

Rapport de stage effectué au sein du : CIRAD UMR ASTRE Campus international de Baillarguet 34398 Montpellier Cedex 5, France

Etude in vitro de l'infection des monocytes, cellules dendritiques et macrophages de chèvre par le virus de la peste des petits ruminants

Universités de Montpellier 2^{ème} année de Master Interactions Microorganismes Hôtes et Environnement (IMHE)

UE HMBA403 : Stage M2 IMHE en laboratoire

Année 2020-2021

Auteur :

Responsable du stage :

Encadrant :

Vincent LASSERRE

Arnaud BATAILLE

Roger-Junior ELOIFLIN

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier Nathalie VACHIERY, directrice de l'Unité Mixte de Recherche ASTRE du Cirad, pour m'avoir accueilli au sein de son unité.

Je tiens particulièrement à remercier Arnaud BATAILLE et Roger-Junior ELOIFLIN pour m'avoir permis d'effectuer ce stage sous leur direction, pour m'avoir apporté de nombreuses connaissances scientifiques et pour leurs encadrements exemplaires notamment lors de la rédaction du rapport.

Merci Roger pour ton investissement dans l'encadrement, et pour les nombreuses fois où tu m'as aidé. Je te remercie aussi pour ta bienveillance, ta patience, et pour tous les précieux conseils lors des manipulations en laboratoires. De même, j'ai fortement apprécié les nombreuses fois où nous avons joué au basket en dehors du laboratoire.

De plus, je remercie Phillipe TOTTE pour sa gentillesse et son aide apportée sur la partie cytométrie et immunologie du rapport.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire P2 et P3 du Cirad, pour leur accueil et pour leur bienveillance. Je remercie particulièrement les stagiaires et les thésards du laboratoire (notamment Florian TARAVEAU, Paola JUBAN, Alexandre VETTOR, Léa JAILLOT et Maxime PRAT) pour leur sympathie, pour les nombreux repas partagés ensemble au Cirad et pour les sorties en dehors du laboratoire.

Je souhaite aussi remercier mes collègues du Master IMHE, particulièrement Amélie BLANCHOT, Maud LAFITTE et Florian RACHENNE avec qui j'ai pu régulièrement discuter. Les revoir lors de mes congés m'a fait énormément de bien au moral. Merci à Jordan QUELLEC, également stagiaire à l'unité ASTRE, avec qui j'ai pu souvent décompresser au laboratoire et en dehors, notamment au basket. De plus, je remercie l'équipe pédagogique du Master IMHE pour les connaissances qu'ils m'ont apporté et qui m'ont été très utiles pour mon stage. Je remercie notamment les responsables du Master Anne-Sophie GOSSELIN-GRENET et Alain GIVAUDAN.

Pour finir, je tiens particulièrement à remercier mon père et ma mère pour leur soutien infaillible, et pour leur présence en cas de problèmes émotionnels ou matériels. Je remercie également ma petite sœur, mon frère et ma famille pour leur soutien émotionnel. De plus, je remercie mes amis (Loïc MAUGERE, Lilyan DANTIER, Benjamin VEZZANI, Quentin MARECAT, Guillaume ACCARIES et Clara DI MARCANTONIO) qui m'ont aidé à décompresser quand j'en avais besoin.

Table des matières

1) Introduction
1.1 – Contexte générale de la peste des petits ruminants1
1.2 – Structure et réplication du virus de la peste des petits ruminants2
1.3 – Interaction entre le virus de la peste des petits ruminants et le système immunitaire 3
1.4 – Modèles cellulaires : monocytes, cellules dendritiques et macrophages4
1.5 – Problématique et objectifs du stage
2) Matériels et méthodes
2.1 – Souches virales
2.2 – Extraction des PBMCs et isolement des monocytes
2.3 – Différenciation des monocytes 7
2.4 – Marqueurs cellulaires des monocytes (CD14+) et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs)
2.5 – Infection des monocytes et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs)9
3) Résultats
3.1 – Rendement de l'extraction des PBMCs et de l'isolation des monocytes CD14 10
3.2 – Production de cytokine et différenciation morphologique des MoDCs et MoMs10
3.3 – Identification des marqueurs cellulaires des monocytes de chèvre et leurs dérivés (MoDCs et MoMs)
3.4 – Infection des monocytes de chèvre et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs) par le PPRV12
3.5 – Etude des surnageants de culture des monocytes et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs)14
4) Discussion et perspectives

Annexes	
D / f /	24
References bibliographiques	

Liste des tableaux et figures

Figure 1 : Carte de l'Organisme mondiale de la santé animale (OIE) du nombre d'années de présence de la peste des petits ruminants par pays entre 2005 et juillet 2018

Figure 2 : Schéma de la circulation du virus de la peste des petits ruminants chez ses hôtes

Figure 3 : Schéma de la structure et du cycle de réplication du virus de la peste des petits ruminant

Figure 4 : Schéma de l'organisation du génome du virus de la peste des petits ruminants (PPRV)

Figure 5 : Schéma de l'entrée du virus de la peste des petits ruminants (PPRV) dans le système respiratoire par l'intermédiaire des cellules immunitaires

Figure 6 : Schéma de l'excrétion du virus de la peste des petits ruminants (PPRV) dans le système respiratoire ou digestif par l'intermédiaire des cellules épithéliales

Figure 7 : Schéma de la voie de signalisation immunitaire dans les PBMCs infectés par le PPRV

Figure 8 : Schéma des sous-population cellulaires dans les cellules mononuclées du sang périphérique humain

Figure 9 : Schéma de la différenciation des monocytes en macrophages et cellules dendritiques

Figure 10 : Schéma d'une plaque de titrage pour les souches virales du virus de la peste des petits ruminants

Figure 11 : Schéma de l'extraction des PBMCs, de l'isolement des monocytes CD14+ et de la différenciation des monocytes

Figure 12 : Schéma des marqueurs cellulaires étudiés pour les monocytes de chèvre et leurs dérivés : macrophages dérivés de monocytes (MoMs) et cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs)

Figure 13 : Schéma du marquage par des anticorps des marqueurs cellulaires et du marquage intracellulaire par des anticorps anti-NPPRV pour l'analyse par cytométrie en flux

Figure 14 : Rendements en PBMCs et en monocytes (CD14+)

Figure 15 : Analyses par cytométrie en flux de la morphologie des monocytes et de leurs dérivés MoDCs et MoMs

Figure 16 : Expression de différents marqueurs détectés par cytométrie à la surface des monocytes de chèvre et leurs dérivés (MoMs et MoDCs)

Liste des tableaux et figures

Figure 17 : Détection de la protéine N du virus de la peste des petits ruminants (NPPRV) mesuré par cytométrie en flux dans les monocytes de chèvre et leurs dérivés (MoMs et MoDCs) infectés par différentes souches de PPRV

Figure 18 : Etude des différentes sous-populations (CD14 et SLAMF9) de monocytes au cours du temps et de l'infection par les souches de PPRV

Figure 19 : Titres viraux (TCID50/ml) moyens pour les surnageants des monocytes, MoDCs et MoMs infectés par le virus de la peste des petits ruminants

Figure 20 : Schéma des marqueurs cellulaires pour les monocytes de chèvre et leurs dérivés : macrophages dérivés de monocytes (MoMs) et cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs)

Figure 21 : Hypothèse sur le mécanisme d'infection des macrophages par les différentes souches de PPRV dans le système respiratoire

Tableau 1 : Profils d'infection des monocytes, des MoDCs et des MoMs, par les différentes souches de PPRV

Liste des abréviations

- PPR : peste des petits ruminants
- PPRV : virus de la peste des petits ruminants
- NPPRV : protéine N du virus de la peste des petits ruminants
- OIE : Organisme international des épizooties (Organisme mondial de la santé animale)
- FAO : Food and agriculture organisation
- SLAM : Signaling lymphocytic activation molecule
- IFN : interféron
- ISG : gène stimulé par les interférons
- IFIT : protéine induite par les interférons
- IRF : facteur de régulation des interférons
- DC : cellule dendritique
- MoDCs : cellules dendritiques dérivées de monocytes
- MoMs : macrophages dérivés de monocytes
- VA : souche vaccinale Nigeria 75/1 de la peste des petits ruminants
- MA08 : souche fortement virulente Maroc 2008 de la peste des petits ruminants
- CI89 : souche faiblement virulente Côte d'Ivoire 1989 de la peste des petits ruminants
- TCID50 : 50% tissue culture infective dose
- ECP : effet cytopathique
- PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique
- IL : interleukine
- FSC : Forward Scatter
- SSC : Side Scatter
- MOI : multiplicité d'infection
- Hpi : heure post-infection
- GM-CSF : facteur de croissance des granulocytes et des macrophages
- M-CSF : facteur de croissance des macrophages
- CPA : cellules présentatrices d'antigènes



Figure 1 : Carte de l'Organisme mondial de la santé animale (OIE) du nombre d'années de présence de la peste des petits ruminants par pays entre 2005 et juillet 2018



Figure 2 : Schéma de la circulation du virus de la peste des petits ruminants chez ses hôtes

1) Introduction

1.1 - Contexte général de la peste des petits ruminants

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie infectieuse virale touchant principalement les petits ruminants tels que les chèvres et les moutons d'élevages. Les bovins, les camélidés, les buffles, les suidés et certaines espèces d'Artiodactyles peuvent être également infectés par le virus de la PPR (**Figure 1**) (1,2). La PPR cause des enzooties (épidémies animales) en Afrique, au Moyen-Orient et en Asie (**Figure 2**). Des cas récents ont aussi été rapportés en Europe, notamment en Bulgarie, et la maladie progresse dans de nombreux pays (3). Cette maladie est décrite pour la première fois en 1942 en Côte d'Ivoire et est connue depuis longtemps en Afrique sous le nom de Kata (4).

La PPR est causée par le virus de la peste des petits ruminants (PPRV), un virus de la famille des *Paramyxoviridae* et du genre des *Morbillivirus*. Le genre des *Morbillivirus* comprend également les virus de la rougeole et de la peste bovine. Les *Morbillivirus* sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire et à polarité négative. Il existe un seul sérotype du PPRV, mais les différentes souches virales ont pu être classées en lignées génétiques (5). La classification des lignées est faite à partir d'une séquence partielle du gène N du virus. Cette méthode est précise et permet de classer les isolats. De manière historique, il existe quatre lignées: les lignées I à II en Afrique de l'Ouest, la lignée III en Afrique de l'Est et la lignée IV au Moyen-Orient et en Asie. La lignée IV est maintenant retrouvée à travers l'Afrique, dans des zones endémiques de la PPR, remplaçant ainsi les autres lignées (6).

La PPR est une maladie très contagieuse avec des taux de morbidité et de mortalité très élevés. La mortalité peut atteindre 80% au sein des populations sensibles. Les contaminations se font par contact entre individus malades et individus sains via des sécrétions nasales, lacrymales ou par aérosols (7). Après 2 à 7 jours d'incubation, les premiers symptômes apparaissent (4).Les principaux symptômes de la PPR sont la fièvre, l'anorexie, la diarrhée, les écoulements oculaires et nasaux, les lésions nasales et orales, et la baisse du taux de globules blancs. Tous ces symptômes associés à une profonde immunosuppression mènent à la mort de l'animal infecté 4 à 6 jours après le début de la fièvre. Les animaux qui guérissent, développent une immunité à vie (1). La susceptibilité des différents hôtes de la PPR varie grandement selon les races et selon la souche virale à l'origine de l'infection. Les raisons de cette variabilité, notamment au niveau des mécanismes d'interaction hôtes-PPRV restent peu comprises (8).

Les méthodes de diagnostic les plus couramment utilisées sont les tests sérologiques (ELISA) pour détecter des antigènes viraux et les tests moléculaires (PCR, RT-PCR et RT-qPCR) pour détecter les ARN viraux (9). La maladie a de graves impacts sur l'économie et la sécurité alimentaire en Afrique, au Moyen-Orient et en Asie, des régions en développement où l'élevage de petits ruminants est un moyen de subsistance important pour les populations (10). La FAO (Food and agriculture organisation) estime le coût annuel des pertes liées à la PPR à 1,4 et 2,1 milliards de dollars. Du fait des impacts de la PPR, l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) et la FAO ont lancé une campagne globale pour éradiquer la PPR pour 2030 (67).



