à l'altération des tissus : les granules primaires ou azurophiles, qui sont riches en myéloperoxydases et contiennent également des hydrolases, des sérines protéases, et des enzymes dirigées contre les acides nucléiques et les sucres ; les granules secondaires ou spécifiques, qui sont riches en lactoferrine et contiennent aussi des métalloprotéinases, des collagénases, des gélatinases, et des leucolysines ; les granules tertiaires ou gélatinases, et les vésicules sécrétoires [391, 392]. Les neutrophiles produisent également des espèces réactives de l'oxygène [391, 392].

Les mastocytes, possèdent des granules ou vésicules d'exocytose. Ces granules contiennent, entre autres, de l'histamine et de la sérotonine, permettant la vasodilatation et augmentant la perméabilité vasculaire en provoquant la contraction des fibres musculaires lisses, de l'héparine, un anticoagulant, des protéases telles que la tryptase, une sérine-protéase qui induit la prolifération des fibroblastes et leur fait synthétiser du collagène, entraînant la fibrose du tissu [133, 257, 386, 391, 393, 394]. Le contenu de ces granules peut accroître l'inflammation lorsqu'il est libéré dans le tissu avoisinant [133]. Une fois activés par la fixation d'antigènes aux IgE qu'ils ont préalablement fixées, ou par la fixation d'IgG, les mastocytes peuvent dégranuler et produire des espèces réactives de l'oxygène [133, 391, 393, 394]. Après activation, ils peuvent aussi synthétiser et libérer d'autres facteurs : des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires comme les leucotriènes, les prostaglandines et le facteur d'activation plaquettaire, impliqués dans la vasodilatation, et permettant l'activation et le recrutement des cellules immunitaires, et la constriction bronchique et vasculaire ; des cytokines pro-inflammatoires ; les cytokines et les chimiokines permettant d'attirer les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles, et l'activation de ces derniers [133, 386, 391, 393, 394].

Les éosinophiles activés et les basophiles sont également capables de fixer les IgE et IgG [133, 391]. La reconnaissance de cibles recouvertes d'IgE va provoquer la dégranulation des éosinophiles (peroxydases, collagénases, ...) [133, 386]. Ils augmentent également la perméabilité vasculaire, en induisant la contraction des fibres lisses, et la sécrétion de mucus [133]. Ils peuvent aussi, par sécrétion de chimiokines, attirer les autres cellules immunitaires et activer les neutrophiles, les mastocytes, les autres éosinophiles et l'agrégation plaquettaire [386]. Comme pour les mastocytes, la fixation d'Ag sur les IgE va provoquer la dégranulation des basophiles (histamine et leucotriène) [133, 391].

Les cellules NK, qui possèdent des granules avec perforines et granzymes (sérines-protéases qui induisent l'apoptose après pénétration dans la cellule), dégranulent elles aussi lorsqu'elles reconnaissent une cible recouverte d'Ac ou une cellule exprimant peu de CMH-I (cas de certaines cellules infectées), induisant ainsi la mort de leur cible [133]. Leur pouvoir cytotoxique est augmenté par les IFN- α et β , et par l'IL-12 [133].

Les L_T et L_B constituent majoritairement l'immunité acquise. Les L_T regroupent, entre autres, les L_{Tc} , qui tuent les cellules infectées via exocytose de perforines et granzymes, et les L_{Th1} , qui aident à la défense contre les pathogènes intracellulaires, et qui sont formés à partir de L_T CD4⁺ en présence d'IL-12 et IL-18, ou en présence d'IL-12 et d'IFN- γ [133, 390]. Les L_T aident aussi à la défense anti-virale par la sécrétion d'IFN- γ [387, 390]. Les L_B quant à eux permettent la production d'Ac et peuvent également réaliser la présentation d'antigènes [133, 390].

Ainsi, si ces cellules sont recrutées par les chimiokines, ce chimiotactisme pourrait être responsable en partie de l'orchite observée chez certains étalons infectés par l'EAV.

III) La testostérone a-t-elle un effet sur la réplication de l'EAV ?

Les expériences que nous avons menées jusqu'à présent n'ont pas mis en évidence d'effets clairs de la testostérone sur la réplication de l'EAV, ni sur la dissémination de l'infection dans les cultures de cellules TM3.

Cependant, dans nos expériences, la testostérone a été exclusivement rajoutée post-infection (1 jpi ou 6 h p.i.). Or, plusieurs équipes ont montré que, pour avoir un effet sur la réplication virale [284-286], les hormones [284, 285] devaient être ajoutées avant l'adsorption et présentes pendant toute la durée de l'infection [284, 286]. En effet, lorsqu'elles sont ajoutées après l'adsorption du virus (1 h après adsorption pour Erlandsson, Bladh [284] et Chong and Mims [285]) ou ajoutées 18 h avant l'infection, et enlevées juste après l'adsorption [284-286] [285], aucun effet n'était observé. C'est le cas pour la dexaméthasone utilisée en pré-traitement par Erlandsson, Bladh [284] et Dreyer, Sydiskis [286], respectivement sur des fibroblastes gingivaux humains et des cellules NB41A3 (MNB), 24 h avant de les infecter avec de l'HSV1, et pour un mélange d'œstrogènes, de progestérone et de corticostéroïdes, utilisé en pré-traitement par Chong and Mims [285], sur des fibroblastes embryonnaires murins, 18 h avant de les infecter avec le CMV murin.

Il se peut également que cela soit dû à une expression insuffisante de l'AR par les cellules TM3. En effet, l'AR a une expression variable suivant les types cellulaires. Certaines cellules l'expriment faiblement, comme les cellules PC3 (de 10 à 20 % des cellules suivant la confluence cellulaire) et les cellules de prostate (de 13 à 19 % des cellules), d'autres l'expriment fortement, comme les cellules LNCaP (de 38 à > 90 % des cellules suivant la confluence cellulaire), les cellules des vésicules séminales (de 26 à 44 % des cellules) et les cellules des nœuds lymphatiques (> 90% des cellules) [395]. Les informations disponibles,

sur le niveau d'expression de l'AR, pour les cellules TM3 semblent contradictoires. En effet, Hwang, Liao [345] indiquent une augmentation de ~1,5 fois l'expression génique de StAR suite à un traitement de 48 heures par 10, 50 et 100 nmol.L⁻¹ testostérone (soit 2,88 ; 14,4 ; et 28,8 ng.mL⁻¹) et une diminution de ~1,4 fois son expression pour des doses plus élevées (500 et 1000 nmol.L⁻¹, soit 144 et 288 ng.mL⁻¹), indiquant un niveau d'expression de l'AR suffisant pour induire une réponse au stimulus hormonal. De plus, l'ATCC indique aussi que les cellules TM3 expriment l'AR. En revanche, Bagchi, Hurst [396] et Bagchi, Zhang [397] ont montré que l'expression de l'AR était négligeable chez les cellules TM3 par rapport aux cellules LNCaP, et ont dû transfecter leurs cellules TM3 avec un vecteur lentiviral pour induire l'expression constitutive de l'AR pour pouvoir observer une réponse de ces cellules au traitement par la testostérone.

De plus, il se peut que cette expression de l'AR ne soit pas non plus homogène chez les cellules TM3. Or, comme, lors de l'infection sans passage de nos cellules TM3, nous avons observé maximum 30 % de cellules infectées, l'effet de la testostérone sur la réplication du virus serait probablement plus facile à observer sur un pourcentage plus élevé de cellules infectées.

De plus, il se pourrait, en théorie, que la testostérone favorise la réplication de l'EAV en augmentant la disponibilité de LC3-I et l'expression d'EDEM-1, qui sont deux protéines présentes sur les vésicules à l'intérieur desquelles se réplique le virus. Or les RLR tels que MDA5 sont capables d'activer l'autophagie [398-400], et donc la conversion de LC3-I en LC3-II. L'expression génique de MDA5 étant induite dans notre modèle *in vitro* par l'EAV, il se pourrait que cette protéine contre-balance l'effet de la testostérone sur la réplication du virus après 3 jpi.

IV) PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, l'infection de cellules de Leydig par l'EAV a permis le développement d'un modèle d'infection *in vitro* non lytique de cellules de l'appareil reproducteur mâle. Ce modèle pourrait être utile à l'étude de la relation hôte-pathogène et plus précisément à l'étude de l'effet du virus sur la physiologie des cellules, comme la capacité des cellules de Leydig à produire de la testostérone.

Ce modèle a par ailleurs montré une surexpression génique de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires qui pourraient être impliquées dans l'orchite observée chez certains étalons infectés. Ces résultats ayant été obtenus sur des cellules TM3 infectées à environ 30 %, il serait utile de confirmer le niveau d'expression des gènes pour lesquels aucune réelle surexpression n'a pu être confirmée, en utilisant le modèle de cellules TM3 infectées passées après 1 ou 2 jpi, pour lequel le pourcentage de cellules infectées est supérieur à 50 %. De plus, pour les cytokines pro-inflammatoires montrant une forte surexpression génique, il serait nécessaire de confirmer leur expression protéique, par des techniques comme l'ELISA ou le Western Blot. Il serait également utile de vérifier l'induction par l'EAV de ces cytokines pro-inflammatoires chez des cultures primaires de cellules de Leydig équinnes.

Concernant les expériences visant à évaluer l'effet de la testostérone sur le cycle viral, à ce jour, nous n'avons pas montré de modification claire de la réplication ni de la propagation du virus dans le modèle développé. Cependant, d'après Erlandsson, Bladh [284], Chong and Mims [285], et Dreyer, Sydiskis [286], les hormones étudiées au cours de leurs travaux avaient un effet sur la réplication virale uniquement si les cellules étaient prétraitées avec l'hormone et laissées en présence de celle-ci pendant toute la durée l'infection. Prétraiter les

cellules avec de la testostérone et la laisser au cours de l'infection pourrait donc permettre d'observer un effet de la testostérone sur le cycle viral de l'EAV. Par ailleurs, dans l'éventualité où les cellules TM3 n'exprimeraient que faiblement l'AR et où il n'y aurait pas une expression homogène de ce dernier par les cellules, il pourrait être utile d'essayer de traiter ou prétraiter avec de la testostérone le modèle des TM3 dont le pourcentage d'infection est plus important (après passage des cellules infectées). On pourrait également envisager de transfecter les cellules TM3 avec un vecteur exprimant l'AR, pour augmenter l'expression de ce récepteur par les cellules, comme certaines équipes qui ont ainsi pu observer un effet de la testostérone sur l'expression génique des cellules qu'ils étudiaient.

Si l'une de ces trois méthodes permet de mettre en évidence un effet de la testostérone sur le cycle viral, les cellules TM3 possédant l'aromatase, et étant donc capables de transformer la testostérone en œstradiol, il faudra d'abord s'assurer que l'action de la testostérone est bien due à la testostérone en elle-même et pas à son dérivé aromatisé. Pour cela, les expériences pourront être répétées avec un androgène non aromatisable, la dihydrotestostérone, qui de plus, est plus active que la testostérone car l'AR présente une affinité plus importante pour la dihydrotestostérone que pour la testostérone. Les cellules TM3 exprimant également les récepteurs à l'œstradiol et la progestérone (ATCC), l'effet direct de ces deux autres hormones stéroïdes sur le cycle viral pourrait être étudié en parallèle.

Il serait ensuite essentiel de déterminer les mécanismes impliqués dans l'action de la testostérone. Celle-ci peut en théorie favoriser la réplication de l'EAV en augmentant la disponibilité de LC3-I et l'expression d'EDEM-1, présentes sur les vésicules à l'intérieur desquelles se réplique le virus (DMVs). Cette hypothèse pourrait être confirmée en regardant si la testostérone favorise toujours la réplication du virus en présence de siARN dirigés contre LC3-I ou EDEM-1. Cette hypothèse pourrait également être appuyée en vérifiant si la testostérone augmente effectivement chez les cellules infectées l'expression de PTP1B et de

EDEM-1, la déphosphorylation de PERK, la déphosphorylation de eIF2 α , le rapport LC3-I/LC3-II, et diminue l'expression de Atg12. Toutes ces protéines, exceptées PTP1B et EDEM-1, sont en effet impliquées dans l'autophagie via la conversion de LC3-I en LC3-II, diminuant ainsi la disponibilité de LC3-I pour les DMVs (Figure 31).

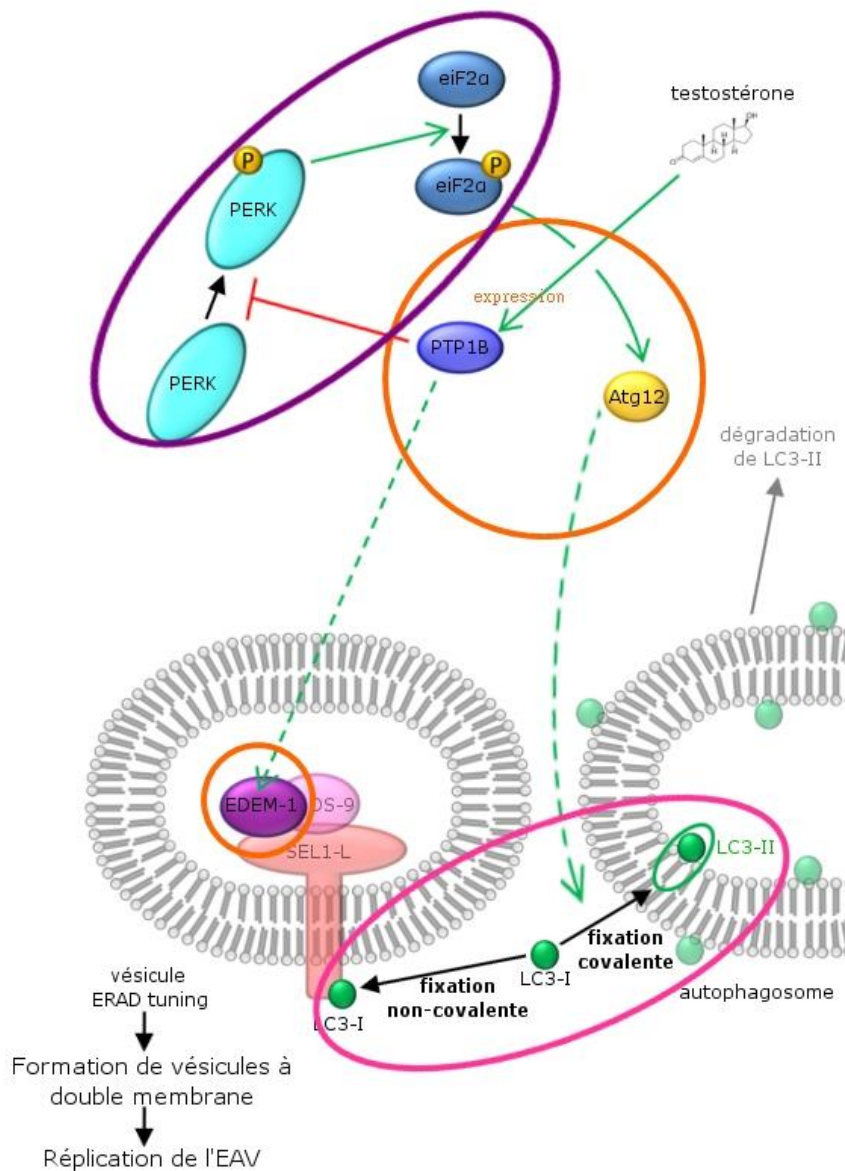


Figure 31 : Protéines impliquées indirectement dans la réplication du virus et dont l'expression ou les modifications post-traductionnelles dépendraient de la testostérone
Sont entourées en orange les protéines dont l'expression pourrait être modulée de façon directe ou indirecte par la testostérone. Sont entourées en violet les protéines qui seraient déphosphorylées par l'action indirecte de la testostérone. Sont entourées en rose les deux liaisons possibles de LC3-I sur une membrane. Le rapport LC3-I/LC3-II serait augmenté en présence de testostérone. Figure réalisée à partir d'une synthèse bibliographique.

De plus, les protéines virales nsp2, 3 et 5 étant impliquées dans la formation des DMVs, il serait intéressant de vérifier si ces protéines sont nécessaires à l'action de la testostérone sur le cycle viral. A cette fin des plasmides contenant le génome viral muté dans l'un des gènes codant pour ces protéines pourraient être utilisés (Figure 32). Cette perspective nécessite néanmoins la construction d'un plasmide infectieux contenant le génome de l'EAV.

En cas d'implication de la testostérone dans la persistance du virus et d'une identification précise des protéines virales impliquées, le développement des traitements ciblant les protéines virales pour les étalons excréteurs, sans altérer la fertilité de ces derniers, pourrait être envisagé.

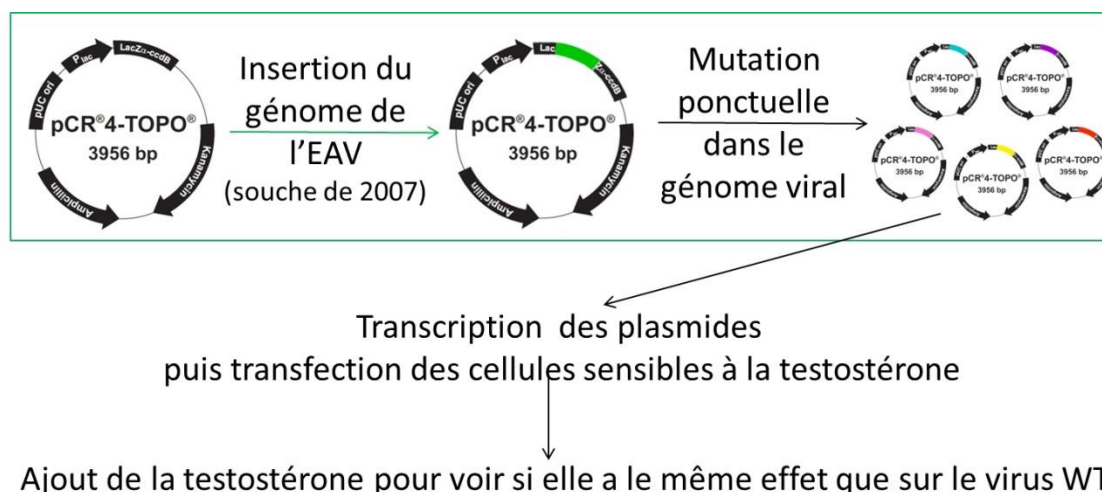


Figure 32 : Construction d'un plasmide infectieux pour identifier les protéines virales nécessaires à l'effet de la testostérone sur le cycle viral

Une fois le plasmide infectieux construit, des mutations ponctuelles pourront être réalisées dans le génome viral. Après transcription du plasmide, les cellules TM3 seront transfectées avec le génome viral muté puis traitées à la testostérone pour déterminer si cette dernière a le même effet que sur le virus non muté.

Par ailleurs, si les organes dans lesquels le virus persiste ont été identifiés, les types cellulaires précis et leur niveau d'expression de l'AR restent inconnus. Il serait donc utile de pouvoir les identifier en isolant puis en caractérisant par marquages immunofluorescents en cytométrie en flux les cellules infectées chez les étalons en état d'infection persistante. Cependant, au vu de l'absence de modèle animal autre que l'étalon pour l'étude de la persistance de l'EAV, la

perspective d'une telle expérience pourrait se heurter à l'éthique de sacrifier des animaux domestiques.

De plus, il a été montré que la testostérone avait un effet inhibiteur sur le système immunitaire. En effet, les mâles sont plus sensibles aux infections [302, 303, 308, 310] et présentent une réponse immunitaire moins importante après vaccination [302, 303, 306, 309, 310, 312]. Ainsi, un taux de testostérone élevé chez les mâles a été associé à un taux plus faible en Ac neutralisants en réponse à la vaccination [310, 312]. Le récepteur aux androgènes se retrouve d'ailleurs sur certaines cellules immunitaires telles que les L_B et les L_T [302, 303, 306]. La testostérone induit la production de cytokines anti-inflammatoires chez ces derniers [302, 303, 305] et diminue également la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages [303]. Elle augmente également le nombre de L_T régulateurs et de cellules myéloïdes suppressives [303]. Ainsi, certains modèles de maladies auto-immunes chez les mâles sont favorisés par leur castration [303, 304, 306] et à l'inverse chez les femelles les maladies auto-immunes et inflammatoires peuvent être traitées à l'aide de testostérone. En effet, la testostérone permet de réduire la sévérité des signes cliniques observés chez les femelles traitées [303, 304, 306, 314]. D'autre part, ces modèles ont également montré que le traitement à la testostérone diminuait le taux en Ac [303] ainsi que l'expression de cytokines pro-inflammatoires [303, 304]. Ces résultats indiquent qu'un taux de testostérone élevé chez l'étalon pourrait favoriser la persistance de l'EAV en rendant la réponse immune innée et/ou adaptative moins efficace chez ce dernier. D'autant plus que l'élimination de l'EAV de l'organisme des chevaux concorde avec l'apparition des Ac neutralisants. Pour éclaircir ce point, il serait utile de rechercher chez les étalons, via des prélèvements sanguins, la présence éventuelle d'une corrélation entre le titre en Ac anti-EAV, la concentration plasmatique en testostérone, et l'élimination ou la persistance du virus. Une telle corrélation apporterait un

Discussion et Perspectives

argument supplémentaire sur le rôle de la testostérone dans la persistance de l'EAV dans l'appareil reproducteur de l'étalon.

Enfin, l'effet inhibiteur de la testostérone sur le système immunitaire pourrait également être étudié dans le modèle d'infection *in vitro* des TM3 développé. Ainsi, l'évaluation de l'effet du traitement à la testostérone sur la réponse immune innée des cellules TM3 suite à l'infection par l'EAV est envisagée.