Figure 3 : Schéma de la structure et du cycle de réplication du virus de la peste des petits ruminants

ER : réticulum endoplasmique

Source : (1)



Le génome du virus de la PPR est une molécule d'ARN non-segmenté, simple brin et de polarité négative. Le génome du virus de la PPR code pour 6 protéines structurales et 2 protéines non structurales. Les protéines structurales sont : la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la protéine matrice M, la protéine de fusion F, la protéine d'hémagglutinine H et la polymérase L. Les protéines non structurales sont les protéines V et C. L'extrémité 3' possède le promoteur du génome (GP) et l'extrémité 5', le promoteur de l'anti-génome (AGP) dans le sens négatif de l'ARN.

Source : (1)

Cette campagne prend exemple sur l'éradication de la peste bovine en 2011, qui avec la variole, sont les seules maladies éradiquées par l'Homme. Cette campagne se base sur l'utilisation de vaccins vivants atténués et efficaces contre la PPR. Les deux vaccins les plus utilisés sont les vaccins Nigéria 75/1 et Sungri 96 (1).

1.2 - Structure et réplication du virus de la peste des petits ruminants

Le virus de la PPR est un virus enveloppé d'une taille de 400 à 500 nm possédant un génome à ARN simple brin de polarité négative de 15,948 nucléotides. Ce génome se compose de 6 unités transcriptionnelles codant pour six protéines structurales : une nucléoprotéine (N), une phosphoprotéine (P), une protéine de matrice (M), une glycoprotéine de fusion (F), une glycoprotéine d'hémagglutinine (H) et une large protéine (L) (Figure 3 et 4). Les protéines F et H forment les spicules recouvrant l'enveloppe viral. La protéine H est une glycoprotéine de surface qui permet l'attachement du virus à la membrane cellulaire par l'interaction avec des récepteurs membranaires. Ces récepteurs membranaires sont les SLAM/CD150 (Signaling lymphocytic activation molecule) et principalement SLAMF1. Nectin-4 et CD46 sont également des récepteurs membranaires du PPRV (1,8,11). Après l'attachement du virus, la protéine F entraîne la fusion avec la membrane cellulaire et permet la libération de la capside dans le cytoplasme. La capside est formée de la nucléoprotéine N qui enferme l'ARN viral. La protéine N est en combinaison avec la protéine L, une ARN polymérase ARN dépendante L (RdRp), et avec la phosphoprotéine cofacteur P. Ces trois protéines forment le complexe ribonucléoprotéique (RNP) de forme hélicoïdale qui protège l'ARN viral des ARNases de l'hôte. L'ARN polymérase viral L associé au cofacteur P, permet la synthèse des ARN viraux messagers et des ARN complémentaires (ARNc) dans le cytoplasme. Les ARNc (sens positif) permettent de générer des copies de l'ARN viral (sens négatif) par la fixation de l'ARN polymérase viral L au promoteur anti-génome de l'ARNc. Les ARN viraux messagers sont traduits par la machinerie cellulaire pour produire les protéines virales (1). À la suite de la production des protéines virales, le complexe ribonucléoprotéique se forme autour des ARNs viraux. La protéine matrice M amène les RNPs et les glycoprotéines virales à la membrane cellulaire, et entraine la formation et le bourgeonnement des virions. Deux protéines supplémentaires non-structurales C et V sont générées par le cadre de lecture ouvert (ORF) de l'unité transcriptionnelle P, grâce à l'utilisation d'un codon start alternatif et grâce à de l'édition d'ARN (1). Les protéines C et V ont un rôle dans l'échappement immunitaire du PPRV, notamment en inhibant la voie des interférons (12,13). Le cycle de vie de PPRV en culture cellulaire est de 6-7h(1)

Les cellules immunitaires et les cellules épithéliales sont les principales cibles des *Morbillivirus*. Une fois infectées, les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages, …) transportent les particules virales jusqu'aux organes lymphoïdes proximaux (ganglions lymphatiques et amygdales) où se déroule une réplication virale extensive (**Figure 5**) (4). Les cellules infectées migrent dans la circulation sanguine, induisant une virémie et la propagation du virus aux organes et aux tissus. L'infection des cellules épithéliales se produit lorsque la virémie est établie. Le récepteur Nectin-4 joue un rôle crucial dans la dissémination et l'excrétion du virus (**Figure 6**) (1,14).



Figure 5 : Schéma de l'entrée du virus de la peste des petits ruminants (PPRV) dans le système respiratoire par l'intermédiaire des cellules immunitaires

SLAMF1 : récepteur d'entrée du virus de la PPR



Figure 6 : Schéma de l'excrétion du virus de la peste des petits ruminants (PPRV) dans le système respiratoire ou digestif par l'intermédiaire des cellules épithéliales

Nectin-4 : récepteur du virus de la PPR sur les cellules épithéliales

Ce récepteur, exprimé à la face basolatérale des cellules épithéliales participe à la sortie du virus dans le mucus. Une fois dans le mucus, les particules virales sont transmises par aérosols, par sécrétions nasales ou lacrymales, et par les matières fécales (7).

1.3 - Interaction entre le virus de la peste des petits ruminants et le système immunitaire

Les réponses immunitaires antivirales sont le fait de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, les deux immunités agissant de concert (15). L'immunité innée consiste principalement en la reconnaissance par des récepteurs (PRR) de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) (4). Les principaux PRR pour la reconnaissance du PPRV sont des RLRs (récepteur de type RIG-1) comme RIG-1/MDA-5, des TLRs (Toll-like récepteur) comme les TLR 3/7/8 et des NLRs (NOD-like récepteur) comme le NLRP3 (4,16). La reconnaissance du virus par les PRRs entraine une cascade de signalisation intracellulaire suivi de la transcription de cytokines antivirales qui conduit à un état antiviral dans la cellule. Les principales cytokines antivirales sont les interférons de type I et II (IFN). Les IFNs de type I (alpha et bêta) sont produits à la suite d'une réponse directe à l'infection virale par les cellules infectées. Les IFNs de type I entrainent la transcription des ISGs (gènes stimulés par les interférons) via la voie JACKs/STATs. Les ISGs assurent par leur action un état antiviral dans les cellules. Les IFNs de type II (gamma) sont sécrétés par les cellules T et NK entrainant un état antiviral. Les IFNs de type II stimulent l'activation des macrophages. Les IFNs ont également un rôle important dans la modulation de l'immunité adaptative (4,17). L'infection par le PPRV induit une forte réponse IFN-I (principalement IFNalpha) précoce (18,19). Chez des chèvres infectées par le PPRV, les gènes des ISGs, des IFITs (protéine induite par les interférons) et des RIG-1, sont régulés positivement pour les lymphocytes et négativement pour les monocytes. L'ISG15 et l'IRF7 (facteur de régulation des interférons) ont été identifiés comme des régulateurs clés activés lors de l'infection par le PPRV (19-22). Le PPRV peut inhiber la voie de signalisation des interférons. Les protéines non structurales V et C du PPRV bloquent l'action des IFNs de type I et II (4). La liaison de la protéine virale V aux récepteurs RIG-I bloque l'induction des IFN-bêta (13). La protéine virale N inhibe également les IFN-bêta et les ISGs. La protéine N cible le IRF3 (facteur 3 de régulation de l'interféron), une molécule clé pour l'induction des IFNs de type I. Les protéines virales V, N et P peuvent bloquer la voie de signalisation JAK-STAT, inhibant la voie de synthèse des interférons (23). Le PPRV entraine également une régulation positive de l'exoribonucléase TREX1 qui dégrade l'ARN simple brin. L'ARN simple brin est reconnu par les récepteurs RIG1 entrainant une forte réponse interféron (Figure 7) (21,22).

L'immunité adaptative, plus tardive, consiste principalement en l'action des lymphocytes. Elle est divisée en deux réponses : la réponse à médiation cellulaire avec les lymphocytes T CD8 cytotoxiques et la réponse humorale avec les lymphocytes B, des cellules présentatrices d'antigènes et productrices d'anticorps. Les lymphocytes CD4 (T helper (Th)) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) en présence de cytokines vont orienter la réponse immunitaire. La protéine N du virus entraine une forte réponse à médiation cellulaire (4). A l'issue de la vaccination pour la PPR, les différenciations cellulaires Th1, Th2 et Th17 et les voies de signalisation du récepteur T et des récepteurs NOD-like sont activées chez les lymphocytes CD4 et CD8.



Figure 7 : Schéma de la voie de signalisation immunitaire dans les PBMCs infectés par le PPRV

Le PPRV est lymphotropique et infecte les PBMCs via le récepteur SLAM. Le virus entre dans la cellule et perd son enveloppe, relâchant l'ARN viral dans le cytoplasme. Le virus peut également rentrer par les endosomes où l'ARN viral y est relâché. L'ARN viral est ensuite répliqué. L'excès d'ARN non répliqué est découpé par l'exoribonucléase TREX1. L'ARN viral en excès peut entrainer une forte réponse interférons de type I via le récepteur RIG-1. Lors de l'infection, TREXI est significativement régulé à la hausse, ceci participant à l'inhibition de la réponse interféron de type I dans les PBMCs. L'ARN viral dans les endosomes va se lier au TLRs (TLR – 3, 7 et 8) et va activer des facteurs de régulation des interférons (IRFs – 3, 7 et 9) avec l'aide de l'adaptateur TRIM14/21. Activés et phosphorylés, les IRFs sont transloqués dans le noyau et se lient à des ISRE (interferon-stimulated response element), entrainant l'activation des ISGs (interferon-stimulated gene). Les ISGs avec d'autres molécules immunitaires entrainent une forte réponse antivirale dans les PBMCs infectées par le PPRV. Les gènes régulés à la hausse sont indiqués par des flèches pointant vers le haut, les gènes régulés à la baisse avec des flèches pointant vers le bas.

PBMCs : cellules mononuclées sanguines périphériques

PPRV : virus de la peste des petits ruminants

La vaccination entraine également l'activation des récepteurs de lectine de type C (CLRs) chez les cellules T CD8 et CD4. Les CLRs sont impliqués dans la reconnaissance et l'induction de l'immunité adaptative aux virus (19). Le PPRV est lymphotropique et l'infection entraine une baisse importante du nombres de globules blancs avec notamment une forte baisse des lymphocytes T CD4 (1). L'infection entraine une immunodépression qui peut être due à la faculté du PPRV d'entrainer l'apoptose chez les lymphocytes (24). Les glycoprotéines H et F de l'enveloppe du PPRV induisent une protection contre la réponse humorale en neutralisant les anticorps (4).

1.4 - Modèles cellulaires : monocytes, cellules dendritiques et macrophages

L'interaction entre les monocytes, les cellules dendritiques (DC) et les macrophages, et le PPRV, est encore mal connue. Ces cellules sentinelles sont la première ligne de défense du système immunitaire contre l'infection virale. Les monocytes sont des cellules mononuclées du sang périphérique représentant 10% des leucocytes circulants chez l'humain (Figure 8) (25). Ce sont des cellules de l'immunité innée, rapidement mobilisées en grand nombre sur les sites inflammatoires. Les monocytes sont divisés en plusieurs sous-populations, avec une majorité de monocytes dit « classiques » et une minorité de monocytes dit « non-classiques ». Les souspopulations de monocytes s'identifient par des différences d'expression de marqueurs de surfaces. Ces marqueurs variant selon les espèces (CD14 et CD16 pour l'Homme) (25). Les monocytes classiques sont des cellules transitoires avec un potentiel de différenciation. Ces cellules, en présence de cytokines, peuvent se différencier en macrophages (MoMs) ou en cellules dendritiques (MoDCs) (Figure 9). Elles peuvent migrer vers les tissus, et servir de réservoir pour repeupler les DC et macrophages résidents. En conditions pathologiques, les monocytes classiques peuvent avoir une activité pro ou anti-inflammatoire (notamment avec une production des cytokines TNF-alpha et IL-10), être des cellules présentatrices d'antigènes et participer à la réparation tissulaire. Les monocytes non classiques ont un rôle de surveillance et de maintien de l'intégrité des cellules endothéliales. Ces cellules participent au recrutement et à l'activation des cellules NK. Chez la souris, une sous-population exprimant le marqueur CD209a possède un plus grand potentiel pour se différencier en MoDCs. Les monocytes classiques ont une durée de vie courte d'environ 24h tandis que les non classiques peuvent survivre entre 2 et 7 jours (26).