1. Doll, E.R., R.E. Knappenberger, and J.T. Bryans, *An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus*. Cornell Vet, 1957. **47**(1): p. 69-75.
2. Golnik, W., Z. Michalska, and T. Michalak, *Natural equine viral arteritis in foals*. Schweiz Arch Tierheilkd, 1981. **123**(10): p. 523-33.
3. Coignoul, F.L. and N.F. Cheville, *Pathology of maternal genital tract, placenta, and fetus in equine viral arteritis*. Vet Pathol, 1984. **21**(3): p. 333-40.
4. Doll, E.R., et al., *Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares; its differentiation from the equine abortion (influenza) virus*. Cornell Vet, 1957. **47**(1): p. 3-41.
5. Jones, T.C., E.R. Doll, and J.T. Bryans, *The lesions of equine viral arteritis*. Cornell Vet, 1957. **47**(1): p. 52-68.
6. MacLachlan, N.J., et al., *Fatal Experimental Equine Arteritis Virus Infection of a Pregnant Mare: Immunohistochemical Staining of Viral Antigens*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1996. **8**(3): p. 367-374.
7. Szeredi, L., et al., *Equine Viral Arteritis in a Newborn Foal: Parallel Detection of the Virus by Immunohistochemistry, Polymerase Chain Reaction and Virus Isolation*. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 2003. **50**(6): p. 270-274.
8. Vaala, W.E., et al., *Fatal, congenitally acquired infection with equine arteritis virus in a neonatal thoroughbred*. Equine Vet J, 1992. **24**(2): p. 155-8.
9. Huntington, P.J., A.J. Forman, and P.M. Ellis, *The occurrence of equine arteritis virus in Australia*. Aust Vet J, 1990. **67**(12): p. 432-5.
10. Laabassi, F., et al., *Prevalence of equine viral arteritis in Algeria*. Rev Sci Tech, 2014. **33**(3): p. 967-74.
11. Lang, G. and W.R. Mitchell, *A serosurvey by elisa for antibodies to equine arteritis virus in ontario racehorses*. Journal of Equine Veterinary Science, 1984. **4**(4): p. 153-157.
12. Metz, G.E., et al., *The equine arteritis virus isolate from the 2010 Argentinian outbreak*. Rev Sci Tech, 2014. **33**(3): p. 937-46.
13. Pronost, S., et al., *Description of the first recorded major occurrence of equine viral arteritis in France*. Equine Veterinary Journal, 2010. **42**(8): p. 713-720.
14. Guthrie, A.J., et al., *Lateral transmission of equine arteritis virus among Lipizzaner stallions in South Africa*. Equine Vet J, 2003. **35**(6): p. 596-600.
15. Barbacini, S., *An outbreak of equine arteritis virus infection in a stallion at a Trakehner studfarm*. Equine Veterinary Education, 2005. **17**(6): p. 294-298.
16. van der Meulen, K., et al., *An outbreak of equine viral arteritis abortion in Belgium*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 2001. **70**(3): p. 221-222.
17. Pagamjav, O., et al., *Serological survey of equine viral diseases in Mongolia*. Microbiol Immunol, 2011. **55**(4): p. 289-92.
18. salah Hussein, Z., M.I. Abdulrasool, and A.A. Hatem, *Seropositivity of Equine Viral Arteritis in horses in Iraqi Equestrian club*. Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences, 2016. **7**(2): p. 56-60.
19. Yen, C. and Y. Wu, *Seroprevalence of Equine Viral Arteritis in Horses in Taiwan in 2012*. Taiwan Vet J, 2014. **40B**(S1): p. 7-14.
20. Wegdan, H.A., et al., *Prevalence of equine viral arteritis in Sudan*. The Journal of Veterinary Science, 2017. **118**: p. 475-479.
21. Cruz-Lopez, F., et al., *Equine viral arteritis in breeding and sport horses in central Spain*. Res Vet Sci, 2017. **115**: p. 88-91.
22. Eichhorn, W., M. Heilmann, and O.R. Kaaden, *Equine viral arteritis with abortions: serological and virological evidence in Germany*. Zentralbl Veterinarmed B, 1995. **42**(9): p. 573-6.
23. Carman, S., C. Rae, and E. DuBovi, *Ontario. Equine arteritis virus isolated from a Standardbred foal with pneumonia*. Can Vet J, 1988. **29**(11): p. 937.
24. Gryspeerdt, A., et al., *Neonatal Foal Death Due to Infection with Equine Arteritis Virus in Belgium*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 2009. **78**(3): p. 189-193.

Références

25. McKenzie, J., *Compulsory control program for equine viral arteritis*. Surveillance, 1990. **17**(1): p. 19-20.
26. McKenzie, J., *Survey of stallions for equine viral arteritis*. Surveillance, 1989. **16**(4): p. 17-18.
27. Balasuriya, U.B.R., Y.Y. Go, and N.J. MacLachlan, *Equine arteritis virus*. Veterinary Microbiology, 2013. **167**(1-2): p. 93-122.
28. Bryans, J.T., et al., *The blood picture and thermal reaction in experimental viral arteritis of horses*. Cornell Vet, 1957. **47**(1): p. 42-52.
29. Timoney, P.J. and W.H. McCollum, *Equine viral arteritis*. Can Vet J, 1987. **28**(11): p. 693-5.
30. Del Piero, F., et al., *Equine viral arteritis in newborn foals: clinical, pathological, serological, microbiological and immunohistochemical observations*. Equine Vet J, 1997. **29**(3): p. 178-85.
31. Wada, R., et al., *Histopathological and Immunofluorescent Studies on Transplacental Infection in Experimentally Induced Abortion by Equine Arteritis Virus*. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 1996. **43**(1-10): p. 65-74.
32. Johnson, B., et al., *Arteritis in equine fetuses aborted due to equine viral arteritis*. Vet Pathol, 1991. **28**(3): p. 248-50.
33. Traub-Dargatz, J., et al., *Outbreak of EVA at CSU-VTH*. Journal of Equine Veterinary Science, 1985. **5**(3): p. 168.
34. Holyoak, G.R., et al., *Relationship between onset of puberty and establishment of persistent infection with equine arteritis virus in the experimentally infected colt*. J Comp Pathol, 1993. **109**(1): p. 29-46.
35. Holyoak, G.R., et al., *Pathological changes associated with equine arteritis virus infection of the reproductive tract in prepubertal and peripubertal colts*. J Comp Pathol, 1993. **109**(3): p. 281-93.
36. Carossino, M., et al., *Equine Arteritis Virus Has Specific Tropism for Stromal Cells and CD8+ T and CD21+ B Lymphocytes but Not for Glandular Epithelium at the Primary Site of Persistent Infection in the Stallion Reproductive Tract*. J Virol, 2017. **91**(13).
37. McCollum, W.H., et al., *Resistance of castrated male horses to attempted establishment of the carrier state with equine arteritis virus*. J Comp Pathol, 1994. **111**(4): p. 383-8.
38. Fukunaga, Y., et al., *Failure in the development of carrier state of equine viral arteritis in colts*. J. Equine Sci., 1994. **5**(1): p. 45-48.
39. Weese, S., G. Munroe, and G. Munroe, *Equine Clinical Medicine, Surgery and Reproduction*. 2011: CRC Press.
40. OIE, V.a.b.t.W.A.o.D.o.t.O.i.M., *C H A P T E R 2 . 5 . 1 0 . EQUINE VIRAL ARTERITIS*. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017, 2017: p. 1-16.
41. Doll, E.R., et al., *Immunization against equine viral arteritis using modified live virus propagated in cell cultures of rabbit kidney*. Cornell Vet, 1968. **58**: p. 497-524.
42. MacLachlan, N.J., A.J. Conley, and P.C. Kennedy, *Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion*. Anim Reprod Sci, 2000. **60-61**: p. 643-51.
43. Golnik, W. and T. Michalak, *Cases of viral arteritis of horses in Poland*. Medycyna wet., 1979. **35**(10): p. 605-606.
44. Cole, J.R., et al., *Transmissibility and abortogenic effect of equine viral arteritis in mares*. J Am Vet Med Assoc, 1986. **189**(7): p. 769-71.
45. Neu, S.M., P.J. Timoney, and W.H. McCollum, *Persistent infection of the reproductive tract in stallions experimentally infected with equine arteritis virus*. In Equine Infectious Diseases V: Proceedings of the Fifth International Conference on Equine Infectious Diseases, Lexington, 1987, pp149-154. Edited by D.G. Powell. The University Press of Kentucky, Lexington., 1988.
46. Timoney, P.J., et al., *Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion*. Research in veterinary science, 1986. **41**: p. 279-280.
47. Hans, A., et al., *L'artérite virale équine en France et en Europe*. Bulletin épidémiologique. Santé animale et alimentation Spécial Equidés, 2012. **49**: p. 39-41.
48. Balasuriya, U.B., et al., *Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 2): p. 379-90.

49. Mischczak, F., et al., *Emergence of novel equine arteritis virus (EAV) variants during persistent infection in the stallion: origin of the 2007 French EAV outbreak was linked to an EAV strain present in the semen of a persistently infected carrier stallion*. Virology, 2012. **423**(2): p. 165-74.
50. Zhang, J., et al., *Molecular epidemiology and genetic characterization of equine arteritis virus isolates associated with the 2006-2007 multi-state disease occurrence in the USA*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 9): p. 2286-301.
51. Hebia-Fellah, I., et al., *Evaluation of the presence of equine viral herpesvirus 1 (EHV-1) and equine viral herpesvirus 4 (EHV-4) DNA in stallion semen using polymerase chain reaction (PCR)*. Theriogenology, 2009. **71**(9): p. 1381-9.
52. Walter, J., et al., *Venereal shedding of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in naturally infected stallions*. J Vet Intern Med, 2012. **26**(6): p. 1500-4.
53. Tearle, J.P., et al., *Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infectious virus*. J Comp Pathol, 1996. **115**(4): p. 385-97.
54. Johnson, D.J., et al., *Isolation of Equine rhinitis A virus from a horse semen sample*. J Vet Diagn Invest, 2012. **24**(4): p. 801-3.
55. Tashjian, R.J., *Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period*. J Am Vet Med Assoc, 1984. **184**(3): p. 282-8.
56. Rebelatto, M.C., et al., *SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS INFECTION IN THE CENTRAL REGION OF THE RIO GRANDE DO SUL STATE*. Ciência Rural, 1992. **22**: p. 191-196.
57. Barzon, L., et al., *Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016*. Euro Surveill, 2016. **21**(32).
58. Musso, D., et al., *Potential sexual transmission of Zika virus*. Emerg Infect Dis, 2015. **21**(2): p. 359-61.
59. Le Tortorec, A. and N. Dejucq-Rainsford, *Virus et appareil génital mâle : cellules cibles et conséquences de l'infection*. Virologie, 2007. **11**(6): p. 433-445.
60. Dejucq, N. and B. Jégou, *Viruses in the Mammalian Male Genital Tract and Their Effects on the Reproductive System*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001. **65**(2): p. 208-231.
61. Jalal, H., et al., *Mumps epididymo-orchitis with prolonged detection of virus in semen and the development of anti-sperm antibodies*. J Med Virol, 2004. **73**(1): p. 147-50.
62. Naumenko, V.A., et al., *Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture*. Herpesviridae, 2011. **2**: p. 7-7.
63. Ma, W., et al., *Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice*. Cell, 2016. **167**(6): p. 1511-1524.e10.
64. Govero, J., et al., *Zika virus infection damages the testes in mice*. Nature, 2016. **540**(7633): p. 438-442.
65. Griffin, B.D., et al., *DNA vaccination protects mice against Zika virus-induced damage to the testes*. 2017. **8**: p. 15743.
66. Osuna, C.E., et al., *Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques*. Nat Med, 2016. **22**(12): p. 1448-1455.
67. Fortier, G., et al., *The effect of GnRH antagonist on testosterone secretion, spermatogenesis and viral excretion in EVA-virus excreting stallions*. Theriogenology, 2002. **58**(2-4, Proceedings of the 8th International Equine Reproduction Symposium on equine Reproduction): p. 425-427.
68. Timoney, P.J., et al., *The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission*. J Reprod Fertil Suppl, 1987. **35**: p. 95-102.