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée, caractérisés par de fortes dispositions pour la phagocytose (27). Ce sont également des cellules présentatrices d'antigènes, qui produisent des cytokines pro ou anti-inflammatoires. Les macrophages peuvent attirer et activer les cellules immunitaires comme les cellules T. Ces cellules ont également un rôle clé dans la réparation des tissus (26). Les macrophages ont des phénotypes et des noms variés selon les tissus, avec notamment les cellules Kupffer, les cellules Hofbauer, les macrophages alvéolaires et les microglies. Une grande partie des macrophages résidents sont d'origine embryonnaire (28). L'autre partie est issue des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (**Figure 8**), et de la différenciation des monocytes (MoMs). Les macrophages activés sont séparés en deux types, les M1 et les M2. Les macrophages inactivés étant les M0. Les M1 ont plus d'affinités pour la phagocytose ainsi qu'une forte activité pro-inflammatoire. Ils entrainent également une forte réponse Th1.



Figure 8 : Schéma des sous-populations cellulaires dans les cellules mononuclées du sang périphérique humain

Source : (29)



Figure 9 : Schéma de la différenciation des monocytes en macrophages et cellules dendritiques

La réponse M1 est notamment favorisée lors d'une infection virale. Les M2 modulent la réponse Th2 avec la production de médiateurs anti-inflammatoires, et ont plus d'affinités pour l'endocytose. In vivo, il peut exister des hybrides M1/M2 et les macrophages peuvent également switcher du phénotype M1 au M2 selon l'environnement. Le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) induit la différenciation des monocytes en MoMs (30). Les MoMs partagent les fonctions des macrophages résidants classiques, mais ce sont de plus gros producteurs de médiateurs pro-inflammatoires (26).

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules sentinelles spécialisées dans le traitement et la présentation d'antigène. Les DCs immatures ont une forte activité de phagocytose tandis que les DCs matures ont une forte capacité de production de cytokines et de présentation antigénique (30). Elles possèdent des expansions cellulaires (dendrites) qui permettent de couvrir une grande surface pour détecter les antigènes. Après la phagocytose d'un pathogène, un antigène va être associer au MHC II, pour permettre sa présentation. Les DCs initient et régulent la réponse immunitaire adaptative, notamment en orientant la polarisation des lymphocytes T CD4 et en activant les lymphocytes T naïf. Les DCs sont des cellules hautement mobiles, qui peuvent migrer des tissus aux organes lymphatiques. Ils existent différentes populations de DC. Les DC conventionnelles (cDC) sont issues de la lignée myéloïde (Figure 8), avec les cDC1 et les cDC2. Les cDC1 sont principalement orientées pour la présentation croisée d'antigène pour activer les cellules T CD8 et les cDC2 sont spécialisées dans l'activation des cellules T CD4 (31). Les DC plasmacytoïdes (pDC) sont issues de la lignée myéloïde, et ont la particularité d'avoir une plus grande longévité et d'être spécialisées dans la réponse antivirale en produisant massivement des interférons de type I. Les DCs de Langerhans sont les seules cellules professionnelles de présentation d'antigènes dans l'épiderme (32). Les DCs dérivées des monocytes (MoDCs) ou DCs inflammatoires ont des fonctions similaires aux cDC2 mais sont de plus grosses productrices de médiateurs proinflammatoires (26). Le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et l'interleukine-4 (IL-4) induisent la différenciation des monocytes en MoDCs (33).

1.5 - Problématique et objectifs du stage

Au cours de ce stage, l'objectif principal sera d'étudier l'infection des monocytes, des cellules dendritiques (MoDCs) et des macrophages (MoMs), par différentes souches du virus de la peste des petits ruminants. Les souches Nigeria 75/1, Côte d'Ivoire 1989 et Maroc 2008 ayant démontré différents niveaux de virulence in vivo sur certaines races de chèvre, permettront d'établir différents profils d'infections (34). Ces profils d'infections pourraient nous éclairer sur la permissivité des cellules aux différentes souches virales ainsi qu'améliorer la compréhension de la virulence du virus de la PPR. Pour répondre à cette problématique, dans un premier temps, les monocytes de chèvre ont été différenciés en MoDCs et en MoMs à l'aide de cytokines recombinantes bovines. La morphologie et l'expression de marqueurs cellulaires de surface ont été étudiées pour confirmer la différenciation des monocytes.

Ensuite, ces cellules ont été infectées avec les différentes souches du virus de la PPR impliquées dans cette étude. Le niveau d'infection des cellules par les souches de PPRV, la capacité de relâchement des virus et la modulation de l'expression des marqueurs cellulaires de surface ont été mesurées pour chaque type de cellules.



Figure 10 : Schéma d'une plaque de titrage pour les souches virales du virus de la peste des petits <u>ruminants</u>

ECP : effets cytopathiques

NI75 : souche vaccinale Nigeria 75/1

MA08 et CI89 : souche fortement virulente Maroc 2008 et faiblement virulente Côte d'Ivoire 1989

2) Matériels et méthodes

2.1 - Souches virales

Au cours de cette étude, trois souches du virus de la peste des petits ruminants (PPRV) ont été étudiées.

- La souche vaccinale Nigeria 75/1 (VA). Il s'agit d'un vaccin vivant atténué obtenu après 75 passages de la souche sauvage sur des cellules Vero. La souche sauvage utilisée pour l'atténuation a été isolée sur des moutons et des chèvres malades pendant une épidémie de PPR au Nigeria en 1975 (35). Cette souche appartient à la lignée II du PPRV (36). Ce vaccin est le plus largement utilisé dans les campagnes de vaccination à travers le monde.
- La souche fortement virulente Maroc 2008 (MA08), isolée sur une chèvre Alpine souffrant de signe clinique grave, pendant l'épidémie de PPR au Maroc en 2008. Cette souche appartient à la lignée IV du PPRV (37).
- La souche Côte d'Ivoire 1989 (CI89), faiblement virulente sur certaines races de chèvre, isolée d'une chèvre infectée en Côte d'Ivoire en 1989. Cette souche appartient à la lignée I du PPRV (38).

Les différentes souches virales ont été produites par culture cellulaire sur des cellules Vero dans du milieu complet DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les souches virales utilisées pour la production, proviennent du Cirad de Montpellier. Les productions virales ont ensuite été titrées en calculant la dose infectieuse médiane en culture tissulaire (TCID50) par la méthode de Spearman-Karber. La TCID50 quantifie la quantité de virus nécessaire pour avoir des effets cytopathiques (ECP) dans 50 % des cellules ou des cultures infectées. Pour ce faire, des plaques de 96 puits contenant 2.10⁴ cellules Vero par puits sont inoculées avec plusieurs dilutions des solutions virales à titrer. Après un temps d'incubation, la présence d'ECP est notée pour chaque dilution (**Figure 10**). En utilisant le nombre de puits positifs (ECP positifs), la TCID50/ml est calculé à l'aide d'un calculateur fourni par ©Marco Binder (Dept. Infectious Diseases, Molecular Virology, Heidelberg University). Ce calculateur utilise l'algorithme de Spearman & Kärber (39). La confirmation du titre viral est faite par immunofluorescence. Cette immunofluorescence permet de révéler, à l'aide d'un marquage de la protéine N viral, la présence ou l'absence d'infection. Les plaques de titrage sont dans un premier temps fixées à l'aide d'une solution d'acétone à 80% pendant 30 min à -20°C. Ensuite, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et marquées avec l'anticorps anti-NPPRV couplé au TRITC (Clone 38-4, Cirad, Montpellier) pendant 30 min à +37°C avant révélation au microscope à fluorescence.

2.2 - Extraction des PBMCs et isolement des monocytes

Au cours de cette étude, des animaux de l'animalerie du laboratoire ASTRE (CIRAD, Campus baillarguet) ont été utilisés. Il s'agit de chèvres domestiques (*Capra aegagrus hircus*) de la race Alpine (n =3) et Saanen (n=1). Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) sont extraites, de manière hebdomadaire, à partir du sang des animaux. Les PBMCs sont extraites du sang total hépariné par la méthode Ficoll-Hypaque (40).



Figure 11 : Schéma de l'extraction des PBMCs, de l'isolement des monocytes CD14+ et de la différenciation des monocytes

MoDCs : cellules dendritiques dérivées de monocytes MoMs : macrophages dérivés de monocytes PBMCs : cellules mononucléés sanguines périphériques RBCs : érythrocytes (red blood cell) Cytokines : GM-SCF, IL-4 et M-CSF PBS : tampon phosphate salin

Source : Roger-Junior ELOIFLIN

A l'issue de cette centrifugation, les PBMCs sont récupérées à l'interface Ficoll-plasma (**Figure 11**) et sont ensuite comptées à l'aide d'une cellule de Malassez et du bleue de Trypan. Ces cellules sont utilisées pour l'isolation des monocytes. Le marqueur cellulaire CD14 a été utilisé pour isoler les monocytes par séparation magnétique à partir des PBMCs (38). Dans un premier temps, les cellules fraichement isolées sont marquées à l'aide de microbilles magnétiques CD14 (CD14 MicroBeads UltraPure). Ensuite, elles sont passées à travers une colonne de sélection positive (MACS® LS Column) sur laquelle les cellules positives sont retenues puis récupérées par pression avec un piston, après plusieurs lavages de la colonne. Les monocytes CD14+ sont comptées et mise en culture pour être infectées ou différenciées en cellules dendritiques et en macrophages (**Figure 11**).

2.3 - Différenciation des monocytes

Pour permettre leur différenciation, les monocytes sont cultivés dans un milieu de culture (RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) + 10% SVF) supplémenté de différentes cytokines. En présence de cytokines, les monocytes conventionnels se différencient en cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Les cytokines IL4 et GM-CSF sont utilisées pour la différenciation des monocytes en MoDCs (cellules dendritiques dérivées de monocytes) tandis que le M-CSF est utilisé pour obtenir des MoMs (macrophages dérivés de monocytes). Les cytokines recombinantes bovines IL-4, GM-CSF et M-CSF ont été produites par transfection transitoire des cellules HEK-293T cultivées dans du milieu DMEM avec 10% de SVF. La transfection est faite de manière chimique avec le kit de transfection Calcium Phosphate Transfection Kit (Invitrogen). L'ion Ca2+ se lie à l'ADN et masque la polarité négative de l'ADN pour lui permettre de rentrer dans les cellules (43). Les plasmides codant pour les cytokines d'intérêts ont été fournis par l'Institut de Virologie et d'Immunologie de Berne (IVI, Bern, Suisse). Il s'agit des plasmides suivants : pEAK8His_poMCSF, pEAK8His_pobGMCSF et pEAK8His_poIL4. L'ADN est mélangé directement avec une solution concentrée de CaCl2, qui est ensuite ajouté par goutte à un tampon de phosphate pour former un précipité fin. Le précipité fin est ajouté sur les cellules HEK-293T pour permettre la transfection. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 4 jours et ensuite les surnageants contenant les cytokines sont récupérés.

Les cytokines produites ont été quantifiées à l'aide de kits ELISA commerciaux : ELISA Bovine IL-4 (Sigma-Aldrich) et ELISA Bovine GM-CSF Do-It-Yourself (Kingfisher Biotech). Les kits ELISA utilisés se basent sur la technique de l'ELISA sandwich indirect qui consiste à bloquer la protéine à quantifier, entre un anticorps de capture et un anticorps de détection. Les plaques ELISA sont pré-coatées ou ont été coatées avec l'anticorps de capture. Les échantillons sont ensuite rajoutés dans les puits. Après plusieurs lavages, l'anticorps de détection est rajouté dans les puits. L'anticorps de détection biotinylé, en présence de streptavidine couplé à la peroxydase de raifort (HRP), permet avec le substrat TMB, la révélation de la détection. L'intensité de cette détection est mesurée avec l'aide d'un lecteur de microplaque. Des courbes standards ont été construites avec l'aide de gamme de solutions de concentrations connues des protéines étudiées (**Annexe 2**). Les MoDCs ont été obtenues en rajoutant de l'IL-4 recombinant bovin (787 pg/ml) et du GM-CSF recombinant bovin (1700 pg/ml) au milieu de culture pour une dilution finale au 1/20^{ème}, après optimisation des concentrations.



Figure 12 : Schéma des marqueurs cellulaires étudiés pour les monocytes de chèvre et leurs dérivés : macrophages dérivés de monocytes (MoMs) et cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs)

Bleue : marqueurs théoriquement présents sur les cellules (par comparaison avec les humains, bovins et murins) Rouge : marqueurs théoriquement absents sur les cellules (par comparaison avec les humains, bovins et murins) Vert : marqueurs dont la présence ou l'absence sur les cellules est à étudier (présence variable selon l'espèces) Le kit ELISA de dosage du M-CSF recombinant bovin étant indisponible dans le commerce, la concentration du M-CSF produite n'a pas pu être mesurée. Pour la différenciation en MoMs, le M-CSF produit sera utilisé à la même dilution que les autres cytokines produites. Les cytokines recombinantes bovines ont été rajoutées aux milieux de culture pour permettre la différenciation des monocytes. Les cellules sont cultivées pendant 120h avec un renouvellement du milieu à 72h.