Références

69. Patton, J.F., et al., *Phylogenetic characterization of a highly attenuated strain of equine arteritis virus from the semen of a persistently infected standardbred stallion*. Arch Virol, 1999. **144**(4): p. 817-27.
70. Hedges, J.F., et al., *Genetic divergence with emergence of novel phenotypic variants of equine arteritis virus during persistent infection of stallions*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 3672-81.
71. Balasuriya, U.B., et al., *Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 8): p. 1949-58.
72. Timoney, P.J. and W.H. McCollum, *The epidemiology of equine viral arteritis*. Proc. 31st Ann. Conv. Am. Assoc. Eq. Pract., 1985: p. 545-551.
73. McCollum, W.H., et al., *Response of vaccinated and non-vaccinated mares to artificial insemination with semen from stallions persistently infected with equine arteritis virus*. In: Equine Infectious Diseases V: Proceedings of the Fifth International Conference, 1988. **5**: p. 13-18.
74. McCollum, W.H., M.E. Prickett, and J.T. Bryans, *Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation*. Res Vet Sci, 1971. **12**(5): p. 459-64.
75. McCollum, W.H. and T.W. Swerczek, *Studies of an epizootic of equine viral arteritis in racehorses*. J Equine Med Surg, 1978. **2**: p. 293-299.
76. Dee, S.A., *Pathogenesis and immune response of nonporcine arteriviruses versus porcine arteriviruses*. Journal of Swine Health and Production, 1998. **6**(2): p. 73-77.
77. McCollum, W.H. and P.J. Timoney, *The pathogenic qualities of the 1984 strain of equine arteritis virus*. in: Proc Grayson Found Int Conf of Thoroughbred Breeders Organisations on Equine Viral Arteritis, Ireland, Grayson Found Inc, Lexington, Kentucky, 1984: p. 34-47.
78. Borchers, K., et al., *Antibodies against equine herpesviruses and equine arteritis virus in Burchell's zebras (Equus burchelli) from the Serengeti ecosystem*. J Wildl Dis, 2005. **41**(1): p. 80-6.
79. Burki, F., A. Hofer, and N. Nowotny, *Objective Data Plead to Suspend Import-Bans for Seroreactors Against Equine Arteritis Virus Except for Breeder Stallions*. Journal of Applied Animal Research, 1992. **1**(1): p. 31-42.
80. Senne, D.A., J.E. Pearson, and E.A. Carbrey, *Equine viral arteritis: a standard procedure for the virus neutralization test and a comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories*. In: Proceedings of the 89th Annual Meeting of the United States Aninzal Health Association. Milwaukee,Wisconsin, 1985: p. 19-20.
81. Fukunaga, Y. and W.H. McCollum, *Complement-fixation reactions in equine viral arteritis*. Am J Vet Res, 1977. **38**(12): p. 2043-6.
82. Timoney, P.J., et al., *Comparative sensitivity of LLC-MK2, RK-13, vero and equine dermis cell lines for primary isolation and propagation of equine arteritis virus*. Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection, Timoney P.J., ed. Maxwell H. Gluck Equine Research Center, Lexington, Kentucky, USA,, 2004: p. 26-27.
83. Timoney, P.J. and W.H. McCollum, *Equine viral arteritis*. Vet Clin North Am Equine Pract, 1993. **9**(2): p. 295-309.
84. Burger, D., et al., *Immunization against GnRH in adult stallions: Effects on semen characteristics, behaviour and shedding of equine arteritis virus*. Anim Reprod Sci, 2006. **94**(1-4, Special Issue: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction): p. 107-111.
85. Mischak, F., et al., *Evaluation of Two Magnetic-Bead-Based Viral Nucleic Acid Purification Kits and Three Real-Time Reverse Transcription-PCR Reagent Systems in Two TaqMan Assays for Equine Arteritis Virus Detection in Semen*. Journal of Clinical Microbiology, 2011. **49**(10): p. 3694-3696.
86. Balasuriya, U.B., et al., *Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay*. J Virol Methods, 2002. **101**(1-2): p. 21-8.

87. Starick, E., *Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridisation and nested polymerase chain reaction*. Acta Virol, 1998. **42**(5): p. 333-9.
88. Gilbert, S.A., et al., *Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(8): p. 2181-3.
89. St-Laurent, G., G. Morin, and D. Archambault, *Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural viral genes by reverse transcription-PCR*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(3): p. 658-65.
90. Sekiguchi, K., et al., *Detection of equine arteritis virus (EAV) by polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EAV strains by restriction enzyme analysis of PCR products*. Arch Virol, 1995. **140**(8): p. 1483-91.
91. Westcott, D.G., et al., *Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes*. Vet Res, 2003. **34**(2): p. 165-76.
92. Lu, Z., et al., *Comparison of two real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of Equine arteritis virus nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid*. J Vet Diagn Invest, 2008. **20**(2): p. 147-55.
93. Hans, A., et al., *Combination of an Unbiased Amplification Method and a Resequencing Microarray for Detecting and Genotyping Equine Arteritis Virus*. Journal of Clinical Microbiology, 2015. **53**(1): p. 287-291.
94. Lugaro, G., et al., *Inhibition of DNA polymerization and DNA transcription to RNA by seminal plasma peptides*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1988. **950**(3): p. 420-428.
95. Zhang, J., et al., *Comparison of virus isolation in cell culture and RT-PCR assays for detection of equine arteritis virus in cryopreserved semen*. Proceedings of the International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection, Timoney P.J., ed. M.H. Gluck Equine Research Center, 20–21 October, 2004, Lexington, Kentucky, USA,, 2004: p. 41-42.
96. Little, T.V., et al., *Evaluation of an immunocytochemical method for rapid detection and identification of equine arteritis virus in natural cases of infection*. In: Nakajima, H., and W. Plowright (eds), Proceedings of the 7th International Conference on Equine Infectious Diseases, Tokyo, Japan, 1994, R & W Publ., Newmarket, UK, 1995: p. 27-31.
97. Deregt, D., et al., *Monoclonal antibodies to equine arteritis virus proteins identify the GL protein as a target for virus neutralization*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 9): p. 2439-44.
98. Weiland, E., et al., *Monoclonal Antibodies Directed against Conserved Epitopes on the Nucleocapsid Protein and the Major Envelope Glycoprotein of Equine Arteritis Virus*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(6): p. 2065-2075.
99. Del Piero, F., *Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection in Two Horses by Using Monoclonal Antibody Immunoperoxidase Histochemistry on Skin Biopsies*. Veterinary Pathology, 2000. **37**(5): p. 486-487.
100. Starick, E., A. Ginter, and P. Coppe, *ELISA and direct immunofluorescence test to detect equine arteritis virus (EAV) using a monoclonal antibody directed to the EAV-N protein*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2001. **48**(1): p. 1-9.
101. Lopez, J.W., et al., *Immunoperoxidase histochemistry as a diagnostic tool for detection of equine arteritis virus antigen in formalin fixed tissues*. Equine Vet J, 1996. **28**(1): p. 77-9.
102. Crawford, T.B. and J.B. Henson, *Immunofluorescent, Light-Microscopic and Immunologic Studies of Equine Viral Arteritis*. In: Proceedings of the 3rd International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1972. Basel, Karger, Switzerland,, 1974: p. 282-302.
103. VMRD, V.M.R.D., *Equine Arteritis Virus cELISA Correlates Well with SN*. 2012.
104. Cho, H.J., et al., *Detection of antibodies to equine arteritis virus by a monoclonal antibody-based blocking ELISA*. Can J Vet Res, 2000. **64**(1): p. 38-43.

105. Nugent, J., et al., *Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (GL) of equine arteritis virus*. Journal of Virological Methods, 2000. **90**(2): p. 167-183.
106. Chung, C., et al., *Validation of an equine arteritis virus antibody cELISA according to OIE protocol*. Journal of Equine Veterinary Science, 2012. **32**(10): p. S53-S54.
107. Hedges, J.F., et al., *Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbant assays utilizing GL, M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses*. Journal of Virological Methods, 1998. **76**(1): p. 127-137.
108. Go, Y.Y., et al., *Development of a Fluorescent-Microsphere Immunoassay for Detection of Antibodies Specific to Equine Arteritis Virus and Comparison with the Virus Neutralization Test*. Clinical and Vaccine Immunology : CVI, 2008. **15**(1): p. 76-87.
109. Cesbron-Gautier, A., et al., *Technologie Luminex : application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA* Annales de Biologie Clinique, 2004. **62**(1): p. 93-98.
110. McCollum, W.H., *Vaccination for equine viral arteritis*. In: Proceedings of the Second International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris, 1969, Karger, Basle, Switzerland, 1970: p. 143-151.
111. McCollum, W.H., *Development of a modified virus strain and vaccine for equine viral arteritis*. J Am Vet Med Assoc, 1969. **155**(2): p. 318-22.
112. Harry, T.O. and W.H. McCollum, *Stability of viability and immunizing potency of lyophilized, modified equine arteritis live-virus vaccine*. Am J Vet Res, 1981. **42**(9): p. 1501-5.
113. Broadbudd, C.C., et al., *Evaluation of the safety of vaccinating mares against equine viral arteritis during mid or late gestation or during the immediate postpartum period*. J Am Vet Med Assoc, 2011. **238**(6): p. 741-50.
114. Fukunaga, Y., et al., *Induction of immune response and protection from equine viral arteritis (EVA) by formalin inactivated-virus vaccine for EVA in horses*. Zentralbl Veterinarmed B, 1990. **37**(2): p. 135-41.
115. Fukunaga, Y., et al., *Tentative preparation of an inactivated virus vaccine for equine viral arteritis*. Bull. Equine Res. Inst., 1984. **21**: p. 56-64.
116. Timoney, P.J., N.W. Umphenour, and W.H. McCollum, *Safety evaluation of a commercial modified live equine arteritis virus vaccine for use in stallions*. In: Equine Infectious Diseases V: Proceedings of the Fifth International Conference (1987), David G. Powell, University Press of Kentucky, 1988.
117. Castillo-Olivares, J., et al., *Generation of a Candidate Live Marker Vaccine for Equine Arteritis Virus by Deletion of the Major Virus Neutralization Domain*. Journal of Virology, 2003. **77**(15): p. 8470-8480.
118. Zhang, J., et al., *Development and Characterization of an Infectious cDNA Clone of the Modified Live Virus Vaccine Strain of Equine Arteritis Virus*. Clinical and Vaccine Immunology : CVI, 2012. **19**(8): p. 1312-1321.
119. Balasuriya, U.B.R., et al., *Expression of the Two Major Envelope Proteins of Equine Arteritis Virus as a Heterodimer Is Necessary for Induction of Neutralizing Antibodies in Mice Immunized with Recombinant Venezuelan Equine Encephalitis Virus Replicon Particles*. Journal of Virology, 2000. **74**(22): p. 10623-10630.
120. Kamrud, K.I., et al., *Development and characterization of promoterless helper RNAs for the production of alphavirus replicon particle*. The Journal of General Virology, 2010. **91**(Pt 7): p. 1723-1727.
121. Zevenhoven-Dobbe, J.C., et al., *Rescue of disabled infectious single-cycle (DISC) equine arteritis virus by using complementing cell lines that express minor structural glycoproteins*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 12): p. 3709-14.
122. Castillo-Olivares, J., et al., *Evaluation of a prototype sub-unit vaccine against equine arteritis virus comprising the entire ectodomain of the virus large envelope glycoprotein (G(L))*:

- induction of virus-neutralizing antibody and assessment of protection in ponies. J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 10): p. 2425-35.
123. Tobiasch, E., et al., *Large envelope glycoprotein and nucleocapsid protein of equine arteritis virus (EAV) induce an immune response in Balb/c mice by DNA vaccination; strategy for developing a DNA-vaccine against EAV-infection. Virus Genes*, 2001. **22**(2): p. 187-99.
124. Giese, M., et al., *Stable and long-lasting immune response in horses after DNA vaccination against equine arteritis virus. Virus Genes*, 2002. **25**(2): p. 159-67.
125. Balasuriya, U.B., et al., *Experiences with infectious cDNA clones of equine arteritis virus: lessons learned and insights gained. Virology*, 2014. **462-463**: p. 388-403.
126. Heinrich, A., et al., *RNA interference protects horse cells in vitro from infection with Equine Arteritis Virus. Antiviral Res*, 2009. **81**(3): p. 209-16.
127. Sentsui, H., et al., *Antiviral effect of recombinant equine interferon-gamma on several equine viruses. Vet Immunol Immunopathol*, 2010. **135**(1-2): p. 93-9.
128. Margat, A., L. Marnay, and P. Doligez, *Transfert de l'immunité au poulain nouveau-né. les Haras nationaux, équipaédia, Reproduction, Le poulinage et le poulain nouveau né*, 2014.
129. Perkins, G.A. and B. Wagner, *The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. Equine Vet J*, 2015. **47**(3): p. 267-74.
130. McCue, P.M., *Colostrum Banking. in Equine Reproductive Procedures* (eds J. J. Dascanio and P. M. McCue), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA. , 2014.
131. ANSES-Dozulé (Moussu C. and Saison A.), et al., *Les diarrhées du poulain – Causes, résultats, soins, prévention – une étude épidémiologique de deux ans en région Basse-Normandie. Plaqueette* éditée par l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (Les Haras nationaux), 2010.
132. Borghesi, J., et al., *Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans-A Review. Open Journal of Animal Sciences*, 2014. **4**(5): p. 323-336.
133. Janeway, C.A., et al., *Immunobiologie*. 2009: De Boeck Supérieur.
134. Chavatte, P., et al., *Le poulain nouveau né. les Haras nationaux, équipaédia, Reproduction, Le poulinage et le poulain nouveau né*, 2016.
135. Lewis, L.D., *Feeding and Care of the Horse*. 2013: Wiley.
136. Doreau, M. and S. Boulot, *Recent knowledge on mare milk production: A review. Livestock Production Science*, 1989. **22**(3): p. 213-235.
137. Doreau, M., *Le lait de jument. INRA Productions animales*, 1991. **4**(4): p. 297-302.
138. Salimei, E. and F. Fantuz, *Equid milk for human consumption. International Dairy Journal*, 2012. **24**(2): p. 130-142.
139. Mealey, R.H., *New Perspectives in Infectious Diseases, An Issue of Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, E-Book*. 2016: Elsevier Health Sciences.
140. Hullinger, P.J., et al., *Passive transfer, rate of decay, and protein specificity of antibodies against equine arteritis virus in horses from a Standardbred herd with high seroprevalence. J Am Vet Med Assoc*, 1998. **213**(6): p. 839-42.
141. Lansade, L. and L. Marnay, *Le sevrage du poulain, comment faire ? les Haras nationaux, équipaédia, Croissance et éducation, Education du poulain*, 2017.
142. McCollum, W.H., *Studies of passive immunity in foals to equine viral arteritis. Veterinary Microbiology*, 1976. **1**(1): p. 45-54.
143. Stout, T.A. and B. Colenbrander, *Suppressing reproductive activity in horses using GnRH vaccines, antagonists or agonists. Anim Reprod Sci*, 2004. **82-83**: p. 633-43.
144. Thompson, D.L., *Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). Anim Reprod Sci*, 2000. **60-61**: p. 459-69.
145. Stout, T.A., *Modulating reproductive activity in stallions: a review. Anim Reprod Sci*, 2005. **89**(1-4): p. 93-103.
146. Talwar, G.P., *Fertility regulating and immunotherapeutic vaccines reaching human trials stage. Hum Reprod Update*, 1997. **3**(4): p. 301-10.