2.4 - Marqueurs cellulaires des monocytes (CD14+) et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs)

Pour discriminer les différents types cellulaires, le profil d'expression de marqueurs cellulaires a été analysé par cytométrie en flux (Figure 12) (BD FACSCanto II et logiciel FlowJo_V10). La taille et la granulosité des populations cellulaires ont été aussi mesurées par les paramètres FSC (Forward Scatter) et SSC (Side Scatter) du cytomètre. FSC correspond à la lumière diffractée mesurée en face du rayon laser du cytomètre et permet d'évaluer la taille des cellules. Le SSC correspond à la lumière diffractée mesurée sur le côté, perpendiculaire au rayon laser du cytomètre, et permet d'évaluer la granularité (complexité) des cellules. Pour identifier les marqueurs cellulaires, les cellules étudiées ont été incubées avec des anticorps primaires (IgM, IgG1 et IgG2a) ciblant différents marqueurs cellulaires, puis les cellules ont été incubées avec des anticorps secondaires, couplés avec un fluorochrome (AF488, AF647, PE-Cy7 ou FITC), ciblant les anticorps primaires sélectionnés. La présence des marqueurs cellulaires est détectée par cytométrie en flux, grâce à la présence de fluorescence émise lors de l'excitation par un laser des fluorochromes associés aux anticorps secondaires (Figure 13). Des contrôles isotypiques permettant d'évaluer les fixations non-spécifiques ont été effectués en utilisant des anticorps primaires (IgM, IgG1 et IgG2a) n'ayant aucune cible dans les cellules de chèvre. Ceci nous permettra de sélectionner nos cellules positives pour l'analyse des marqueurs. Des bloqueurs de récepteurs Fc (récepteurs cellulaires de la partie constante des anticorps) ont également été utilisés pour éviter des liaisons non-spécifiques des anticorps.

Le marqueur **CD14** a été principalement étudié pour mesurer la pureté des isolements de monocytes (CD14+), et identifier les monocytes et les macrophages (CD14+). La présence du marqueur CD14 sur les MoDCs varie selon les espèces et sera étudiée pour les chèvres (42,44–46). Le marqueur **CD6** a également été étudié pour mesurer la pureté des monocytes (CD6-). Ce marqueur est spécifique aux lymphocytes T exprimant le récepteur TCRab (CD4, CD8, NKT) et peut-être aussi retrouvé chez une sous-population de lymphocytes B. L'expression de marqueurs de la ligné myéloïde (**MHC II, CD172a et CD11c**) a aussi été étudiée pour confirmer leurs présences sur les monocytes, MoDCs et MoMs de chèvre.

- Le MHC II est une molécule présente sur les cellules présentatrice d'antigènes (CPA) dont les monocytes, les DCs, les macrophages et les lymphocytes B. Cette molécule permet la présentation des antigènes aux lymphocytes T naïf (47).
- Le CD172a ou Signal regulatory protein α (SIRPα) est un marqueur des cellules de la lignée myéloïde comme les monocytes, les DCs, les macrophages ou les granulocytes. Cette molécule participe par son interaction avec CD47 à l'inhibition de la phagocytose et au signal « don't eat me » (48).



Figure 13 : Schéma du marquage par des anticorps des marqueurs cellulaires et du marquage intracellulaire par des anticorps anti-NPPRV pour l'analyse par cytométrie en flux

NPPRV : protéine N du virus de la peste des petits ruminants

- Le **CD11c** est une intégrine exprimée entre autres chez les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages (49,50).

L'expression des marqueurs de la modulation immunitaire CD209 et CD205 a été étudiée pour discriminer les monocytes, des MoDCs et des MoDCs.

- Le CD209 ou DC-SIGN est un récepteur lectine de type C. C'est un PRR qui permet l'activation de la phagocytose via la reconnaissance de PAMPs. Le marqueur CD209 est présent sur les DCs et les macrophages. Le CD209 est également impliqué dans l'infection des cellules dendritiques par des *Morbillivirus* et est impliqué dans leurs disséminations (44,51,52).
- Le CD205 est un récepteur de l'endocytose, c'est un récepteur de reconnaissance des cellules apoptotiques et nécrotiques. Il est exprimé sur les DCs chez l'Homme. Selon les espèces, il est exprimé ou non par les monocytes. (53–55).

Le marqueur **SLAMF9** a été utilisé pour vérifier l'expression du récepteur d'entrée du PPRV sur les différents types cellulaires étudiés. Le marqueur **SLAMF9** sera utilisé car le marqueur **SLAMF1** (disponible pour la souris) réagit très faiblement chez la chèvre.

- Le **SLAMF9** est une protéine de la famille des SLAM (signaling lymphocyte activation molecule). La famille des SLAM comprend 9 récepteurs allant de SLAMF1 à SLAMF9 (56). Ce récepteur est présent sur les lymphocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et les monocytes activés (57,58).

2.5 - Infection des monocytes et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs)

Les monocytes, MoDCs et MoMs ont été infectés par les différentes souches PPRV : la souche vaccinale VA, la souche faiblement virulente CI89 et la souche fortement virulente MA08 avec une **MOI** (**multiplicité d'infection**) **de 0,1** pendant 1h à 37°C dans du milieu RPMI sans SVF. Après 1h d'infection, l'inoculum est retiré, les cellules sont lavées au PBS 1X et remises en culture dans du RPMI avec 2% de SVF. La MOI est le rapport entre le nombre de particules virales et le nombre de cellules cibles.

Les monocytes infectés ont été analysés par cytométrie en flux à 24-48-72-96 heures post-infection (hpi), et les MoDCs et MoMs à 48 hpi. La présence du virus a été détectée par marquage intracellulaire de la nucléoprotéine N du PPRV. Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA) à 4%, puis incubées dans la Saponine 0,3% contenant l'anticorps de détection de la protéine N du PPRV (NPPRV). La Saponine permet la perméabilisation des membranes cellulaires, permettant le marquage intracellulaire (**Figure 13**). Des marqueurs cellulaires (notamment CD14 et SLAMF9) ont été également étudiés pour les différentes populations cellulaires infectées par les différentes souches virales.

Les surnageants de culture (monocytes, MoMs et MoDCs) ont été récupérés à différents temps d'infection et dosés pour la présence du virus. La concentration virale a été quantifiée en calculant la TCID50/ml avec la méthode utilisée précédemment pour doser les productions virales.



A - Nombres de PBMCs extraits et de CD14+ isolés par ml de sang de chèvre.

B - Pourcentage de CD14+ isolés par rapport au nombre de PBMCs extraits.

C - Pourcentage de cellules CD14+ pour les PBMCs extraits et les fractions issues de l'isolement des CD14+

PBMCs : cellules mononucléés sanguines périphériques.

La fraction négative (CD14-) représente la fraction obtenue après les lavages de la colonne contenant les billes magnétiques CD14+.

La fraction positive (CD14+) représente la fraction obtenue après élution de cette colonne.



Figure 15 : Analyses par cytométrie en flux de la morphologie des monocytes et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs)

MoDCs : cellules dendritiques dérivées de monocytes MoMs : macrophages dérivés de monocytes

Les voltages sont identiques pour les trois expériences

3) Résultats

3.1 - Rendement de l'extraction des PBMCs et de l'isolation des monocytes CD14

Les extractions de PBMCs et les isolements de monocytes CD14+ ont permis d'obtenir en moyenne **1,3.10^6 PBMCs par ml** de sang de chèvre et **7,2.10^4 monocytes CD14+ par ml** de sang de chèvre avec un **rendement moyen en monocytes CD14+ de 5,7% (Figure 14A/B)**. La majorité des extractions de PBMCs ont été faites sur deux chèvres Alpines. Deux extractions ont été faites sur une chèvres Saanen et une troisième chèvre Alpine. La première extraction de PBMCs a servi de test et n'a pas entrainer d'isolement de CD14+.

Les PBMCs, les cellules CD14+ (fraction positive) et les cellules CD14- (fraction négative) ont été analysées par cytométrie en flux. Pour les PBMCs, ils se distinguent deux populations cellulaires de taille (FSC-A) et de granularité (SSC-A) différentes (**Annexe 1A**). Une population majoritaire de taille et de complexité inférieures (FSC-A entre 50K et 100K, SSC-A entre 0 et 50K), correspond aux lymphocytes. Et une population minoritaire, de taille et de complexité supérieures (FSC-A entre 100K et 150K, SSC-A entre 50K et 100K), correspond aux lymphocytes. Et une population minoritaire, de taille et de complexité supérieures (FSC-A entre 100K et 150K, SSC-A entre 50K et 100K), correspond aux monocytes. Après l'isolement des cellules **CD14**+, la majorité (**92,3%**) des cellules de la fraction positive expriment le marqueur CD14 correspondant à la population de monocytes (**Annexe 1B**). La fraction négative ne contient plus de cellules expriment CD14. Les cellules correspondent à la population de lymphocytes (CD14-). En moyenne, il y a **5,2% de cellules CD14**+ (monocytes) dans les PBMCs de chèvre étudiées (**Figure 14C**).

Après l'isolement des cellules CD14 (fraction positive), la pureté des monocytes (CD14+) est en moyenne de 83%. Dans la fraction négative, la majorité des monocytes (CD14+) ne sont plus présent (**Figure 14C**).

3.2 - Production de cytokine et différenciation morphologique des MoDCs et MoMs

Après 72h de culture des monocytes avec l'IL-4/GM-CSF ou avec le M-CSF, des changements morphologiques sont observés en comparaison des monocytes en culture sans cytokine (**Annexe 3**). L'allongement et la complexification des structures des cellules sont observés chez les MoDCs, avec notamment des prolongements du corps cellulaire assimilables à des dendrites. Une augmentation de la taille des cellules et la présence de vésicules dans les cellules sont observées pour les MoMs. Après 168h de culture, les changements morphologiques évoqués précédemment sont accentués et montrent des morphologies évoquant des cellules dendritiques pour les MoDCs et des macrophages pour les MoMs. Par cytométrie en flux, des différences de taille et de complexité sont observées entre les monocytes, les MoDCs et les MoMs (**Figure 15**). Les voltages pour ces expériences sont différents des analyses par cytométrie de l'extraction des PBMCs et de l'isolement des monocytes CD14+ (**Annexe 1**). Les monocytes sont de tailles inférieures (entre 50K et 100K FSC-A) et ont une structure moins complexe (environ 50 K SSC-A). En comparaison, les MoDCs sont de tailles supérieures (FSC-A entre 100K et 200K) et ont en moyenne une plus grande complexité dans leur structure (SSC-A entre 50K et 200K). Les MoMs ont des tailles supérieures aux deux populations précédentes (FSC-A entre 150K et 250K), et ils ont également une complexité supérieure (SSC-A entre 100K et 250K).



Figure 16 : Expression de différents marqueurs détectés par cytométrie à la surface des monocytes de chèvre et leurs dérivés (MoMs et MoDCs)

- A- Pourcentage de monocytes exprimant les différents marqueurs après isolement des CD14+ (0h)
- B- Pourcentage de cellules dendritiques dérivées des monocytes (MoDCs) exprimant les différents marqueurs
- C- Pourcentage de macrophages dérivés des monocytes (MoMs) exprimant les différents marqueurs

Pour les monocytes, les marqueurs ont été mesurés pour la population CD14+ (excepté pour CD6)

Des différences morphologiques sont observées entre les populations cellulaires par microscopie et par cytométrie en flux. Ces populations de monocytes, de MoDCs et de MoMs ont été choisies pour la suite de l'étude.