147. Talwar, G.P., et al., *Gonadotropin-releasing hormone/human chorionic gonadotropin beta based recombinant antibodies and vaccines*. J Reprod Immunol, 2009. **83**(1-2): p. 158-63.
148. Gupta, J.C., et al., *Development of a novel recombinant LHRH fusion protein for therapy of androgen and estrogen dependent cancers*. Protein Expr Purif, 2017. **134**: p. 132-138.
149. Janett, F., et al., *Suppression of testicular function and sexual behavior by vaccination against GnRH (Equity) in the adult stallion*. Anim Reprod Sci, 2009. **115**(1-4): p. 88-102.
150. Clement, F., et al., *Immunocastration in stallions: effect on spermatogenesis and behaviour*. Anim Reprod Sci, 2005. **89**(1-4): p. 230-3.
151. Turkstra, J.A., et al., *Effects of GnRH immunization in sexually mature pony stallions*. Anim Reprod Sci, 2005. **86**(3-4): p. 247-59.
152. Van der Meer, F.J.U.M., et al., *Immunocastration of stallions: an investigation into the effects of anti-GnRH immunization on reproductive parameters (preliminary results)*. Anim Reprod Sci, 2001. **68**(3-4): p. 326-328.
153. Dowsett, K.F., et al., *Suppression of testicular function using two dose rates of a reversible water soluble gonadotrophin releasing hormone (GnRH) vaccine in colts*. Aust Vet J, 1996. **74**(3): p. 228-35.
154. Malmgren, L., O. Andresen, and A.M. Dalin, *Effect of GnRH immunisation on hormonal levels, sexual behaviour, semen quality and testicular morphology in mature stallions*. Equine Vet J, 2001. **33**(1): p. 75-83.
155. Hinojosa, A.M., et al., *The effect of a GnRH antagonist on endocrine and seminal parameters in stallions*. Theriogenology, 2001. **56**(5): p. 903-12.
156. Davolli, G.M., et al., *Reversible downregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in stallions with a novel GnRH antagonist*. Theriogenology, 2016. **86**(9): p. 2272-2280.
157. Schanbacher, B.D. and B.R. Pratt, *Response of a cryptorchid stallion to vaccination against luteinising hormone releasing hormone*. Vet Rec, 1985. **116**(3): p. 74-5.
158. Sieme, H., et al., *Relationship between sexual hormones, seminal characteristics and fertility in stallions*. Anim Reprod Sci, 2001. **68**(3-4): p. 351-353.
159. Roser, J.F. and J.P. Hughes, *Dose-response effects of gonadotropin-releasing hormone on plasma concentrations of gonadotropins and testosterone in fertile and subfertile stallions*. J Androl, 1992. **13**(6): p. 543-50.
160. Cox, J.E., et al., *Testosterone in Normal, Cryptorchid and Castrated Male Horses*. Equine Veterinary Journal, 1973. **5**(2): p. 85-90.
161. Berndtson, W.E., B.W. Pickett, and T.M. Nett, *Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma*. J Reprod Fertil, 1974. **39**(1): p. 115-8.
162. Roberts, S.J. and B.V. Beaver, *The use of progestagen for aggressive and hypersexual horses*. In: Robinson, N.E. (Ed.), Current Therapy in Equine Medicine, Saunders, London,, 1987: p. 129-131.
163. Brady, H.A., et al., *Effects of Oral Altrenogest on Testicular Parameters, Steroidal Profiles, and Seminal Characteristics in Young Stallions*. Vol. 43. 1997.
164. Miller, C.D., et al., *Effects of Altrenogest on Behavior and Reproductive Function of Stallions*. 1997.
165. Squires, E.L., et al., *Effects of altrenogest on total scrotal width, seminal characteristics, concentrations of LH and testosterone and sexual behavior of stallions*. Theriogenology, 1997. **48**(2): p. 313-28.
166. Huirne, J.A. and C.B. Lambalk, *Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists*. Lancet, 2001. **358**(9295): p. 1793-803.
167. Boyle, M.S., et al., *The effects of continuous treatment of stallions with high levels of a potent GnRH analogue*. J Reprod Fertil Suppl, 1991. **44**: p. 169-82.
168. Johnson, C.A., S.L. McMeen, and D.L. Thompson, *Effects of multiple GnRH analogue (deslorelin acetate) implants on cyclic mares*. Theriogenology, 2002. **58**(2): p. 469-471.

169. Montovan, S.M., et al., *The effect of a potent GnRH agonist on gonadal and sexual activity in the horse*. Theriogenology, 1990. **33**(6): p. 1305-1321.
170. Brinsko, S.P., et al., *Gonadal and pituitary responsiveness of stallions is not down-regulated by prolonged pulsatile administration of GnRH*. J Androl, 1998. **19**(1): p. 100-9.
171. van den Born, E., et al., *Antiviral activity of morpholino oligomers designed to block various aspects of Equine arteritis virus amplification in cell culture*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): p. 3081-90.
172. Zhang, J., et al., *Curing of HeLa cells persistently infected with equine arteritis virus by a peptide-conjugated morpholino oligomer*. Virus Res, 2010. **150**(1-2): p. 138-42.
173. Hudziak, R.M., et al., *Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1996. **6**(4): p. 267-72.
174. Moulton, H.M., et al., *Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides*. Bioconjug Chem, 2004. **15**(2): p. 290-9.
175. Deas, T.S., et al., *Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 4599-609.
176. Nelson, M.H., et al., *Arginine-rich peptide conjugation to morpholino oligomers: effects on antisense activity and specificity*. Bioconjug Chem, 2005. **16**(4): p. 959-66.
177. Zhang, Y.J., et al., *Suppression of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by morpholino antisense oligomers*. Vet Microbiol, 2006. **117**(2-4): p. 117-29.
178. Neuman, B.W., et al., *Antisense morpholino-oligomers directed against the 5' end of the genome inhibit coronavirus proliferation and growth*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5891-9.
179. Burrer, R., et al., *Antiviral effects of antisense morpholino oligomers in murine coronavirus infection models*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5637-48.
180. McCaffrey, A.P., et al., *A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 503-8.
181. Warren, T.K., et al., *A single phosphorodiamidate morpholino oligomer targeting VP24 protects rhesus monkeys against lethal Ebola virus infection*. MBio, 2015. **6**(1).
182. Barrientos, L.G., et al., *Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1,2 and inhibits infectivity of Ebola virus*. Antiviral Res, 2003. **58**(1): p. 47-56.
183. van der Meer, F.J., et al., *Antiviral activity of carbohydrate-binding agents against Nidovirales in cell culture*. Antiviral Res, 2007. **76**(1): p. 21-9.
184. van der Meer, F.J., et al., *The carbohydrate-binding plant lectins and the non-peptidic antibiotic pradimicin A target the glycans of the coronavirus envelope glycoproteins*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(4): p. 741-9.
185. Keyaerts, E., et al., *Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle*. Antiviral Res, 2007. **75**(3): p. 179-87.
186. Dey, B., et al., *Multiple antiviral activities of cyanovirin-N: blocking of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with CD4 and coreceptor and inhibition of diverse enveloped viruses*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4562-9.
187. O'Keefe, B.R., et al., *Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(8): p. 2518-25.
188. Balzarini, J., et al., *The mannose-specific plant lectins from Cymbidium hybrid and Epipactis helleborine and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from Urtica dioica are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro*. Antiviral Res, 1992. **18**(2): p. 191-207.
189. Witvrouw, M., et al., *Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to the high-mannose binding agents cyanovirin N and concanavalin A*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7777-84.
190. Helle, F., et al., *Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25177-83.
191. Min, Y.Q., et al., *Effects of microvirin monomers and oligomers on hepatitis C virus*. Biosci Rep, 2017. **37**(3).

192. Mu, J., et al., *A Novel High-Mannose Specific Lectin from the Green Alga Halimeda renschii Exhibits a Potent Anti-Influenza Virus Activity through High-Affinity Binding to the Viral Hemagglutinin*. Mar Drugs, 2017. **15**(8).
193. Morrell, J.M. and R.M. Geraghty, *Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen*. Equine Vet J, 2006. **38**(3): p. 224-9.
194. Levy, R., et al., *Pregnancy after safe IVF with hepatitis C virus RNA-positive sperm*. Hum Reprod, 2002. **17**(10): p. 2650-3.
195. Bujan, L., et al., *Intermittent human immunodeficiency type 1 virus (HIV-1) shedding in semen and efficiency of sperm processing despite high seminal HIV-1 RNA levels*. Fertil Steril, 2002. **78**(6): p. 1321-3.
196. Inoue, O., et al., *Clinical efficacy of a combination of Percoll continuous density gradient and swim-up techniques for semen processing in HIV-1 serodiscordant couples*. Asian J Androl, 2017. **19**(2): p. 208-213.
197. Cavanagh, D., *Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae*. Arch Virol, 1997. **142**(3): p. 629-33.
198. Ivanov, K.A., et al., *Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12694-9.
199. Gorbalenya, A.E., et al., *Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome*. Virus Res, 2006. **117**(1): p. 17-37.
200. ICTV, *Virus Taxonomy: 2009 Release*. 2009. **ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) 9th Report; EC41: Leiden, June 2009; Email ratification 2009 (MSL #25)**.
201. ICTV, *Virus Taxonomy: 2016 Release*. EC 48, Budapest, Hungary, August 2016; Email ratification 2017 (MSL #31), 2017.
202. Lauber, C., et al., *Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses*. Arch Virol, 2012. **157**(8): p. 1623-8.
203. Veit, M., et al., *Membrane proteins of arterivirus particles: structure, topology, processing and function*. Virus Res, 2014. **194**: p. 16-36.
204. Archambault, D., et al., *Animal Arterivirus Infections*. Biomed Res Int, 2014. **2014**.
205. Faaberg, K.S., *Arterivirus Structural Proteins and Assembly*, in *Nidoviruses*. 2008, American Society of Microbiology.
206. Adams, M.J., et al., *Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017)*. Archives of Virology, 2017. **162**(8): p. 2505-2538.
207. Kuhn, J.H., et al., *REORGANIZATION AND EXPANSION OF THE NIDOVIRAL FAMILY ARTERIVIRIDAE*. Archives of virology, 2016. **161**(3): p. 755-768.
208. Han, M. and D. Yoo, *Modulation of innate immune signaling by nonstructural protein 1 (nsp1) in the family Arteriviridae*. Virus Res, 2014. **194**: p. 100-9.
209. Brinton, M.A., H. Di, and H.A. Vatter, *Simian hemorrhagic fever virus: Recent advances*. Virus Res, 2015. **202**: p. 112-9.
210. Snijder, E.J. and J.J. Meulenberg, *The molecular biology of arteriviruses*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 5): p. 961-79.
211. de Vries, A.A., et al., *Structural proteins of equine arteritis virus*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6294-303.
212. Magnusson, P., B. Hyllseth, and H. Marusyk, *Morphological studies on equine arteritis virus*. Archiv für die gesamte Virusforschung, 1970. **30**(2): p. 105-112.
213. Lu, Z., et al., *Chimeric viruses containing the N-terminal ectodomains of GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus do not change the cellular tropism of equine arteritis virus*. Virology, 2012. **432**(1): p. 99-109.
214. Lauber, C., et al., *The Footprint of Genome Architecture in the Largest Genome Expansion in RNA Viruses*. PLoS Pathogens, 2013. **9**(7): p. e1003500.
215. Han, M., et al., *Biogenesis of non-structural protein 1 (nsp1) and nsp1-mediated type I interferon modulation in arteriviruses*. Virology, 2014. **458-459**: p. 136-50.