3.3 - Identification des marqueurs cellulaires des monocytes de chèvre et de leurs dérivés (MoMs et MoDCs)

Les monocytes de chèvre isolés (**Figure 16A**) expriment en majorité le marqueur **CD14** (82.7%). Les monocytes n'expriment pas le marqueur CD6 (12% de CD6+ lié à des contaminations de lymphocytes). La population CD14+ a été choisie pour étudier le pourcentage des autres marqueurs (excepté CD6). Les monocytes de chèvre étudiés expriment en grande majorité (90%) les marqueurs **MHC II, CD172a et CD11c.** Ils possèdent les marqueurs de la lignée myéloïde. Les monocytes de chèvre n'expriment pas le marqueur **CD205** mais ils expriment le marqueur **CD209.** Pour finir, en moyenne plus de **90%** des monocytes de chèvre expriment le marqueur **SLAMF9.** Des contrôles isotypiques ont été faits pour l'étude des marqueurs. Des exemples d'analyse par cytométrie (avec les contrôles isotypiques) pour les monocytes sont en annexe (**Annexe 4**).

Les MoDCs de chèvre (**Figure 16B**) expriment en majorité (80%) le marqueur **CD14**. Elles expriment également en grande majorité (90%) **CD172a.** Les MoDCs possèdent un marqueur de la lignée myéloïde. Les résultats pour les marqueurs MHC II et CD11c n'ont pas pu être exploités (nombre de cellules trop faible pour l'analyse et problème de contrôle isotypique dû aux récepteur Fc des MoDCs). La population de MoDCs de chèvre exprime le marqueur **CD205** à 80%, et possède donc un marqueur cellulaire qui n'est pas exprimé chez les monocytes. Les marqueurs CD209 et SLAMF9 n'ont pas pu être étudiés à cause d'un problème avec le contrôle isotypique dû aux récepteurs Fc.

Les MoMs de chèvre (**Figure 16C**) expriment en majorités (85%) le marqueur **CD14**. Ils expriment également en grande majorité (90%) **CD172a.** Les MoMs possèdent un marqueur de la lignée myéloïde. La population de MoMs de chèvre exprime le marqueur **CD205** à **80%**, et possède donc un marqueur cellulaire qui n'est pas exprimé chez les monocytes. Les marqueurs CD11c, MHC II, CD209 et SLAMF9 n'ont pas pu être étudiés pour les mêmes raisons que les MoDCs. Des exemples d'analyses par cytométrie (avec les contrôles isotypiques) pour les MoDCs et MoMs sont en annexes (**Annexe 6**).



Figure 17 : Détection de la protéine N du virus de la peste des petits ruminants (NPPRV) mesurée par cytométrie en flux dans les monocytes de chèvre et leurs dérivés (MoMs et MoDCs) infectés par différentes souches de PPRV

- A- Pourcentage de monocytes possédant la NPPRV à 48 heures post-infection (hpi)
- B- Pourcentage MoDCs possédant la NPPRV à 48 hpi
- C- Pourcentage les MoMs possédant la NPPRV à 48 hpi

Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1 Test de Tukey : ns = P > 0,05 et *, ** ou *** = P < 0,05

3.4 - Infection des monocytes de chèvre et de leurs dérivés (MoMs et MoDCs) par le PPRV

Les différentes souches virales ont été produites et titrées sur cellules Vero. Les titres viraux ont été estimés à **2,81.10^5 TCID50/ml** pour la souche CI89, à **1,58.10^5 TCID50/ml** pour la souche MA08 et à **2,51.10^5 TCID50/ml** pour la souche VA. Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1, à partir de ces concentrations virales.

Pour les monocytes à 48 hpi, la présence de la protéine N du virus de la peste des petits ruminants (NPPRV) a été observée dans les cellules pour la souche vaccinale Nigeria 75/1 (VA) et les souches virulentes Côte d'Ivoire 1989 (CI89) et Maroc 2008 (MA08) (**Figure 17A**). Le pourcentage de cellules positives pour la NPPRV pour la souche VA est de **7,5%**, pour la souche CI89 de **35,5%** et pour la souche MA08 de **12,1%**. Les souches virales utilisées ont toutes la capacité d'infecter les monocytes. Entre 24, 48, 72 et 96 hpi, il n'y a pas de différence majeure dans le pourcentage de cellules NPPRV positives pour chaque souche virale (Test de Tukey, P > 0,05; **Annexe 5**). La souche CI89 infecte d'avantage les monocytes par rapport aux souches VA et MA08 (Test de Tukey, P > 0,05). Il n'y a pas de différence significative entre les souches VA et MA08 (Test de Tukey, P > 0,05).

Pour les MoDCs et les MoMs, des effets de l'infection du virus peuvent être observés à 48 hpi au microscope optique (**Annexe 7**). Des amas de cellules mortes, des granules noirs, de nombreuses vésicules et des trous dans certaines cellules peuvent être observés.

Pour les MoDCs à 48 hpi, la présence de la protéine N du virus de la peste des petits ruminants (NPPRV) a été observée dans les cellules pour les trois souches virales (**Figure 17B**). Le pourcentage de cellules positives pour la NPPRV pour la souche VA est de **3,6%**, pour la souche CI89 de **49,6%** et pour la souche MA08 de **64,4%**. Les souches virales utilisées ont toutes la capacité d'infecter les MoDCs. La souche VA infecte très faiblement les MoDCs, en comparaison des souches MA08 et CI89 (Test de Tukey, P < 0,05). Il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage de cellules positives pour la NPPRV entre la souche CI89 et MA08 pour les MoDCs (Test de Tukey, P > 0,05).

Pour les MoMs à 48 hpi, la présence de la protéine N du virus de la peste des petits ruminants (NPPRV) a été observée dans les cellules pour les trois souches virales (**Figure 17C**). Le pourcentage de cellules positives pour la NPPRV pour la souche VA est de **1,3%**, pour la souche CI89 de **29,5%** et pour la souche MA08 de **24,2%**. Les souches virales utilisées ont toutes la capacité d'infecter les MoMs. La souche VA infecte très faiblement les MoMs, en comparaison des souches MA08 et CI89 (Test de Tukey, P < 0,05). Il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage de cellules positives à la NPPRV entre la souche CI89 et MA08 pour les MoDCs (Test de Tukey, P > 0,05).

Pour la souche MA08, le pourcentage de MoMs positifs à la NPPRV est inférieur de manière significatif (Test de Tukey, P < 0.05) au pourcentage de MoDCs positives à la NPPRV.

Des exemples d'analyses par cytométrie du pourcentage de cellules positives à la NPPRV, pour les monocytes, les MoDCs et les MoMs sont en annexes (**Annexe 8**).



Figure 18 : Etude des différentes sous-populations (CD14 et SLAMF9) de monocytes au cours du temps et de l'infection par les souches de PPRV

- A- Pourcentage de monocytes CD14 et SLAMF9 au cours du temps et selon les différentes souches virales
- **B-** Pourcentage de monocytes NPPRV+ dans les différentes sous-populations et différentes souches virales pour 24 hpi

NPPRV : protéine N du virus de la peste des petits ruminants Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1. Pour les monocytes, une évolution du pourcentage de cellules CD14 et SLAMF9 est observée au cours du temps (Figure 18A). Après l'isolement (0h), les monocytes expriment le marqueur CD14 à 80% et le marqueur SLAMF9 à 90%. A 24h, le pourcentage de cellules exprimant CD14 et SLAMF9 diminuent pour atteindre 40% pour les cellules CD14 positives et 20% pour les cellules SLAMF9 positives, pour les monocytes contrôles. Des résultats similaires sont observés pour les monocytes infectés par la souche VA, la souche CI89 et la souche MA08, le pourcentage de cellules CD14 positives et SLAMF9 positives diminuant fortement. La diminution de l'expression des marqueurs CD14 et SLAMF9 se poursuit à 48h, 72h et 96h pour les monocytes contrôles et ceux infectés par les différentes souches virales. A 96h, la majorité (>90%) des monocytes contrôles et des monocytes infectés par la souche Vaccinale et la souche MA08 n'exprime plus les marqueurs CD14 et SLAMF9. Pour les monocytes infectés par la souche CI89 à 96 hpi, le pourcentage de cellules expriment les marqueurs CD14 et SLAMF9. En moyenne, les populations CD14 expriment à plus de 60% le marqueur SLAMF9, et les populations SLAMF9 expriment à plus de 60% le marqueur SLAMF9, et les populations SLAMF9 expriment à plus de SS% le marqueur CD14 (Data not shown). Les monocytes perdent l'expression des marqueurs CD14 et de SLAMF9 au cours du temps.

Les différentes sous-populations de monocytes infectés par les souches de PPRV ont des taux d'infection différents (**Figure 18B**). A 24 hpi, pour les populations CD14, la souche VA infecte **3.52%** des cellules, la souche CI89 **61,4%** des cellules et la souche MA08 **37,2%** des cellules. Pour les populations SLAMF9, la souche VA infecte **2,2%** des cellules, la souche CI89 **69,5%** des cellules et la souche MA08 **40,4%** des cellules. Pour les populations n'exprimant pas les marqueurs CD14 et SLAMF9, la souche VA infecte **0,7%** des cellules, la souche CI89 **21,1%** et la souche MA08 **8,8%**. A 24 hpi pour les souches CI89 et MA08, les populations exprimant les marqueurs CD14 et SLAMF9 semblent plus infectées que les populations n'exprimant pas ces marqueurs. Le pourcentage cellules infectées est très faible pour la souche VA à 24 hpi. Le pourcentage d'infection à 48, 72 et 96 hpi pour les différentes populations et les différentes souches ne varient pas de façon significative (Teste de Tukey, P > 0,05).

Les analyses par cytométrie du pourcentage de l'évolution des populations de monocytes CD14 et SLAMF9 au cours du temps sont en annexes (**Annexe 9**).



Figure 19 : Titres viraux (TCID50/ml) moyens pour les surnageants des monocytes, MoDCs et MoMs infectés par le virus de la peste des petits ruminants

- A : Titres viraux moyens pour les surnagrants de monocytes (24-48-72-96 hpi)
- **B**: Titres viraux moyens pour les surnageants de MoDCs (48 hpi)
- C: Titre viraux moyens pour les surngeants de MoMs (48 hpi)

TCID50/ml : 50% tissue culture infective dose

Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1.

MoDCs : cellules dendritiques dérivées de monocytes

MoMs : macrophages dérivés de monocytes

VA : souche vaccinale Nigeria 75/1

MA08 : souche Maroc 2008 du virus de la peste des petits ruminants

CI89 : souche Côte d'Ivoire 1989 du virus de la peste des petits ruminants

La moyenne est calculé pour N=2 animaux

L'échelle de l'abscisse est logarithmique

A

3.5 - Etude des surnageants de culture des monocytes et de leurs dérivés (MoDCs et MoMs)

La concentration virale a été mesurée pour les surnageants de culture des monocytes infectés par les différentes souches à 48-72-96 hpi. La concentration virale a également été mesurée pour les surnageants de culture des MoDCs et MoMs infectés par les différentes souches virales à 48 hpi (**Figure 19**). Des ECPs positifs ont été observés pour les monocytes, les MoMs et les MoDCs lors du titrage des surnageants sur cellules Vero (**Annexe 10**). Les titres viraux des surnageants de cultures sont issus d'une moyenne des résultats obtenus sur deux animaux.

Pour les surnageants de monocytes (**Figure 19A**), aucun virus n'a été retrouvé, à 48 et 72 hpi, pour toutes les souches virales. Cependant du virus a été retrouvé dans le surnageant des monocytes avec la souche MA08 et la souche VA pour 96 hpi. Le surnageant a été titré à **3,4 TCID50/ml** pour les monocytes 96 hpi avec la souche MA08 et VA. Les titres viraux des monocytes avec les souches MA08 et VA sont très faibles. Aucun virus n'a été retrouvé pour la souche CI89 à 96 hpi.

Pour les surnageants de MoDCs (**Figure 19B**), du virus a été retrouvé, pour les souches MA08 et CI89. Les surnageants ont été titrés pour la souche MA08 à **1,738.10^3 TCID50/ml** et pour la souche CI89 à **3,16.10^2 TCID50/ml**. Environ 10 fois plus de virus sont retrouvés dans les surnageants de MoDCs avec la souche MA08 en comparaison de la souche CI89. Aucun virus n'a été retrouvé dans le surnageant de MoDCs avec la souche VA.

Pour les surnageants de MoMs (**Figure 19C**), du virus a été retrouvé pour les souches MA08 et CI89. Les surnageants ont été titrés pour la souche MA08 à **4,98.10^3 TCID50/ml** et pour la souche CI89 à **3,4 TCID50/ml**. Environ 100 fois plus de virus sont retrouvés dans les surnageants de MoMs avec la souche MA08 en comparaison de la souche CI89. Aucun virus n'a été retrouvé dans le surnageant de MoMs avec la souche VA.

Pour les MoMs et MoDCs, les particules virales de la souche MA08 sont libérées en plus grande quantité dans les surnageants de culture, en comparaison des souches CI89 et VA.