216. Go, Y.Y., et al., *Equine arteritis virus does not induce interferon production in equine endothelial cells: identification of nonstructural protein 1 as a main interferon antagonist*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 420658.
217. Tijms, M.A., Y. van der Meer, and E.J. Snijder, *Nuclear localization of non-structural protein 1 and nucleocapsid protein of equine arteritis virus*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 4): p. 795-800.
218. van Kasteren, P.B., et al., *Deubiquitinase function of arterivirus papain-like protease 2 suppresses the innate immune response in infected host cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. E838-47.
219. Balasuriya, U.B., et al., *Development and characterization of an infectious cDNA clone of the virulent Bucyrus strain of Equine arteritis virus*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 3): p. 918-24.
220. Tian, D., et al., *Arterivirus minor envelope proteins are a major determinant of viral tropism in cell culture*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 3701-12.
221. Wieringa, R., et al., *Structural Protein Requirements in Equine Arteritis Virus Assembly*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 13019-27.
222. Balasuriya, U.B., et al., *Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain of the G(L) envelope glycoprotein*. Virology, 1997. **232**(1): p. 114-28.
223. Konishi, S., et al., *Studies on equine viral arteritis. I. Characterization of the virus and trial survey on antibody with vero cell cultures*. Nihon Juigaku Zasshi, 1975. **37**(5): p. 259-67.
224. Wilson, J.C., et al., *Propagation of equine arteritis virus previously adapted to cell cultures of equine kidney in monolayer cultures of hamster kidney*. Cornell Vet, 1962. **52**: p. 200-5.
225. McCollum, W.H., et al., *Isolation and propagation of equine arteritis virus in monolayer cell cultures of rabbit kidney*. Cornell Vet, 1962. **52**: p. 452-458.
226. Radwan, A.I. and D. Burger, *The complement-requiring neutralization of equine arteritis virus by late antisera*. Virology, 1973. **51**(1): p. 71-77.
227. Hyllseth, B., *A plaque assay of equine arteritis virus in BHK-21 cells*. Archiv für die gesamte Virusforschung, 1969. **28**(1): p. 26-33.
228. Kim, H.S., et al., *Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line*. Arch Virol, 1993. **133**(3-4): p. 477-83.
229. Van Breedam, W., et al., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 7): p. 1659-67.
230. Moore, B.D., et al., *Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF-alpha and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages*. Virology, 2003. **314**(2): p. 662-70.
231. Anderson, G.W., et al., *Lactate dehydrogenase-elevating virus replication persists in liver, spleen, lymph node, and testis tissues and results in accumulation of viral RNA in germinal centers, concomitant with polyclonal activation of B cells*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 5177-85.
232. Del Piero, F., *Equine viral arteritis*. Vet Pathol, 2000. **37**(4): p. 287-96.
233. Vairo, S., et al., *Identification of target cells of a European equine arteritis virus strain in experimentally infected ponies*. Vet Microbiol, 2013. **167**(3-4): p. 235-41.
234. Go, Y.Y., et al., *Complex interactions between the major and minor envelope proteins of equine arteritis virus determine its tropism for equine CD3+ T lymphocytes and CD14+ monocytes*. J Virol, 2010. **84**(10): p. 4898-911.
235. Chen, Z., et al., *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, 2010. **398**(1): p. 87-97.
236. Beura, L.K., et al., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation*. J Virol, 2010. **84**(3): p. 1574-84.
237. Leroy, M. and D. Desmecht, *Les interférons de type I et leur fonction antivirale*. Ann. Méd. Vét., 2006. **150**: p. 73-107.

238. Jiang, X., et al., *Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 959-73.
239. Thompson, M.R., et al., *Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection*. Viruses, 2011. **3**(6): p. 920-940.
240. Li, M., et al., *The critical role of Toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases*. Curr Mol Med, 2009. **9**(3): p. 365-74.
241. Liu, Z., et al., *Roles of Toll-like receptors 2 and 4 in mediating experimental autoimmune orchitis induction in mice*. Biol Reprod, 2015. **92**(3): p. 63.
242. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
243. Vabulas, R.M., et al., *Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31332-9.
244. Park, J.S., et al., *Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7370-7.
245. Alexopoulou, L., B. Desnues, and O. Demaria, *Le récepteur Toll-like 8*. Med Sci (Paris), 2012. **28**(1): p. 96-102.
246. Hu, H. and S.-C. Sun, *Ubiquitin signaling in immune responses*. Cell Research, 2016. **26**(4): p. 457-483.
247. Chen, Z.J., *Ubiquitin Signaling in the NF-κB Pathway*. Nature cell biology, 2005. **7**(8): p. 758-765.
248. McGovern, J.L., et al., *Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(10): p. 3129-38.
249. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
250. Tosato, G. and K.D. Jones, *Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes*. Blood, 1990. **75**(6): p. 1305-10.
251. Takami, M., V. Terry, and L. Petruzzelli, *Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4559-66.
252. Asfaha, S., et al., *Mice That Express Human Interleukin-8 Have Increased Mobilization of Immature Myeloid Cells, Which Exacerbates Inflammation and Accelerates Colon Carcinogenesis*. Gastroenterology, 2013. **144**(1): p. 155-166.
253. Hol, J., L. Wilhelmsen, and G. Haraldsen, *The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(3): p. 501-8.
254. McFarlane, D. and T.C. Holbrook, *Cytokine dysregulation in aged horses and horses with pituitary pars intermedia dysfunction*. J Vet Intern Med, 2008. **22**(2): p. 436-42.
255. Borzakian, S., *La persistance virale: un agent étiologique possible pour les maladies auto-immunes* Med. Sci. , 1993. **9**(8-9): p. 907-916.
256. Wu, H., et al., *Mumps virus-induced innate immune responses in mouse Sertoli and Leydig cells*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19507.
257. Zhao, S., et al., *Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity*. Cell Mol Immunol, 2014. **11**(5): p. 428-37.
258. Yule, T.D., et al., *Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier*. J Immunol, 1988. **141**(4): p. 1161-7.
259. Walker, W.H., *Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1546): p. 1557-69.
260. Nieschlag, S.M.A., E. Nieschlag, and H. Behre, *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
261. Siegel, A., H. Snyder, and J.W. Duckett, *Epididymitis in infants and boys: underlying urogenital anomalies and efficacy of imaging modalities*. J Urol, 1987. **138**(4 Pt 2): p. 1100-3.

262. Weingartner, K., et al., *Ectopic trifid ureter causing recurrent acute epididymitis*. Br J Urol, 1998. **81**(1): p. 164-5.
263. Hviid, A., S. Rubin, and K. Muhlemann, *Mumps*. Lancet, 2008. **371**(9616): p. 932-44.
264. Le Goffic, R., et al., *Mumps virus decreases testosterone production and gamma interferon-induced protein 10 secretion by human leydig cells*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3297-300.
265. Institut-du-cheval, *Maladies des chevaux*. 1994: France Agricole.
266. Fukunaga, Y., et al., *Complement-dependent serum neutralization with virulent and avirulent Bucyrus strains of equine arteritis virus*. Vet Microbiol, 1993. **36**(3-4): p. 379-83.
267. Go, Y.Y., et al., *Characterization of equine humoral antibody response to the nonstructural proteins of equine arteritis virus*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(2): p. 268-79.
268. Balasuriya, U.B., et al., *Expression of the two major envelope proteins of equine arteritis virus as a heterodimer is necessary for induction of neutralizing antibodies in mice immunized with recombinant Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10623-30.
269. Castillo-Olivares, J., et al., *Detection of equine arteritis virus (EAV)-specific cytotoxic CD8+ T lymphocyte precursors from EAV-infected ponies*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 10): p. 2745-53.
270. Go, Y.Y., et al., *Assessment of correlation between in vitro CD3+ T cell susceptibility to EAV infection and clinical outcome following experimental infection*. Vet Microbiol, 2012. **157**(1-2): p. 220-5.
271. Go, Y.Y., et al., *Genome-wide association study among four horse breeds identifies a common haplotype associated with in vitro CD3+ T cell susceptibility/resistance to equine arteritis virus infection*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13174-84.
272. Go, Y.Y., et al., *Evidence that in vitro susceptibility of CD3+ T lymphocytes to equine arteritis virus infection reflects genetic predisposition of naturally infected stallions to become carriers of the virus*. J Virol, 2012. **86**(22): p. 12407-10.
273. Baba, T., et al., *CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2004-12.
274. Inoue, J., et al., *Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions*. Int J Androl, 1993. **16**(2): p. 155-8.
275. Shideler, R.K., et al., *Disappearance of spermatozoa from the ejaculates of geldings*. J Reprod Fertil Suppl, 1979(27): p. 25-9.
276. McDowell, K.J., et al., *Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and supplemented with testosterone*. Res Vet Sci, 1996. **61**(1): p. 33-7.
277. Little, T.V., et al., *Output of equine arteritis virus persistently infected carrier stallions is testosterone dependent*. Proceedings of the 6th International Conference of Equine Infectious Diseases, Cambridge, 1991, 1992: p. 225-229.
278. Little, T.V., *An endocrinological basis for the persistence of equine arteritis virus in the reproductive tract of the stallion*. 1993.
279. Heber, D., et al., *Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in vivo: mechanism of action*. Science, 1982. **216**(4544): p. 420-1.
280. Jones, R.E. and K.H. Lopez, *Human Reproductive Biology*. 2006: Elsevier Science.
281. Golan, D.E., *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 2008: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
282. Crepieux, P., et al., *The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation*. Oncogene, 2001. **20**(34): p. 4696-709.
283. Fix, C., et al., *Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(30): p. 10919-10924.
284. Erlandsson, A.C., et al., *Herpes simplex virus type 1 infection and glucocorticoid treatment regulate viral yield, glucocorticoid receptor and NF-kappaB levels*. J Endocrinol, 2002. **175**(1): p. 165-76.