Figure 20 : Schéma des marqueurs cellulaires pour les monocytes de chèvre et leurs dérivés : macrophages dérivés de monocytes (MoMs) et cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs)

Bleue : marqueurs présents sur les cellules

Rouge : marqueurs absents sur les cellules

Vert : marqueurs dont la présence ou l'absence sur les cellules est à étudier

4) **Discussion et perspectives**

Le but de cette étude est de comprendre et de caractériser l'infection des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (monocytes, MoDCs et MoMs) de chèvre par le virus de la peste des petits ruminants. Différentes souches du virus de la PPR, ayant démontré une virulence différente in vivo sur certaines espèces de chèvre, ont été utilisées (34). Il s'agit de la souche vaccinale Nigeria 75/1, de la souche virulence Côte d'Ivoire 1989 et de la souche de forte virulence Maroc 2008. Ces souches virales ont été utilisées pour infecter des CPA.

Les monocytes, caractérisés par l'expression du marqueur CD14 ont été isolés et différenciés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) de chèvre. Chez l'humain, le pourcentage de monocytes circulants peut atteindre 10% et chez la vache 20% (29,59,60). Les résultats du stage montrent que, en moyenne, 5% des PBMCs de chèvre expriment le marqueur CD14 (Figure 14C). L'augmentation de réplicats biologiques permettraient de confirmer ce résultat. L'isolation par séparation magnétique des cellules CD14+ de chèvre permet d'obtenir 83% de pureté. Les 17% restants sont principalement des cellules exprimant le marqueur CD6 caractéristique des lymphocytes T. Ces cellules contaminantes ont une durée de vie courte lorsqu'elles sont cultivées sans stimulation en culture in vitro. Les contaminants pourraient avoir un impact sur l'infection des monocytes. L'impact sur l'infection des MoDCs et des MoMs, est lui minime, en raison du plus grand temps de culture. Une fois obtenus les monocytes ont été caractérisés par l'expression de différents marqueurs de surface. L'analyse par cytométrie en flux a montré que, les monocytes de chèvre possèdent le profil suivant : MHC II+, CD172a+, CD11c+, CD209+, SLAMF9+ et CD205- (Figure 20). L'expression de certains de ces marqueurs est similaire pour les monocytes humains, bovins et ceux de la souris. Néanmoins, certaines différences sont à noter chez ces différentes espèces. Les monocytes humains expriment le marqueur CD205 et les monocytes de souris en majorité n'expriment pas le marqueur CD11c. Le marqueur CD209 n'est exprimé chez aucun des monocytes humains, bovins ou de souris (42,44,47-55). Ainsi, les monocytes de chèvre expriment les marqueurs classiques de la lignée myéloïde. L'expression du marqueur CD209 semble être spécifique à la chèvre. Ces cellules expriment également le récepteur SLAM (57,58). L'expression du marqueur SLAMF9 est vérifiée chez les monocytes de chèvre. Néanmoins, le SLAMF1 et non le SLAMF9 est documenté comme le récepteur d'entrée des Morbillivirus dans le système immunitaire (61). Bien qu'il y ait une forte homologie entre SLAMF9 et SLAMF1, la présence du SLAMF1 sur les monocytes de chèvre reste encore à confirmer (56). Au cours du temps, l'expression des marqueurs CD14 et SLAMF9 chute (Figure 18A). A 96h, la population CD14+/SLAMF9+ devient insignifiante en comparaison de la population CD14-/SLAMF9-. Les monocytes ont une durée de vie courte, pouvant expliquer la perte rapide du marqueur CD14 (26). Les monocytes laissés en culture sans cytokines se différencient par défaut en macrophages M0 (26). La population CD14-/SLAMF9- pourrait être une population en cours de différenciation. En revanche, les monocytes cultivés en présence de M-CSF (MoMs) ou de GM-CSF et Il-4 (MoDCs) expriment le marqueur CD14. Les cytokines pourraient permettre de maintenir le marqueur CD14 au cours de la différenciation.

Les monocytes de chèvre ont ensuite été différenciés en cellules dendritiques (MoDCs) et en macrophages (MoMs) en utilisant des cytokines recombinantes bovines.

Dans cette étude, la concentration de cytokines utilisées pour la différenciation des monocytes est suffisante pour obtenir des morphologies de MoDCs et de MoMs. Mais ces concentrations sont plus faibles que celles décrites dans la littérature (62,63). L'aspect morphologique des monocytes différenciés a été observé au microscope optique. Aucunes différences ne sont observées lorsque les monocytes sont laissés en culture. Cependant, entre 72h et 168h après l'ajout de cytokines dans le milieu de culture, les cellules semblent plus grandes et revêtir des excroissances (Annexe 3). Un « voile cytoplasmique » caractéristique des macrophages différenciés est également observé lors de la différenciation des monocytes en MoMs (64). Des vésicules sont observées dans les MoMs. Les MoDCs ont des excroissances cellulaires qui peuvent être assimilées à des dendrites. Ces morphologies sont typiques des cellules dendritiques et des macrophages (26). La taille et la granulosité de ces cellules sont différentes, lorsqu'elles sont observées par cytométrie en flux (Figure 15). Les monocytes ont une taille plus petite (FSC) et sont moins complexes (SSC). Les MoMs sont plus grands et possèdent une grande complexité membranaire. Les MoDCs ont une taille intermédiaire et une structure plus complexe. Ces différences de complexité membranaire (SSC) entre populations peuvent s'expliquer par la morphologie des MoDCs (dendrites) et des MoMs (voile cytoplasmique, vésicule, excroissance membranaire). Les analyses par cytométrie en flux montrent que les MoDCs de chèvre obtenues possèdent des caractéristiques communes aux MoDCs du mouton (65). L'analyse des récepteurs membranaires exprimés à la surface des MoMs et MoDCs, nous a permis d'établir un profil d'expression de marqueurs cellulaires (Figure 20). En effet, les MoMs et les MoDCs de chèvre sont : CD14+, CD172a+ et CD205+. Les DCs et macrophages humains, bovins et de souris sont CD172a+, MHC II+, CD11c+, CD205+, CD209+ et SLAMF9+ (4,42,45,47-50,57,58). Les macrophages humains, bovins et de souris expriment le marqueur CD14. Les DCs humains et souris n'expriment pas le marqueur CD14, néanmoins les DCs de bovins expriment le marqueur CD14 comme les MoDCs de chèvre. Une étude de Charles K. Nfon sur des MoDCs et des MoMs de chèvre, a pu caractériser les MoDCs comme étant CD14 négatifs, et faiblement CD11c et CD172a. Les MoMs ont été caractérisés comme étant CD14 positifs, et fortement CD11c et CD172a (66). Cette différence d'expression des marqueurs avec les MoDCs et MoMs étudiés pourrait s'expliquer par la différence de concentration des cytokines utilisées pour l'étude de Charles K. Nfon. Cette étude utilise des concentrations beaucoup plus élevées de cytokines pour la différenciation. L'expression des marqueurs des MoDCs et des MoMs sera testée pour des concentrations de cytokines plus élevées lors de la différenciation de ces cellules. Les MoDCs et MoMs de chèvre ont un profil de marqueurs cellulaires différent des monocytes de chèvre, et peuvent être différenciés des monocytes par le marqueur CD205. Cependant d'avantage de réplicats biologiques et techniques sont nécessaires pour confirmer l'expression de CD205. L'expression des marqueurs cellulaires MHC II, CD11c, CD209 et SLAMF9 restent encore à confirmer pour les MoDCs et les MoMs. Concernant le récepteur du PPRV, SLAM, sa présence est documentée pour les DCs et les macrophages (4,57,58). Les MoDCs et les MoMs de chèvre testés étant infectés par les différentes souches de PPRV, la présence de récepteur SLAM est fortement probable (Figure 17). Notre étude n'a pas pu identifier de marqueurs cellulaires pour différencier les MoDCs des MoMs.

Plusieurs éléments indiquent une différenciation des monocytes en MoDCs et en MoMs. Les cellules sont cultivées dans des milieux de culture avec des cytokines entrainant la différenciation des monocytes.

Tableau 1 : Profils d'infection des monocytes, des MoDCs et des MoMs, par les différentes souches de PPRV