285. Chong, K.T. and C.A. Mims, *Effects of pregnant mouse serum and pregnancy hormones on the replication in vitro of murine cytomegalovirus*. Arch Virol, 1984. **82**(3-4): p. 223-31.
286. Dreyer, L.L., R.J. Sydiskis, and N. Bashirelahi, *Effect of dexamethasone on herpes simplex virus replication in mouse neuroblastoma cells (NB41A3): receptor characteristics*. J Clin Lab Anal, 1989. **3**(4): p. 236-43.
287. Ringold, G.M., et al., *Dexamethasone-mediated induction of mouse mammary tumor virus RNA: a system for studying glucocorticoid action*. Cell, 1975. **6**(3): p. 299-305.
288. Robertson, D.L. and H.E. Varmus, *Dexamethasone induction of the intracellular RNAs of mouse mammary tumor virus*. J Virol, 1981. **40**(3): p. 673-82.
289. McGrath, C.M. and R.F. Jones, *Hormonal induction of mammary tumor viruses and its implications for carcinogenesis*. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 2): p. 4112-25.
290. Chen, F., et al., *Overexpression of thyroid hormone receptor β 1 altered thyroid hormone-mediated regulation of herpes simplex virus-1 replication in differentiated cells*. Journal of NeuroVirology, 2016. **22**(5): p. 555-563.
291. Morrow, P.L., A. Freedman, and J.E. Craighead, *Testosterone effect on experimental diabetes mellitus in encephalomyocarditis (EMC) virus infected mice*. Diabetologia, 1980. **18**(3): p. 247-9.
292. Webster, K., A. Taylor, and K. Gaston, *Oestrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 1): p. 201-13.
293. Vom Steeg, L.G., et al., *Age and testosterone mediate influenza pathogenesis in male mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **311**(6): p. L1234-L1244.
294. White, D.L., et al., *Higher serum testosterone is associated with increased risk of advanced hepatitis C-related liver disease in males*. Hepatology, 2012. **55**(3): p. 759-68.
295. Sinclair, M., et al., *In reference to higher serum testosterone is associated with increased risk of advanced hepatitis c-related liver disease in males*. Hepatology, 2012. **56**(5): p. 2007-2007.
296. Nguyen, H.V., et al., *Chronic hepatitis C infection and sex hormone levels: effect of disease severity and recombinant interferon-alpha therapy*. Intern Med J, 2006. **36**(6): p. 362-6.
297. Huang, J.S., et al., *Reduced testosterone levels in human immunodeficiency virus-infected women with weight loss and low weight*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(4): p. 499-506.
298. Dolan Looby, S.E., et al., *Effects of Long-term Testosterone Administration in HIV-infected Women: A Randomized, Placebo-Controlled Trial*. AIDS (London, England), 2009. **23**(8): p. 951-959.
299. Rochira, V., et al., *Low testosterone is associated with poor health status in men with human immunodeficiency virus infection: a retrospective study*. Andrology, 2015. **3**(2): p. 298-308.
300. Gomes, A.R., et al., *Prevalence of testosterone deficiency in HIV-infected men under antiretroviral therapy*. BMC Infectious Diseases, 2016. **16**: p. 628.
301. Monroe, A.K., et al., *Sex hormones, insulin resistance, and diabetes mellitus among men with or at risk for HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **58**(2): p. 173-80.
302. Giefing-Kroll, C., et al., *How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination*. Aging Cell, 2015. **14**(3): p. 309-21.
303. Trigunaite, A., J. Dima, and T.N. Jorgensen, *Suppressive effects of androgens on the immune system*. Cell Immunol, 2015. **294**(2): p. 87-94.
304. Schwinge, D., et al., *Testosterone suppresses hepatic inflammation by the downregulation of IL-17, CXCL-9, and CXCL-10 in a mouse model of experimental acute cholangitis*. J Immunol, 2015. **194**(6): p. 2522-30.
305. Liva, S.M. and R.R. Voskuhl, *Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2060-7.
306. Olsen, N.J. and W.J. Kovacs, *Gonadal steroids and immunity*. Endocr Rev, 1996. **17**(4): p. 369-84.
307. Schuurs, A.H. and H.A. Verheul, *Effects of gender and sex steroids on the immune response*. J Steroid Biochem, 1990. **35**(2): p. 157-72.

308. Klein, S.L., *The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior*. Neurosci Biobehav Rev, 2000. **24**(6): p. 627-38.
309. Robinson, D.P., et al., *Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses*. PLoS Pathog, 2011. **7**(7): p. e1002149.
310. Furman, D., et al., *Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 869-74.
311. Kovats, S., *Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways*. Cell Immunol, 2015. **294**(2): p. 63-9.
312. Grossman, C.J., *Interactions between the gonadal steroids and the immune system*. Science, 1985. **227**(4684): p. 257-61.
313. Kissick, H.T., et al., *Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(27): p. 9887-9892.
314. Vendramini, A.C., C. Soo, and D.A. Sullivan, *Testosterone-induced suppression of autoimmune disease in lacrimal tissue of a mouse model (NZB/NZW F1) of Sjogren's syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(11): p. 3002-6.
315. Lessard, L., et al., *PTP1B is an androgen receptor-regulated phosphatase that promotes the progression of prostate cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(6): p. 1529-37.
316. Bakke, J. and F.G. Haj, *Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **37**: p. 58-65.
317. Gu, F., et al., *Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49689-93.
318. Krishnan, N., et al., *H2S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response*. Sci Signal, 2011. **4**(203): p. ra86.
319. Kandadi, M.R., et al., *Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B rescues against myocardial anomalies in high fat diet-induced obesity: Role of AMPK-dependent autophagy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2015. **1852**(2): p. 299-309.
320. Panzhinskiy, E., et al., *Endoplasmic reticulum stress upregulates protein tyrosine phosphatase 1B and impairs glucose uptake in cultured myotubes*. Diabetologia, 2013. **56**(3): p. 598-607.
321. Bettaieb, A., et al., *Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Potentiates PERK/eIF2 α Signaling in Brown Adipocytes*. PLOS ONE, 2012. **7**(4): p. e34412.
322. Su, Q., et al., *Modulation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase PERK by tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 469-75.
323. Liu, Z., et al., *Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1822.
324. Kouroku, Y., et al., *ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(2): p. 230-9.
325. Noack, J., R. Bernasconi, and M. Molinari, *How viruses hijack the ERAD tuning machinery*. J Virol, 2014. **88**(18): p. 10272-5.
326. Monastyrska, I., et al., *An autophagy-independent role for LC3 in equine arteritis virus replication*. Autophagy, 2013. **9**(2): p. 164-74.
327. Arkoun, B., et al., *Stallion spermatozoa: putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER*. Gen Comp Endocrinol, 2014. **200**: p. 35-43.
328. Naden, J., R.P. Amann, and E.L. Squires, *Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions*. J Reprod Fertil, 1990. **88**(1): p. 167-76.
329. Pelletier, G., *Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues*. Histo Histopathol, 2000. **15**(4): p. 1261-70.
330. Parlevliet, J.M., et al., *Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis*. Theriogenology, 2006. **66**(4): p. 755-65.

331. Yamashita, S., *Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **279**(2): p. 768-78.
332. Snyder, E.M., et al., *Regulation of gene expression by estrogen and testosterone in the proximal mouse reproductive tract*. Biol Reprod, 2009. **81**(4): p. 707-16.
333. Pearl, C.A., H. Mason, and J.F. Roser, *Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis*. Anim Reprod Sci, 2011. **125**(1-4): p. 103-11.
334. Carreau, S., et al., *Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 35.
335. Sipahutar, H., et al., *Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(3): p. 311-8.
336. Ma, C., et al., *Characterization of swine testicular cell line as immature porcine Sertoli cell line*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2016. **52**(4): p. 427-33.
337. Li, T., et al., *Up-regulation of NDRG2 through nuclear factor-kappa B is required for Leydig cell apoptosis in both human and murine infertile testes*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(2): p. 301-13.
338. Shen, X., et al., *Effect of dehydroepiandrosterone on cell growth and mitochondrial function in TM-3 cells*. Gen Comp Endocrinol, 2012. **177**(1): p. 177-86.
339. Yang, Q., et al., *Spermidine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through inducing inhibitory macrophages*. Cell Death and Differentiation, 2016. **23**(11): p. 1850-1861.
340. Cambien, B., et al., *CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFRbeta in colorectal carcinoma*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28842.
341. Peters, M.C., et al., *Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014. **133**(2): p. 388-394.e5.
342. Cumming, G., F. Fidler, and D.L. Vaux, *Error bars in experimental biology*. J Cell Biol, 2007. **177**(1): p. 7-11.
343. Vaux, D.L., *Research methods: Know when your numbers are significant*. Nature, 2012. **492**(7428): p. 180-181.
344. Vaux, D.L., F. Fidler, and G. Cumming, *Replicates and repeats—what is the difference and is it significant?: A brief discussion of statistics and experimental design*. EMBO Reports, 2012. **13**(4): p. 291-296.
345. Hwang, T.I., et al., *Low-dose testosterone treatment decreases oxidative damage in TM3 Leydig cells*. Asian J Androl, 2011. **13**(3): p. 432-7.
346. Boldogh, I., T. Albrecht, and D.D. Porter, *Persistent Viral Infections*, in Medical Microbiology, S. Baron, Editor. 1996: Galveston (TX).
347. Mahy, B.W., *Strategies of virus persistence*. Br Med Bull, 1985. **41**(1): p. 50-5.
348. Ballestas, M.E., P.A. Chatis, and K.M. Kaye, *Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen*. Science, 1999. **284**(5414): p. 641-4.
349. Feeney, K.M. and J.L. Parish, *Targeting mitotic chromosomes: a conserved mechanism to ensure viral genome persistence*. Proc Biol Sci, 2009. **276**(1662): p. 1535-44.
350. Hogg, J.C., *Role of latent viral infections in chronic obstructive pulmonary disease and asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 2): p. S71-5.
351. van der Zeijst, B.A., et al., *Persistent infection of some standard cell lines by lymphocytic choriomeningitis virus: transmission of infection by an intracellular agent*. J Virol, 1983. **48**(1): p. 249-61.
352. Nathanson, N., *Viral Pathogenesis and Immunity (2nd edition)*. 2007: Elsevier Science.
353. Zhang, J., et al., *Persistent Equine Arteritis Virus Infection in HeLa Cells*. Journal of Virology, 2008. **82**(17): p. 8456-8464.
354. Heim, A., et al., *Cultured human myocardial fibroblasts of pediatric origin: natural human interferon-alpha is more effective than recombinant interferon-alpha 2a in carrier-state coxsackievirus B3 replication*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(10): p. 2199-208.

355. Rehren, F., et al., *Induction of a broad spectrum of inflammation-related genes by Cocksackievirus B3 requires Interleukin-1 signaling*. Med Microbiol Immunol, 2013. **202**(1): p. 11-23.
356. Matteucci, D., et al., *Group B coxsackieviruses readily establish persistent infections in human lymphoid cell lines*. J Virol, 1985. **56**(2): p. 651-4.
357. Nukuzuma, S., et al., *Establishment and characterization of a carrier cell culture producing high titres of polyoma JC virus*. J Med Virol, 1995. **47**(4): p. 370-7.
358. Pinkert, S., et al., *Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13409-19.
359. Schnurr, D.P. and N.J. Schmidt, *Persistent infection of mouse fibroblasts with Cocksackievirus*. Arch Virol, 1984. **81**(1-2): p. 91-101.
360. Zhang, X., et al., *Human astrocytic cells support persistent coxsackievirus B3 infection*. J Virol, 2013. **87**(22): p. 12407-21.
361. Dermody, T.S., et al., *Cells and viruses with mutations affecting viral entry are selected during persistent infections of L cells with mammalian reoviruses*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2055-63.
362. Crowell, R.L. and J.T. Syverton, *The mammalian cell-virus relationship. VI. Sustained infection of HeLa cells by Cocksackie B3 virus and effect on superinfection*. J Exp Med, 1961. **113**: p. 419-35.
363. Garcia, I., et al., *Characterization of an infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carrier cell culture with resistance to superinfection with heterologous viruses*. Vet Microbiol, 2011. **149**(1-2): p. 48-55.
364. Smith, H., *Microbial Behaviour, 'in Vivo' and 'in Vitro'*. 1964: Society for General Microbiology.
365. de la Torre, J.C., et al., *Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture*. J Virol, 1988. **62**(6): p. 2050-8.
366. de la Torre, J.C. and E. Domingo, *Minimum number of cells required for reconstitution of a foot-and-mouth disease virus-carrier cell culture*. Microbiologia, 1988. **4**(3): p. 161-6.
367. de la Torre, J.C., et al., *Extensive cell heterogeneity during persistent infection with foot-and-mouth disease virus*. J Virol, 1989. **63**(1): p. 59-63.
368. Martin-Acebes, M.A., et al., *Cell density-dependent expression of viral antigens during persistence of foot-and-mouth disease virus in cell culture*. Virology, 2010. **403**(1): p. 47-55.
369. Ahmed, R., P.R. Chakraborty, and B.N. Fields, *Genetic variation during lytic reovirus infection: high-passage stocks of wild-type reovirus contain temperature-sensitive mutants*. J Virol, 1980. **34**(1): p. 285-7.
370. Ahmed, R., et al., *Genetic Variation During Persistent Reovirus Infection: Presence of Extragenically Suppressed Temperature-Sensitive Lesions in Wild-Type Virus Isolated from Persistently Infected L Cells*. Journal of Virology, 1980. **34**(2): p. 383-389.
371. Ho, M. and J.F. Enders, *AN INHIBITOR OF VIRAL ACTIVITY APPEARING IN INFECTED CELL CULTURES*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1959. **45**(3): p. 385-9.
372. Miranda-Hernandez, S., et al., *Role for MyD88, TLR2 and TLR9 but not TLR1, TLR4 or TLR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2011. **187**(2): p. 791-804.
373. Fang, J., et al., *The role of TLR2, TLR3, TLR4, and TLR9 signaling in the pathogenesis of autoimmune disease in a retinal autoimmunity model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(6): p. 3092-9.
374. Mendel, I., N. Kerlero de Rosbo, and A. Ben-Nun, *A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(7): p. 1951-9.
375. Caspi, R.R., et al., *Mouse models of experimental autoimmune uveitis*. Ophthalmic Res, 2008. **40**(3-4): p. 169-74.

376. Segal, B.M., J.T. Chang, and E.M. Shevach, *CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5683-8.
377. Millet, P., et al., *GAPDH Binding to TNF- α mRNA Contributes to Post-Transcriptional Repression in Monocytes: A Novel Mechanism of Communication between Inflammation and Metabolism*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2016. **196**(6): p. 2541-2551.
378. Mijatovic, T., et al., *Tumor necrosis factor-alpha mRNA remains unstable and hypoadenylated upon stimulation of macrophages by lipopolysaccharides*. Eur J Biochem, 2000. **267**(19): p. 6004-12.
379. Zhong, Y., Y.W. Tan, and D.X. Liu, *Recent Progress in Studies of Arterivirus- and Coronavirus-Host Interactions*. Viruses, 2012. **4**(6): p. 980-1010.
380. Yamanaka, H., *TNF as a Target of Inflammation in Rheumatoid Arthritis*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2015. **15**(2): p. 129-34.
381. Theas, M.S., et al., *Tumour necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis*. Hum Reprod, 2008. **23**(8): p. 1865-72.
382. Guazzone, V.A., et al., *Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review*. Microsc Res Tech, 2009. **72**(8): p. 620-8.
383. Zhang, X., et al., *Damaged spermatogenic cells induce inflammatory gene expression in mouse Sertoli cells through the activation of Toll-like receptors 2 and 4*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **365**(2): p. 162-73.
384. Cudicini, C., et al., *Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(5): p. 1426-33.
385. Mathieu, C., et al., *Nonstructural Nipah virus C protein regulates both the early host proinflammatory response and viral virulence*. J Virol, 2012. **86**(19): p. 10766-75.
386. Russo-Marie, F., *L'inflammation*. 1998: John Libbey Eurotext.
387. Dufour, J.H., et al., *IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3195-204.
388. Kouroumalis, A., et al., *The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5403-11.
389. Rauch, I., M. Müller, and T. Decker, *The regulation of inflammation by interferons and their STATs*. Jakstat, 2013. **2**(1).
390. Kaufmann, S.H.E. and D. Kabelitz, *Immunology of Infection*. 2002: Academic Press.
391. Serhan, C.N., P.A. Ward, and D.W. Gilroy, *Fundamentals of Inflammation*. 2010: Cambridge University Press.
392. Bhattacharya, A., et al., *Autophagy Is Required for Neutrophil-Mediated Inflammation*. Cell Rep, 2015. **12**(11): p. 1731-9.
393. Frenzel, L. and O. Hermine, *Mast cells and inflammation*. Joint Bone Spine, 2013. **80**(2): p. 141-5.
394. Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, *Mast cells in innate immunity*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 131-40.
395. Krishan, A., et al., *Flow Cytometric Analysis of Androgen Receptor Expression in Human Prostate Tumors and Benign Tissues*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(5): p. 1922-1930.
396. Bagchi, G., C.H. Hurst, and D.J. Waxman, *Interactions of methoxyacetic acid with androgen receptor*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(2): p. 101-10.
397. Bagchi, G., et al., *Complex modulation of androgen responsive gene expression by methoxyacetic acid*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 42.
398. Deretic, V., *Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 92-104.
399. Tormo, D., et al., *Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells*. Cancer cell, 2009. **16**(2): p. 103-114.

400. Xu, F., et al., *Melanoma differentiation-associated gene 5 is involved in the induction of stress granules and autophagy by protonophore CCCP*. Biol Chem, 2016. **397**(1): p. 67-74.

RÉSUMÉ

Le virus de l'Artérite Virale Équine (EAV) est un virus à ARN simple brin positif, appartenant à la famille des *Arteriviridae*, dans l'ordre des *Nidovirales*. C'est un virus spécifique des équidés qui peut être transmis par voies respiratoire et vénérienne. Lors de la primo-infection, l'EAV peut entraîner des signes cliniques grippaux, mais de façon plus grave, il peut aussi provoquer l'avortement des juments gestantes ainsi que la mort des nouveau-nés. L'EAV représente donc un enjeu économique majeur pour la filière équine. Suite à la primo-infection, ce virus peut persister dans de l'appareil reproducteur de certains étalons. Les mécanismes de cette persistance ne sont pas connus.

Au cours de cette thèse, le premier modèle *in vitro* d'infection non lytique d'une lignée issue de l'appareil reproducteur mâle par l'EAV a été développé. L'infection de ces cellules de Leydig a montré une induction de l'expression de nombreux gènes de l'immunité innée dont ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui permettraient le recrutement de cellules de l'immunité innée au niveau des testicules, et qui pourraient expliquer l'orchite observée chez certains étalons lors de la phase aiguë de l'infection.

Pour les étalons infectés de façon persistante, la castration et les traitements anti-GnRH peuvent permettre la suppression de la persistance du virus, suggérant ainsi une implication de la testostérone dans la persistance du virus. Les cellules TM3 exprimant le récepteur aux androgènes, des essais de traitements ont été réalisés. Les premiers résultats préliminaires semblent indiquer que les cellules TM3 ne répondent pas ou peu au stimulus hormonal. Cependant, des tests de prétraitement par la testostérone seraient à envisager afin d'en étudier les conséquences sur le cycle viral.

Ce modèle d'infection non lytique reste cependant un modèle intéressant pouvant être utilisé afin d'étudier les relations hôte-pathogène et pouvant aider à comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance de l'EAV.

Mots-Clés

Artérite Virale Équine, persistance virale, cheval, cellules de Leydig, cellules TM3, immunité innée, testostérone

ABSTRACT

Equine Arteritis Virus (EAV) is a positive-strand RNA virus, which belongs to the *Arteriviridae* family, in the *Nidovirales* order. It is an equid specific virus that can be transmitted by respiratory and venereal routes. During primary infection, EAV can induce flu-like clinical signs, but worse, it may also cause the abortion of pregnant mares and newborn foal death. EAV is therefore a main economic challenge for the horse industry. Following primary infection, this virus is able to persist in the reproductive tract of some stallions. The mechanisms of this persistence remain unknown.

During this thesis, the first *in vitro* model of an EAV non-lytic infection of a male reproductive tract cell line has been developed. EAV infection of these Leydig cells induced the expression of numerous innate immune genes including those coding for pro-inflammatory cytokines and chemokines, which could recruit innate immune cells to testicles and which could explain the orchitis observed in some stallions during primary infection.

For persistently infected stallions, castration and anti-GnRH treatments can suppress EAV persistence, suggesting an involvement of testosterone in the virus persistence. Since TM3 cells express the androgen receptor, treatment trials have been performed. The first preliminary results suggest TM3 cells do not respond to the hormonal stimulus, or only a little. However, pretreatment trials should be realized to study the consequences on the viral cycle.

Nevertheless, this non-lytic infection model is still an interesting model that can be used to study the host-pathogen relationship and that could help understanding the mechanisms involved in EAV persistence.

Keywords:

Equine Arteritis Virus, viral persistence, horse, Leydig cells, TM3 cells, innate immunity, testosterone

Développement et caractérisation d'un modèle d'infection non lytique de cellules de Leydig par le virus de l'Artérite Virale Équine

Le virus de l'Artérite Virale Équine (EAV) est un virus à ARN simple brin positif, appartenant à la famille des *Arteriviridae*, dans l'ordre des *Nidovirales*. C'est un virus spécifique des équidés qui peut être transmis par voies respiratoire et vénérienne. Lors de la primo-infection, l'EAV peut entraîner des signes cliniques grippaux, mais de façon plus grave, il peut aussi provoquer l'avortement des juments gestantes ainsi que la mort des nouveau-nés. L'EAV représente donc un enjeu économique majeur pour la filière équine. Suite à la primo-infection, ce virus peut persister dans de l'appareil reproducteur de certains étalons. Les mécanismes de cette persistance ne sont pas connus.

Au cours de cette thèse, le premier modèle *in vitro* d'infection non lytique d'une lignée issue de l'appareil reproducteur mâle par l'EAV a été développé. L'infection de ces cellules de Leydig a montré une induction de l'expression de nombreux gènes de l'immunité innée dont ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui permettraient le recrutement de cellules de l'immunité innée au niveau des testicules, et qui pourraient expliquer l'orchite observée chez certains étalons lors de la phase aiguë de l'infection.

Pour les étalons infectés de façon persistante, la castration et les traitements anti-GnRH peuvent permettre la suppression de la persistance du virus, suggérant ainsi une implication de la testostérone dans la persistance du virus. Les cellules TM3 exprimant le récepteur aux androgènes, des essais de traitements ont été réalisés. Les premiers résultats préliminaires semblent indiquer que les cellules TM3 ne répondent pas ou peu au stimulus hormonal. Cependant, des tests de prétraitement par la testostérone seraient à envisager afin d'en étudier les conséquences sur le cycle viral.

Ce modèle d'infection non lytique reste cependant un modèle intéressant pouvant être utilisé afin d'étudier les relations hôte-pathogène et pouvant aider à comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance de l'EAV.

Mots-Clés

Artérite Virale Équine, persistance virale, cheval, cellules de Leydig, cellules TM3, immunité innée, testostérone

Development and characterization of a non-lytic infection model of Leydig cells infected with Equine Arteritis Virus

Equine Arteritis Virus (EAV) is a positive-strand RNA virus, which belongs to the *Arteriviridae* family, in the *Nidovirales* order. It is an equid specific virus that can be transmitted by respiratory and venereal routes. During primary infection, EAV can induce flu-like clinical signs, but worse, it may also cause the abortion of pregnant mares and newborn foal death. EAV is therefore a main economic challenge for the horse industry. Following primary infection, this virus is able to persist in the reproductive tract of some stallions. The mechanisms of this persistence remain unknown.

During this thesis, the first *in vitro* model of an EAV non-lytic infection of a male reproductive tract cell line has been developed. EAV infection of these Leydig cells induced the expression of numerous innate immune genes including those coding for pro-inflammatory cytokines and chemokines, which could recruit innate immune cells to testicles and which could explain the orchitis observed in some stallions during primary infection.

For persistently infected stallions, castration and anti-GnRH treatments can suppress EAV persistence, suggesting an involvement of testosterone in the virus persistence. Since TM3 cells express the androgen receptor, treatment trials have been performed. The first preliminary results suggest TM3 cells do not respond to the hormonal stimulus, or only a little. However, pretreatment trials should be realized to study the consequences on the viral cycle.

Nevertheless, this non-lytic infection model is still an interesting model that can be used to study the host-pathogen relationship and that could help understanding the mechanisms involved in EAV persistence.

Keywords:

Equine Arteritis Virus, viral persistence, horse, Leydig cells, TM3 cells, innate immunity, testosterone