PPRV : virus de la peste des petits ruminants

MA08 : souche fortement virulente Maroc 2008

CI89 : souche faiblement virulente Côte d'Ivoire 1989

VA : souche vaccinale Nigeria 75/1

TCID50/ml : titres viraux des surnageants de culture

Infection par le PPRV	VA	CI89	MA08
MOI : 0,1 48 hpi			
	Infection :	Infection :	Infection :
	0 - 15%	29 - 42%	5 - 19%
	<u>Réplication :</u>	Réplication :	Réplication :
	Ø	Ø	Ø
Monocytes			
	Infection :	Infection :	Infection :
L	0 - 8%	30 - 70%	43 - 86%
202	Réplication :	Réplication :	Réplication :
	Ø	3,2.10^2	1,7.10^3
~~~		TCID50/ml	TCID50/ml
MoDCs			
	Infection :	Infection :	Infection :
	0 - 4%	21 - 38%	12 - 37%
La contra			
5 6 7	Réplication :	Réplication :	Réplication :
300	Ø	3,4	5.10^2
2		TCID50/ml	TCID50/ml
MoMs			

Des différences morphologiques sont observées au microscope et au cytomètre. Le marqueur CD205 est exprimé uniquement sur les MoDCs et MoMs. Et finalement, les monocytes en culture perdent l'expression du CD14, contrairement aux MoDCs et MoMs. Pour les MoDCs et les MoMs, seules les différences morphologiques permettent de les différencier. Ces populations ont servi de modèle pour l'infection des CPA avec le PPRV.

Après la caractérisation des modèles cellulaires (monocytes, MoDCs et MoMs), les cellules ont été infectées par les différentes souches virales avec une MOI de 0,1. Le pourcentage de cellules infectées a été mesuré avec la présence de la nucléoprotéine N du PPRV (NPPRV). Les surnageants de culture des cellules infectées ont également été récupérés pour calculer la quantité de virus libérer par les cellules infectées. L'infection des monocytes de chèvre par le PPRV n'a pas été observée lors d'une étude expérimentale in vivo (20). Cependant in vitro, les monocytes de chèvre peuvent être infectés par les différentes souches du PPRV (**Figure 17A**). A 48 hpi, la souche peu virulente CI89 infecte d'avantage les monocytes (35,5% d'infection), en comparaison de la souche vaccinale VA (7,5% d'infection) et de la souche fortement virulente MA08 (12,1% d'infection). Cependant, le pourcentage d'infection des monocytes pour les différentes souches de PPRV ne varie pas de manière significative dans le temps (**Annexe 5**). Le virus ne semble pas pouvoir se répliquer dans les monocytes ou être libéré par les monocytes. Ceci pourrait expliquer que le virus n'est pas retrouvé in vivo dans les monocytes lors de l'infection du PPRV. Cependant le pourcentage d'infection peut être également dû aux contaminants (lymphocytes) présents au temps zéro de l'isolement des monocytes. On ne peut pas écarter la possibilité que les monocytes aient phagocyté les contaminants lysés après la réplication du virus.

Chez les lymphocytes, SLAM est régulé à la baisse après l'infection par le PPRV (20). Dans notre étude, les monocytes du groupe contrôle perdent également l'expression de SLAMF9, donc l'infection par le PPRV ne peut être mise en cause. L'infection par le PPRV est plus élevée pour la population CD14+/SLAMF9+ des monocytes, ce qui suggère que cette population est plus permissive aux PPRV. La souche CI89 a le taux d'infection le plus fort et les monocytes infectés par CI89 ont d'avantage de monocytes CD14 et SLAMF9 positifs. Le plus grand nombre de monocytes avec le marqueur SLAMF9 pourrait expliquer le plus grand taux d'infection de la souche CI89. L'infection par la souche CI89 pourrait également stimuler l'expression de ces marqueurs. Les monocytes ne libèrent pas de virus dans le surnageant après l'infection par les différentes souches (**Figure 19**). Du virus a uniquement été retrouvé à 96 hpi pour les monocytes infectés par la souche VA et MA08. Néanmoins, la concentration de virus libérée est extrêmement faible (3,4 TCID50/ml) et donc n'est peut-être pas due à une libération active du virus. Ces résultats suggèrent que les monocytes ne sont pas impliqués activement lors de l'infection du PPRV.

Pour les MoDCs et les MoMs à 48 hpi, la souche vaccinale infecte très faiblement les cellules (**Figure 17B/C**). Une étude sur des DCs de souris, suggère que la souche vaccinale Nigeria 75/1 ne se réplique pas dans les DCs (67). Le taux d'infection entre les souches CI89 et MA08 est équivalent au sein des MoDCs et des MoMs. Cependant, la souche MA08 infecte d'avantage les MoDCs en comparaison aux MoMs. La souche CI89 semble également infectée d'avantage les MoDCs, mais la différence n'est pas significative (Teste de Tukey, P > 0.05).



Figure 21 : Hypothèse sur le mécanisme d'infection des macrophages par les différentes souches de PPRV dans le système respiratoire

- PPRV : virus de la peste des petits ruminants MA08 : souche fortement virulente Maroc 2008 CI89 : souche faiblement virulente Côte d'Ivoire 1989
- VA : souche vaccinale Nigeria 75/1

Les MoDCs semblent être un hôte privilégié pour le virus, les DCs étant un parfait cheval de Troie pour la dissémination du PPRV dans l'organisme, notamment pour atteindre les ganglions lymphatiques. L'infection par des *Morbillivirus* des macrophages et des DCs est documentée (4,68). Des macrophages alvéolaires infectés par le PPR ont été retrouvés dans des chèvres infectées par le PPRV lors d'une épidémie au Bangladesh (69).Contrairement aux monocytes, du virus est retrouvé de façon conséquente dans les surnageants de MoMs et de MoDCs (**Figure 19**). Les MoDCs libèrent plus de virus que les MoMs. Ceci renforce l'idée que les DCs sont des hôtes privilégiés pour le PPRV. Les MoDCs infectées par la souche MA08 libèrent 10 fois plus de virus que les MoDCs infectées par la souche CI89. Les MoMs infectés par la souche CI89 et MA08 pourrait expliquer la forte virulence de la souche MA08. La souche VA n'est pas libérée par les MoDCs et les MoMs, ce qui correspond bien au faible taux d'infection observé.

Cette étude a pu montrer différents profils d'infection pour les monocytes, les MoDCs et les MoMs, infectés par des souches de PPRV de différentes virulences (Tableau 1). Les monocytes ne semblent pas être impliqués de manière significative dans l'infection du PPRV, le PPRV n'étant pas libéré par les monocytes infectés. En revanche, les MoDCs sont des hôtes très favorables à l'infection du PPRV, avec de fort taux d'infection. Les MoMs sont également des hôtes du PPRV bien que moins favorables que les MoDCs. Les MoDCs ont sûrement un rôle primordial dans l'infection et la dissémination du PPRV. En ce qui concerne les souches du PPRV, la souche vaccinale est atténuée et a perdu en grande partie sa capacité à interagir avec le SLAM, et donc infecte très faiblement les MoDCs et les MoMs. La souche peu virulente CI89 infecte les MoDCs et les MoMs, mais semble être libérée uniquement par les MoDCs, et ceci en quantité moins importante que la souche MA08, malgré des taux d'infections similaires. Ceci pourrait être associé à une faible capacité de réplication dans les cellules, comme suggéré par des travaux de R. Eloiflin sur les lymphocytes. Enfin, la souche MA08 infecte les MoDCs et les MoMs, et est libérée en grand quantité par ces cellules. La souche MA08 semble également être la seule à pouvoir se répliquer efficacement dans les MoMs. La forte virulence de la souche MA08 peut être expliquée par cette grande capacité à infecter et à se répliquer dans les CPAs infectées, dont les macrophages, qui sont en première ligne en cas d'infection. Une forte réplication précoce dans les CPAs permettrait à la souche MA08 d'assurer une infection plus importante en amont, avant la migration des CPAs vers les ganglions lymphatiques (Figure 21). Une plus grande infection des CPAs, entrainerait alors également une plus forte réplication dans les ganglions lymphatiques.

Pour compléter cette étude, des analyses transcriptomiques et protéomiques des différentes populations cellulaires, infectées par les différentes souches de PPRV seraient intéressantes, notamment une analyse de l'expression des gènes de la réponse antivirale, comme la réponse interféron. La plus forte réplication de la souche MA08 pourrait être due à une capacité plus importante pour l'inhibition ou le contournement de la réponse immunitaire. Une plus faible capacité de la souche CI89 à inhiber la réponse immunitaire pourrait expliquer que la souche ne se réplique pas dans les macrophages. Ces analyses pourraient permettre de savoir si les différences de réplication entre les souches sont dues à des différences de capacités intrinsèques de réplication ou à des différences dans la capacité à bloquer la réponse antivirale de la cellule.

#### **Annexes :**



<u>Annexe 1 : Images de la cytométrie en flux des PBMCs extraits et des fractions issues de l'isolement des CD14+</u>

A- Elimination des doublets et des débris B- Isolement des cellules CD14+
 La fraction négative (CD14-) représente la fraction obtenue après les lavages de la colonne contenant les billes magnétiques CD14+.

La fraction positive (CD14+) représente la fraction obtenue après élution de cette colonne. Le marquage CD14 permet de montrer la population de monocytes (CD14+).



Annexe 2 : Courbes standards des ELISA pour les cytokines IL-4 et GM-CSF



MoDCs 168h

MoMs 168h

Annexe 3 : Photos par microscopie optique des Monocytes et de la différenciation en Cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs) et en Macrophages dérivés de monocytes (MoMs)



Annexe 4 : Images de la cytométrie en flux des Monocytes pour différents marqueurs





Annexe 5 : Pourcentage de protéine N du virus de la peste des petits ruminants (NPPRV) mesuré par cytométrie en flux dans les monocytes de chèvre infectés par le PPRV

Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1. Les monocytes sont mesurés à différents temps post-infection : 24-48-72-96 hpi. Test de Tukey : ns = P > 0,05



Annexe 6 : Images de la cytométrie en flux des MoDCs et MoMs pour différents marqueurs

MoDCs : cellules dendritiques dérivées de monocytes MoMs : macrophages dérivés de monocytes



MoDCs non-infectées



MoDCs infectées par le PPRV (MA08)



MoMs non-infectés



MoMs infectés par le PPRV (MA08)

Annexe 7 : Photos par microscopie optique des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs) et des macrophages dérivés de monocytes (MoMs) infectés ou non-infectés par le virus de la peste des petits ruminants

Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1. Les photos ont été prises pour 48 heures post-infection.



## <u>Annexe 8 : Images type du marquage de la protéine N du virus de la PPR obtenues par cytométrie</u> <u>en flux</u>)

Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1. MoDCs : cellules dendritiques dérivées de monocytes MoMs : macrophages dérivés de monocytes VA : souche vaccinale Nigeria 75/1 MA08 : souche Maroc 2008 du virus de la peste des petits ruminants CI89 : souche Côte d'Ivoire 1989 du virus de la peste des petits ruminants



Annexe 9 : Images de la cytométrie en flux des populations CD14 et SLAMF9 des monocytes au cours du temps



ECP négatif



ECP positif : surnageant MoDCs + CI89



ECP positif : surnageant MoDCs + MA08



ECP positif : surnageant MoMs + MA08



ECP positif : surnageant Monocytes 96hpi + MA08

## <u>Annexe 10 : Photos par microscopie optiques ou à fluorescence du titrage sur cellules Vero des</u> <u>surnageants de monocytes, MoDCs et MoMs infectés</u>

Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,1. ECP : effets cytopathiques Hpi : heure post-infection MoDCs : cellules dendritiques dérivées de monocytes MoMs : macrophages dérivés de monocytes MA08 : souche Maroc 2008 du virus de la peste des petits ruminants CI89 : souche Côte d'Ivoire 1989 du virus de la peste des petits ruminants

## **Références bibliographiques :**

- 1. Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, Muthuchelvan D, Buczkowski H, Banyard AC. Peste des petits ruminants. Vet Microbiol. 14 déc 2015;181(1):90-106.
- Rahman A-U-, Dhama K, Ali Q, Hussain I, Oneeb M, Chaudhary U, et al. Peste des petits ruminants in large ruminants, camels and unusual hosts. Vet Q. 1 janv 2020;40(1):35-42.
- Kamel M, El-Sayed A. Toward peste des petits virus (PPRV) eradication: Diagnostic approaches, novel vaccines, and control strategies. Virus Res. déc 2019;274:197774.
- 4. Kumar N, Maherchandani S, Kashyap SK, Singh SV, Sharma S, Chaubey KK, et al. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review. Viruses. 6 juin 2014;6(6):2287-327.
- Banyard AC, Parida S, Batten C, Oura C, Kwiatek O, Libeau G 2010. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. J Gen Virol. 91(12):2885-97.
- Dundon WG, Diallo A, Cattoli G. Peste des petits ruminants in Africa: a review of currently available molecular epidemiological data, 2020. Arch Virol. 1 oct 2020;165(10):2147-63.
- Baron MD, Diallo A, Lancelot R, Libeau G. Chapter One Peste des Petits Ruminants Virus. In: Kielian M, Maramorosch K, Mettenleiter TC, éditeurs. Advances in Virus Research [Internet]. Academic Press; 2016 [cité 24 janv 2021]. p. 1-42. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006535271630001X
- Baron MD, Diop B, Njeumi F, Willett BJ, Bailey D. Future research to underpin successful peste des petits ruminants virus (PPRV) eradication. J Gen Virol. nov 2017;98(11):2635-44.
- Kinimi E, Odongo S, Muyldermans S, Kock R, Misinzo G. Paradigm shift in the diagnosis of peste des petits ruminants: scoping review. Acta Vet Scand [Internet]. 29 janv 2020 [cité 30 mai 2021];62. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6988203/
- Jones BA, Rich KM, Mariner JC, Anderson J, Jeggo M, Thevasagayam S, et al. The Economic Impact of Eradicating Peste des Petits Ruminants: A Benefit-Cost Analysis. PLoS ONE [Internet]. 22 févr 2016 [cité 30 mai 2021];11(2). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764769/
- 11. Melia MM, Earle JP, Abdullah H, Reaney K, Tangy F, Cosby SL. Use of SLAM and PVRL4 and identification of pro-HB-EGF as cell entry receptors for wild type phocine distemper virus. PloS One. 2014;9(8):e106281.
- 12. Linjie L, Xiaoling S, Xiaoxia M, Xin C, Ali A, Jialin B. Peste des petits ruminants virus non-structural C protein inhibits the induction of interferonβ by potentially interacting with MAVS and RIG-I. Virus Genes. 2021;57(1):60-71.
- 13. Sanz Bernardo B, Goodbourn S, Baron MD. Control of the induction of type I interferon by Peste des petits ruminants virus. PloS One. 2017;12(5):e0177300.
- 14. Birch J, Juleff N, Heaton MP, Kalbfleisch T, Kijas J, Bailey D. Characterization of Ovine Nectin-4, a Novel Peste des Petits Ruminants Virus Receptor. J Virol. avr 2013;87(8):4756-61.
- 15. Turvey SE, Broide DH. Chapter 2: Innate Immunity. J Allergy Clin Immunol. févr 2010;125(2 Suppl 2):S24-32.
- 16. Takeuchi O, Akira S. Innate Immunity to Virus Infection. Immunol Rev. janv 2009;227(1):75-86.
- 17. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferons. Clin Microbiol Rev. oct 2001;14(4):778-809.
- Sharma Y, Sarkar R, Jain A, Singh S, Shekhar C, Shanmugam C, et al. Modeling PPRV pathogenesis in mice to assess the contribution of innate cells and anti-viral T cells [Internet]. Immunology; 2020 oct [cité 24 janv 2021]. Disponible sur: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.10.27.358309
- 19. Wani S, Praharaj M, Sahu A, Khan R, K R, Dhanavelu M, et al. Systems Biology behind immunoprotection of both Sheep and Goats after Sungri/96 PPRV vaccination. 2020.
- Wani SA, Sahu AR, Khan RIN, Pandey A, Saxena S, Hosamani N, et al. Contrasting Gene Expression Profiles of Monocytes and Lymphocytes From Peste-Des-Petits-Ruminants Virus Infected Goats. Front Immunol [Internet]. 2019 [cité 24 janv 2021];10. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01463/full

- 21. Manjunath S, Mishra BP, Mishra B, Sahoo AP, Tiwari AK, Rajak KK, et al. Comparative and temporal transcriptome analysis of peste des petits ruminants virus infected goat peripheral blood mononuclear cells. Virus Res. 2 févr 2017;229:28-40.
- 22. Manjunath S, Saxena S, Mishra B, Santra L, Sahu AR, Wani SA, et al. Early transcriptome profile of goat peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) infected with peste des petits ruminant's vaccine virus (Sungri/96) revealed induction of antiviral response in an interferon independent manner. Res Vet Sci. 1 juin 2019;124:166-77.
- Li P, Zhu Z, Zhang X, Dang W, Li L, Du X, et al. The Nucleoprotein and Phosphoprotein of Peste des Petits Ruminants Virus Inhibit Interferons Signaling by Blocking the JAK-STAT Pathway. Viruses. juill 2019;11(7):629.
- 24. Mondal B, Sreenivasa BP, Dhar P, Singh RP, Bandyopadhyay SK. Apoptosis induced by peste des petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells. Virus Res. mars 2001;73(2):113-9.
- 25. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. Immunity. 16 oct 2018;49(4):595-613.
- Coillard A, Segura E. In vivo Differentiation of Human Monocytes. Front Immunol [Internet]. 13 août 2019 [cité 31 mai 2021];10. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6700358/
- 27. Nikitina E, Larionova I, Choinzonov E, Kzhyshkowska J. Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. Int J Mol Sci [Internet]. 18 sept 2018 [cité 31 mai 2021];19(9). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6163364/
- 28. Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. Immunology. avr 2015;144(4):541-8.
- 29. Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. Cytometry A. 2010;77A(5):410-9.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. Science. 5 févr 2010;327(5966):656-61.
- 31. Ferris ST, Durai V, Wu R, Theisen DJ, Ward JP, Bern MD, et al. cDC1 prime and are licensed by CD4 T cells to induce anti-tumour immunity. Nature. août 2020;584(7822):624-9.
- 32. Otsuka M, Egawa G, Kabashima K. Uncovering the Mysteries of Langerhans Cells, Inflammatory Dendritic Epidermal Cells, and Monocyte-Derived Langerhans Cell-Like Cells in the Epidermis. Front Immunol [Internet]. 30 juill 2018 [cité 31 mai 2021];9. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6077183/
- 33. Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. déc 2010;4(6):723-31.
- 34. Enchery F, Hamers C, Kwiatek O, Gaillardet D, Montange C, Brunel H, et al. Development of a PPRV challenge model in goats and its use to assess the efficacy of a PPR vaccine. Vaccine. 14 mars 2019;37(12):1667-73.
- 35. Eloiflin R, Boyer M, Kwiatek O, Guendouz S, Loire E, Servan de Almeida R, et al. Evolution of Attenuation and Risk of Reversal in Peste des Petits Ruminants Vaccine Strain Nigeria 75/1. Viruses. août 2019;11(8):724.
- 36. Hodgson S, Moffat K, Hill H, Flannery JT, Graham SP, Baron MD, et al. Comparison of the Immunogenicities and Cross-Lineage Efficacies of Live Attenuated Peste des Petits Ruminants Virus Vaccines PPRV/Nigeria/75/1 and PPRV/Sungri/96. J Virol [Internet]. 15 déc 2018 [cité 12 mars 2021];92(24). Disponible sur: https://jvi.asm.org/content/92/24/e01471-18
- 37. Muniraju M, Harrak ME, Bao J, Parthiban ABR, Banyard AC, Batten C, et al. Complete Genome Sequence of a Peste des Petits Ruminants Virus Recovered from an Alpine Goat during an Outbreak in Morocco in 2008. Genome Announc [Internet]. 27 juin 2013 [cité 12 mars 2021];1(3). Disponible sur: https://mra.asm.org/content/1/3/e00096-13
- Chard LS, Bailey DS, Dash P, Banyard AC, Barrett T. Full genome sequences of two virulent strains of peste-des-petits ruminants virus, the Côte d'Ivoire 1989 and Nigeria 1976 strains. Virus Res. 1 sept 2008;136(1):192-7.
- 39. Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantitation. Virol Methods Man. 1996;25-46.
- 40. Kaur I, Zulovich JM, Gonzalez M, McGee KM, Ponweera N, Thandi D, et al. Comparison of two methodologies for the enrichment of mononuclear cells from thawed cord blood products: The automated Sepax system versus the manual Ficoll method. Cytotherapy. 1 mars 2017;19(3):433-9.
- Tesfaigzi Y, Daheshia M. CD14. In: Laurent GJ, Shapiro SD, éditeurs. Encyclopedia of Respiratory Medicine [Internet]. Oxford: Academic Press; 2006 [cité 9 mars 2021]. p. 343-7. Disponible sur: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123708796000636

- 42. Park KT, ElNaggar MM, Abdellrazeq GS, Bannantine JP, Mack V, Fry LM, et al. Phenotype and Function of CD209+ Bovine Blood Dendritic Cells, Monocyte-Derived-Dendritic Cells and Monocyte-Derived Macrophages. PLoS ONE [Internet]. 20 oct 2016 [cité 10 mars 2021];11(10). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5072659/
- 43. Jordan M, Wurm F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. Methods. 1 juin 2004;33(2):136-43.
- 44. Chometon TQ, Siqueira M da S, Sant´anna JC, Almeida MR, Gandini M, Martins de Almeida Nogueira AC, et al. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. PLoS ONE [Internet]. 9 avr 2020 [cité 10 mars 2021];15(4). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7145147/
- 45. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. Immunology. sept 2013;140(1):22-30.
- 46. Mahnke K, Becher E, Ricciardi-Castagnoli P, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. CD14 is Expressed by Subsets of Murine Dendritic Cells and Upregulated by Lipopolysaccharide. In: Ricciardi-Castagnoli P, éditeur. Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology: Volume 3 [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1997 [cité 11 mars 2021]. p. 145-59. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9966-8_25
- 47. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Trends Immunol. nov 2016;37(11):724-37.
- 48. Takahashi S. Molecular functions of SIRPα and its role in cancer. Biomed Rep. juill 2018;9(1):3-7.
- 49. Wu H, Gower RM, Wang H, Perrard X-YD, Ma R, Bullard DC, et al. Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. Circulation. 26 mai 2009;119(20):2708-17.
- Sándor N, Lukácsi S, Ungai-Salánki R, Orgován N, Szabó B, Horváth R, et al. CD11c/CD18 Dominates Adhesion of Human Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells over CD11b/CD18. PLoS ONE [Internet]. 22 sept 2016 [cité 10 mars 2021];11(9). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033469/
- Ovsyannikova IG, Haralambieva IH, Vierkant RA, O'Byrne MM, Jacobson RM, Poland GA. The Association of CD46, SLAM and CD209 Cellular Receptor Gene SNPs with Variations in Measles Vaccine-Induced Immune Responses: A Replication Study and Examination of Novel Polymorphisms. Hum Hered. nov 2011;72(3):206-23.
- 52. Rahimi N. C-type Lectin CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN: Cell Adhesion Molecules Turned to Pathogen Recognition Receptors. Biology [Internet]. 22 déc 2020 [cité 10 mars 2021];10(1). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7822156/
- 53. Butler M, Morel A-S, Jordan WJ, Eren E, Hue S, Shrimpton RE, et al. Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205–DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation. Immunology. 2007;120(3):362-71.
- 54. Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, et al. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. Int Immunol. 1 juin 2006;18(6):857-69.
- 55. Shrimpton RE, Butler M, Morel A-S, Eren E, Hue SS, Ritter MA. CD205 (DEC-205): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self. Mol Immunol. 1 mars 2009;46(6):1229-39.
- 56. Dragovich M, Mor A. The SLAM family receptors: potential therapeutic targets for inflammatory and autoimmune diseases. Autoimmun Rev. juill 2018;17(7):674-82.
- 57. Prajapati M, Alfred N, Dou Y, Yin X, Prajapati R, Li Y, et al. Host Cellular Receptors for the Peste des Petits Ruminant Virus. Viruses. 8 août 2019;11(8).
- Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. J Gen Virol. 1 déc 2001;82(12):2913-7.
- 59. Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPTTM) and standard density gradient. BMC Immunol [Internet]. 26 août 2015 [cité 9 mars 2021];16. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549105/
- 60. Ceciliani F, Ávila Morales G, De Matteis G, Grandoni F, Furioso Ferreira R, Roccabianca P, et al. Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages. Methods. 1 févr 2021;186:22-41.
- Abdullah N, Kelly JT, Graham SC, Birch J, Gonçalves-Carneiro D, Mitchell T, et al. Structure-Guided Identification of a Nonhuman Morbillivirus with Zoonotic Potential. J Virol [Internet]. 12 nov 2018 [cité 9 juin 2021];92(23). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6232486/

- 62. Jin X, Kruth HS. Culture of Macrophage Colony-stimulating Factor Differentiated Human Monocyte-derived Macrophages. J Vis Exp JoVE [Internet]. 30 juin 2016 [cité 3 juin 2021];(112). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993314/
- 63. Li L, Wu J, Liu D, Du G, Liu Y, Shang Y, et al. Transcriptional Profiles of Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells in Response to Peste des Petits Ruminants Virus. Vet Sci. 29 nov 2019;6(4).
- Braukmann M, Methner U, Berndt A. Immune Reaction and Survivability of Salmonella Typhimurium and Salmonella Infantis after Infection of Primary Avian Macrophages. PLoS ONE [Internet]. 26 mars 2015 [cité 7 juin 2021];10(3). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4374797/
- 65. Rojas JM, Pascual E, Wattegedera SR, Avia M, Santiago C, Martín V, et al. Hemagglutinin protein of Peste des Petits Ruminants virus (PPRV) activates the innate immune response via Toll-like receptor 2 signaling. Virulence. 1 janv 2021;12(1):690-703.
- 66. Nfon CK, Marszal P, Zhang S, Weingartl HM. Innate Immune Response to Rift Valley Fever Virus in Goats. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 24 avr 2012 [cité 9 juin 2021];6(4). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335883/
- 67. Li L, Wu J, Cao X, Zhou J, Yin S, Yang S, et al. Proteomic analysis of murine bone marrow derived dendritic cells in response to peste des petits ruminants virus. Res Vet Sci. 1 août 2019;125:195-204.
- 68. de Vries RD, Mesman AW, Geijtenbeek TB, Duprex WP, de Swart RL. The pathogenesis of measles. Curr Opin Virol. 1 juin 2012;2(3):248-55.
- 69. Chowdhury EH, Bhuiyan AR, Rahman MM, Siddique MSA, Islam MR. Natural peste des petits ruminants virus infection in Black Bengal goats: virological, pathological and immunohistochemical investigation. BMC Vet Res [Internet]. 14 nov 2014 [cité 3 juin 2021];10. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4233235/
- 70. OIE, & FAO. (2015) Global control and eradication of PRR. [Internet]. [cité 8 juin 2021]. Disponible sur: http://www.fao.org/3/i4477e/i4477e.pdf

## Mots clés :

peste des petits ruminants, monocytes, cellules dendritiques, macrophages, phénotype, virulence

## Résumé :

Le virus de la peste des petits ruminants (PPRV) est un Morbillivirus infectant les cellules immunitaires et causant de forte mortalité chez les petits ruminants. Pour mieux comprendre la virulence du PPRV, des monocytes, des cellules dendritiques (DC) et des macrophages de chèvre ont été infectés par une souche vaccinale, une souche faiblement virulente (Côte d'Ivoire 1989) et une souche fortement virulente (Maroc 2008). Les DCs et les macrophages ont été différenciés à partir des monocytes, et leurs différences phénotypiques ont pu être confirmées. L'infection des cellules a montré que le virus se réplique dans les macrophages et fortement dans les DCs, suggérant un rôle clé dans la virulence. Les monocytes peuvent être également infectés mais ils n'entrainent pas de réplication du virus. Pour finir, une plus grande capacité de réplication dans les DCs et particulièrement dans les macrophages est observée pour la souche Maroc, pouvant expliquer sa forte virulence.

## Abstract :

The "peste des petits ruminants" virus (PPRV) is a Morbillivirus that infects immune cells and causes high mortality in small ruminants. To better understand the virulence of PPRV, goat monocytes, dendritic cells (DC) and macrophages were infected with a vaccine strain, a virulent strain (Côte d'Ivoire 1989), and a highly virulent strain (Morocco 2008). DCs and macrophages were differentiated from monocytes, their phenotypic differences were confirmed. Cell infection has shown that the virus replicates in macrophages and strongly in DCs, suggesting a key role in virulence. Monocytes may also be infected but the virus does not replicate. Finally, greater replication capacity in the DCs and especially in macrophages is observed for the Morocco strain, which may explain its high virulence.